

ЗНАЧЕНИЕ МАРКЕРА АУТОФАГИИ LC3B В РЕЦИДИВЕ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПРОСТАТЫ

**Воронина Е.С.¹, Маслякова Г.Н.¹, Бучарская А.Б.¹, Наволокин Н.А.¹, Палатова Т.В.¹,
Медведева А.В.¹, Врабие Е.Е.¹, Руфина Ю.Р.¹**

¹ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, e-mail: Lenchicves@mail.ru

Аннотация. Цель исследования: изучить экспрессию маркера аутофагии LC3B у пациентов с диагнозом «аденокарцинома простаты» без признаков рецидива и с рецидивом после проведенной терапии. В исследовании участвовали 72 пациента с клиническим диагнозом «карцинома простаты». Материалом служила пункционная биопсия простаты до и после проведенной терапии. Все случаи поделили на две группы: в первую группу вошел материал от 42 человек без признаков рецидива; во вторую группу вошел материал от 30 мужчин с признаками продолженного роста опухоли после проведенной терапии. Терапия пациентам проводилась: высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком; комбинированными методами лечения - максимальной андрогенной блокадой и ультразвуковой аблацией; максимальной андрогенной блокадой и лучевой терапией. В обеих группах проводили иммуногистохимическое исследование с маркером аутофагального белка LC3B. В первой группе после лечения экспрессия LC3B отсутствовала в клетках карциномы, увеличивалась в стромальных клетках и эндотелии сосудов. Во второй группе после лечения значительно увеличивалась реакция с LC3B в опухолевых клетках, клетках стромы, эндотелии сосудов. Экспрессия LC3B не зависела от выбранного метода терапии. Аутофагия - это один из факторов, способствующий сохранению и выживанию клеток карциномы после терапии. Маркер аутофагии LC3B может использоваться в иммуногистохимической панели маркеров пациентов с аденокарциномой простаты для выявления и оценки рецидива.

Ключевые слова: аденокарцинома простаты, аутофагия, лечебный патоморфоз аденокарциномы, рецидив аденокарциномы.

SIGNIFICANCE OF AUTOPHAGY MARKER LC3B IN PROSTATE ADENOCARCINOMA RECURRENCE

**Voronina E.S., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Navolokin N.A., Palatova T.V.,
Medvedeva A.V., Vrabie E.E., Rufina Yu.R.**

Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky Ministry of Health of Russia, Saratov, e-mail: Lenchicves@mail.ru

Purpose of the study: to investigate the expression of the autophagy marker LC3B in patients diagnosed with prostate adenocarcinoma without signs of recurrence and with recurrence after therapy. 72 patients with a clinical diagnosis of prostate carcinoma participated in the study. The material was a puncture biopsy of the prostate before and after therapy. All cases were divided into two groups: the first group included material from 42 men without signs of recurrence, the second group included material from 30 men with signs of continued tumor growth after therapy. High-intensity focused ultrasound, combined treatment methods: maximal androgen blockade and ultrasound ablation; maximal androgen blockade and radiation therapy. Immunohistochemical study with autophagal protein marker LC3B was performed in both groups. In the first group after treatment, LC3B expression was absent in carcinoma cells and increased in stromal cells and vascular endothelium. In the second group, reaction with LC3B was significantly increased in tumor cells, stromal cells, and vascular endothelium after treatment. LC3B expression was independent of the chosen therapy method. Autophagy is one of the factors contributing to the preservation and survival of carcinoma cells after therapy. The autophagy marker LC3B can be used in an immunohistochemical panel of markers in patients with prostate adenocarcinoma to detect and evaluate recurrence.

Keywords: prostate adenocarcinoma, autophagy, therapeutic pathomorphosis of adenocarcinoma, recurrence of adenocarcinoma.

В настоящее время во всем мире возросло количество мужчин с диагнозом «аденокарцинома простаты» (АП). По данным авторов [1], у каждого пятого из них после терапии развивается рецидив. Механизмы адаптации клеток злокачественной опухоли к

лечению остаются до сих пор неизвестными. Аутофагия является, возможно, одним из факторов сохранения клеток карциномы после воздействия терапией. Процесс защиты опухолевых клеток основан на частичной деградаци и последующем восстановлении ее повреждения после терапии [2; 3]. В аутофагии участвует специальный белок LC3-II. При этом реализуется молекулярный механизм фагоцитоза, при котором мембраны фагосомы, за счет соединения с лизосомой, деградируют поврежденный компонент [4]. Аутофагия - это процесс, который осуществляет гомеостаз клетки. Клетки злокачественных опухолей в большей степени зависят от данного процесса, чем здоровые [5; 6]. В литературных источниках есть небольшое количество работ, где изучался маркер аутофагии как маркер прогноза АП [7], однако значение данного антитела в рецидиве остается мало изученным.

Цель исследования: изучить экспрессию маркера аутофагии LC3B у пациентов с диагнозом «аденокарцинома простаты» без признаков рецидива и с рецидивом после проведенной терапии.

Материалы и методы исследования

В исследовании, проведенном авторами, участвовали 72 пациента с клиническим диагнозом АП. Материалом служила пункционная биопсия простаты до и после проведенной терапии. Все случаи поделили на две группы: в первую группу вошел материал от 42 человек без признаков рецидива АП, во вторую группу вошел материал от 30 мужчин с признаками продолженного роста опухоли после проведенной терапии. Наличие рецидива подтверждали лабораторно уровнем простат-специфического антигена крови, результатами ультразвукового и биопсийного исследований. Пациенты первой группы получали различную терапию: 21 мужчина получал монотерапию высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком (HIFU), 11 мужчин получали гормональное лечение в виде максимальной андрогенной блокады и HIFU, 10 мужчин получали лучевую и гормональную терапии. Во вторую группу вошли 10 мужчин, получавших монотерапию HIFU, 10 мужчин после HIFU и гормональной терапии, 10 мужчин после лучевой и гормональной терапий. Рецидив АП подтверждался морфологическим исследованием. Материал для морфологического исследования проходил стандартный алгоритм изготовления гистологических стекол (фиксация, дегидратация, заливка в парафиновые блоки, изготовление тонких срезов на микротоме, депарафинизация, стандартная окраска гематоксилином и эозином. Иммуногистохимию делали с антителом Anti-LC3B antibody ab48394 (Rabbit polyclonal to LC3B, фирмы Abcam). Реакция данного маркера была в цитоплазме опухолевых клеток, клетках фиброзно-мышечной стромы простаты и стенке сосудов. В некоторых случаях положительная экспрессия данного антитела была в ядре. Для определения степени позитивной реакции с антителом использовали гистосчет (Hs).

Формула $H_s = \sum P \times i$,

где i - яркость полученного окрашивания от 0 до 3, P – процентное соотношение позитивных клеток и негативных.

Обработку полученных результатов авторы проводили с помощью прикладной программы SPSS 13.0 for Windows. Полученные показатели представлены в виде медианы с 25% и 75% квартилями, нормальность распределения выборки оценивали при помощи критерия Шапиро - Уилка. После проверки данных на нормальность распределения в дальнейшем использовали непараметрические методы. Для определения выраженности различий в полученных данных между группами мужчин с АП до и после терапии авторы применяли Т-критерий Вилкоксона. Значимость различия принималась при $T \leq 0,01$.

Результаты исследования

Медиана экспрессии антитела к LC3B в первой группе в клетках АП до терапии составляла $H_s=113$, что соответствует умеренной реакции. Данная экспрессия наблюдалась у всех пациентов данной группы, преимущественно возле клеточной мембраны в цитоплазме опухолевых клеток. Также у 7% пациентов данной группы до терапии была слабая реакция в ядрах клеток АП и цитоплазме стромальных клеток $H_s=52$. У 9% мужчин была слабая экспрессия LC3B в кровеносных сосудах. При морфологическом исследовании она отмечалась чаще всего в области эндотелия, медиана составляла $H_s=27$.

В данной группе пациентов после терапии высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком результаты иммуногистохимической реакции с LC3B: в клетках АП были отрицательными; в клетках стромы слабые - медиана $H_s=78$; в эндотелии сосудистой стенки слабые - медиана $H_s=57$ (рис. 1 А-В). После 26 мес. после HIFU-терапии у 10% пациентов отмечалась интенсивная очаговая внеклеточная экспрессия маркера аутофагии в строме (рис. 1Г).

В группе пациентов без рецидива после комбинированного лечения гормональной терапией и высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком (HIFU и МАБ) в клетках АП экспрессия маркера аутофагии была отрицательной у всех пациентов, в стромальных клетках и в стенке сосудов незначительной (медиана H_s 63 и 57 соответственно). После лучевой терапии и гормонального лечения реакция с аутофагальным белком в клетках карциномы отрицательная, а в клетках стромы и в стенке кровеносных сосудов слабой (медиана $H_s = 68$ и 40 соответственно).

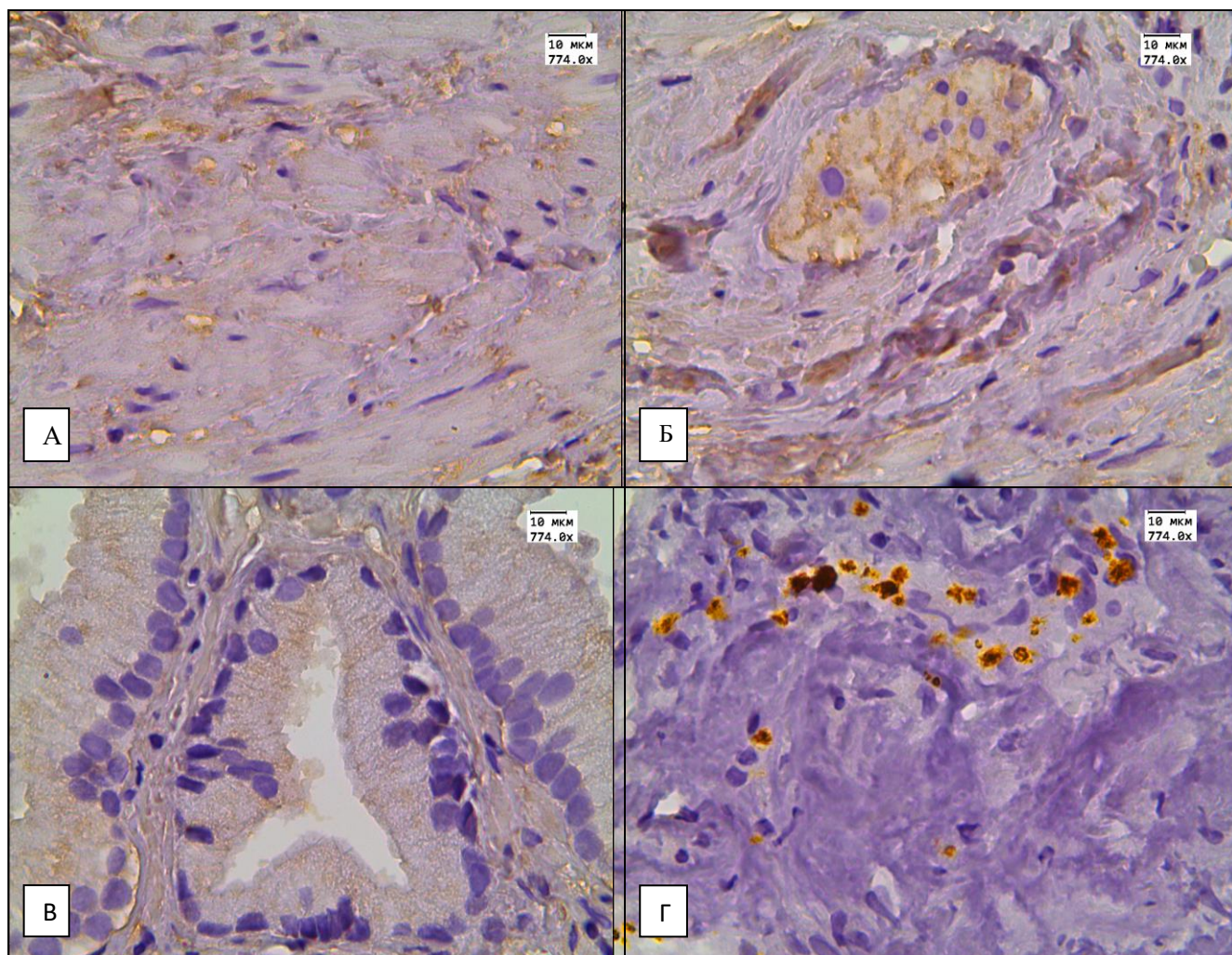


Рис. 1. Реакция с аутофагальным белком LC3B в группе пациентов без рецидива после терапии высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком и комбинированного лечения: А - LC3B в строме; Б - LC3B в цитоплазме эпителия и клетках стромы; В - LC3B в эпителии ацинарных клеток; Г - LC3B в мышечно-соединительнотканной строме после лечения NIFU. Ув. x774

При статистическом анализе данных иммуногистохимического исследования с аутофагальным белком после разных методов терапии АП критерий Вилкоксона показал, что экспрессия LC3B не зависела от выбранного метода лечения.

При изучении полученных результатов реакции аутофагального белка у пациентов в первой группе между зависимыми выборками (до и после терапии) Т-критерий Вилкоксона показал значимые отличия экспрессии в клетках АП, клетках стромы, в эндотелии сосудов ($T_{эмп} < T_{кр} (0,01)$).

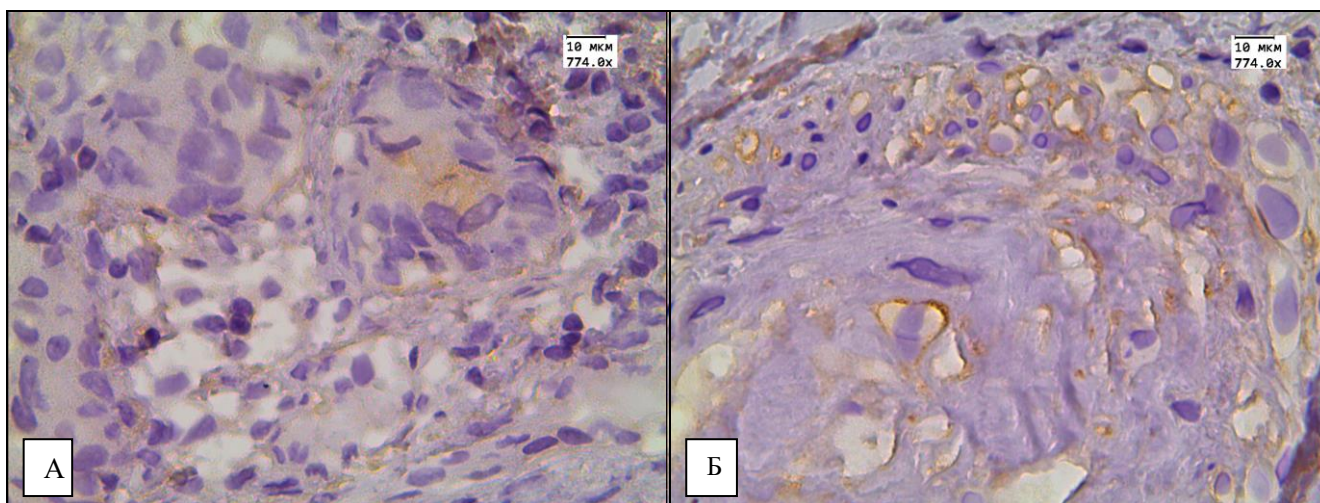


Рис. 2. Реакция маркера LC3B в АП с признаками рецидива после терапии высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком: А - экспрессия аутофагального белка в АП; Б - экспрессия аутофагального белка в АП и в строме. Ув. x774

При морфологическом исследовании биопсийного материала в группе с рецидивом АП медиана экспрессии в клетках опухоли до терапии составила $H_s=141$. Скопление аутофагального белка отмечалось чаще всего в периферической части цитоплазмы, у 93% пациентов. У 8,4% также слабая положительная экспрессия данного маркера отмечалась в ядрах АП. В строме простаты реакция маркера аутофагии была слабой, $H_s=35$, авторами она наблюдалась у 14% пациентов с АП. В сосудистой стенке реакция с маркером аутофагии была слабой и локализовалась в области эндотелия, $H_s=25$ у 9% пациентов.

Во второй группе после проведенного лечения высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком медиана цитоплазматической экспрессии LC3B в АП составила $H_s=279$ и отмечалась у 100% пациентов (рис. 2 А, Б). В этой же группе в стромальных клетках медиана экспрессии маркера составляла $H_s=135$, а в стенке сосуда $H_s=30$. У пациентов после проведенного лечения андрогенной блокадой и HIFU-терапией в клетках АП медиана экспрессии была выраженной - $H_s=261,5$. Данная реакция была положительной у всех пациентов в цитоплазме, а в 72% случаев еще и в ядрах опухолевых клеток (рис. 3 А, Б). В клетках стромы реакция с маркером LC3B составила $H_s=109$, а в эндотелии сосудистой стенки $H_s=52,5$ (рис. 3 А, Б).

После проведенного лечения АП андрогенной блокадой и лучевой терапией медиана экспрессии маркера аутофагии в опухолевых клетках составила $H_s=271$. Данная экспрессия у всех пациентов была цитоплазматической, а в 87% ядерной. Медиана экспрессии данного маркера в строме составила $H_s=129$, в эндотелии сосудов $H_s=42$.

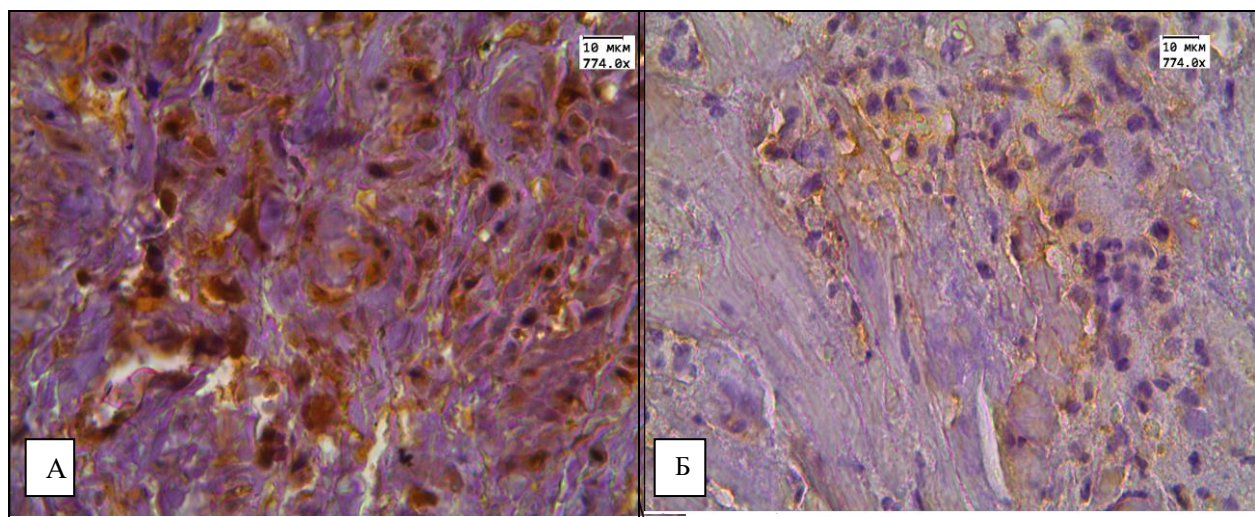


Рис. 3. Реакция маркера LC3B у пациентов второй группы в АП после комбинированной терапии: А - LC3B в АП; Б - LC3B в АП и клетках стромы. Ув. х774

У всех пациентов маркер LC3B был в цитоплазме клеток, а если проводилось лечение андрогенной блокадой и высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком или андрогенной блокадой и лучевой терапией, в клетках АП отмечалась еще и ядерная экспрессия.

При анализе полученных данных авторами было отмечено, что выраженность аутофагии в простате не зависела от метода выбранной терапии, критерий Вилкоксона находился вне зоны значимости.

При статистическом изучении результатов иммуногистохимического исследования с аутофагальным белком у мужчин в группе с рецидивом между двумя выборками (до и после терапии) Т-критерий Вилкоксона показал различия в клетках карциномы ($T_{эмп} < T_{кр}(0,01)$) и в стромальных клетках ($T_{эмп} < T_{кр}(0,01)$) (табл.).

Реакция LC3B в биопсийном материале пациентов с рецидивом и без рецидива АП

Реакция с LC3B (Hs)	При комплексном исследовании не был выявлен рецидив АП		При комплексном исследовании был выявлен рецидив АП	
	до терапии Me [25;75]	после терапии Me [25;75]	до терапии Me [25;75]	после терапии Me [25;75]
В опухолевой ткани	112,5*[111;116]	0*	151,5*[130;161]	258*[249;291]
В строме	48*[42;52,5]	79*[68;82,5]	33*[30,5;54]	121*[101;129]
В стенке сосудов	25*[18;37,5]	55*[42,5;58]	24,5[18,5;35]	43[29;61]

* - значимое различие в группах у пациентов до и после терапии $T_{эмп} < T_{кр}(0,01)$.

Антитело LC3В экспрессируется в клетках АП. Данные показатели совпадают с другими авторами [8]. В данном исследовании авторы отмечают умеренную цитоплазматическую экспрессию маркера LC3В в АП до лечения.

В биопсийном материале простат у мужчин в первой группе после лечения авторами отмечались признаки регенерации в мышечно-соединительнотканной строме и в эндотелии сосудов. Это проявлялось в виде экспрессии маркера аутофагии в данных локализациях. Так как у пациентов данной группы не было признаков рецидива АП, в опухолевой ткани реакция с маркером LC3В отрицательная. У второй группы пациентов авторы отмечали значимое увеличение маркера LC3В в клетках АП и в клетках мышечно-соединительнотканной стромы после лечения. У пациентов с признаками рецидива позитивная окраска к аутофагальному белку в ядрах клеток карциномы отмечалась только при комбинированной терапии: андрогенная блокада + высокоинтенсивный сфокусированный ультразвук, андрогенная блокада + лучевая терапия. Наиболее вероятно, это связано с тем, что рецепторы к андрогенам локализуются в ядрах клеток [9].

В обеих исследуемых группах пациентов выбор метода лечебного воздействия не влиял на интенсивность реакции с маркером LC3В.

В группе пациентов с рецидивом АП в раковых клетках резко увеличивалась интенсивность аутофагии, вероятно, это связано с тем, что клетки опухоли после воздействия на них пытаются восстановиться и выжить за счет аутофагии. В настоящее время много авторов изучает значение аутофагии в сохранении клеток опухоли после терапии [10], однако авторы не нашли работ, изучающих роль аутофагии в рецидиве АП.

Таким образом, при морфологическом изучении биопсийного материала пациентов с АП после проведенной терапии маркер аутофагии может быть применен как прогностический маркер рецидива [3; 11].

Заключение

Аутофагия - это один из факторов, способствующий сохранению и выживанию клеток АП после терапии. Маркер аутофагии LC3В может использоваться в иммуногистохимической панели маркеров пациентов с АП для выявления и оценки рецидива.

Список литературы

1. Zachary A., Glaser and Soroush Rais-Bahrami. Fluciclovine positron emission tomography in the setting of biochemical recurrence following local therapy of prostate cancer // *Translational Andrology and Urology*. 2018. Vol. 7(5). P. 824–830. DOI: 10.21037/tau.2018.07.17.

2. Giatromanolaki A., Sivridis E, Mendrinou S., Koutsopoulos A.V., Koukourakis M.I. Autophagy proteins in prostate cancer: Relation with anaerobic metabolism and Gleason score // Urologic oncology. 2014. Vol. 32. Is. 1. P. 39. DOI: 10.1016/j.urolonc.2013.04.003.
3. Wei Jing Liu, Lin Ye, Wei Fang Huang, Lin Jie Guo, Zi Gan Xu, Hong Luan Wu, Chen Yang, Hua Feng Liu. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation // Cellular & Molecular Biology Letters An International Journal. 2016. Vol. 21. P. 29. DOI: 10.1186/s11658-016-0031-z.
4. 4.Schläfli A.M., Berezowska S., Adams O., Langer R., Tschan M. Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in formalin fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry // European Journal of Histochemistry. 2015. Vol.59. P.2481. DOI: 10.4081/ejh.2015.2481
5. White E., Mehnert J. M., Chan Clin C.S. Autophagy, Metabolism and Cancer // Cancer Res. 2015. Vol. 21 (22). P.5037-46. DOI: 10.1158/1078-0432.
6. Schläfli A.M., Berezowska S., Adams O., Langer R., Tschan M.P. Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in formalin fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry // European Journal of Histochemistry. 2015. Vol. 59. P.2481. DOI: 10.4081/ejh.2015.2481.
7. Niklaus M., Adams O., Berezowska S., Zlobec I., Graber F., Slotta-Huspenina J., Nitsche U., Rosenberg R., Tschan M.P., Langer R. Expression analysis of LC3B and p62 indicates intact activated autophagy is associated with an unfavorable prognosis in colon cancer // Oncotarget. 2017. Vol.8(3)3. P. 54604-54615. DOI: 10.18632/oncotarget.17554.
8. Mortezaei A., Salemi S., Rupp N.J., Rüschoff J.H., Hermanns T., Poyet C., Randazzo M., Simon H.-U., Moch H., Sulser T., Eberli P.W., Negative D. LC3b immunoreactivity in cancer cells is an independent prognostic predictor of prostate cancer specific death // Oncotarget. 2017. Vol. 8 (19). P. 31765-31774. DOI: 10.18632/oncotarget.15986.
9. Воронина Е.С., Маслякова Г.Н., Медведева А.В., Бучарская А.Б. Лечебный патоморфоз аденокарциномы простаты через 3 месяца после максимальной андрогенной блокады // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 4. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26608> (дата обращения: 17.01.2024).
10. Hashimoto D., Bläuer M., Hirota M., Ikonen N.H., Sand J., Laukkanen J. Autophagy is needed for the growth of pancreatic adenocarcinoma and has a cytoprotective effect against anticancer drugs // Eur. J. Cancer. 2014. Vol. 50(7). P. 1382-90. DOI: 10.1016/j.ejca.2014.01.011.
11. Воронина Е.С., Фомкин Р.Н., Бучарская А.Б., Палатова Т.В., Маслякова Г.Н., Фомкина О.А. Тканевая экспрессия аутофагического маркера LC3B как потенциальный биомаркер рецидива рака предстательной железы после лечения высокоинтенсивным

сфокусированным ультразвуком (пилотное исследование) // Онкоурология. 2023. № 19(2). С. 47–55. DOI: 10.17650/1726-9776-2023-19-2-47-55.