

Юсупова И.Р., Казмирова А.А.

Сравнительная оценка экспрессии маркера D2-40 эндотелием лимфатических сосудов при атипичной мелкоацинарной пролиферации и аденокарциноме предстательной железы

ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, кафедра патологической анатомии

Ключевые слова: лимфоангиогенез, аденокарцинома предстательной железы

Введение

Рак предстательной железы занимает одну из лидирующих позиций в структуре онкологических заболеваний среди мужчин. Своевременное выявление предраковых процессов к одним из которых относится атипичная мелкоацинарная пролиферация предстательной железы (АМАП), дает возможность осуществлять контроль за течением данной патологии. Исследования экспериментальных моделей рака и некоторых типов раковых образований человека показали, что опухоли могут активно индуцировать формирование лимфатических сосудов [1]. По данным Бородина Ю.М. с соавт. [2], лимфатические капилляры, а более конкретно их отростки — это звенья русла, которое максимально пластично и обладает потенцией к перестройке. Однако усиленный рост лимфатических капилляров является не только элементом прогрессирования опухолевой ткани, но и может возникнуть в случае повреждений, вызванных застоем лимфы в связи с хронической недостаточностью кровообращения [3], реакции воспаления, ранении и т. д. [4]. Чтобы оценить плотность лимфатических сосудов применяется маркер к эндотелиоцитам D2-40. Насколько практично применение данного маркера для дифференциальной диагностики АМАП и аденокарциномы еще не описано в доступных литературных источниках, но возможно это прояснит спорные вопросы о том, что АМАП — это предиктор рака, либо это неполноценно взятый материал при биопсии.

Цель: дать сравнительную морфологическую оценку экспрессии маркера D2-40 лимфатических сосудов при атипичной мелкоацинарной пролиферацией и аденокарциномы предстательной железы.

Материал и методы

В исследование были включены 15 пациентов с атипичной мелкоацинарной пролиферацией предстательной железы — первая группа и 15 пациентов с аденокарциномой предстательной железы — вторая группа. Все исследуемые являлись пациентами отделения лучевой диагностики Челябинского областного клинического онкологического диспансера (ЧОКОД) за 2012-2013 гг. Возраст мужчин составил от 60 до 82 лет. Материал получен при тонкоигольной трепан биопсии предстательной железы. Все пациенты при поступлении в стационар имели предварительный диагноз «рак предстательной железы» и доброкачественная гиперплазия предстательной железы.

В работе использованы — гистологический и иммуногистохимический методы исследования. Морфологические исследования выполнены на кафедре патологической анатомии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (зав. кафедрой — доктор мед. наук, профессор Е. Л. Казачков).

Фрагменты тканей предстательной железы фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина на 24 часа. Далее материал обезжировали, обезжирили и заливали в парафин в гистологическом автомате по общепринятой методике. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для иммуногистохимического исследования тканевые образцы фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина в течение 18-24 часов, заливали в парафин по общепринятым методикам. Затем готовили гистологические срезы толщиной 4-5 мкм. Срезы помещали на покрытые силаном предметные стекла («ДАКО», Дания), тщательно высушивали, депарафинировали, обезжировали и отмывали в растворе трис-буфера при pH 7,2-7,4. Вариант обработки депарафинированных срезов выбирали в зависимости от вида МКАТ/ПКАТ с учетом инструкций фирмы-производителя. С целью восстановления структуры антигенных детерминант на поверхности клеток, изменившихся в процессе фиксации ткани, гистологические срезы подвергали термической обработке в СВЧ печи при 95⁰ в течение 30 минут в цитратном буферном растворе при pH 6,0. После отмывки в буфере наносили пероксидазный блок в течение 5 минут, вновь промывали в буфере, наносили на препарат МКАТ/ПКАТ в рабочих разведениях и продолжали инкубацию в течение 60 минут при t = 37⁰С. Для визуализации антигенреактивных клеток использовали тест-систему («SPRING bioscience»). После окончания инкубации с первичными антителами препараты тщательно отмывали, обрабатывали сначала вторичными биотинилированными, затем третичными стрептавидиновыми антителами. По окончании 30 минутной инкубации при температуре 37⁰ и тщательной отмывки антигенреактивные клетки визуализировали с помощью 3,3-диаминобензидаина тетрахлорида в буферном растворе. Препараты докрашивали водным раствором гематоксилина в течение 30 секунд, а с целью получения подсинивающего эффекта обрабатывали в растворе 37мМ аммония. После редегидратации в спиртах препараты осветляли в 2 объемах ксилола и заключали в канадский бальзам. При просмотре препаратов на светооптическом уровне антиген-позитивные клетки идентифицировали по их коричневому окрашиванию. Использовали моноклональные антитела к D2-40 («SPRING bioscience»).

Полученные препараты предстательной железы изучали на световом микроскопе Axioscop 40 («Carl Zeiss Jena», Германия), с учетом рекомендации Международной гистологической классификации, предложенной экспертами ВОЗ под руководством Mastofi (1980), а также Классификацией опухолей ВОЗ (2004): гистологический тип, степень дифференцировки. При морфометрическом исследовании использовали электронный аналог окулярной стереометрической сетки Автандилова, содержащую 100 тест-точек

[5,6]. Проводили подсчет точек, совпадающих с изучаемыми гистологическими структурами на срезах ткани, и по 20 полям зрения микроскопа оценивали объемную плотность лимфатических сосудов.

При обработке цифровых данных применяли статистический пакет лицензионных программ Microsoft Excel, Statistica 6,0 для операционной системы Windows XP. Учитывая, что распределение не являлось нормальным, применяли медиану и интерквартильный размах. Вариационный анализ осуществляли с помощью критерия Манна-Уитни – для двух независимых выборок (при сравнении количественных параметров). Для выяснения корреляционных взаимосвязей ряда показателей – линейный коэффициент корреляции (r) [7]. Статистическое измерение связи (силы и направления) проводилось путем вычисления коэффициента корреляции рангов Спирмена (ρ). Коэффициент равен +1,0 при прямой связи, -1,0 – при обратной связи, 0 – в отсутствии связи. Сила корреляционной связи оценивалась качественно: $\rho=0,0\dots-0,25$ и $\rho=0,0\dots0,25$ – отсутствие связи или слабая связь; $\rho=0,26\dots0,5$ (-0,26...-0,5) – умеренная связь; $\rho=0,51\dots0,75$ (-0,51...-0,75) – средняя связь; $\rho=0,76$ и более (-0,76...) – сильная связь. Достоверными считались различия при $p<0,05$.

Результаты

Иммуногистохимическое окрашивание (ИГХ) биоптатов предстательной железы с использованием антител к маркерам эндотелиоцитов лимфатических сосудов выявило, что медиана объемной плотности лимфатических сосудов при АМАП $Me = 26,5$ (6 - 123), а медиана объемной плотности лимфатических сосудов при аденокарциноме составила $Me = 18,5$ (7 - 42). Это говорит о том, что объемная плотность лимфатических сосудов в биоптатах с АМАП была достоверно выше, чем в аденокарциноме ($p = 0,03$). При исследовании биопсийных образцов с АМАП у 14 пациентов из 15 выявлены признаки хронического простатита, в результате чего сформировано 3 подгруппы: АМАП с хроническим простатитом высокой степени активности – 3 мужчины, с хроническим простатитом низкой – 5 мужчин, и умеренной степени активности – 6 мужчин. При хроническом простатите с умеренной степенью активности $Me = 1$ (1 – 7). У пациентов с хроническим простатитом низкой степени активности $Me = 3,5$ (1 – 12). У мужчин с хроническим простатитом высокой степени активности имели $Me = 3$ (1 – 12). При сравнении подгрупп в группе с АМАП выявлены достоверные различия между плотностью лимфатических сосудов при неактивном хроническом простатите и хроническим простатитом умеренной активности ($p = 0,0035$). А также хронического простатита высокой активности с умеренной и низкой активностью ($p = 0,04$). При исследовании биоптатов с аденокарциномой было сформировано 3 подгруппы: аденокарцинома умеренной степени дифференцировки – 9 пациентов, низкой – 4 пациентов и высокой степени анаплазии – 2 пациента. Медиана мужчин с аденокарциномой умеренной степени дифференцировки составила $Me = 2$ (1 – 8), с аденокарциномой низкой степени дифференцировки составила $Me = 3$ (1 – 6), и с аденокарциномой высокой степени дифференцировки $Me = 3$ (1 – 13). Также выявлены достоверные различия плотности лимфатических сосудов аденокарциномы с умеренной и низкой степенью дифференцировки ($p = 0,04$). При вычислении коэффициента корреляции выявлено, что чем ниже степень дифференцировки аденокарциномы, тем меньше плотность лимфатических сосудов (средняя обратная связь $r = -0,6$; $p = 0,03$)

Обсуждение

Анализ структуры лимфатических сосудов выявил, что наличие сосудов как с суженными просветами, так и с расширенными просветами встречаются как при АМАП, так и при аденокарциноме. Но при АМАП общее количество суженных и с расширенными просветами лимфатических сосудов достоверно больше, чем при аденокарциноме. ($p = 0,02$ и $0,04$ соответственно). Однако некоторые авторы отмечают, что при росте опухоли повышается гидростатическое давление, и лимфатические сосуды спазмируются [8]. Большое количество новообразованных лимфатических сосудов и увеличение их диаметра указывает на выраженную экспрессию опухолевыми клетками эндотелиальных факторов роста [9].

Заключение

1. Иммуногистохимическое исследование с использованием антител D2-40 к рецепторам эндотелиоцитов лимфатических сосудов выявило возрастание объемной плотности лимфатических сосудов при атипичной мелкоацинарной пролиферацией предстательной железы в сравнении с аденокарциномой предстательной железы.
2. Плотность лимфатических сосудов при хроническом простатите низкой степени активности достоверно преобладала над плотностью лимфатических сосудов при хроническом простатите с умеренной степенью активности воспалительного процесса.
3. При атипичной мелкоацинарной пролиферации количество сосудов с расширенными просветами было больше, чем с узкими, а их общая плотность достоверно выше, чем при аденокарциноме, но при аденокарциноме количество расширенных и суженных лимфатических сосудов было в равных количествах.
4. Отмечено, что дифференцировка аденокарциномы и объемная плотность лимфатических сосудов находятся в обратной корреляционной связи: чем ниже степень дифференцировки аденокарциномы, тем выше объемная плотность лимфатических сосудов.

Литература

1. Wissmann, C. Pathways targeting tumor lymphangiogenesis / C. Wissmann, M. Detmar // Clin. Cancer Res. – 2006. – Vol. 12, N 23. – P. 6865 – 6868.
2. Бородин, Ю. М. Общая анатомия лимфатической системы / Ю. М. Бородин, М. Р. Сапин, Л. Е. Этинген [и др.] – Новосибирск: Наука, 1990. – 243 с.
3. Зербино, Д. Д. Общая патология лимфатической системы / Д. Д. Зербино. – Киев: Здоров'я, 1974. – 160 с.
4. Куприянов, В. В. Ангиогенез / В. В. Куприянов, В. А. Миронов, А. А. Миронов [и др.] – М.: 1993. – 170 с.

5. Автандилов Г. Г. Проблемы патогенеза и патологоанатомической диагностики болезней в аспектах морфометрии. – М.: Медицина, 1984. – 286 с.
6. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии: Учеб. пособие. – М.: Медицина, 2002. – 238 с.
7. Власов, В. В. Введение в доказательную медицину / В. В. Власов. — Москва: Издательство Медиа Сфера, 2001. – 392 с.
8. Ramin, Shayan, Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps / G. Marc, Achen, A. S. Steven // Oxford Journals. Carcinogenesis. – 2006. – № 27(9). – P. 1729 – 1738.
9. Фильченков, А. А. Лимфоангиогенез и метастазирование опухолей / А. А. Фильченков // Онкология. – 2009. — №11 (2). – С. 94-103.