

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ
БИОМАРКЕРОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПРИЖИЗНЕННОГО
ПАТОЛОГОАТОМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ РАКА ПРОСТАТЫ**

**А.В. Смирнов^{1,2}, Д.В. Перлин¹, М.Р. Экова¹, Д.Ю. Гуров¹, Л.И. Александрова¹,
В.С. Замараев¹, Р.П. Самусев¹, Л.Н. Рогова¹**

¹ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации;
²ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр»

Проведен анализ результатов прижизненной патологоанатомической дифференциальной диагностики первичной ацинарной аденокарциномы простаты и доброкачественных поражений предстательной железы при трансректальной биопсии предстательной железы с использованием оптимизированной панели антител к высокомолекулярным цитокератинам (клон 34βE12), протеину P63, AMACR, PSA и/или PSAP. Показана наибольшая диагностическая информативность маркера базально-клеточной дифференцировки столбчатых эпителиоцитов простаты. Использование указанного набора биомаркеров способствует установлению правильного диагноза и, в дополнение к рутинному морфологическому исследованию материала биопсии, может быть рекомендовано для проведения прижизненной патологоанатомической дифференциальной диагностики рака предстательной железы.

Ключевые слова: патологоанатомическая диагностика, биопсия, рак предстательной железы, иммуногистохимическое исследование.

DOI 10.19163/1994-9480-2019-1(69)-55-58

**DIAGNOSTIC INFORMATIVITY OF IMMUNOHISTOCHEMICAL BIOMARKERS
IN CONDUCTING PRIVATE PATHOLOGICAL
AND ANATOMICAL RESEARCH OF PROSTATE CANCER**

**A.V. Smirnov^{1,2}, D.V. Perlin¹, M.R. Ekova¹, D.YU. Gurov¹, L.I. Aleksandrova¹,
V.S. Zamaraev¹, R.P. Samusev¹, L.N. Rogova¹**

¹FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation;
²SBI «Volgograd Medical Scientific Centre»

The results of an in vivo pathoanatomical differential diagnosis of primary acinar adenocarcinoma of the prostate and benign lesions of the prostate gland were analyzed using a transrectal biopsy of the prostate gland using an optimized panel of antibodies to high-molecular cytokeratins (clone 34βE12), protein P63, AMACR, PSA and/or PSRA. The greatest diagnostic informativity of the basal cell differentiation marker of the columnar prostate epithelial cells was shown. The use of this set of biomarkers contributes to the establishment of a correct diagnosis and, in addition to the routine morphological examination of the biopsy material, can be recommended for carrying out an intravital pathologic anatomic differential diagnosis of prostate cancer.

Key words: pathological and anatomical diagnosis, biopsy, prostate cancer, immunohistochemical research.

Рак предстательной железы (РПЖ) является наиболее распространенным злокачественным новообразованием среди мужчин (ЗНО) России и других странах СНГ у мужчин старше 60 лет [1]. По данным ВОЗ в структуре смертности от онкологических причин РПЖ занимает третье место в России (7,7 %) и в странах Европейского Союза после ЗНО органов дыхательной и пищеварительной систем, в то время как в США данный показатель выше и поднимается на вторую позицию [6]. По данным Южного научного центра РАН показатель заболеваемости раком предстательной железы в Российской Федерации с 2001 по 2016 гг. увеличился в 3,0 раза (с 19,1 до 56,5 случаев на 100 тысяч населения) [3]. В связи с широким использованием скрининга простатспецифического антигена (PSA) число мужчин с выявлением РПЖ на ранних этапах увеличивается в развитых странах, включая Россию [10]. Концепция активного наблюдения (последовательный мониторинг прогрессирующего заболевания с намерением вылечить)

представляется безопасным и предпочтительным подходом для мужчин с менее агрессивным РПЖ, у которых уровень PSA составляет менее 10 нг/мл и индекс Глисона ≤3+3 [8]. Следовательно, возрастает роль стандартизации исследования биопсийного материала. Прогноз и выбор тактики лечения РПЖ во многом зависят от результатов оценки степени злокачественности опухоли по шкале Глисона, которая получила признание во всем мире с момента его введения 50 лет назад. С 1966 г. произошли значительные изменения в ведении и диагностике РПЖ, включая скрининг простат-специфических антигенов, что привело к выявлению ранних форм неоплазии. Это привело к эволюции классификации Глисона. Значительные изменения в Gleasongrading были внесены в 2005 и 2014 гг. на основе консенсусных конференций, проведенных Международным обществом урологической патологии (International Society of Urological Pathology, ISUP). Новые изменения включали в себя классификацию всех паттернов

крибриформного рака и гломерулоидов как варианты неоплазий при степени Глисона 4, введение в классификацию муцинозной аденокарциномы на основе лежащих в ее основе структурных особенностей, а не единообразного рассмотрения этих опухолей как степень 4, и введение системы 5-балльной шкалы по шкале Глисона, которая включала модификации 2014 г., обозначенной как ISUP и состоящей из пяти классов: класс 1 ($3 + 3 = 6$ и менее), класс 2 ($3 + 4 = 7$), класс 3 ($4 + 3 = 7$), класс 4 ($3 + 5 = 8$, $5 + 3 = 8$, $4 + 4 = 8$) и класс 5 ($4 + 5 = 9$, $5 + 4 = 9$, $5 + 5 = 10$). В настоящее время рекомендуется не оценивать по шкале Глисона внутрипротоковую карциному [9].

Стадия опухолевого роста зависит от распространения РПЖ, при этом ключевыми факторами являются объем неоплазии, включая экстрапростатическое распространение (очаговое и установленное), а также вовлечение семенных пузырьков и тазовых лимфатических узлов. Перинеуральная инфильтрация при биопсии и лимфоваскулярная инвазия являются параметрами, которые должны быть включены в патологоанатомическое заключение [5]. Идентификация прогностических и дифференциально-диагностических биомаркеров находится в процессе разработки, хотя показано, что в качестве морфологических критериев диагностики высокодифференцированной аденокарциномы простаты важное место занимает использование иммуногистохимических биомаркеров базальных клеток и онкомаркеров. Другими молекулярными маркерами, показывающими перспективность в качестве прогностических показателей, являются метилирование PTEN, андрогенных рецепторов, PARP, андрогенрегулируемых ферментов (FASN) и промоторов опухолевого роста (GST-pi, RASSF1, PITX2) [1, 5].

При наличии в одном диагностическом случае даже 12 столбиков ткани (в зависимости от объема железы биоптатов может достигать 24) длиной не менее 4 мм возникает необходимость выбора достаточной для диагностики панели, и остро встает вопрос об экономической целесообразности использования всего возможного количества биомаркеров, что ведет удорожанию прижизненной патологоанатомической диагностики.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Анализ диагностической информативности иммуногистохимических биомаркеров при проведении прижизненной патологоанатомической дифференциальной диагностики рака предстательной железы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами проведено прижизненное патологоанатомическое исследование РПЖ (1 группа, $n = 40$), представленного ацинарной аденокарциномой, класс 1 ISUP (сумма Глисона $3 + 3 = 6$ и менее, $n = 38$), ацинарной аденокарциномой, класс 3 ISUP (сумма Глисона $4 + 3 = 7$, $n = 2$). Группу сравнения составили случаи с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ)

(2 группа, $n = 40$) в сочетании с простатической интраэпителиальной неоплазией (ПИН), хроническим простатитом, очаговой атрофией, атипической мелкоацинарной пролиферацией (ASAP) на биопсийном материале больных ГБУЗ «Волгоградский областной уронефрологический центр».

Биоптаты предстательной железы фиксировались в 10%-м растворе забуференного формалина в течение 24 часов при комнатной температуре, обрабатывались по стандартной методике. Из парафиновых блоков были изготовлены гистологические серийные срезы толщиной 3–5 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином. После изучения микропрепаратов устанавливался предварительный патологоанатомический диагноз (заключение).

Для проведения иммуногистохимического исследования (ИГХ) на парафиновых серийных срезах толщиной 4 мкм использовали биомаркеры базальных эпителиальных клеток: мышинные и кроличьи антитела против высокомолекулярных цитокератинов (клон 34BE12, 1:100, Cell Marque, США), протеина P63 (клон 4A4, 1:100, Dako, Дания); онкомаркеров: альфа-метилацил-КоА-рацемазы, AMACR (клон 13H4, RTU, Dako, Дания), а также простатспецифических биомаркеров: простатспецифического антигена, PSA (клон A67-B/E3, 1:100, Thermo Scientific, США) и простатической кислой фосфатазы, PSAP (клон PASE/4LJ, 1:25, Cell Marque, США). Процедуры депарафинизации, демаскировки антигенов, визуализации, окрашивания гематоксилином проводили в соответствии с рекомендуемым протоколом с последующим анализом иммунофенотипа. С учетом результатов иммуногистохимического исследования микропрепаратов устанавливался патологоанатомический диагноз (заключение).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами проведено патологоанатомическое диагностическое исследование материала 80 трансректальных биопсий предстательной железы. После изучения микропрепаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, из 12 точек биопсии в каждом случае (всего 960 микропрепаратов) нами были отобраны по 2–4 парафиновых блока от каждого больного с подозрением на аденокарциному или с наличием ацинарной аденокарциномы простаты (сумма Глисона 4, 6 и 7), изготовлены срезы для проведения ИГХ исследования (823 микропрепарата). Таким образом, ИГХ исследованию было подвергнуто 16,7–33,3 % биопсийного материала, чаще из наиболее сомнительных образцов ткани.

Иммунофенотип ацинарной аденокарциномы предстательной железы (класс 1 ISUP, сумма Глисона $2 + 2 = 4$, $3 + 3 = 6$ и класс 3 ISUP, сумма Глисона $4 + 3 = 7$) в 100 % случаев характеризовался как: высокомолекулярные цитокератины (–), протеин P63 (–), PSA (+), PSAP (+) (рис. 1). Биомаркер AMACR (+) продемонстрировал меньшую диагностическую информативность, был позитивен в 38 случаях (95 %) ацинарной аденокарциномы класс 1 ISUP, сумма Глисона $3 + 3 = 6$ (рис. 2).

Практически во всех случаях РПЖ возникал на фоне ДГПЖ. В 18 случаях (45 %) аденокарцинома предстательной железы, класс 1 ISUP, сопровождалась ПИН высокой степени (2–3-й степень), в т.ч. с наличием участков ПИН криброзного строения.

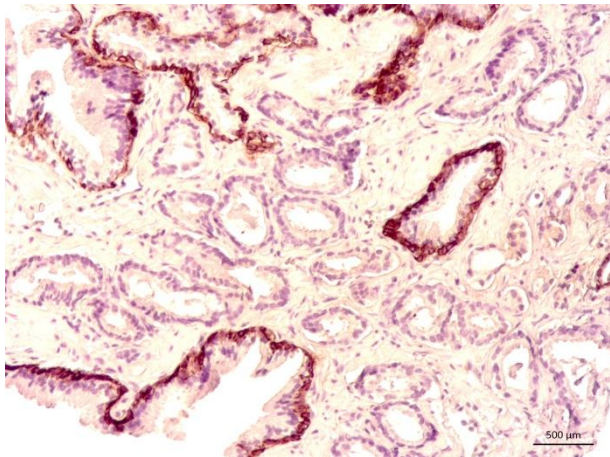


Рис. 1. Ацинарная аденокарцинома простаты, класс 1 ISUP (сумма Глисона 3 + 3 = 6).

Отсутствие иммунореактивного материала в опухолевых железистых структурах и наличие цитоплазматической экспрессии иммунореактивного материала в базальных клетках нормальных желез простаты. Иммуногистохимическое исследование с использованием первичных антител против высокомолекулярных цитокератинов (клон 34βE12), докраска гематоксилином. Ув. X 100

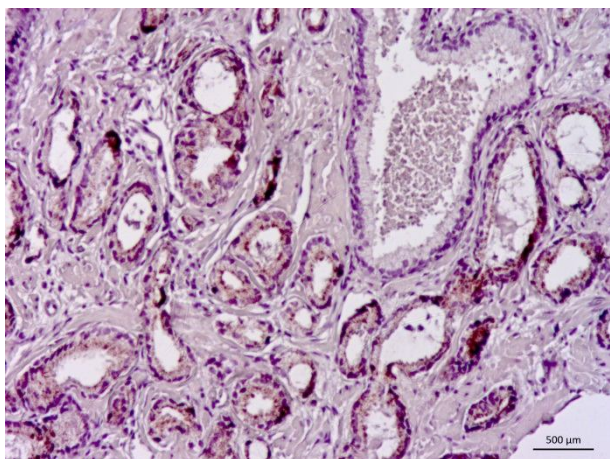


Рис. 2. Ацинарная аденокарцинома простаты, класс 1 ISUP (сумма Глисона 3 + 3 = 6).

Наличие цитоплазматической экспрессии иммунореактивного материала в опухолевых железистых структурах простаты и отсутствие иммунореактивного материала в клетках нормальных желез. Иммуногистохимическое исследование с использованием первичных антител против AMACR, докраска гематоксилином. Ув. X 100

Напротив, в 100 % случаев ДГПЖ характеризовалась следующим иммунофенотипом: высокомолекулярные цитокератины (+), протеин P63 (+), AMACR (–) при PSA (+), PSAP (+). Следует отметить, что цитоплазматическая экспрессия протеина P63 в части желез в 12,5 % случаев была расценена

как «сомнительная». В 14 случаях (35 %) ДГПЖ сопровождалась ПИН. В значительной части случаев ПИН была отмечена прерывистая экспрессия высокомолекулярных цитокератинов и белка P63 (+/–). Кроме того, в 32 случаях (80 %) ДГПЖ выявлялась различная по выраженности атрофия желез, которая сопровождалась появлением средних и небольших светлых желез, разделенных небольшими количествами стромы, расположенных группами. В подобных случаях для исключения фокусов злокачественного роста проведенное ИГХ исследование подозрительных образцов ткани выявляло наличие в столбчатых эпителиоцитах признаков базальноклеточной дифференцировки (экспрессии высокомолекулярных цитокератинов и белка P63). В 38 случаях (95 %) ДГПЖ сопровождалась признаками хронического простатита, различной по выраженности лимфоидной инфильтрацией стромы.

В 5 случаях (12,5 %) при ДГПЖ были обнаружены участки атипической мелкоацинарной пролиферации с наличием очагово расположенных групп мелких желез в количестве до 7 ацинусов с умеренной цитологической атипией и различным иммунофенотипом: 2 случая – высокомолекулярные цитокератины (+), протеин P63 (+), AMACR (–) и 3 случая – высокомолекулярные цитокератины (–), протеин P63 (–), AMACR (–).

Поскольку трансректальная биопсия предстательной железы с последующим гистологическим исследованием материала считается «золотым стандартом» диагностики РПЖ [4], выполнение ИГХ исследования в целях дифференциальной диагностики ацинарной аденокарциномы простаты с ДГПЖ, ПИН, очаговой атрофией, атипической мелкоацинарной пролиферацией является необходимым элементом диагностического поиска и включено в различные национальные руководства [2, 6]. Однако в настоящее время отсутствует обязательная стандартизация процедуры ИГХ исследования, использование различных клонов и разведенных антител ведет к получению различных результатов при одних и тех же патологических процессах. В этом контексте можно отметить, что наибольшей диагностической информативностью обладают антитела против высокомолекулярных цитокератинов (клон 34βE12).

Кроме того, для удешевления ИГХ исследования можно использовать разработанные производителями ПИН-коктейли (PIN-cocktail), составленные из антител против онкомаркера – AMACR (цитоплазматическая экспрессия), антител против протеина P63 (ядерная экспрессия) и против высокомолекулярных цитокератинов (клон 34βE12) (цитоплазматическая экспрессия) – маркеров базальных клеток, что способствует правильному установлению диагноза в 92–97 % случаев [7]. Кроме того, отмечается, что использование системы мультиблока позволяет уменьшить расход антител на один столбик ткани без потери информации о маркировке объекта, однако данная система не включена в отечественные клинические рекомендации и приказы по патологической анатомии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при дифференциальной патологоанатомической диагностике первичной ацинарной аденокарциномы предстательной железы и различных доброкачественных поражений простаты по результатам исследования трансректальной биопсии предстательной железы представленная оптимизированная панель антител против высокомолекулярных цитокератинов (клон 34βE12), протеину P63, AMACR, PSA, PSAP позволила в 100 % случаев установить правильный диагноз.

С учетом новых достижений [9] становится очевидным, что в будущем потребуются поправки к существующей системе, при использовании которой проводится дифференциальная диагностика между РПЖ, опухолеподобными «мимикрирующими» атрофическими процессами, простатической интраэпителиальной неоплазией (ПИИ), атипичной мелкоацинарной пролиферацией (ASAP), склерозирующим аденозом, что диктует необходимость не только использования единых дифференциально-диагностических морфологических критериев, но и включения в клинические рекомендации о проведении прижизненной патологоанатомической диагностики достоверных иммуногистохимических методов в определенных объемах.

Результаты настоящего исследования позволяют рекомендовать для включения в клинические рекомендации по проведению прижизненной патологоанатомической диагностики РПЖ помимо традиционного исследования материала из 12–24 точек биопсии с окраской микропрепаратов гематоксилином-эозином и определения степени злокачественности по шкале Глисона ИГХ исследование материала с использованием следующих биомаркеров: высокомолекулярных цитокератинов (клон 34βE12), протеина P63, AMACR, PSA и/или PSAP.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аллина Д.О., Андреева Ю.Ю., Завалишина Л.Э. и др. FASN в диагностике новообразований предстательной железы // Архив патологии. – 2017. – Т. 79, № 2. – С. 10–14.
2. Андреева Ю.Ю., Москвина Л.В., Завалишина Л.Э. и др. Опухоли предстательной железы. Морфологическая диагностика и генетика: Руководство / Под ред. Ю.Ю. Андреевой, Г.А. Франка // РМАПО. – М., 2011. – 70 с.
3. Архипова О.Е., Черногубова Е.А. Анализ заболеваемости раком предстательной железы в Ростовской области за 2001–2016 гг.: пространственно-временная статистика // Вестник урологии. – 2017. – Т. 5, № 4. – С. 13–21.
4. Смирнов А.В., Снигур Г.Л., Перлин Д.В., Гуров Д.Ю. Оптимизация алгоритма патологоанатомической диагностики рака предстательной железы с применением иммуногистохимического метода // Якутский медицинский журнал. – 2015. – № 2 (50). – С. 41–43.
5. Egevad L., Delahunt B., Kristiansen G. et al. Contemporary prognostic indicators for prostate cancer incorporating International Society of Urological Pathology recommendations // Pathology. – 2018. – Vol. 50, № 1. – P. 60–73.

6. Heidenreich A., Bastian P.J., Bellmunt J. et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013 // Eur. Urol. – 2014. – Vol. 65. – P. 124–137.

7. Jiang Z., Li C., Fischer A. et al. Using an AMACR (P504S)/34βE12/p63 cocktail for the detection of small focal prostate carcinoma in needle biopsy specimens // Am. J. Clin. Pathol. – 2005. – Vol. 123, № 2. – P. 231–236.

8. Litwin M.S., Tan H.J. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review // JAMA. – 2017. – Vol. 317, № 24. – P. 2532–2542.

9. Samaratunga H., Delahunt B., Yaxley J. et al. From Gleason to International Society of Urological Pathology (ISUP) grading of prostate cancer // Scand. J. Urol. – 2016. – Vol. 50, № 5. – P. 325–329.

10. Sano F., Uemura H. The Utility and Limitations of Contrast-Enhanced Ultrasound for the Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer // Sensors. – 2015. – Vol. 15. – P. 4947–4957.

REFERENCES

1. Allina D.O., Andreeva YU.YU., Zavalishina L.E. i dr. FASN v diagnostike novoobrazovaniy predstatel'noj zhelezy [FASN in the diagnosis of prostate neoplasms]. *Arhiv patologii* [Archives of Pathology], 2017, Vol. 79, no. 2, pp. 10–14. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Andreeva YU.YU., Moskvina L.V., Zavalishina L.E. i dr. Opuholi predstatel'noj zhelezy. Morfologicheskaya diagnostika i genetika: Rukovodstvo [Tumors of the prostate gland. Morphological diagnosis and genetics: Guide]. In YU.YU. Andreeva, G.A. Frank (ed.). In RMAPO. Moscow, 2011. 70 p.
3. Arhipova O.E., Chernogubova E.A. Analiz zaboлеваemosti rakom predstatel'noj zhelezy v Rostovskoy oblasti za 2001–2016 gg.: prostranstvenno-vremennaya statistika [Analysis of the incidence of prostate cancer in the Rostov region for 2001–2016: spatio-temporal statistics]. *Vestnik urologii* [Herald of Urology], 2017, Vol. 5, no. 4, pp. 13–21. (In Russ.; abstr. in Engl.).
4. Sмирнов А.В., Снигур Г.Л., Перлин Д.В., Гуров Д.Ю. Оптимизация алгоритма патолого-анатомической диагностики рака предстательной железы с применением иммуногистохимического метода [Optimization of the pathoanatomical diagnosis of prostate cancer using the immunohistochemical method]. *Yakutskij medicinskij zhurnal* [Yakutsk Medical Journal], 2015, no. 2 (50), pp. 41–43. (In Russ.; abstr. in Engl.).
5. Egevad L., Delahunt B., Kristiansen G. et al. Contemporary prognostic indicators for prostate cancer incorporating International Society of Urological Pathology recommendations. *Pathology*, 2018, Vol. 50, no. 1, pp. 60–73.
6. Heidenreich A., Bastian P.J., Bellmunt J. et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur. Urol*, 2014, Vol. 65, pp. 124–137.
7. Jiang Z., Li C., Fischer A. et al. Using an AMACR (P504S)/34βE12/p63 cocktail for the detection of small focal prostate carcinoma in needle biopsy specimens. *Am. J. Clin. Pathol*, 2005, Vol. 123, no. 2, pp. 231–236.
8. Litwin M.S., Tan H.J. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*, 2017, Vol. 317, no. 24, pp. 2532–2542.
9. Samaratunga H., Delahunt B., Yaxley J. et al. From Gleason to International Society of Urological Pathology (ISUP) grading of prostate cancer. *Scand. J. Urol.*, 2016, Vol. 50, no. 5, pp. 325–329.
10. Sano F., Uemura H. The Utility and Limitations of Contrast-Enhanced Ultrasound for the Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. *Sensors*, 2015, Vol. 15, pp. 4947–4957.

Контактная информация

Смирнов Алексей Владимирович – д. м. н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ВолгГМУ, e-mail: alexeysmirnov.volggu@gmail.com