

На правах рукописи

Кудрявцев Георгий Юрьевич

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ
KI-67, P53, NOTCH1 И NANOG В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ
ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ РАЗЛИЧНЫХ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ
ГРУПП**

14.03.02 – патологическая анатомия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена на кафедре патологической анатомии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» г. Москва

Научный руководитель:

Бабиченко Игорь Иванович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Официальные оппоненты:

Андреева Юлия Юрьевна - доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ДПО Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России

Мальков Павел Георгиевич - доктор медицинских наук, доцент, заведующий отделом клинической патологии Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита диссертации состоится «22» декабря 2021 года в 12:00 на заседании диссертационного совета ПДС 0300.006 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Макля, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Макля, д. 6; сайт <http://dissovet.rudn.ru>).

Автореферат размещен на сайте www.vak.ed.gov.ru

Автореферат разослан «___» ноября 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

ПДС 0300.006

В.А. Горячев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Ежегодно в мире диагностируется около 1,6 млн новых случаев рака предстательной железы, что делает данную форму онкологии одной из самых распространенных среди мужского населения [Pernar S.H et al., 2018]. Парадоксальным является тот факт, что, несмотря на столь высокое распространение, смертность от РПЖ (рак предстательной железы) относительно невысока, а усредненные показатели 5-летней выживаемости в развитых странах достигают 98% [Rawla P., 2019]. Этот факт можно объяснить широким распространением ранней диагностики, позволяющей выявить заболевание на этапе локализованной формы, совершенствованием терапевтических подходов к лечению, а также применением радикального хирургического пособия в случаях подтвержденного диагноза. Однако немаловажную роль играет сама опухолевая гетерогенность: различные варианты РПЖ могут характеризоваться абсолютно разным прогнозом и ответом на лечение. Эти обстоятельства побуждают медицинское сообщество разрабатывать как можно более гибкие системы разделения пациентов на группы для выбора максимально эффективной и при этом наименее травматичной лечебной тактики.

Широко распространенные системы стратификации риска прогрессирования и, зачастую, рецидива, подтвержденные многоцелевыми рандомизированными исследованиями, основаны в первую очередь на оценке гистологического строения опухоли (оценка по Глиссону), концентрации ПСА (простатспецифический антиген) и клинической стадии заболевания. В последнее время в качестве прогностических маркеров также были предложены такие параметры, как процент биоптатов с наличием опухоли и наличие «положительного» края резекции при операции РПЭ (радикальной простатэктомии) [Ceylan S. et al., 2016].

Иммуногистохимическая техника занимает важную роль в морфологической диагностике рака предстательной железы, причем относительно широко применяются именно диагностические маркеры, такие как антитела к PSA, высокомолекулярным цитокератинам, AMACR, P63, позволяющие с высокой точностью определять опухолевые клетки при неоднозначных результатах гистологического исследования [Попов С.В и др., 2018]. Несмотря на это, роль иммуногистохимического исследования в качестве прогностической модели остается весьма ограниченной. В связи с этим, особый интерес представляют работы, направленные на исследование различных сигнальных путей в клетках рака предстательной железы с последующим клиничко-морфологическим сопоставлением полученных данных и оценкой перспективы использования антител к отдельным белкам в качестве прогностических факторов неблагоприятного течения рака предстательной железы.

Степень разработанности темы

Исследований, посвящённых изучению прогностической ценности различных белков и сигнальных путей в клетках рака предстательной железы, относительно немного. Наиболее полно представлены данные об особенностях экспрессии Ki-67 в клетках рака предстательной железы. Многими авторами была показана прямая корреляция между степенью выраженности экспрессии данного белка и наличием перинеуральной инвазии, экстрапростатического распространения, поздней клинической стадией опухоли, а также возникновением рецидива [Richardson E. et al., 2017; Tretiakova M.S. et al., 2016], что позволяет говорить о данном белке как о надёжном индикаторе неблагоприятного течения.

Несмотря на долгую историю исследования белка P53 в механизмах канцерогенеза, данные о его роли до определенного времени оставались противоречивыми. Одним из ключевых моментов понимания его функционирования стало открытие «мутантных» изоформ белка P53: как правило, миссенс-мутации в гене *TP53* приводят к появлению гомологичного белка, функционирование которого, напротив, повышает пролиферативный потенциал раковых клеток, способствует инвазии, миграции, метастазированию и устойчивости к химиотерапии [Mantovani F. et al., 2019]. В большинстве работ, посвященных исследованию P53 в клетках рака предстательной железы, показана ассоциация высоких значений экспрессии данного белка с поздней стадией заболевания и в целом с неблагоприятным прогнозом [Verma R. et al., 2015; Wan J. et al., 2018], однако большинство данных работ выполнены на клеточных линиях *in vitro* и не акцентируют внимание на сопоставлении данных об экспрессии P53 «дикого» и «мутантного» типов.

Высоко консервативный и относительно просто организованный сигнальный путь NOTCH играет важную роль в физиологическом эмбриогенезе и гомеостазе, однако, несмотря на это, активность данного пути прослеживается и при некоторых заболеваниях, в том числе онкологического профиля [Bray S.J., 2016]. При изучении экспрессии различных компонентов данного сигнального пути в опухолевых клетках исследователями был показан функциональный полиморфизм этих молекул: в одних случаях обнаруживались признаки противоопухолевой защиты, в других работах, напротив, была показана прямая корреляция с неблагоприятным прогнозом. Аналогичного вида дуалистические представления встречаются в обзорах литературы, посвященных роли NOTCH1 в клетках рака предстательной железы [Lefort K. et al., 2016].

Роль белка NANOG в качестве фактора, поддерживающего мультипотентный потенциал стволовых клеток на самых ранних этапах эмбриогенеза, хорошо исследована [Zhang W. et al., 2016], в тоже время, ограниченное количество исследований посвящено изучению данного белка в

процессах канцерогенеза. Большинство работ на тему экспрессии NANOG при раке предстательной железы характеризуют его в качестве неблагоприятного прогностического маркера, ассоциированного, в том числе, с процессами химиорезистентности [Jeter C.R. et al., 2016]. Следует отметить, что многие работы выполнены на клеточных линиях рака предстательной железы и не содержат клиничко-морфологических параллелей.

Таким образом, в доступных источниках литературы нам не удалось обнаружить информации о комплексном иммуногистохимическом исследовании экспрессии Ki-67, P53, NOTCH1 и NANOG с последующим клиничко-морфологическим сопоставлением и оценкой корреляционных взаимосвязей.

Цель исследования

На основании клиничко-морфологических особенностей экспрессии белков Ki-67, P53, NOTCH1 и NANOG в клетках рака предстательной железы выделить формы с клинически неблагоприятным прогнозом.

Задачи исследования

1. Изучить особенности пролиферативной активности клеток рака предстательной железы с использованием маркера Ki-67 в различных прогностических группах.
2. Изучить особенности экспрессии антионкогенного белка P53 как в его дикой изоформе, так и в мутантной, применительно к клеткам рака предстательной железы в различных прогностических группах.
3. Изучить роль сигнального пути Notch в механизмах канцерогенеза рака предстательной железы.
4. Изучить иммунофенотипические особенности экспрессии эмбрионального маркера NANOG в канцерогенезе рака предстательной железы различных прогностических групп.
5. Оценить корреляции между пролиферацией, экспрессией различных вариантов антионкогенного белка P53, белка NOTCH1, NANOG и различными прогностическими группами рака предстательной железы, а также клиничко-лабораторными данными.
6. Создать алгоритм для выявления прогностически неблагоприятных, «агрессивных» форм рака предстательной железы.

Научная новизна

Впервые показаны прямые статистически значимые корреляционные взаимосвязи между прогностической группой рака предстательной железы и уровнем пролиферации опухолевых клеток, а также экспрессией P53, в особенности его мутантной формы.

Выявлена обратная корреляционная связь между экспрессией NOTCH1 и прогностической группой, а также стадией заболевания, что может свидетельствовать о роли данного белка в качестве фактора противоопухолевой защиты. Установлено, что среди низкодифференцированных аденокарцином из наиболее неблагоприятных прогностических групп, где выявлена экспрессия мутантной формы P53, активность сигнального пути Notch значительно снижается.

Впервые показана статистически значимая прямая корреляционная связь между выраженностью экспрессии Ki-67, NANOG и прогностической группой, а также между высокой степенью экспрессии NANOG и экстрапростатическим распространением опухоли.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты данного исследования демонстрируют значимость ИГХ исследования образцов ткани рака предстательной железы с определением пролиферативной активности опухолевых клеток, а также определением уровня экспрессии P53 и, в частности, его мутантной формы, как неблагоприятных факторов прогноза заболевания. Высокие уровни экспрессии NOTCH1 свидетельствуют о сохранности противоопухолевого иммунитета, в том числе механизма апоптоза, что может быть интерпретировано в качестве благоприятного прогностического фактора, с другой стороны, может служить поводом к расширению показаний для консервативного лечения. Напротив, обнаружение в тканях рака предстательной железы белка NANOG свидетельствует о неблагоприятном прогнозе, что делает целесообразным наиболее радикальное лечение.

Методология и методы исследования

В работе использовали методологию, основанную на системном подходе с применением общенаучных и специфических методов. Все исследования были проведены с учетом требований международных и российских законодательных актов о юридических и этических принципах медико-биологических исследований у человека. Исследование проведено на операционном и диагностическом материале урологических отделений двух клинических баз — ГБУЗ города Москвы «Городская клиническая больница №31 ДЗМ» и ГБУЗ города Москвы «Госпиталь для ветеранов войн №2 ДЗМ» — и охватывает период 2017—2020 гг. В работу включен материал, полученный от 98 пациентов, средний возраст которых — $71,3 \pm 6,8$ года (от 47 до 94 лет). Образцы предстательной железы представлены как материалом после трансуретральной резекции (29 операций, 29,6%) и простатэктомии (35 операций, 35,7%), так и материалом тонкоигольных пункционных биопсий (34 случая, 34,7%). После гистологического исследования все наблюдения были классифицированы по системе Глисона, на основании которой были сформированы пять прогностических групп.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлено наличие положительной корреляционной связи между индексом пролиферативной активности и порядковым номером прогностической группы РПЖ, а также клинической стадией заболевания.
2. Выявлена положительная корреляционная связь между выраженностью экспрессии P53 и порядковым номером прогностической группы РПЖ, а также клинической стадией заболевания, причем показано, что в наиболее высоких прогностических группах положительная экспрессия данного белка обусловлена появлением «мутантной» изоформы.
3. Показана высокая активность экспрессии белка сигнального пути Notch в аденокарциномах первой прогностической группы и прогредиентное снижение данного показателя при нарастании анаплазии опухолевых клеток и увеличении экспрессии мутантной формы P53.
4. Показана положительная корреляционная связь между экспрессией белка NANOG в клетках рака предстательной железы и прогностической группой заболевания, а также уровнем пролиферативной активности и экспрессией P53.

Степень достоверности

Достоверность результатов подтверждается достаточным количеством исследованных наблюдений, применением статистических методов обработки полученных данных, использованием современных, адекватных поставленным задачам, методов исследования, критическим анализом собственных результатов и сопоставлением их с данными других авторов.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены на научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 12-13 ноября 2020г.).

Публикации

По материалам диссертационной работы всего опубликовано 5 научных работ, в том числе 2 статьи в журналах МЦБ и 2 в журналах, входящих в Перечень РУДН рецензируемых научных изданий, где должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационной работы Г.Ю. Кудрявцева внедрены в практику патологоанатомического отделения ГБУЗ «Городская клиническая больница №31 ДЗМ» для расширенной патоморфологической диагностики рака

предстательной железы. Полученные результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры патологической анатомии медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» и используются преподавателями кафедры на лабораторных занятиях при изучении студентами 3 курса дисциплин «Патологическая анатомия, клиническая патологическая анатомия».

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, а также выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, включающего 197 источников, из них 10 отечественных и 187 зарубежных. Работа иллюстрирована 23 рисунками, данные представлены в 9 таблицах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основным материалом, использованным в исследовании, послужили парафиновые блоки с образцами ткани предстательной железы, отобранные на базе двух патологоанатомических отделений: ГКБ№31 и ГВВ№2. В работу включен материал, собранный за период 2017-2020гг. Были определены критерии включения: наличие клинической информации и лабораторных данных (ультразвуковое исследование предстательной железы с определением объема органа, предоперационные значения ПСА), гистологический тип опухоли, согласно классификации ВОЗ, 2017 г. – ацинарная аденокарцинома, достаточный объем ткани в парафиновом блоке для подготовки срезов. Критерии исключения: отсутствие парафиновых блоков в архиве отделения (вследствие выдачи материала по запросу для пересмотра в другом лечебном учреждении), случаи с выраженным лечебным патоморфозом, не позволяющим провести оценку по Глиссону, выраженные искусственные изменения, а также малый объем опухолевой ткани в образцах тонкоигольных биопсий. После отбора материала согласно вышеперечисленным условиям, в исследование попали всего 98 наблюдений: 79 случаев, отобранных на базе ГКБ31 и 27 случаев из ПАО ГВВ№2. Образцы предстательной железы были представлены как материалом после трансуретральной резекции (29 операций, 29,6%) и простатэктомии (35 операций, 35,7%), так и материалом тонкоигольных пункционных биопсий (34 случая, 34,7%).

С целью проведения клинико-морфологических сопоставлений концепция исследования подразумевала сбор минимальных клинических данных в обезличенном виде. Часть необходимой клинической информации была получена из бланков-направлений, копии которых хранятся в архиве патологоанатомических отделений. Заполненное направление на прижизненное патологоанатомическое исследование биопсийного (операционного) материала

(учетная форма №014/у) включает в себя такие данные, как дату рождения, клинический диагноз, дополнительные клинические сведения (результаты лабораторных и инструментальных анализов), предоперационное лечение. В большинстве случаев в направлениях была представлена информация о показателях концентрации ПСА и объеме предстательной железы по данным ТРУЗИ, а в случае подтвержденного рака также была информация о стадии заболевания, основанная на клинической классификации TNM. В случае отсутствия в направлении упомянутых данных, они были восполнены из электронной истории болезни, либо при работе в архиве больницы с бумажной версией истории болезни. Полученная информация систематизирована в сводной таблице на платформе Microsoft Excel 365.

Для всех отобранных случаев было выполнено ИГХ исследование: для этого были выбраны образцы ткани, содержащие как элементы опухоли, так и прилегающую ткань предстательной железы без признаков аутолитических изменений. В качестве первичных антител были использованы следующие реактивы: моноклональные мышиные антитела к белку P53 (Clone D 07, Epitomics, США); моноклональные кроличьи антитела к мутантному белку P53 (Clone Y5, Epitomics, США); моноклональные кроличьи антитела к белку Ki 67 (Clone SP6, Cell Marque, США); моноклональные рекомбинантные антитела к белку NOTCH1 (Clone EP1238Y, Abcam, США); моноклональные кроличьи антитела к белку NANOG (Clone EPR2027(2), Epitomics, США).

Подготовленные препараты исследовали под микроскопом (AxioPlan 2 imaging, Karl Zeiss, Германия) с фотофиксацией (AxioCam ERc 5s, Karl Zeiss, Германия). Для количественной оценки экспрессии Ki-67, а также обеих изоформ белка P53 осуществлялся подсчет соотношения окрашенных ядер в «горячих» точках (областях с наибольшим количеством компактно расположенных иммунопозитивных ядер) при увеличении $\times 400$, количество клеток для оценки в каждом случае составляло не менее 300. Условно была принята следующая градация: отсутствие экспрессии (0 баллов), слабая экспрессия (1 балл) — окрашены менее 10% ядер клеток, умеренная экспрессия (2 балла) — более 10%, но менее 33% клеточных ядер, сильная экспрессия (3 балла) — более 33% ядер клеток в ткани были положительными.

Оценка экспрессии белков NOTCH1 и NANOG производилась полуколичественным методом: первоначально также осуществлялся подсчет числа иммунопозитивных клеток при большом увеличении ($\times 400$, минимальное число клеток — 300), однако результат был скорректирован с учетом интенсивности окрашивания. Был применен иммуногистохимический индекс, который представляет собой сумму произведений процентов, характеризующих долю клеток (ядер) с различной интенсивностью окраски на балл, соответствующий выраженности реакции (0- нет окрашивания, 1- слабое окрашивание, 2- умеренное, 3 – сильное).

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и

визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 365. Статистический анализ проводился с использованием программы STATISTICA 13.3 (разработчик - StatSoft.Inc) на базе операционной системы Windows 10.

Описание количественных величин при нормальном распределении проводили в формате « $M \pm SD$ », с указанием среднего значения и стандартного отклонения.

При сравнении средних величин в нормально распределенных совокупностях количественных данных рассчитывался t-критерий Стьюдента. Для сравнения независимых совокупностей в случаях отсутствия признаков нормального распределения данных использовался U-критерий Манна-Уитни. Для проверки равенства медиан нескольких выборок использовался критерий Краскела — Уоллиса. Сравнение номинальных данных проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона. С целью изучения связи между явлениями, представленными количественными данными, распределение которых отличалось от нормального, использовался непараметрический метод – расчет коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Статистически значимыми считали уровень вероятности ошибки 0,05 ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рак предстательной железы был диагностирован у 98 пациентов, возраст которых колебался от 47 до 94 лет (средний показатель $71,3 \pm 6,8$ лет). Возраст пациентов превышал отметку в 65 лет в 86,7% всех наблюдений. При сопоставлении возрастных параметров во всех пяти прогностических группах и использовании дисперсионного анализа Краскала-Уоллиса для множественных выборок установлено, что эти величины статистически значимо не различаются ($p = 0,068$, $N = 9,11$).

Материал, полученный при различных видах оперативных и диагностических вмешательств, отличался по структуре морфологических заключений. Так, среди материала трансуретральной резекции ПЖ наибольшее количество заключений (41,4%) соответствовало критериям первой прогностической группы, на втором месте (27,6%) по распространенности оказались опухоли с морфологической оценкой $4+3=7$ баллов по Глисон (ПГ3). Исследование материала после радикальной простатэктомии подтвердило диагноз РПЖ в 35 наблюдениях, причем распределение по различным прогностическим группам оказалось более равномерным. Так, наибольший удельный вес по частоте встречаемости в данной группе взяли на себя наблюдения с морфологической картиной умеренно дифференцированной карциномы - $4+4=8$ б. (ПГ4) – 9 случаев (25,7%), на втором месте - 8 наблюдений с картиной $4+3=7$ б. по Глисон (ПГ3) - 22,9%. Наконец, при проведении гистологического исследования биопсийного материала почти половина

наблюдений (n=14, 41,2%) соответствовала наиболее высокодифференцированной форме АК и была отнесена к первой прогностической группе. В 10 случаях (29,4%) был выставлен диагноз аденокарциномы 3+4=7б. по Глиссону (ПГ2).

Средние показатели объема органа составили $63,7 \pm 22,1 \text{ см}^3$ (от 30 до 130 см^3). Дисперсионный анализ значений объема предстательной железы в различных прогностических группах продемонстрировал разницу, приближенную к статистически значимой ($p=0,0718$, $N = 8,604$).

В 19 случаях (19,4%) концентрация ПСА соответствовала нормальным возрастным показателям, во всех остальных наблюдалось повышение показателя различной степени выраженности. Среднее значение данного параметра в нашем исследовании составило $22,2 \pm 19,9 \text{ нг/л}$, в отдельных случаях концентрация достигала 112,1 нг/л. При оценке данного показателя в различных прогностических группах была получена статистически значимая разница ($p < 0,001$, $N = 8,604$).

Клинико-морфологический анализ позволил уточнить стадию заболевания, основанную на классификации TNM. Почти в половине случаев онкологический процесс диагностировался на второй стадии (n=48, 49,0%), в 11 наблюдениях опухолевая ткань была обнаружена случайно, и при дальнейшем обследовании не обнаружилось подтверждения экстрапростатического распространения (T1, стадия I). Местнораспространенные формы РПЖ были диагностированы в 21-ом наблюдении (21,4%), а варианты с прорастанием в соседние органы и/или наличием метастазов составили 18,4% (n=18).

Иммуногистохимическое исследование экспрессии Ki-67 в клетках рака предстательной железы пациентов различных прогностических групп

Положительная экспрессия в клетках опухоли была выявлена в 95 случаях из 98 (96,9%) и характеризовалась ярким окрашиванием ядер опухолевых клеток (рисунок 1).

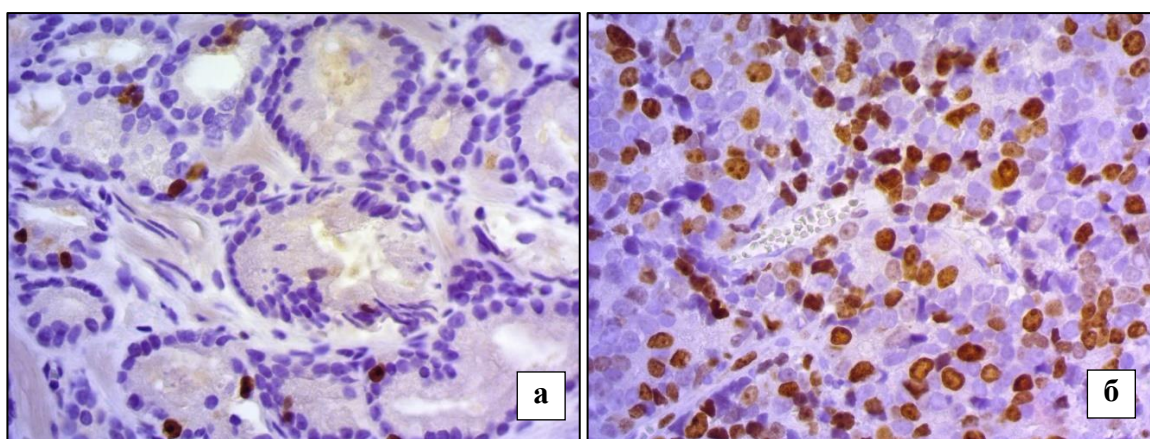


Рисунок 1 а - иммуногистохимическая реакция при раке предстательной железы 3+3=6б. по Глисон с антителами к белку Ki-67. Окраска ДАБ–гематоксилин, ув.х400; б - иммуногистохимическая реакция при раке предстательной железы 5+5=10б. по Глисон с антителами к белку Ki-67. Окраска ДАБ–гематоксилин, ув.х400

Основные значения пролиферативной активности опухолевых клеток в различных прогностических группах отображены на рисунке 2.

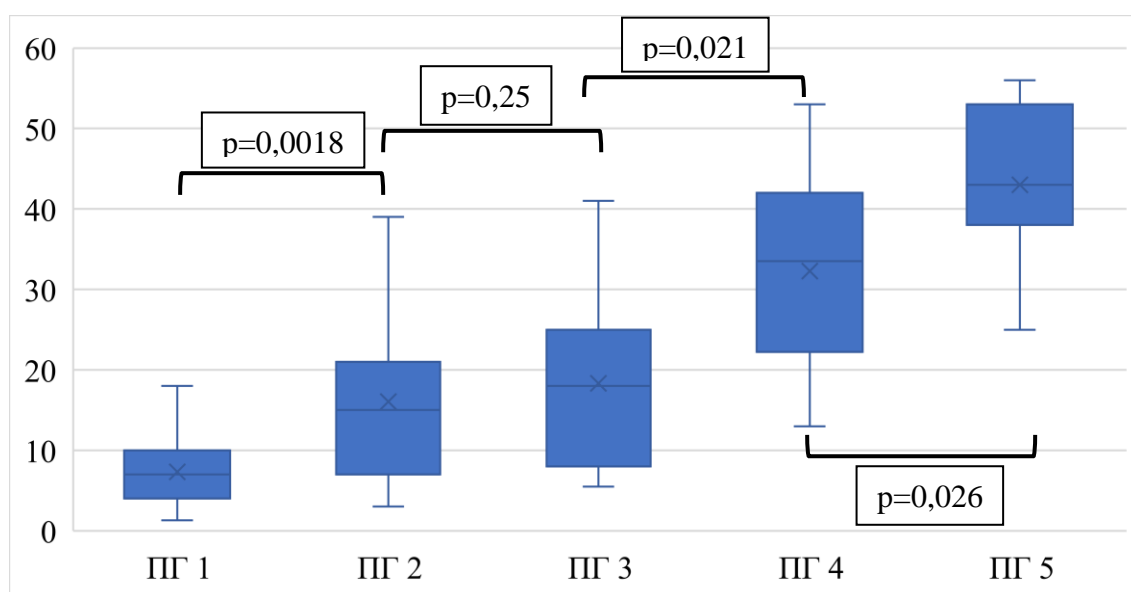


Рисунок 2 Основные показатели пролиферативной активности опухолевых клеток при РПЖ в различных прогностических группах

Корреляционный анализ показал наличие прямой сильной связи между уровнем экспрессии Ki-67 в опухолевых клетках РПЖ и прогностической группой ($r_s = 0,759$, $p < 0,001$). Аналогичные показатели были выявлены при сопоставлении уровня пролиферативной активности и стадии заболевания: количество иммунопозитивных клеток возрастало в зависимости от распространенности опухолевого процесса ($r_s = 0,649$, $p = 0,003$). Менее значимыми оказались показатели взаимосвязи экспрессии данного маркера с уровнем ПСА в крови ($r_s = 0,502$, $p = 0,047$) и размером органа ($r_s = 0,471$, $p = 0,032$).

Нашими соотечественниками была установлена положительная корреляционная связь между значениями пролиферативной активности опухолевых клеток и возрастанием индекса Глисона [Ковылина М.В. и др., 2014; Пульбере С.А. и др., 2017], аналогичные данные были получены нами в предшествующих наблюдениях [Кудрявцев Г.Ю. и др., 2019]. В настоящей работе было показано, что средние значения экспрессии Ki-67 статистически различаются практически во всех смежных прогностических группах, за исключением пары ПГ2-ПГ3. Несмотря на это, удалось проследить положительную корреляцию между пролиферативной активностью и прогностической группой, а также, что не менее важно, стадией заболевания, что позволяет интерпретировать повышенные значения экспрессии Ki-67 в качестве фактора неблагоприятного прогноза РПЖ.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии различных изоформ белка P53 в клетках рака предстательной железы пациентов различных прогностических групп

В нашей работе проводилось ИГХ исследование образцов опухолевой ткани с антителами к двум изоформам белка P53: «дикой» и «мутантной». Использование моноклональных антител серии D 07, позволяющих определять любые варианты интересующего нас белка, позволило выявить наличие стойкой ядерной экспрессии в 69 наблюдениях (70,4%), в то время как экспрессия именно «мутантной» формы P53 (определение которой осуществлялось при помощи антител серии Y5) идентифицировалась лишь в 23-х наблюдениях (23,5%).

При оценке различных гистологических паттернов наблюдалась следующая картина: среди высокодифференцированных карцином с оценкой по Глисону 3+3=6 баллов относительно небольшое количество клеток демонстрировало положительную иммуногистохимическую реакцию; в клетках криброзных опухолевых структур количество «позитивных» ядер увеличивалось, а среди низкодифференцированных отмечались наиболее значимые показатели экспрессии P53 (Рисунок 3).

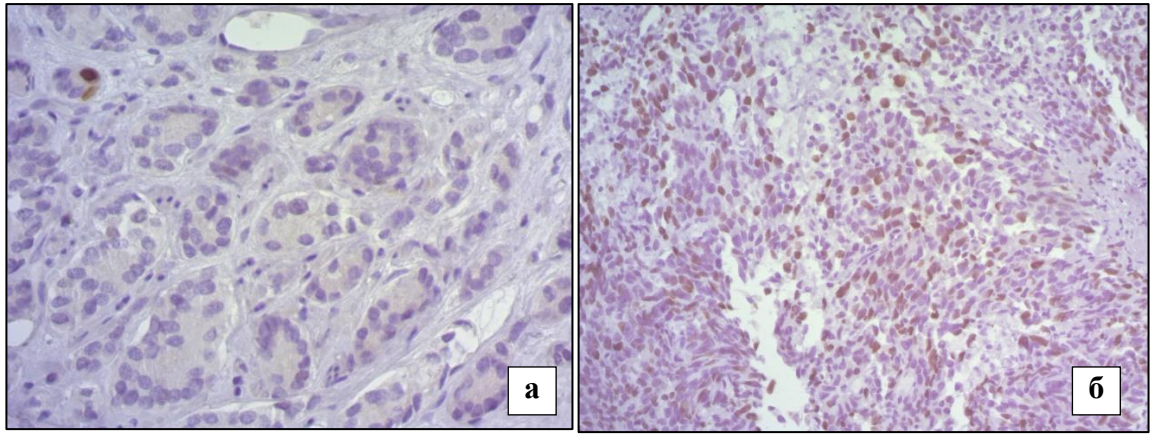


Рисунок 3 а - иммуногистохимическая реакция при раке предстательной железы 3+3=6б. по Глисона с антителами к белку P53 (клон D07). Окраска ДАБ–гематоксилин, ув.х400; б - иммуногистохимическая реакция при раке предстательной железы 5+5=10б. по Глисона с антителами к белку P53 (клон D07). Окраска ДАБ–гематоксилин, ув.х200

Средние показатели выраженности экспрессии P53 D-07 в клетках РПЖ отображены на рисунке 4.

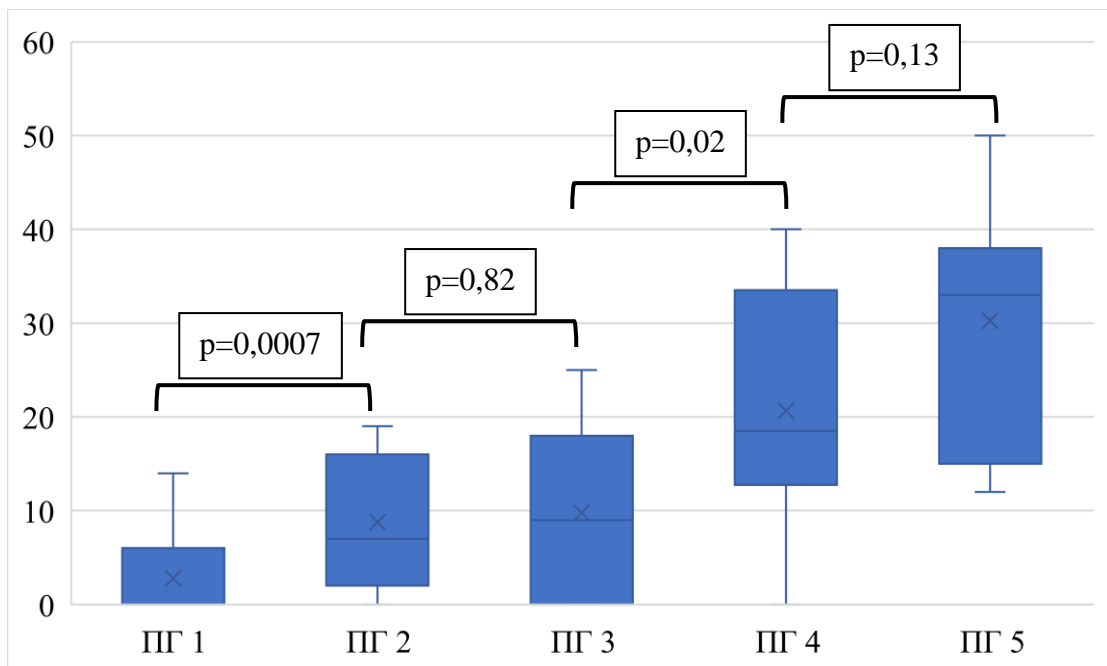


Рисунок 4 Основные показатели экспрессии p53 (клон D07) в опухолевых клетках при РПЖ в различных прогностических группах

Корреляционный анализ продемонстрировал наличие умеренно выраженной прямой связи между порядковым номером прогностической группы и выраженностью экспрессии P53 (Clone D-07) - $r_s = 0,415$ ($p < 0,001$), также статистически значимой оказалась прямая связь между P53 и стадией заболевания ($r_s = 0,393$, $p = 0,023$). Показатели взаимосвязи экспрессии данного маркера с уровнем ПСА в крови и объемом предстательной железы

аналогичным образом демонстрируют положительную корреляцию, хоть и менее выраженную ($r_s = 0,315$, $p=0,031$ и $r_s = 0,214$, $p=0,04$, соответственно).

«Мутантная» версия белка P53 выявлялась на порядок реже и встречалась лишь в относительно низкодифференцированных вариантах РПЖ: в гистологическом грейде 3 меченых клеток не определялось, а наибольшее количество иммунореактивных опухолевых ядер обнаруживалось при оценке 5 баллов по Глисон (рисунок 5).

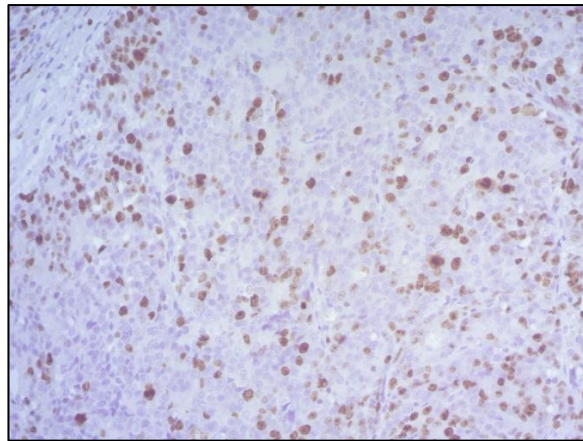


Рисунок 5 Иммуногистохимическая реакция при раке предстательной железы 5+5=10б. по Глисон с антителами к «мутантной» версии белка P53. Окраска ДАБ–гематоксилин, ув.х400

Мутантная версия белка P53 не обнаруживалась лишь в наблюдениях из первой прогностической группы, во всех остальных группах было выявлено различное количество иммунореактивных ядер в опухолевых клетках, причем среднее количество окрашенных ядер прогрессивно увеличивалось: в ПГ2 - $1,7 \pm 3,8\%$, в ПГ3 - $2,1 \pm 4,0\%$, в ПГ4 - $5,8 \pm 10,7\%$, в ПГ5 - $19,3 \pm 18,7\%$. Статистически значимая разница определялась при сопоставлении значений в паре «ПГ4-ПГ5» ($p=0,02$).

Корреляционный анализ выявил наличие умеренной прямой статистически значимой связи между выраженностью экспрессии мутантного варианта белка P53 и прогностической группой ($r_s = 0,399$, $p=0,008$), а также стадией заболевания ($r_s = 0,375$, $p=0,016$). Статистически значимой корреляции между экспрессией данного белка и объемом предстательной железы, а также концентрацией ПСА, выявлено не было ($r_s=0,219$, $p=0,56$, и $r_s=0,308$, $p=0,09$, соответственно).

Мутации в гене TP53 приводят к нарушению регуляции клеточного цикла, вызывая аномальную пролиферацию, и способствуют злокачественной трансформации [Meek D.W., 2015]. При этом молекулярные механизмы регуляции данного эффекторного пути остаются до конца не ясными. Так, Wan J. et al. на клеточных линиях РПЖ продемонстрировали, что интерференция гена TP53 опосредует снижение способности раковых клеток к пролиферации,

миграции, адгезии, и при этом активируется сигнальный путь FAK / Src и наблюдается повышение уровней фосфорилирования JNK и ERK [Wan X.D. et al., 2018].

Одной из ключевых функций белка P53 является инициация программы апоптоза в тех случаях, когда остановка клеточного цикла и репарация повреждения ДНК невозможна. По всей вероятности, при возникновении мутации в самом гене TP53 может страдать в том числе и функция апоптоза, что было продемонстрировано на клеточных линиях РПЖ при сопоставлении группы клеток с нативным содержанием данного белка и группы, где генная модификация привела к образованию «мутантного» гомолога P53 с удаленной областью в ДНК-связывающем домене [Chappell W.H. et al., 2012]. Таким образом, основываясь на полученных данных, можно резюмировать, что низкодифференцированные карциномы характеризуются более выраженным полиморфизмом мутаций, которые зачастую затрагивают локус TP53, что приводит к инактивации клеточной гибели путем апоптоза за счет появления мутантного белка P53.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии белка NOTCH1 в клетках рака предстательной железы пациентов различных прогностических групп

При анализе образцов ткани предстательной железы слабовыраженная экспрессия белка NOTCH1 определялась в цитоплазме мышечных клеток стромы органа, эндотелиальных клетках микрососудистого русла. В 54 случаях (55,1%) положительная реакция выявлялась в нормальных ацинусах ПЖ: в отдельных наблюдениях была характерна сильная цитоплазматическая экспрессия в люминальных клетках, а в базальных, помимо цитоплазматической, отмечалась очаговая ядерная экспрессия данного белка (Рисунок 6).

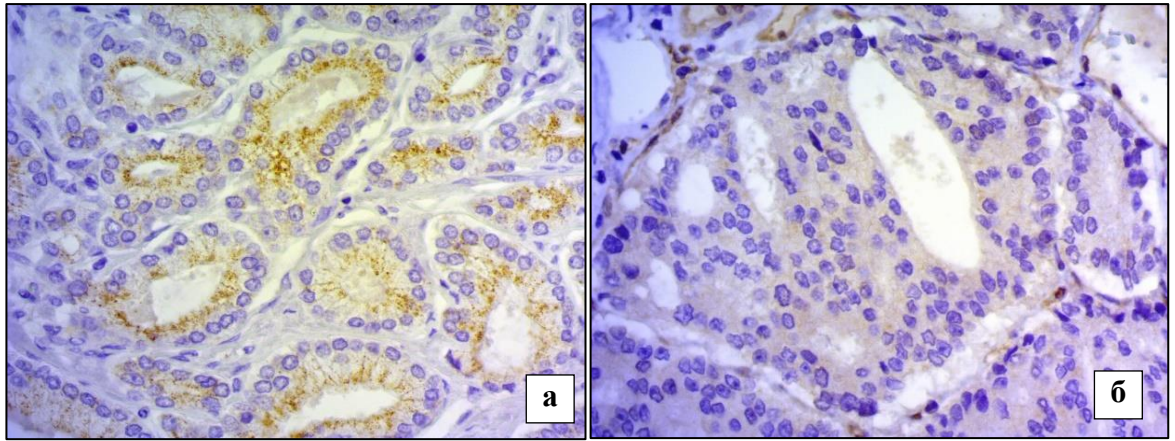


Рисунок 6 а - иммуногистохимическая реакция с антителами к белку NOTCH1 в опухолевых клетках рака предстательной железы 3+3=6б. по Глиссону. Окраска ДАБ–гематоксилин, ув.х400; б - иммуногистохимическая реакция с антителами к белку NOTCH1 в опухолевых клетках рака предстательной железы 4+4=8б. по Глиссону. Окраска ДАБ–гематоксилин, ув.х400

Расчет иммуногистохимического индекса экспрессии белка NOTCH1 в клетках АК предстательной железы у пациентов из различных прогностических групп продемонстрировал значительные колебания средних значений (рисунок 7).

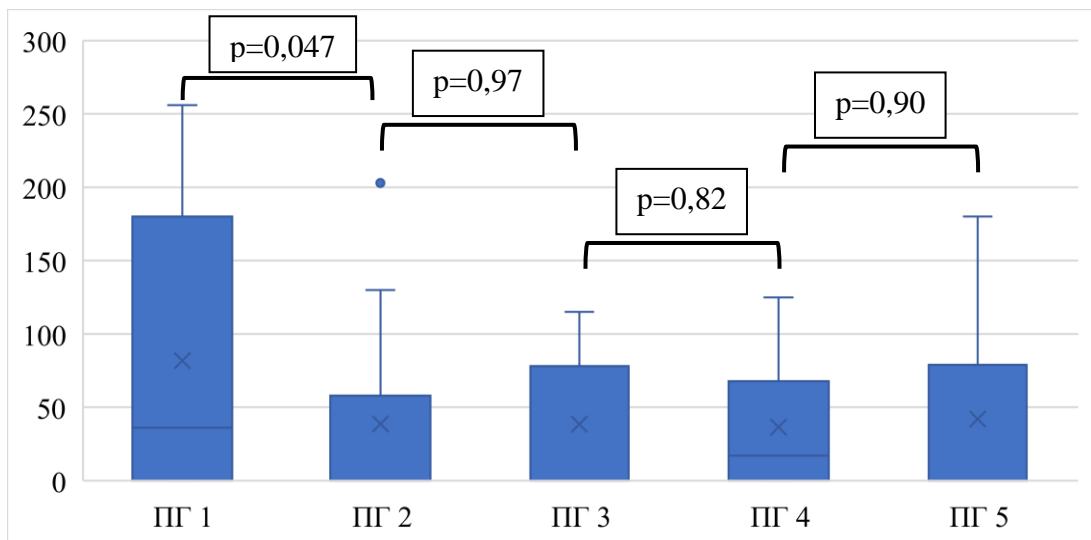


Рисунок 7 Основные показатели экспрессии NOTCH1 (иммуногистохимический индекс) в опухолевых клетках при РПЖ в различных прогностических группах

Корреляционный анализ выявил наличие умеренной обратной статистически значимой связи между выраженностью экспрессии белка NOTCH1 и прогностической группой ($r_s = -0,425$, $p=0,0041$), а также стадией заболевания ($r_s = -0,375$, $p=0,025$). В тоже время при сопоставлении показателя выраженности экспрессии данного белка со значениями объема предстательной

железы и концентрации ПСА статистически значимой зависимости получено не было ($r_s=0,118$, $p=0,43$, и $r_s=-0,014$, $p=0,18$, соответственно).

Согласно нашим результатам, активацию сигнального пути Notch1 в клетках рака предстательной железы в большей степени можно интерпретировать как фактор противоопухолевой направленности в относительно хорошо дифференцированных опухолях. Присутствие белка NOTCH1 в цитоплазме железистого эпителия обусловлено необходимостью выполнения ряда физиологических функций, в том числе функции поддержания гомеостаза. Одной из таких функций может являться инициация клеточной гибели путем апоптоза. Это могло бы объяснить прогредиентное снижение средних показателей экспрессии белка NOTCH1 при нарастании клеточной анаплазии в РПЖ, что продемонстрировано в настоящей работе. Корреляция между экспрессией белка NOTCH1 и Ki-67 показала отрицательное значение, что говорит об активности сигнального пути Notch в клетках с относительно невысокой пролиферативной активностью. Аналогичного вида связь прослеживается при сравнении экспрессии NOTCH1 и P53 «мутантного» типа. Наибольшая активность сигнального пути Notch сохранена в тех наблюдениях, где «мутантный» белок P53 либо не определяется, либо встречается крайне редко, т.е. тогда, когда в клетках сохранен один из путей инициации апоптоза. В наиболее низкодифференцированных опухолях с выраженной экспрессией P53 «мутантного» типа механизмы апоптоза значительно снижены и активность сигнального пути Notch падает.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии белка NANOG в клетках рака предстательной железы пациентов различных прогностических групп

Среди всех исследованных биомаркеров экспрессия белка NANOG отмечалась в наименьшем количестве наблюдений – из 98 наблюдений лишь в 43 (43,9%) удалось выявить наличие данного белка. В клетках эпителия нормальных желез белок NANOG не встречался, в то время как ядра опухолевых клеток при РПЖ демонстрировали наличие экспрессии различной степени выраженности (Рисунок 8).

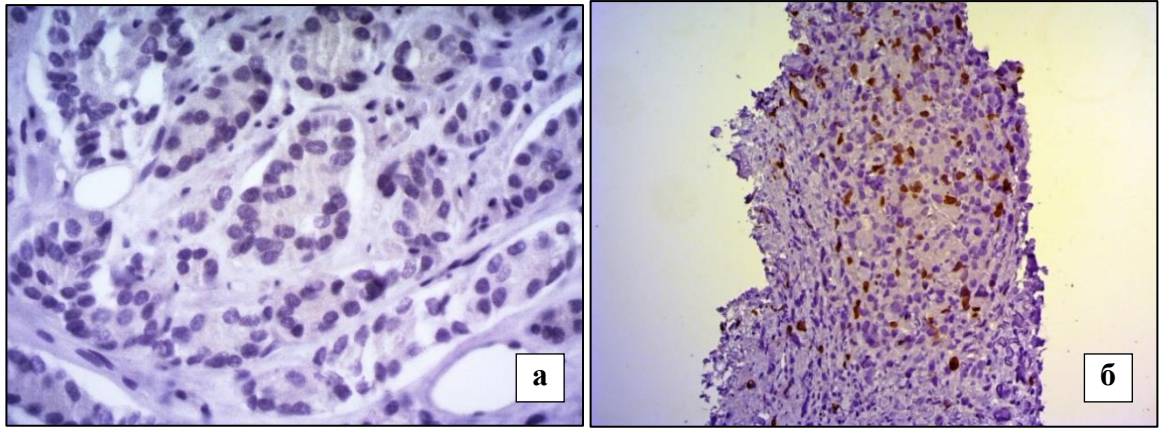


Рисунок 8 а - иммуногистохимическая реакция с антителами к белку NANOG в опухолевых клетках рака предстательной железы 3+3=6б. по Глиссону. Окраска ДАБ–гематоксилин, ув.х400; б - иммуногистохимическая реакция с антителами к белку NANOG в опухолевых клетках рака предстательной железы 5+5=10б. по Глиссону. Окраска ДАБ–гематоксилин, ув.х200

Следует отметить, что в прогностической группе 1 наблюдения с положительной экспрессией отсутствовали, а средние значения иммуногистохимического индекса экспрессии в оставшихся группах показывали прогрессивный рост с увеличением степени злокачественности опухоли от $29,5 \pm 33,9$ во второй ПГ до $146,2 \pm 77,6$ в пятой ПГ (Рисунок 9).

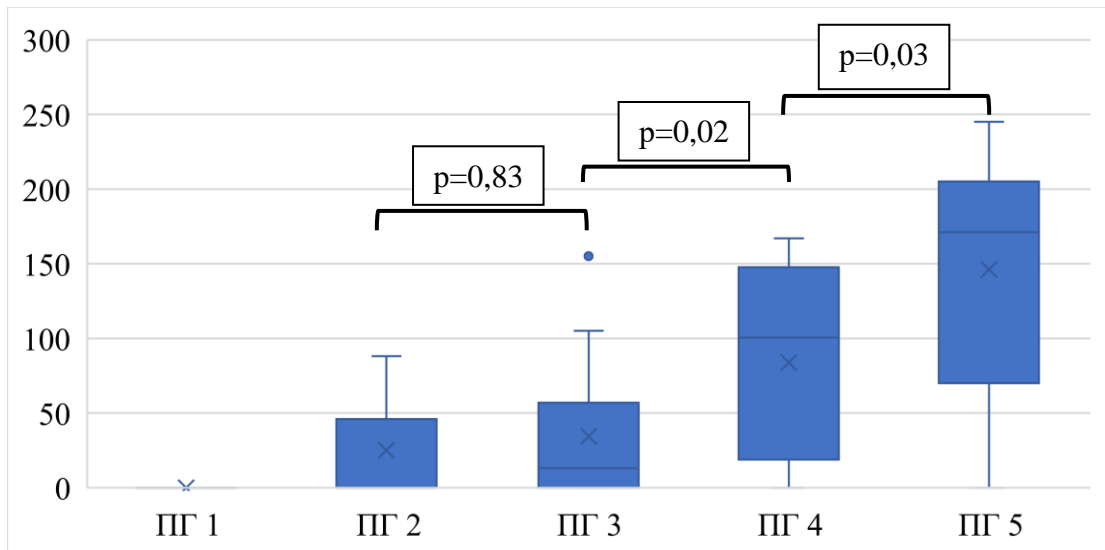


Рисунок 9 Основные показатели экспрессии NANOG (иммуногистохимический индекс) в опухолевых клетках при РПЖ в различных прогностических группах

Корреляционный анализ выявил наличие сильной прямой статистически значимой связи между выраженностью экспрессии белка NANOG и прогностической группой ($r_s = 0,786$, $p < 0,001$), а также стадией заболевания ($r_s = 0,418$, $p = 0,041$). Также слабая статистически значимая связь была получена

при сопоставлении иммуногистохимического индекса экспрессии данного белка и концентрации ПСА ($r_s = 0,105$, $p=0,039$), в то время как связь с объемом органа не достигала статистически значимой разницы ($r_s = 0,012$, $p=0,48$).

Наши данные подтверждают тот факт, что в клеточном составе наиболее низкодифференцированных аденокарцином предстательной железы существует значимая субпопуляция клеток с признаками стволовости, которые проявляют свойства мультипотентности благодаря наличию NANOG. Также, в исследовании была продемонстрирована статистически значимая связь между выраженностью экспрессии NANOG и наличием экстрапростатического распространения опухоли, что является немаловажным негативным фактором, влияющим на прогноз. Большинство наблюдений, оказавшихся в значительной степени иммунореактивными по экспрессии данного белка, также характеризовались высокими показателями экспрессии Ki-67, что говорит о высоком пролиферативном потенциале анаплазированных раковых клеток, в том числе проявляющих признаки РСК (раковых стволовых клеток). Следует дополнить, что в работе Jeter C.R. et al. была показана активность сигнального пути Nanog в клетках РПЖ, резистентных к воздействию андрогена, что может говорить о вовлеченности данного пути в механизм возникновения кастрат-резистентных форм рака [Jeter C.R. et al., 2016].

Маркер Ki-67 позволят оценить пролиферативный потенциал опухолевых клеток и, соответственно, выделить группу с повышенным риском рецидива и метастазирования. Комплексная оценка P53 позволяет, с одной стороны, раскрыть противоопухолевый потенциал, в том числе активность системы апоптоза, с другой стороны, при использовании антител к «мутантной» форме данного белка становится возможным понять, какая доля из иммунопозитивных клеток несет в себе белок с, напротив, проонкогенным вектором воздействия. Соответственно, критичным для прогноза становится определение наблюдений именно с мутантной формой белка P53, поскольку именно такие случаи будут характеризоваться наиболее неблагоприятным течением. Детекция белка NOTCH1 также может отражать активность механизмов противоопухолевой защиты, ассоциированной в том числе функционированием нативного белка P53. Потеря цитоплазматической экспрессии данного белка также может оказаться неблагоприятным фактором прогноза. Наконец, белок NANOG, иммуногистохимическое определение которого наиболее часто встречалось в низкодифференцированных карциномах, позволяет сделать вывод о наличии пула клеток, обладающих признаками опухолевых стволовых клеток, а значит, способными к безграничному репликативному потенциалу и устойчивых к химиотерапии, в том числе андрогенной депривации, что является, несомненно, крайне неблагоприятным прогностическим фактором и требует как можно более скорого и радикального лечения.

Таким образом, существующие системы стратификации риска РПЖ, такие как Ki-67, позволяющий оценить пролиферативную активность клеток, и P53, оценивающий апоптоз, могут быть дополнены и уточнены за счет введения

в практику новых биологических маркеров: NOTCH1 и NANOG, характеризующих активность различных сигнальных путей в опухолевых клетках и степень их дифференцированности, и способных прогнозировать течение заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в настоящей диссертационной работе, позволяют сформулировать следующие выводы:

1. Корреляционный анализ показал наличие прямой сильной связи между уровнем экспрессии Ki-67 в опухолевых клетках РПЖ и прогностической группой ($r_s = 0,759$, $p < 0,001$).

2. При сравнении уровня пролиферативной активности и стадии заболевания количество иммунопозитивных клеток увеличивается в зависимости от распространенности опухолевого процесса ($r_s = 0,649$, $p = 0,003$), менее значимыми являются показатели взаимосвязи экспрессии данного маркера с уровнем ПСА в крови ($r_s = 0,502$, $p = 0,047$) и размером органа ($r_s = 0,471$, $p = 0,032$).

3. Выявлена различная экспрессия белка P53 при взаимодействии с отличными клонами антител D07 и Y5 (70,4% и 23,5% соответственно). Экспрессия мутантного белка P53 (клон Y5) выражена в высоких прогностических группах аденокарцином и коррелирует со степенью пролиферативной активности опухолевых клеток $r_s = 0,402$, $p = 0,09$, а также порядковым номер прогностической группы ($r_s = 0,399$, $p = 0,008$)/

4. Активация сигнального пути Notch характерна преимущественно в клетках высокодифференцированных аденокарцином из первой прогностической группы, что отражает противоопухолевый иммунитет, в то время как наиболее анаплазированные формы рака, в том числе несущие мутантные формы P53, характеризуются инактивацией данного сигнального пути. Была установлена обратная связь между экспрессией NOTCH1 и прогностическими группами рака предстательной железы ($r_s = -0,425$, $p = 0,0041$).

5. Повышенная экспрессия белка NANOG в клетках рака предстательной железы ассоциирована с более высокими значениями прогностической группы и свидетельствует о неблагоприятном прогнозе. Обнаружена статистически значимая прямая корреляционная связь между выраженностью экспрессии NANOG и такими показателями как: пролиферативная активность ($r_s = 0,619$, $p < 0,001$), порядковый номер прогностической группой ($r_s = 0,786$, $p < 0,001$); экстрапростатическое распространение опухоли ($r_s = 0,418$, $p = 0,041$).

6. Существующие системы стратификации риска неблагоприятного течения рака предстательной железы могут быть дополнены и уточнены за счет

введения в практику новых биологических маркеров, таких как NOTCH1 и NANOG, характеризующих активность различных сигнальных путей в опухолевых клетках и степень их дифференцированности, и способных прогнозировать течение заболевания.

Практические рекомендации

Иммуногистохимическое исследование может служить дополнительным средством стратификации рисков и прогнозирования неблагоприятного течения РПЖ. Высокие значения пролиферативного индекса опухолевых клеток в сочетании с повышением экспрессии P53, в первую очередь, «мутантной» изоформы, а также обнаружение в клетках белка NANOG, свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе течения и расширяют показания для радикального лечения. Напротив, обнаружение цитоплазматической экспрессии белка NOTCH1 свидетельствует о сохранности противоопухолевого иммунитета и, соответственно, может являться предпосылкой для пролонгирования консервативного лечения.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Перспективным направлением развития исследований в области данной темы является изучение активности других молекул сигнального пути Notch в опухолевых клетках рака предстательной железы, поскольку терапевтическое воздействие на описанный путь может способствовать противоопухолевому иммунитету. Также перспективным является исследование других маркеров плюрипотентности, которые могут быть обнаружены в нише раковых стволовых клеток, поскольку терапевтическая блокада данных белков может оказать положительное воздействие на чувствительность к химиотерапии и снизить риск рецидивирования.

Список научных работ, опубликованных по теме исследования

Статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук:

1. **Кудрявцев Г.Ю.**, Кудрявцева Л.В., Михалева Л.М., Бабиченко И.И. Иммуногистохимическое исследование пролиферативной активности опухолевых клеток при различных градациях аденокарциномы предстательной железы // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. - 2019. – Т.23, № 4. - С. 364 – 372.

2. **Кудрявцев Г.Ю.**, Кудрявцева Л.В., Михалева Л.М., Кудрявцева Я.Ю., Соловьева Н.А., Осипов В.А., Бабиченко И.И. Иммуногистохимическое исследование экспрессии белка P53 в аденокарциномах предстательной железы различной степени злокачественности // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. - 2020. – Т.24, № 2. - С. 145 – 155.

3. **Кудрявцев Г.Ю.**, Кудрявцева Л.В., Михалева Л.М., Соловьева Н.А., Бабиченко И.И. Иммуногистохимическое исследование экспрессии Ki-67, p53 и Notch1 в аденокарциномах предстательной железы различной степени злокачественности // Архив патологии. - 2020. – Т.82, № 5. - С. 42 – 49.

4. **Кудрявцев Г. Ю.**, Кудрявцева Л.В., Михалева Л.М., Кудрявцева Я.Ю., Соловьева Н.А., Осипов В.А., Бабиченко И.И. Иммуногистохимическая экспрессия белка Nanog в клетках рака предстательной железы различных прогностических групп // Вестник РГМУ. - 2020. - №5. - С. 24–30.

Другие публикации:

1. **Кудрявцев Г.Ю.** Экспрессия белка P53 в клетках аденокарциномы предстательной железы // Сборник научных трудов научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва. – 2020. – С.80-81.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Список сокращений и условных обозначений

ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ИГХ	иммуногистохимия
ПГ	прогностическая группа
ПЖ	предстательная железа
РПЖ	рак предстательной железы
РСК	раковая стволовая клетка
ТРУЗИ	трансректальное ультразвуковое исследование
ERK	extracellular signal-regulated kinase, внеклеточная сигнал-опосредованная киназа
FAK	focal adhesion kinase, киназа фокальной адгезии, тирозинкиназа, играющая критическую роль в опосредованной интегрином передаче сигнала
JNK	c-Jun N-terminal kinase, стресс-активируемые протеинкиназы
NOTCH	семейство трансмембранных белков
P63	член семейства противоопухолевых белков P53
AMACR	alpha methylacyl CoA racemase, α -метилацил-КоА-рацемазы
PSA	prostate-specific antigen, простатспецифический антиген
Src	семейство нерецепторных тирозинкиназ, кодируемых геном SRC
TNM	tumor, nodus и metastasis, международная классификация стадий злокачественных новообразований

Аннотация

В работе было проведено комплексное клинико-морфологическое исследование активности отдельных белков и сигнальных путей в клетках аденокарциномы предстательной железы при помощи иммуногистохимической методики. Было показано, что пролиферативная активность опухолевых клеток, определяемая выраженностью экспрессии Ki-67, определяется практически во всех наблюдениях, а также коррелирует со стадией опухолевого процесса и порядковым номером прогностической группы. Опухолевый супрессор – белок P53 – может определяться в клетках рака предстательной железы как в нативной форме, так и в «мутантной», причем в последнем случае отмечается выраженная положительная корреляционная связь со стадией заболевания и высокими прогностическими группами. Наиболее значимые показатели выраженности экспрессии белка NOTCH1 ассоциирована с опухолями первой прогностической группы, а с увеличением анаплазии опухолевых клеток активность данного пути снижается. Белок NANOG встречается преимущественно в низкодифференцированных карциномах предстательной железы, а выраженность его экспрессии увеличивается с нарастанием анаплазии опухолевых клеток. Таким образом, высокие показатели экспрессии Ki-67, «мутантной» изоформы P53 и белка NANOG свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе течения рака предстательной железы.

Abstract

In this work, a comprehensive clinical and morphological study of the activity of individual proteins and signaling pathways in prostate adenocarcinoma cells was carried out using an immunohistochemical technique. It was shown that the proliferative activity of tumor cells, determined by the severity of Ki-67 expression, is determined in almost all cases, and also correlates with the stage of the tumor process and the ordinal number of the prognostic group. The tumor suppressor protein P53 can be detected in prostate cancer cells both in the native form and in the “mutant” form, and in the latter case, there is a pronounced positive correlation with the stage of the disease and high prognostic groups. The most significant indicators of the expression of the NOTCH1 protein associated with tumors of the first prognostic group, and with an increase in the anaplasia of tumor cells, the activity of this pathway decreases. The NANOG protein is found mainly in poorly differentiated prostate carcinomas, and the severity of its expression increases with increasing anaplasia of tumor cells. Thus, high levels of expression of Ki-67, the “mutant” isoform of P53, and the NANOG protein indicate an unfavorable prognosis of the course of prostate cancer.