

ANDROGENOVÝ RECEPTOR, PROLIFERACE, APOPTÓZA A DIFERENCIACE U PROSTATICKEHO KARCINOMU: KORELUJE POUZE RECEPTOR S NÁDOROVOU PROLIFERACÍ

ANDROGEN RECEPTOR, PROLIFERATION, APOPTOSIS AND DIFFERENTIATION IN PROSTATE CANCER: CORRELATION BETWEEN ANDROGEN RECEPTOR AND PROLIFERATION ONLY.

VAGUNDA V., JANDÁKOVÁ E., VERMOUSEK I., ROVNÝ A.*, ROVNÝ F.*, DOROCIÁK F., KREJČÍ E.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO
*FAKULTNÍ NEMOCNICE U SVATÉ ANNY, BRNO

Souhrn: *Východiska:* U prostatického karcinomu jsou v centru pozornosti proliferačně-apoptotické prediktivní a prognostické faktory ve vztahu k androgenovému receptoru (AR). *Typ studie a soubor:* Provedli jsme retrospektivní studii na souboru 52 prostatických karcinomů. *Metody a výsledky:* Imunohistochemicky jsme stanovili expresi proliferačních markerů PCNA a Ki-67, dále proteinů bcl-2, c-MYC, p-glykoproteinu a AR, kde byla také použita biochemická ligand-saturační analýza. Spearmanovým testem jsme určili vzájemné statistické korelace se zahrnutím podskupin podle použité předoperační hormonální terapie. Nalezli jsme pouze korelaci mezi obsahem AR zjištěným biochemickou metodou a expresí Ki-67 proteinu. U bcl-2 a c-myc jsme neprokázali souvislost s proliferací ani s diferenciací karcinomu prostaty. *Závěry:* Nálezy ukazují, že AR se podílí na řízení proliferace prostatického karcinomu a nesoúvisí přímo s apoptózou.

Klíčová slova: Androgenový receptor, proliferace, apoptóza, karcinom prostaty, p-glykoprotein, korelace

Abstract: *Backgrounds:* Proliferative-apoptotic predictive and prognostic factors are explored in prostatic carcinoma in relation with androgen receptor (AR). *Design and subjects:* We tested 52 prostatic carcinomas obtained by radical prostatectomy in a retrospective study. *Methods and results:* Immunohistochemistry was used for detecting AR, bcl-2, c-myc, p-glycoprotein, PCNA and Ki-67 proteins. For AR, biochemical dextran charcoal method was used as well. By Spearman's rank test, we found correlation only between AR and Ki-67. For apoptosis related proteins bcl-2 and c-myc we did not find correlations with proliferation or differentiation of prostatic carcinoma. *Conclusions:* The results suggest that AR plays role in proliferation control but is not directly related to frequency of apoptosis in prostatic carcinoma.

Keywords: Androgen receptor, proliferation, apoptosis, prostate cancer, p-glycoprotein, correlation

Úvod

Expresí proliferačních antigenů a proteinů zúčastněných v procesu apoptózy u karcinomu prostaty se zkoumá s ohledem na jejich prognostickou či prediktivní hodnotu¹⁻⁵.

Proliferace je základní parametr který je stanovován u různých nádorů v souvislosti s určením stupně jejich malignity. Kromě mitotického indexu jsou stanovovány především proteiny PCNA a Ki-67¹²⁻¹⁵. Ne vždy je u nádorů prokázána korelace exprese těchto proteinů, kromě toho absolutní hodnoty PCNA pozitivitivity jsou vyšší. Zkoumá se rovněž, zda proliferace koreluje s expresí androgenového receptoru (AR) a s frekvencí apoptóz. Role androgenového receptoru není zcela jasná. Některé práce prokazují jeho souvislost s diferenciací karcinomu prostaty a prognostický význam intenzity jeho exprese, jiné nenalezly souvislost s grade, stadiem nebo prognózou nádoru. Na rozdíl od jiných nádorů, jako je například karcinom prsu nebo endometria, není role steroidních receptorů u karcinomu prostaty v současné době objasněna^{1-5, 16-24}.

Vzhledem k tomu, že androgeny kontrolují růst prostatické tkáně a při blokování jejich působení dochází k masívní apoptóze buněk tkáně prostaty, je možné očekávat asociaci exprese androgenového receptoru s některými proteiny, zúčastněnými v procesu apoptózy¹⁸. Z proteinů zúčastněných v procesu apoptózy jsou důležité bcl-2 a c-myc⁶⁻¹¹. P-glykoprotein (pGp) je transmembránový glykoprotein, kte-

rý je častou příčinou multirezistence nádoru k chemoterapii. Rovněž je užíván jako marker diferenciací některých nádorů^{25, 26}.

Hlavním cílem naší práce bylo stanovení proliferace a apoptózy (nepřímou detekcí bcl-2 proteinu) u karcinomu prostaty, stanovení jejich vzájemné korelace a závislosti na expresi AR, c-myc, gradu nádoru, expresi pGp a různých typech předoperační hormonální terapie.

Materiál a metody

Biopický materiál byl získán radikálními prostatektomiemi. Do studie bylo zařazeno 52 pacientů. Soubor jsme rozdělili na tři skupiny podle použité předoperační terapie. 15 pacientů bylo bez terapie, u 26 byla použita metoda totální androgenní blokády (TAB), což je použití analogu LH-RH a antiandrogenu. U 11 pacientů byla použita jen antiandrogenní terapie (podávání samotného antiandrogenu). Jako analog LH-RH byl použit tiporelin nebo leuprorelin, jako antiandrogen flutamid nebo bicalutamid.

Materiál byl zpracován standardní technikou - formalínovou fixací a zalitím bloků do parafínu. Části tumoru byly odděleny ještě před fixací a po homogenizaci v nich byla stanovena koncentrace androgenového receptoru (AR) biochemickou ligand-saturační analýzou. K vyhodnocení byly použity vzorky odebrané z těsné blízkosti reprezentativního bloku, určeného pro imunohistochemická barvení.

Imunohistochemie byla provedena na rehydratovaných tkáňových řezech. K detekci byl použit imunoperoxidázový ABC detekční kit firmy Novocastra. U antigenů AR, Ki-67, PCNA, bcl-2 a pGp byla použita metoda tepelné revitalizace mikrovláknou troubou, u c-MYC byla užita pro revitalizaci antigenu proteináza K.

Jako primární protilátky byly použity: monoklonální myší protilátka proti AR F39.4.1 firmy Novocastra, polyklonální králičí protilátka proti AR sc-816 firmy Santa Cruz, monoklonální myší protilátky Ki67-MIB1 (Biogenex), Ki67-MM1, bcl-2, pGp, cMYC a PCNA-PC10 (vše Novocastra)

Jako imunohistochemicky pozitivní jsme hodnotili intenzivní hnědé zbarvení (podle použité protilátky nukleární či plazmatické) v místech s maximem pozitivitu. Dále jsme semikvantitativně v % vyhodnocovali pozitivitu AR, Ki67, pGp a PCNA a semikvantitativně od – do ++++ pozitivitu bcl-2 a c-MYC.

AR byl dále stanoven biochemickou ligand saturační analýzou na tkáňovém homogenátu pomocí 3H-methyltrienolonu. Výsledky jsou udány v fmol/mg tkáňě.

Ke statistickému vyhodnocení výsledků jsme použili Spearmanův test korelace pořadí a χ^2 test.

Výsledky

V celém souboru korelovaly signifikantně hodnoty AR zjištěné biochemicky a imunohistochemicky za použití monoklonální protilátky ($r = 0,32$; $p = 0,02$) a rovněž hodnoty zjištěné imunohistochemicky za použití dvou různých protilátek ($r = 0,39$; $p = 0,002$)²⁷. Dále korelovaly hodnoty imunohistochemické pozitivitu Ki-67 a Ki-67-MIB-1 ($r = 0,61$; $p < 0,0001$) a také množství AR zjištěné biochemicky a pozitivita Ki-67-MIB-1 ($r = 0,33$; $p = 0,02$). Korelace pozitivitu bcl-2 a MIB-1 byla na hranici signifikance ($r = 0,28$; $p = 0,05$).

Ve skupině léčené TAB korelovaly signifikantně hodnoty stanovené protilátkami Ki-67 a MIB-1 ($r = 0,69$; $p = 0,002$), dále množství AR stanovené biochemickou metodou a Ki-67 ($r = 0,61$; $p = 0,006$), množství AR stanovené biochemicky a MIB-1 ($r = 0,53$; $p = 0,02$), negativně koreloval grade nádoru podle Gleasona a hodnoty PCNA ($r = -0,53$; $p = 0,02$), na hranici signifikance byly korelace imunohistochemických pozitivit AR za použití monoklonální protilátky a Ki-67 ($r = 0,43$; $p = 0,05$), resp. MIB-1 ($r = 0,45$; $p = 0,04$).

Ve skupině léčené antiandrogenní terapií (AAT) korelovala negativně imunohistochemická pozitivita AR (monoklonální protilátka) a exprese MIB-1 ($r = -0,9$; $p = 0,01$), na hranici signifikance byla korelace Ki-67 a MIB-1 ($r = 0,78$; $p = 0,04$) a dále negativní korelace exprese c-MYC a množství AR stanoveného biochemicky ($r = -0,7$; $p = 0,05$).

Ve skupině bez preoperační terapie korelovala signifikantně pozitivita Ki-67 a MIB-1, na hranici signifikance byla korelace MIB-1 a imunohistochemická pozitivita AR stanovená polyklonální protilátkou ($r = 0,85$; $p = 0,04$).

Diskuse

Při hodnocení proliferace se projevila absence korelace imunohistochemických pozitivit PCNA a Ki-67. Tyto proteiny jsou užívány často jako markery proliferace a z našich výsledků je zřejmé, že v jejich expresi u prostatického karcinomu není žádná souvislost. V dřívějších studiích sice byla nalezena korelace mitotického indexu s PCNA a Ki-67, ale s lepšími výsledky pro Ki-67. Proto je Ki-67 považován za marker, který více odpovídá intenzitě proliferace ve tkáni. Tento protein je exprimován v kratší části buněčného cyklu než PCNA. Navíc má PCNA delší poločas rozpadu a je exprimován nejen během proliferace, ale také při opravě poškozené DNA. Dalším problémem jsou technické obtíže, především

vyšší pozadí při stanovení PCNA. Z metodického hlediska nejsou překvapivé korelace Ki-67 a Ki-67-MIB, v případě neshody bychom museli uvažovat o chybě v technickém postupu.

Inverzní korelace exprese PCNA a nádorového grade ve skupině léčené TAB má nejasný význam. Náhodný výsledek zde nepravděpodobný a pravděpodobně jde o souvislost s typem hormonální terapie.

Korelace imunohistochemických pozitivit AR zjišťovaných použitím dvou různých protilátek byly očekávané. Zjistili jsme vyšší specifitu monoklonální protilátky, kterou tedy lze doporučit pro další studie²⁷.

Korelace proliferčních antigenů Ki-67 s koncentrací androgenového receptoru stanovenou ligand-saturační analýzou se objevuje u celého souboru i v jednotlivých podskupinách. Pravděpodobně jde o regulační vliv AR na proliferaci, ovšem pro potvrzení této hypotézy by bylo třeba dalších studií. Vzhledem k tomu, že tato závislost byla nalezena jen u biochemického stanovení AR, může jít o souvislost s poměrem mezi volnými a obsazenými AR, s mutacemi AR nebo o vliv dosud neznámého faktoru.

Co se týče bcl-2 proteinu jako antiapoptického faktoru, překvapivě jsme nezaznamenali korelaci s žádným z vyšetřovaných proteinů, kromě korelace s expresí Ki-67-MIB-1 v celém souboru. Pokládáme ji spíše za náhodný výsledek vzhledem k nízkému korelačnímu koeficientu a hraniční hladině významnosti, protože se na rozdíl od celého souboru podobný výsledek neobjevuje ani u jedné z podskupin. Nález by znamenal inverzní korelaci apoptózy a proliferace. Mohlo by tedy jít o specifický nález odlišný od jiných tumorů, například lymfomů či mamárního karcinomu, kde prokazatelně kladně koreluje mitotický a apoptotický index.

Co se týče výsledků u různých podskupin podle použité terapie, výrazné rozdíly jsme zachytili jen u stanovení AR²⁷. U jiných markerů jsme nenalezli signifikantní rozdíly. Bylo by vhodné podobnou studii zopakovat na větším souboru případů, protože některé ze skupin neměly dostatečnou velikost pro spolehlivou statistickou analýzu. Konečným výsledkem by mělo být stanovení nezávislých prognostických faktorů, to ovšem bude možné až po dlouhodobém sledování celého souboru a vyhodnocení intervalů bezpříznakového přežití a celkového přežití.

Inverzní korelace exprese PCNA a nádorového gradu ve skupině léčené TAB naznačuje, že je možná souvislost mezi proliferací a diferenciací nádoru, kdy použitý Gleasonův grade je založen na diferenciaci a růstové charakteristice nádoru, bez zřetele k proliferaci¹². Pravděpodobně se však týká jen dané podskupiny a souvisí s určitým typem hormonální terapie. U pGp jako markeru diferenciaci, exprese nekoreluje s apoptózou ani proliferací. Jeho význam pro praxi se tedy omezuje na predikci účinku specifické chemoterapie.

U c-myc nebyla nalezena, byť literárně citovaná, korelace s apoptózou ani proliferací, což potvrzuje i jinde uváděný duálně funkční typ tohoto onkogenu a naopak zatím nepodporuje terapeutické implikace, které by se mohly hledat jen v úzce vymezených podskupinách nádoru.

Závěr

Další studie by se měly zaměřit na zkoumání souvislostí proliferace a apoptózy z hlediska detekce apoptotických figur, stanovení apoptotického a mitotického indexu a jejich korelací s expresí bcl-2, p53, c-myc a dalších proteinů souvisejících s apoptózou. V centru dalšího výzkumu také zůstává ověření prognostického významu kombinovaných proliferace-apoptotických indexů, včetně indexu apoptóza plus mitóza.

Studie byla podpořena grantem č. 301/96/K047 Grantové agentury České republiky, grantem Interní grantové agentury MZ ČR č. 2922-3, darem Kanadského velvyslanectví v Praze z výtěžku Běhu Terryho Foxe a firmou Ferring-Léčiva a.s. Praha. Autoři děkují za spolupráci paní Libuši Rašovské, Heleně Bursové a Evě Mikoškové.

Literatura

1. 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* 1998 Mar;159:641-649.
2. Pertschuk, L. P., Schaeffer, H., Feldman, J. G., Macchia, R. J., Kim, Y. D., Eisenberg, K., Braithwaite, L. V., Axiotis, C. A., Prins, G., Green, G. L. Immunostaining for Prostate Cancer Androgen Receptor in Paraffin Identifies a Subset Men With a Poor Prognosis. *Lab Invest* 1995 Aug;73:302-305.
3. 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* 1991 Jun 15;67:3057-3064.
4. Takeda, H., Akakura, K., Masai, M., Akimoto, S., Yatani, R., Shimazaki J. Androgen Receptor Content of Prostate Carcinoma Cells Estimated by Immunohistochemistry is Related to Prognosis of Patients with Stage D2 Prostate Carcinoma. *Cancer*, 77:934-40, 1996 Mar.
5. Sadi MV, Barrack ER. Androgen Receptors and Growth Fraction in Metastatic Prostate Cancer as Predictors of Time to Tumour Progression After Hormonal Therapy. *Cancer Surv* 1991;11:195-215.
6. Matsushima H., Hosaka Y., Suzuki M., Mizutani T., Ishizuka H., Kawabe K. Bcl-2 Expression on Prostate Cancer and Its Relationship to Cell Cycle and Prognosis. *Int J Urol*, 3:113-7, 1996 Mar.
7. Lipponen P., Vesalainen S. Expression of The Apoptosis Suppressing Protein bcl-2 In Prostatic Adenocarcinoma Is Related to Tumor Malignancy. *Prostate*, 32:9-15, 1997 Jun 15.
8. Bubendorf L., Sauter G., Moch H., Jordan P., Blöchliger A., Gasser TC., Mihatsch MJ. Prognostic Significance of Bcl-2 In Clinically Localized Prostate Cancer. *Am J Pathol*, 148:1557-65, 1996 May.
9. Bauer JJ., Sesterhenn IA., Mostofi FK., McLeod DG., Srivastava S., Moul JW. Elevated Levels of Apoptosis Regulator Proteins p53 and Bcl-2 Are Independent Prognostic Biomarkers in surgically treated clinically localized prostate cancer. *J Urol*, 156:1511-6, 1996 Oct.
10. Moul JW., Bettencourt MC., Sesterhenn IA., Mostofi FK., McLeod DG., Srivastava S., Bauer JJ. Protein Expression of p53, bcl-2, and Ki-67 (MIB-1) as Prognostic Biomarkers in Patients With Surgically Treated, Clinically Localized Prostate Cancer. *Surgery*, 120:159-66; discussion 166-7, 1996 Aug.
11. Theodorescu D., Broder SR., Boyd JC., Mills SE., Frierson HF Jr. P53, bcl-2 and Retinoblastoma Proteins as Long-term Prognostic Markers in Localized Carcinoma of The Prostate. *J Urol*, 158:131-7, 1997 Jul.
12. Botticelli AR, Casali AM, Botticelli L, Zaffe D. Immunohistochemical Detection of Cell-cycle Associated Markers on Paraffin Embedded and Formalin Fixed Needle Biopsies of Prostate Cancer: Correlation of p120 Protein Expression With AgNOR, PCNA/cyclin, Ki-67/MIB1 Proliferation-scores and Gleason Gradings. *Eur J Histochem* 1998;42(1):41-8.
13. Golusinski W, Szmeja Z, Olofsson J, Biczysko W, Krygier-Stojalowska A, Majewski P. Retrospective Analysis of Selected Tumor Markers (p53, PCNA, Ki67; DNA ploidy) and Ultrastructure in Patients With Larynx Carcinomas *HNO* 1998 Mar;46(3):233-40. McLeod DG. Hormonal Therapy in the Treatment of Carcinoma of the Prostate. *Cancer* 1995;75:1914-9
14. Carson HJ, Reddy V, Taxy JB. Proliferation Markers and Prognosis in Merkel Cell Carcinoma. *J Cutan Pathol* 1998 Jan;25(1):16-9.
15. Aranda FI, Laforga JB. Cellular Proliferation in Breast Ductal Infiltrating Carcinoma. Correlation With Clinical and Histopathological Variables. *Pathol Res Pract* 1997;193(10):683-8.
16. Graham SD, Keane TE, Petros JS, Sanders WH. Perioperative Hormonal Therapy in Locally Advanced Adenocarcinoma of the Prostate. *Cancer* 1995;75:1969-71.
17. Van der Kwast TH, Tetu B, Fradet Y, Dupont A, Gomez J, Cusan L, Diamond P, Labrie F. Androgen Receptor Modulation in Benign Human Prostatic Tissue and Prostatic Adenocarcinoma During Neoadjuvant Endocrine Combination Therapy. *Prostate* 1996 Apr;28:227-231.
18. Honn KV, Aref A, Chen YQ, Cher ML, Crissman JD, Forman JD, Gao X, Gringon D, Hussain M, Porter AT, Pontes JE, Powell I, Redman B, Sakr W, Severson R, Tang DG, Wood DP. Prostate Cancer. Old Problems and New Approaches. *Path Onc Res* Vol 2 No3, 1996 191-211.
19. Brolin J, Skoog L, Ekman P. Immunohistochemistry and Biochemistry in Detection of Androgen, Progesterone and Estrogen Receptors in Benign and Malignant Human Prostatic Tissue. *Prostate* 1992; 20: 281-295.
20. Montie JE. Staging of Prostate Cancer. Current TNM Classification and Future Prospects for Prognostic Factors. 1995;75:1814-8.
21. Miyamoto KK, McSherry SA, Dent GA, Sar M, Wilson EM, French FS, Sharief Y, Mohler JL. Immunohistochemistry of the Androgen Receptor in Human Benign and Malignant Prostate Tissue. *J Urol* 1993 May;149:1015-101.
22. Cohen RJ., Cooper K., Haffejee Z., Robinson E., Becker PJ. Immunohistochemical Detection of Oncogene Proteins and Neuroendocrine Differentiation in Different Stages of Prostate Cancer. *Pathology*, 27:229-32, 1995 Jul.
23. Leav I, McNeal JE, Kwan PW, Komminoth P, Merk FB. Androgen Receptor Expression in Prostatic Dysplasia (Prostatic Intraepithelial Neoplasia) in The Human Prostate: An Immunohistochemical And In Situ Hybridization Study. *Prostate* 1996 Sep;29(3):137-45.
24. Chen CT, Gan Y, Au JL, Wientjes MG. Androgen-dependent and -independent Human Prostate Xenograft Tumors as Models For Drug Activity Evaluation. *Cancer Res* 1998 Jul 1;58(13):2777-83.
25. Stavrovskaya A, Turkina A, Sedyakhina N, Stromskaya T, Zabolina T, Khoroshko N, Baryshnikov. A Prognostic Value of P-glycoprotein and Leukocyte Differentiation Antigens in Chronic Myeloid Leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998 Feb;28(5-6):469-82.
26. Molnar J, Szabo D, Mandi Y, Mucsi I, Fischer J, Varga A, Konig S, Motohashi N. Multidrug Resistance Reversal in Mouse Lymphoma Cells by Heterocyclic Compounds. *Anticancer Res* 1998 Jul-Aug;18(4C): 3033-8.
27. Vagunda V., Pochmon D., Vermousek I., Jandáková E., Rovný F., Rovný A.: Assesment of androgen receptor in prostatic carcinoma: good correlation between immunohistochemical and biochemical methods. *Arch. anat. cytol. path.clin. exp. path.* Vol. 46, no 5-6, p.436.