

УДК 616.65-002-006.6-091.8-07-037(043.3)

ПАВЕЛ ВЛАДИМИРОВИЧ ТКАЧЕНКО, ИРИНА ИВАНОВНА ЯКОВЦОВА,  
ИГОРЬ ВЛАДИМИРОВИЧ ИВАХНО, ОКСАНА ВЛАДИМИРОВНА ДОЛГАЯ,  
АНДРЕЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ ОЛЕЙНИК

*Харьковская медицинская академия последипломного образования*

## ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ПРОГНОЗА РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Среди диагностических клинико-морфологических признаков рака предстательной железы (РПЖ) наиболее значимыми остаются уровень ПСА крови, сумма по Глиссону, стадия заболевания по системе TNM. Учет иммуногистохимических (ИГХ) показателей необходим для прогноза заболевания и выбора лечебной тактики. Цель исследования — усовершенствовать морфологические критерии прогноза РПЖ путем исследования ИГХ маркеров в формировании агрессивного фенотипа опухоли. РПЖ были распределены на три группы риска (низкий, промежуточный и высокий) согласно рекомендациям EAU. Иммуногистохимическое исследование проводилось с использованием маркеров TGF- $\beta$ , Ki-67, E-кадгерина, рецепторов андрогенов, VEGF, виментина, CD34+, CD4+, CD8+, CD3+, CD20+, CD68+, ГМА- $\alpha$ , цитокератина 8/18, цитокератина HMW. Из 15 ИГХ маркеров выявлена статистически значимая зависимость между уровнем экспрессии Ki-67, E-кадгерина, виментина, CD34, CD68 и принадлежностью РПЖ к группам исследования, что определяет эти маркеры как значимые для прогноза заболевания.

**Ключевые слова:** рак предстательной железы, прогноз, иммуногистохимия.

Рак предстательной железы (РПЖ) в Украине среди онкологических заболеваний мужского населения занимает второе место и первое у лиц старше 75 лет. Отмечается рост заболеваемости ежегодно в среднем на 14,5 % и смертности на 3,5 % в год [1].

В терапии РПЖ одной из основных задач, которые ставятся перед онкоурологами, является предупреждение рецидивирования и прогрессии заболевания после радикальной простатэктомии. Такими наиболее востребованными прогностическими факторами признаны биохимическое рецидивирование, стадия заболевания по системе TNM, сумма по Глиссону (СГ) [2].

В рутинной диагностике РПЖ иммуногистохимическое (ИГХ) исследование может дать ответы на вопросы особенностей клинического течения заболевания, понимания биологического поведения опухоли, стремительной диссеминации процесса, выбора необходимого индивидуализированного лечения. На сегодняшний день РПЖ остается без рекомендуемого международными организациями использования молекулярно-биологических критериев для прогноза и выбора лечебной тактики [3]. Прогноз и лечение РПЖ основывается на клинических и морфологических параметрах, применяемых десятилетия назад.

**Цель исследования** — усовершенствовать морфологические критерии прогноза рака предстательной железы путем исследования иммуногистохимических

маркеров в формировании агрессивного фенотипа опухоли.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования послужили предстательные железы, оперативно удаленные в Харьковском областном клиническом центре урологии и нефрологии им. В. И. Шаповала. Всего 40 случаев РПЖ после радикальной простатэктомии.

Были сформированы три группы исследования с учетом СГ, распространенности опухолевого процесса (Т) и уровня ПСА крови. Распределение на три группы риска (биохимического рецидивирования, повторной терапии и смертности) проведено согласно рекомендациям Европейской ассоциации урологов (2016 г.) [4]. I группу низкого риска составили раки с уровнем ПСА крови до 10 нг/мл при стадии cT1-2a и СГ 2-6; II группу — промежуточного риска с уровнем ПСА крови 10–20 нг/мл, или СГ 7, или cT2b; III группу — высокого риска с СГ 8–10, или ПСА более 20 или cT2c. В исследовании учитывалась СГ согласно рекомендациям градации РПЖ по системе Глиссон ISUP [5]. При взятых в равном количестве РПЖ с СГ <6, 7 (3 + 4), 7 (4 + 3), 8, 9–10 — по 8 случаев — РПЖ I группы низкого риска было 10 % (4/40) случаев, II группы промежуточного риска — 25 % (10/40), III группы риска — 65 % (26/40).

Иммуногистохимические исследования проводили с использованием моноклональных антител (МКАТ) к TGF- $\beta$ , Ki-67, E-кадгерину, рецепторов андрогенов (РА), VEGF, виментина, CD34, CD4, CD8,

CD3, CD20, CD68, ГМА- $\alpha$ , цитокератина 8/18, цитокератина HMW. MKAT фирмы Thermo Scientific, DAKO (Дания), Ready-to-Use, всего 15 маркеров.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась по общепринятым методикам с использованием пакета «Statistica 6.0». Достоверными считались результаты при  $p < 0,05$ . Связь между признаками оценивалась с использованием критерия хи-квадрат Пирсона, для выявления статистической значимости различий между группами — критерий Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пролиферативная активность РПЖ оценивалась по проценту раковых клеток, экспрессирующих Ki-67. При распределении РПЖ по уровню экспрессии маркера на 0 %, до 1 %, до 5 %, до 10 % и более 10 % раковых клеток, процент опухолей составил 32,5 %, 25,0 %, 22,5 %, 12,5 % и 7,5 % соответственно.

Согласно полученным данным, среди РПЖ слабого и умеренного риска уровень экспрессии Ki-67 не превышал 1 % опухолевых клеток, а все случаи с экспрессией маркера  $>1$  % были в группе высокого риска ( $\chi^2 = 15,9$ ;  $p < 0,0001$ ). Это позволяет считать уровень экспрессии Ki-67 критерием прогноза РПЖ. Полученные результаты в целом соответствуют приводимым в научной литературе [6], однако противоречат данным некоторых авторов о наличии случаев РПЖ с экспрессией Ki-67 практически всех клеток опухоли и случаев с выраженной экспрессией маркера в высокодифференцированных формах [7].

В РПЖ наряду со снижением дифференцировки и повышением пролиферативной активности могут происходить изменения, выявляемые на молекулярном уровне. Одной из программ реализации агрессивного биологического поведения является эпителиально-мезенхимальная трансформация (ЭМТ), выражающаяся повышением подвижности раковых клеток, их отрывом от первичных комплексов и ранним метастазированием. Исследование ЭМТ в РПЖ преимущественно проведено на клеточных моделях, в то же время остается недостаточно изученным значение маркеров ЭМТ в клинике для прогноза заболевания [8].

Имеются работы, устанавливающие прямую взаимосвязь между экспрессией TGF- $\beta$  и рядом ЭМТ-зависимых факторов [9]. В данной работе прослежена зависимость между экспрессией раковым эпителием TGF- $\beta$  и виментина ( $r = 0,32$ ;  $p < 0,05$ ) и между экспрессией TGF- $\beta$  и E-кадгерина ( $r = 0,31$ ;  $p < 0,05$ ), однако зависимость между экспрессией TGF- $\beta$  и принадлежностью раков к группам исследования не выявлена ( $\chi^2 = 6,2$ ;  $p = 0,39$ ).

Со снижением экспрессии E-кадгерина связывают потерю межклеточных контактов, способность к клеточному обособлению и метастазированию [10]. Во всех случаях наблюдалась экспрессия E-кадгерина, индекс метки (ИМ) составил в среднем  $67,0 \pm 31,6$ . Высокий уровень экспрессии E-кадгерина был в РПЖ слабого и промежуточного риска, составив в среднем

$95 \pm 10$  и  $91 \pm 11,7$ . Значительное снижение ИМ наблюдалось в группе высокого риска (среднее значение  $53,4 \pm 30$ ) по сравнению как с группой слабого риска ( $U = 11,5$ ;  $p < 0,01$ ), так и с группой промежуточного риска ( $U = 38$ ;  $p < 0,01$ ), что может определять E-кадгерин как дополнительный прогностический критерий течения заболевания.

Экспрессия виментина в раковых клетках преимущественно отсутствовала, лишь в некоторых случаях наблюдалось частичное бурое окрашивание цитоплазмы слабой и умеренной интенсивности. Прослежено изменение уровня экспрессии виментина эпителием в зависимости от принадлежности к группам риска при учете ИМ ( $U = 24$ ;  $p < 0,05$ ), однако, как видно из таблицы 1, при распределении уровня экспрессии на 0, 1–33 %, 34–66 %, 67–100 % опухолевых клеток — различия недостоверны ( $\chi^2 = 7,2$ ;  $p = 0,29$ ). Анализ особенностей экспрессии цитокератинов 8/18 и HMW показал отсутствие их зависимости с принадлежностью раков к группам риска.

Пациентам с РПЖ широко применяется андроген-депривационная терапия, которая показана в случаях биохимического рецидивирования, в случаях высокого риска быстрой прогрессии заболевания, при местно-распространенных раках с отсутствием хирургического лечения или лучевой терапии [4]. Однако при столь широком применении гормональной терапии на сегодняшний день отсутствуют прогностические критерии ее эффективности и риска формирования наиболее агрессивного андроген-резистентного РПЖ [3]. При оценке особенности экспрессии PA в группах риска не выявлено статистически значимого различия. Однако отмечалась тенденция в более низком уровне экспрессии маркера среди РПЖ высокого риска ( $50,1 \pm 30$ ) и примерно равный уровень экспрессии PA среди РПЖ слабого и промежуточного риска ( $70,2 \pm 31$  и  $68,5 \pm 25$  соответственно).

Стромальная экспрессия PA была несколько слабее эпителиальной и наблюдалась во всех случаях РПЖ. В научной литературе в относительно небольшом числе доступных работ, посвященных исследованию PA в строме РПЖ, выявлена взаимосвязь между потерей экспрессии PA клетками стромы и стадией заболевания, высоким риском клинических критериев, прогрессией опухоли, плохим прогнозом [3, 11]. В нашей работе отсутствовала статистически значимая зависимость между уровнем экспрессии стромального PA и принадлежностью РПЖ к группам риска.

Развитие и прогрессия РПЖ являются результатом комплексного взаимодействия между эпителиальными клетками и фибробластами/миофибробластами, последовательного динамического процесса, регулируемого гормонами. Следовательно, исследованию соединительнотканного компонента опухоли и его клеточного состава следует уделять пристальное внимание как научным работникам, так и патоморфологам в процессе рутинной микроскопии ПЖ [12]. Была исследована экспрессия ГМА- $\alpha$  и виментина стромой. В РПЖ промежуточного и высокого риска, в которых наблюдались процессы десмоплазии, было характерным

появление фибробластов, экспрессирующих виментин, и опухоль-ассоциированных миофибробластов, экспрессирующих ГМА- $\alpha$  и виментин. Выявлено, что выраженная степень экспрессии стромального виментина ассоциировалась с принадлежностью РПЖ к высокой группе риска ( $p < 0,001$ ), что определяет значение этого маркера как возможного прогностического критерия течения заболевания. Так, выраженная экспрессия виментина была среди пациентов группы высокого риска в 57,0 % (15/26) случаев, группы промежуточного риска — только в 10,0 % (1/10), она отсутствовала в группе слабого риска.

Одним из прогностических факторов, определяющих риск метастазирования и неблагоприятного исхода раков различной локализации, является неоангиогенез [13]. Средняя плотность микрососудов (ПМС) при РПЖ составила  $80,1 \pm 41$  и колебалась в широких пределах от 10 до 210. Средняя площадь сосудов в РПЖ составила  $493 \pm 139$ . Прослежена обратная взаимосвязь между ПМС и их площадью ( $p < 0,05$ ). Таким образом, низкий показатель площади сосудов, как и большое их количество, являются критериями ангиогенеза. Прослежена также зависимость между ИМ VEGF и ПМС ( $r = 0,9$ ;  $p < 0,001$ ), а также ИМ VEGF и площадью сосудов ( $r = -0,4$ ;  $p < 0,03$ ).

Выявлено, что показатели высокого уровня васкуляризации (ПМС и их площадь) являются прогностическими критериями РПЖ, ассоциируясь с группой

высокого риска. Так, площадь микрососудов в раках высокого риска меньше, чем в раках низкого риска ( $p < 0,0001$ ), ПМС в раках высокого риска больше, чем низкого ( $p < 0,001$ ) и промежуточного риска ( $p < 0,05$ ). Зависимость между экспрессией VEGF и принадлежностью раков к группам риска не установлена.

Известно, что хроническое воспаление может быть вовлечено в развитие и прогрессию рака предстательной железы. В целом, научные работы позволяют утверждать, что воспалительная инфильтрация при РПЖ коррелирует с более агрессивным клиническим их поведением, однако сведения отдельных авторов противоречивы [14]. Нами было исследовано абсолютное число клеток с CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD68+ фенотипом по методу «hot spot» при увеличении микроскопа  $\times 400$ . Выявлено, что только макрофаги вовлечены в формирование агрессивного фенотипа РПЖ. Так, абсолютное число макрофагов в зонах наибольшей иммуноклеточной инфильтрации было большим в группе высокого риска ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, на основании клинико-морфологического и молекулярно-биологического исследования как паренхиматозного, так и стромального компонентов РПЖ с оценкой процессов ЭМТ, ангиогенеза, десмоплазии, особенностей иммуноклеточной инфильтрации, подтверждена прогностическая ценность ИГХ исследования в оценке агрессивности РПЖ.

Таблица 1

**Распределение экспрессии ИГХ маркеров, имеющих прогностическое значение, в зависимости от их принадлежности к группам исследования**

Маркер, экспрессия		Группы	Слабого риска N = 4	Промежуточного риска N = 10	Высокого риска N = 26	Достоверность, критерий $\chi^2$
Ki-67	0		2 (50 %)	6 (60 %)	5 (19,2 %)	$\chi^2 = 10,31$ , $p < 0,05$
	до 1 %		2 (50 %)	4 (40 %)	4 (15,3 %)	
	до 5 %		0	0	9 (34,6 %)	
	до 10 %		0	0	5 (19,2 %)	
	более 10 %		0	0	3 (11,5 %)	
Е-кадгерин	0		0	0	1 (3,8 %)	$\chi^2 = 14,3$ , $p < 0,03$
	1+ (1–33 %)		0	0	9 (34,6 %)	
	2+ (34–66 %)		0	0	6 (23,1 %)	
	3+ (67–100 %)		4 (100 %)	10 (100 %)	10 (38,4 %)	
Виментин эпителия	0		4 (100 %)	8 (80 %)	12 (46,1 %)	$\chi^2 = 7,2$ , $p = 0,29$
	1+ (1–33 %)		0	2 (20 %)	8 (30,7 %)	
	2+ (34–66 %)		0	0	3 (11,5 %)	
	3+ (67–100 %)		0	0	3 (11,5 %)	
Виментин стромы	0		0	5 (50 %)	7 (26,9 %)	$\chi^2 = 13,2$ , $p < 0,03$
	1+ (1–33 %)		2 (50 %)	2 (20 %)	11 (42,3 %)	
	2+ (34–66 %)		2 (50 %)	0	8 (30,7 %)	
	3+ (67–100 %)		0	3 (30 %)	1 (3,8 %)	
ПМС			$62,2 \pm 25$	$70,5 \pm 22$	$99,8 \pm 34^*$	
Площадь сосудов, мкм <sup>2</sup>			$637 \pm 50$	$537 \pm 141$	$454 \pm 131^*$	
CD68+			$13,2 \pm 1,9$	$14,8 \pm 1,3$	$21,5 \pm 1,9^*$	

Примечание 1. \* — наличие статистически значимого различия между группами исследования по соответствующему признаку ( $p < 0,05$ ).

Перспективним являється дальнійший пошук молекулярно-біологічних критеріїв прогноза захворювання і резистентності к хіміотерапії.

### ВИВОДИ

1. Из 15 досліджуваних імуногістохімічних маркерів критеріями прогноза рецидивування і виживаємості пацієнтів з РПЖ являються експресія Ki-67, E-кадгерина, виментина, CD34+ і CD68+.

2. Індекс метки Ki-67 до 1 % являється благоприйнятним критерієм прогноза ( $p < 0,05$ ). ІМ Ki-67  $>1$  % асоціюється з групою високого ризику ( $p < 0,0001$ ).

3. Епітеліально-мезенхімальна трансформація РПЖ може служити критерієм прогноза захворювання,

що визначається значимим підвищенням експресії виментина і зниженням експресії E-кадгерина в раках високого ризику ( $p < 0,05$  і  $p < 0,01$  відповідно).

4. Такі показателі стромы, як неоангіогенез з візастаєнням числа мікрососудів і зниженням їх площі, підвищена експресія виментина клітками стромы, високий рівень інфільтрації опухолі макрофагами (CD68+) асоціюються з РПЖ високого ризику ( $p < 0,05$ ).

5. Не мають суттєвого прогностичного значення такі ІГХ маркери, як експресія цитокератина 8/18, цитокератина HMW, TGF- $\beta$ , ГМА- $\alpha$ , VEGF, рецепторів андрогена, ступінь вираженості іммуноклеточної інфільтрації і абсолютне число CD3+, CD8+, CD4+ CD20+ кліток.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федоренко З. П. Рак в Україні, 2013–2017 [Текст] / З. П. Федоренко, Л. О. Гулак, Є. Л. Горюх [та ін.] // Бюл. Нац. канцер-реєстру України. — 2014–2018. — Т. 16–20. <http://users.i.kiev.ua/~ucr/>
2. Moch H. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs / H. Moch, P. A. Humphrey, T. M. Ulbright, V. Reuter. — Lyon, France : IARC Press. — 2016.
3. Damien A. L. Stromal Androgen Receptor in Prostate Cancer Development and Progression / A. L. Damien, Grant Buchanan // Cancer. — 2017. — Vol. 9 (10). — 34 p.
4. European Association of Urology: the guidelines on prostate cancer [Text] / N. Mottet, J. Bellmunt, E. Briers et al. // Clinical Endocrinology. — 2014. — Vol. 81 (1). — 136 p.
5. Gordetsky J. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System / J. Gordetsky, J. Epstein // Am J Surg Pathol. — 2016. — Vol. 40 (2). — P. 244–252.
6. Prognostic value of Ki-67 for prostate cancer death in a conservatively managed cohort / G. Fisher, Z. H. Yang, S. Kudahetti et al. // British Journal of Cancer. — 2013. — Vol. 108. — P. 271–277.
7. Tumour growth fraction measured by immunohistochemical staining of Ki67 is an independent prognostic factor in preoperative prostate biopsies with small-volume or low-grade prostate cancer / T. Zellweger, S. Gunther, I. Zlobec et al. // International Journal of Cancer. — 2009. — Vol. 4, Issue 9. — P. 2116–2123.
8. The intraobserver variability of digital rectal examination in a large randomized trial for the screening of prostate cancer / C. Gosselaar, R. Kranse, M. J. Roobol et al. // Prostate. — 2008. — Vol. 68, N 9. — P. 985–993.
9. Cao Zheng. Mechanisms navigating the TGF- $\beta$  pathway in prostate cancer. / Zheng Cao, Natasha Kyprianou // Asian Journal of Urology. — 2015. — Vol. 2. — P. 11–18.
10. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer / K. M. Mrozik, O. W. Blaschuk, C. M. Cheong [et al.] // BMC Cancer. — 2018. — Vol. 18. — P. 939–46.
12. Stromal androgen receptor regulates the composition of the microenvironment to influence prostate cancer outcome / D. A. Leach, E. F. Need, R. Toivanen et al. // Oncotarget. — 2015. — Vol. 6. — P. 16135–16150.
13. Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness / J. Cai, H. Tang, L. Xu et al. // Carcinogenesis. — 2012. — Vol. 33. — P. 20–29.
14. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy / Z. Wang, C. Dabrosin, X. Yin [et al.] // Seminars in Cancer Biology. — 2015. — Vol. 35. — S. 224–243.
15. Secreted Factors from Colorectal and Prostate Cancer Cells Skew the Immune Response in Opposite Directions / M. Lundholm, C. Hägglöf, M.L. Wikberg // Scientific Reports. — 2015. — Vol. 5. — P. 45–52.

Статья поступила в редакцию 27.09.2019.

П. В. ТКАЧЕНКО, І. І. ЯКОВЦОВА, І. В. ІВАХНО, О. В. ДОЛГАЯ, А. Є. ОЛІЙНИК

Харківська медична академія післядипломної освіти

### ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ КРИТЕРІЇ ПРОГНОЗУ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

Серед діагностичних клініко-морфологічних ознак раку передміхурової залози (РПЗ) найбільш значущими залишаються рівень ПСА крові, сума за Глісоном, стадія захворювання за системою TNM. Урахування імуногістохімічних (ІГХ) показників необхідне для прогнозу захворювання і вибору лікувальної тактики. Мета дослідження — удосконалити морфологічні критерії прогнозу РПЗ шляхом дослідження ІГХ маркерів у формуванні агресивного фенотипу пухлини. РПЗ були розподілені на три групи ризику (низький,

проміжний і високий) згідно з рекомендаціями EAU. ІГХ дослідження проводилося з використанням маркерів TGF- $\beta$ , Ki-67, E-кадгерину, рецепторів андрогенів, VEGF, виментину, CD34+, CD4+, CD8+, CD3+, CD20+, CD68+, ДМА- $\alpha$ , цитокератину 8/18, цитокератину HMW. Із 15 ІГХ маркерів виявлено статистично значущу залежність між рівнем експресії Ki-67, E-кадгерину, виментину, CD34+, CD68+ і приналежністю РПЗ до груп дослідження, що визначає ці маркери як значущі для прогнозу захворювання.

**Ключові слова:** рак передміхурової залози, прогноз, імуногістохімія.

P. TKACHENKO, I. YAKOVTSOVA, I. IVAKHNO, O. DOLGAYA, A. OLIYNIK

*Kharkov Medical Academy of Postgraduate Education*

### **IMMUNOHISTOCHEMICAL CRITERIA FOR PROGNOSIS OF PROSTATE CANCER**

Among the diagnostic clinical and morphological features of prostate cancer (PCa), the most significant remain: the level of blood PSA, Gleason sum score, the stage of the disease according to the TNM system. The consideration of immunohistochemical (IHC) factors are necessary for the prognosis of the disease and the choice of therapeutic tactics. The aim of the study was to improve the morphological criteria for the prognosis of prostate cancer by examining IHC markers in the forming of aggressive tumor phenotype. PCa was divided into three groups of low, intermediate and high risk, according to EAU guidelines. The IHC study was performed using markers: TGF- $\beta$ , Ki-67, E-cadherin, androgen receptors, VEGF, vimentin, CD34+, CD4+, CD8+, CD3+, CD20+, CD68+, GMA- $\alpha$ , cytokeratin 8/18, cytokeratin HMW. Of the 15 IHC markers, a statistically significant relationship was found between the expression levels of Ki-67, E-cadherin, vimentin, CD34+, CD68+ and the presence of prostate cancer in the study groups, which determines these markers significant for disease prognosis.

**Keywords:** prostate cancer, prognosis, immunohistochemistry.

#### **Контактная информация:**

Ткаченко Павел Владимирович

врач-патологоанатом отделения патанатомии Харьковской областной клинической больницы

тел.: +38 (096) 166-88-77