
Proliferační a apoptotické znaky u karcinomu prostaty ve vztahu k androgenovému receptoru

Dvořáčková J.¹, Čeganová L.¹, Štěrba J.¹, Nedbálek A.², Kolář Z.³

¹CGB laboratoř spol. s r.o., Ostrava

²Urologické oddělení Nemocnice Vítkovice, Ostrava

³Ústav patologie a LMP LF UP a FN, Olomouc

Souhrn

Karcinom prostaty, jedna z nejčastějších malignit u mužů, je v určitých fázích svého vývoje významně ovlivňován androgeny. Proto byla provedena na souboru 130 pacientů s negeneralizovaným (lokalizovaným) karcinomem prostaty (stadium T1-T2, PSA do 25 ng/ml) retrospektivní studie. Imunohistochemicky byla stanovena exprese proliferačních znaků PCNA a Ki67, proteinů Bax, p53, Bcl-2, p21^{waf1}, p27^{kip1} (dále je p21 a p27) a bylo provedeno jejich srovnání s expresí androgenového receptoru (AR). Multivariační statistická analýza výsledků pomocí chí-kvadrát testu s Pearsonovou korekcí a analýza variability s použitím programu SPSS, verze 8,0, ukázala silnou korelaci proliferačních znaků PCNA a Ki67 s expresí znaků hormonální závislosti a apoptózy. Exprese PCNA korelovala silně s expresí p27 a Bax, zatímco exprese Ki67 korelovala nejsilněji s expresí p27 a Bcl-2. Exprese p27 korelovala s expresí androgenového receptoru, PCNA, Ki67 i Bcl-2. Žádný ze sledovaných znaků nekoreloval významně s Gleasonovým skóre. Nebyl nalezen podstatný signifikantní vztah sledovaných znaků k expresi p53 a p21. Výsledky ukazují na významnou roli proteinu p27 při regulaci proliferační aktivity a hormonální odpovědi u karcinomu prostaty v počátečním stadiu.

Klíčová slova: karcinom prostaty – androgenový receptor - Ki67- PCNA - Bax - Bcl-2 - p53 - p21^{waf1} - p27^{kip1} – korelační vztahy – karcinogeneze – hormonální senzitivita

Summary

Proliferative and Apoptotic Markers in Prostate Carcinoma in Relation to Androgen Receptor

Prostate carcinoma, one of the most frequent male malignancies, is in certain stages of its development significantly influenced by androgens. Therefore, we carried out a retrospective study on a set of 130 patients with nongeneralized, localized prostate carcinoma (stage T1-T2, PSA up to 25 ng/ml). We determined immunohistochemically the expression of proliferation markers PCNA and Ki67, Bax, p53, Bcl-2, p21^{waf1}, p27^{kip1} and compared them with the expression of the androgen receptor (AR). Multivariation statistical analysis of the results using the chi-square test with Pearson's correction and variability analysis using the SPSS 8.0 software program showed a strong correlation of the PCNA and Ki67 proliferation markers with the expression of hormonal dependence and apoptosis markers. The expression of PCNA correlated strongly with p27^{kip1} and Bax, while the expression of Ki67 correlated most strongly with p27^{kip1} and Bcl-2. The expression of p27^{kip1} correlated with the expression of androgen receptor, PCNA, Ki67 as well as Bcl-2. None of the observed markers correlated significantly with Gleason's score. We did not find substantial significant relation between the observed markers and the expression of p53 and p21^{waf1}. The results indicate a significant role of the expression of p27^{kip1} protein in regulating proliferative activity and hormonal responsiveness in the initial stage of prostate carcinoma.

Key words: prostate carcinoma – androgen receptor - Ki67 - PCNA - Bax - Bcl-2 - p53 - p21^{waf1} - p27^{kip1} – carcinogenesis – hormone sensitivity

Čes.-slov. Patol., 42, 2006, No. 3, p. 125–129

Karcinom prostaty, jedna z nejčastějších malignit u mužů vyššího věku, je v určitých fázích svého vývoje ovlivňován androgeny. Rovněž funkce a velikost prostaty jsou závislé na hladině androgenů v organismu. Vlastní mechanismus účinku androgenů je zprostředkován androgenovými receptory (AR), se kterými androgeny tvoří komplexy. Tyto komplexy vznikající v cytoplasmě bu-

něk jsou transportovány do jádra buňky, kde se vážou na responzibilní element (RE) DNA a působí jako transkripční faktor. Nejjednodušším vysvětlením vzniku rezistence nádorových buněk na hormonální blokádu je, že androgeny přestanou být nezbytně nutné pro přežití nádorových buněk. Pravděpodobně však existuje více drah, které mohou vést ke vzniku rezistence nádorových buněk

na androgenovou blokádu (3, 7, 9). V našem sdělení chceme navázat na předchozí studie četných autorů, které hledaly souvislosti mezi expresí AR a dalších znaků, ve snaze vysvětlit vznik ztráty odpovědi na androgeny. My jsme se zaměřili především na některé znaky uplatňující se v regulaci buněčného cyklu a apoptózy.

kem 130 primárně diagnostikovaných nemetastazujících karcinomů prostaty ve stádiích T1-T2, u kterých byla revidována histologická vyšetření a grading dle Gleasona. Ve všech případech se jednalo o tkáňové vzorky získané punkcí. Materiál byl zpracován standardním způsobem s formalínovou fixací a zalitím do parafínu. K detekci sledovaných znaků byla použita klasická nepřímá imunoperoxidázová metoda po postupech sloužících k demaskování antigenu pomocí mikrovlnného generátoru. Detaily metodiky, stejně jako bližší specifikace použitých protilátek jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Materiál a metody

Bylo provedeno retrospektivní vyšetření cel-

Tab. 1. Pracovní postup

1. Odparafinování (tři lázně xylenů po 5 minutách a dvě lázně 96% alkoholu po 5 minutách).
2. Oplach destilovanou vodou třikrát po 5 minutách.
3. Blokování endogenní peroxidázy k potlačení endogenní peroxidázové aktivity pomocí 3% H ₂ O ₂ v metanolu 30 minut.
4. Oplach destilovanou vodou třikrát po 5 minutách.
5. Natrávení 0,05% roztokem trypsinu (trypsin 1: 250, Sigma) při teplotě 37 °C. a) Tkáňové vzorky demaskované v mikrovlnném generátoru byly natravovány 10 minut. b) Vzorky zpracované bez použití mikrovlnného generátoru byly natravovány 30 minut.
6. Oplach v destilované vodě (3x 5 min).
7. Vložení vzorků do mikrovlnného generátoru při výkonu 750 W v citrátovém pufru pH 6,0 3x po dobu 5 minut. Po každém cyklu je doplněna destilovaná voda, aby nedocházelo ke změně pH nebo vysušení preparátů.
8. Chladnutí v citrátovém pufru 20 minut při laboratorní teplotě.
9. Oplach destilovanou vodou třikrát po 5 minutách.
10. Aplikace blokovacího proteinu 5 minut (Ultra Tech HRP kit, Immunotech) ve vlhké komůrce.
11. Okap bez oplachu.
12. Aplikace primární protilátky, 30–60 minut (dle instrukcí výrobce) ve vlhké komůrce a v temnu.
13. Oplach v PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7,2 třikrát po 5 minutách.
14. Aplikace sekundární protilátky (Streptavidin-biotin komplex – Ultra Tech HRP kit, Immunotech) 15 minut ve vlhké komůrce.
15. Oplach v PBS , pH 7,2 třikrát po 5 minutách.
16. Aplikace enzymového komplexu (Streptavidin-biotin komplex – Ultra Tech HRP kit, Immunotech) 15 minut ve vlhké komůrce.
17. Oplach v PBS, pH 7,2 třikrát po 5 minutách.
18. Aplikace chromogenu DAB (3,3'diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate) 15 minut (příprava roztoku DAB těsně před použitím).
19. Oplach v destilované vodě třikrát po 5 minutách.
20. Dobarvení jader v hematoxylinu (Mayer, Biooptica) 1–3 minuty.
21. Diferenciace jader v tekoucí vodě.
22. Odvodnění a projasnění.
23. Montáž do nevodného média (Solacryl BMX).

Tab. 2. Specifikace protilátek a jejich užití

	Firma	Označení klonu	Typ protilátky	Inkubace	Tepelné odmaskování epitopů	Ředění
AR	DAKOCytomation	AR 441	monoklonální	30 min	ano	1:50-1:75
Bax	DAKOCytomation	neuveдено	polyklonální	30 min	ano	1:50
Bcl 2	DAKOCytomation	124	monoklonální	30 min	ano	1:50-1:100
Ki 67	DAKOCytomation	Ki-S5	monoklonální	30 min	ano	1:50
p 21	DAKOCytomation	SX 118	monoklonální	30 min	ano	1:25-1:50
p 27	DAKOCytomation	SX53G8	monoklonální	30 min	ano	1:25-1:50
p 53	DAKOCytomation	DO-7	monoklonální	30 min	ano	předředěná
PCNA	DAKOCytomation	PC 10	monoklonální	30 min	ano	1:100
PSA	DPC Biermann	neuveдено	polyklonální	30 min	ano	1:150
PSAP	DPC Biermann	neuveдено	polyklonální	30 min	ano	1:150

Statistická analýza výsledků byla provedena pomocí chí-kvadrát testu s Pearsonovou korekcí a analýza variability s použitím programu SPSS, verze 8.0.

Pearsonův korelační koeficient vyjadřuje míru lineární závislosti mezi dvěma spojitými veličinami. Hodnota korelačního koeficientu se pohybuje od -1 do 1. Hodnoty ± 1 nabývá tehdy, je-li závislost absolutní (v bodovém grafu leží všechny body na přímce). Nule je roven v případě, že jsou veličiny nezávislé. Znaménko korelačního koeficientu je kladné, když obě veličiny zároveň rostou nebo obě zároveň klesají, a záporné, když jedna z veličin roste, zatímco druhá klesá. Korelace je

uváděna s dosaženou hladinou významnosti p (v tabulce označena jako Sig.). Ta se vztahuje k testu nulové hypotézy, že korelační koeficient je roven nule, tedy, že mezi veličinami neexistuje žádný lineární vztah. Hodnoty dosažené hladiny významnosti p uvedené spolu s hodnotami korelačních koeficientů se musí posuzovat kriticky – pro velký rozsah výběru může i prakticky nevýznamná korelace být významná statisticky (tj. významnost – signifikance $p < 0,05$, ev. $p < 0,01$).

Ke slovnímu vyjádření síly vztahu dvou veličin, vyjde-li korelační koeficient statisticky významně nenulový (tj. $p < 0,05$), se mohou použít tyto hranice:

je-li absolutní hodnota korelačního koeficientu v intervalu:

- 0,1–0,3, interpretuje se korelace jako slabá,
- 0,4–0,6, interpretuje se korelace jako střední,
- pro interval 0,7–0,8 jako silná a
- je-li větší než 0,9 jako velmi silná.

Pro další statistické zpracování byla sestrojena tabulka 3, do níž byly vloženy údaje o charakteristice souboru a sledovaných znaků.

Statistickým zpracováním těchto sledovaných znaků byla vytvořena tabulka 4 vždy tak, aby jeden znak byl porovnán se zbylými sledovanými znaky.

Tab. 3. Charakteristika souboru

	N*(počet)	Minimum	Maximum	Průměr	Směrodatná odchylka**	Variabilita**
Věk (rok)	130	27	91	69,9	10,1	101,2
Gleasonovo skóre (bez jednotek)	122	2	10	5,0	1,7	3,0
AR (%)	123	0	100	85,7	24,8	613,5
PCNA (%)	123	0	100	72,2	26,7	713,3
Ki 67 (%)	123	0	100	14,2	18,7	349,2
BAX (%)	120	0	100	67,0	29,8	885,9
Bcl 2 (%)	121	0	100	14,0	21,2	448,2
p 53 (%)	121	0	100	21,8	26,8	720,2
p 27 (%)	120	0	100	53,5	30,4	925,5
p 21 (%)	121	0	100	9,9	16,0	255,2

% buněk

* Soubor tvořilo celkem 130 pacientů. Důvodem snížení počtu pacientů při statistickém zpracování byla neúplnost některých sledovaných hodnot pro vykrájení materiálu eventuálně nezastižení ložiska karcinomu ve všech řezech.

** Údaje sloužící pro statistické zpracování.

Tab. 4. Tabulka porovnávacích vztahů (Pearsonova korelace – porovnání)

	Pearsonovo porovnání	Gleasonovo skóre	AR	PCNA	Ki 67	BAX	Bcl 2	p 53	p 27	p 21
Věk	Sig. (2-tailed) N	,038 ,675	-,084 ,355	-,021 ,819	-,111 ,221	-,098 ,286	,039 ,675	-,043 ,642	-,038 ,680	-,035 ,706
Gleasonovo skóre	Sig. (2-tailed) N		-,129* ,034	,032 ,726	,206* ,023	,000 ,999	,262** ,004	,043 ,636	,032 ,727	-,029 ,750
AR	Sig. (2-tailed) N			,262** ,003	,101 ,269	,238** ,009	,015 ,874	,228* ,012	,330** ,000	,129 ,159
PCNA	Sig. (2-tailed) N				,286** ,001	,407** ,000	,242** ,007	,186* ,041	,459** ,000	,138 ,131
Ki 67	Sig. (2-tailed) N					,242** ,008	,366** ,000	,224* ,014	,418** ,000	,271** ,003
BAX	Sig. (2-tailed) N						,232* ,011	,006 ,945	,220* ,017	,132 ,154
Bcl 2	Sig. (2-tailed) N							,117 ,204	,397** ,000	,294** ,001
p 53	Sig. (2-tailed) N								,290** ,001	,303** ,001
p 27	Sig. (2-tailed) N									,241** ,008

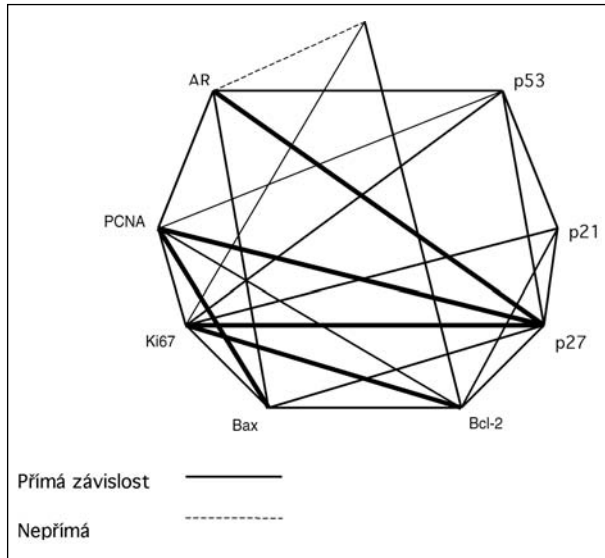
Pearsonovo porovnání - hladina významnosti p – značená Sig. (2-tailed)N

Významnost ** $p < 0,05$ event. * $p < 0,01$

Výsledky

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 3. Korelační vztahy jsou zřejmé z tabulky 4.

Schematicky jsou výsledné korelační vztahy vyznačeny v grafu 1, kde síla vzájemného vztahu je přímo úměrná síle spojovací úsečky.



Graf 1.

Na zobrazeném schématu je patrna silná vazba mezi p27 a androgenovými receptory, znaky proliferativní aktivity (PCNA, Ki67) a apoptózy (Bcl-2). Spojitost tohoto komplexu znaků s komplexem představovaným p53 a p21 není silná a se stupněm diferenciacie nádoru představovaným Gleasonovým skóre prakticky neexistuje. Výsledky ukazují na ústřední roli proteinu p27 při regulaci proliferativní aktivity a apoptózy.

Diskuse a závěr

Expresi proteinu p27 u karcinomu prostaty sledovala v posledních letech řada studií, které zjistily, že u většiny nádorů prostaty je exprese p27 oproti normě snižena, ale míra snížení se u jednotlivých pacientů značně liší (10, 16). Řada studií rovněž prokázala přímou souvislost mezi expresí p27 a odpovědí nádoru na androgeny (2, 7, 9, 12). Agresivní nádory pravděpodobně dovedou protein p27 aktivně rozkládat, takže u takových pacientů jsou jeho hladiny velmi nízké, případně neprokazatelné. Pomalu rostoucí nádory působí na p27 málo, jeho hladiny jsou normální nebo jen mírně snižené (8).

Naše výsledky indikují existenci významné vzájemné vazby exprese genů regulujících hormonální citlivost buněk karcinomu prostaty. Proto lze očekávat, že při vzniku hormonální necitlivosti dojde k poruše této „souhry“. Předpokládáme, že tyto změny bychom mohli detekovat ve vzorcích nádoru velmi časně a doporučit tak klinikům změnu terapeutického přístupu. Ukazuje se, že pouhé monitorování hladiny PSA v séru pacientů je nedostatečné, protože odráží již relativně pozdní fázi relapsu. Řešením by mohly být odběry vzorku prostaty na imunohistochemická vyšetření, a to už v průběhu remise dosažené po terapii první linie, kterou je androgenová blokáda.

Protein p27 může být považován za znak s velkým významem pro odhad prognózy karcinomu prostaty, umožňující přesněji předvídat stupeň rozvoje nádorového onemocnění (grading) a identifikovat pacienty, u nichž je vhodné zahájit adjuvantní terapii.

Práce byla částečně podpořena grantem MSM 6198959216.

Literatura

1. **Agus, D., Akita, R., Fos, W., et al.:** Targeting ligand – activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell*, 2, 2002, s. 127. – 2. **Agus, D. B., Cordon-Cardo, C., Fox, W., et al.:** Prostate cancer cell cycle regulators: response to androgen withdrawal and development of androgen independence. *J. Natl. Cancer Ind.*, 91, 1999, s. 1869–1876. – 3. **Arnold, J.T., Isaacs, J. T.:** Mechanism involved in the progression of androgen – independence prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault. *Endocr. Relat. Cancer*, 9, 2002, s. 61–73. – 4. **Brinkmann, A. O.:** Mechanism of developing androgen dependence. In: *New perspectives in prostate cancer* (Belldegrun A. ed.) Isis Medical media, Oxford: 1998, s. 77–82. – 5. **Bruckheimer, E. M., Gjertsen, B. T., McDonnell, T. J.:** Implications of cell death regulation in the pathogenesis and treatment of prostate cancer. *Semin. Oncol.*, 26, 1999, s. 382–398. – 6. **D'Amico, A. V., Whittington, R., Malkowicz, S. B., et al.:** Combination of the preoperative PSA level, biopsy Gleason score, percentage of positive biopsies, and MRI T- stage to predict early PSA failure in men with clinically localized prostate cancer. *Urology*, 55, 2000, s. 572–577. – 7. **Feldman, B. J., Feldman, D.:** The development of androgen independent prostate cancer. *Nature. Rev. Cancer*, 1, 2001, s. 34–45. – 8. **Fernandez, P. L., Arce, Y., Ferre, X., et al.:** Expression of p27/Kip1 is down-regulated in human prostate carcinoma progression. *J. Pathol.*, 187, 1999, s. 563–566. – 9. **Grossmann, M. E., Juany, H., Tindall, D. J.:** Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J. Natl. Cancer Ind.*, 93, 2001, s. 1687–1697. – 10. **Guo, Y., Sklar, G. N., Borkowski, A., Kyprianou, N.:** Loss of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) protein in human prostate cancer correlates with tumor grade. *Clin. Cancer Res.*, 3, 1997, s. 2269–2274. – 11. **Jenster, G.:** The role of androgen receptor in the development and progression of prostate cancer. *Semin. Oncol.*, 26, 1999, s. 263–273. – 12. **Jenster, G.:** The role of the androgen receptor in the

development and progression of prostate cancer. *Semin. Oncol.*, 26, 1999, s. 407–421. – 13. **Pertschuk, L. P., Schaeffer, H., Feldman, J. G., et al.:** Immunostaining for prostate cancer androgen receptor in paraffin identifies a subset men with a poor prognosis. *Lab. Invest.*, 73, 1995, s. 302–305. – 14. **Prins, G. S., Sklarew, R. J., Pertschuk, L. P.:** Image analysis of androgen receptor immunostaining in prostate cancer accurately predicts response to hormonal therapy. *J. Urol.*, 59, 1998, s. 641–649. – 15. **Sadi, M. V., Walsh, P. C., Barrack, E. R.:** Immunohistochemical study of androgen receptors in metastatic prostate cancer. Comparison of receptor content and response to hormonal

therapy. *Cancer*, 67, 1991, s. 3057–3064. – 16. **Vis, A. N., Noordzij, M. A., Fitoz, K., Wildhagen, M. F., Schroder, F. H., van der Kast, T.H.:** Prognostic value of cell cycle proteins p27(Kip1) and MIB-1, and the cell adhesion protein CD44 in surgical treated patients with prostate cancer. *J. Urol.*, 164, 2000, s. 2156–2161.

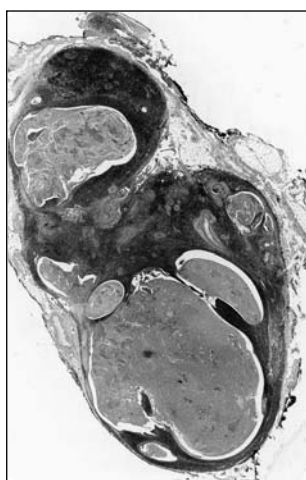
MUDr. Jana Dvořáčková
Na Nivách 23
700 30 Ostrava 3
Tel. 602 724 223, + 420 595 700 170,
e-mail: dvorackova@pathology.cz

JAKÁ JE VAŠE DIAGNÓZA?

Při běžném mamologickém screeningu 37leté ženy byla v zevním horním kvadrantu pravého prsu palpačně zjištěna rezistence přibližně 8 mm velká, elastické konzistence. Na mamogramu byly v ložisku popsány i hraniční mikrokalcifikace, proto byla navržena exstirpace útvaru. Anamnesticky se pacientka dosud s ničím závažným neléčila, pouze před půl rokem prodělala autonehodu s lehkým pohmožděním hrudníku. K vyšetření byla dodána kulovitá částice 10 mm v průměru, na řezu s drobnými vícečetnými cystami do průměru 2 mm (obr. 1). Mikroskopicky jde o intramamární lymfatickou uzlinu prostoupenou mnohočetnými různě velkými cystami, které jsou vystlané pravidelně vyžrávajícím dlaždicovým epitelem (obr. 2), místy i s dobře patrnou granu-

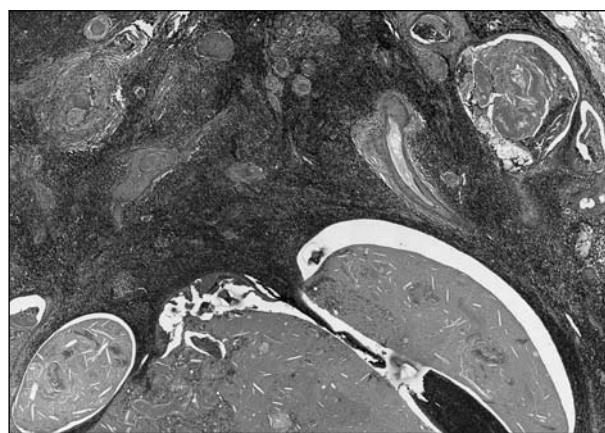
lární vrstvou (bez cytologických atypií, bez zvýšené mitotické aktivity) (obr. 3). Obsah cyst tvoří lamelárně uspořádané rohové hmoty a amorfní nekrotický materiál s cholesterolovými krystaly a dekomponovanou krví. Mezi cystami jsou v lymfatické tkáni v hojném počtu roztroušeny různé velké ostrůvky dlaždicového epitelu, ve kterých lze pozorovat náznak tricholemální, sebaceózní (obr. 4), či dokonce žlázové diferenciace. V parenchymu uzliny jsou ojedinělé mnohojaderné granulomy typu z cizích těles (patrně jako reakce na uvolněné rohové hmoty). Uzlina byla zpracována v celém rozsahu a nebyly nalezeny jiné tkáňové struktury ani mamograficky popísované calcifikace.

Odpověď na str. 154



1

2



3

4

