



КЛИНИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ (CD34 и P53) В РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М. С. Саломов¹

М.Н.Тилляшайхов²

¹Республиканский Специализированный Научно-практический
Медицинский Центр Онкологии и Радиологии Сурхандарьинской
филиале РСНПМЦОиРСФ» РУз. Узбекистан г. Термез, ул. Ибн Сина
38а,

²Республиканский Специализированный Научно-практический
Медицинский Центр Онкологии и Радиологии «РСНПМЦОиР» РУз.
Узбекистан г. Ташкент, ул. Фароби, 383.

e-mail: m.salomov28@gmail.com

<https://www.doi.org/10.5281/zenodo.7944686>

ARTICLE INFO

Received: 08th May 2023

Accepted: 16th May 2023

Online: 17th May 2023

KEY WORDS

Рак простаты,
иммуногистохимия, P53,
CD34, метастазы.

ABSTRACT

Иммуногистохимия (ИГХ) – метод выявления точной локализации того или иного клеточного или тканевого компонента (антигена) благодаря связыванию его с мечеными антителами. Последний является функциональным гомологом p53, но экспрессируется в ткани предстательной железы исключительно базальным слоем эпителия и играет, как предполагается, важную роль в его формировании.

Введение

Учитывая глобальное постарение населения, в том числе мужского, проблема дифференциальной диагностики и прогноза болезней предстательной железы у мужчин старше 40 лет в ближайшем будущем не утратит своей остроты. Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из самых распространенных заболеваний у мужчин. В России с 2008 по 2018 год заболеваемость увеличилась с 8,42 до 14,25 на 100 тысяч населения. Прирост составил 60,2% (самый высокий показатель среди злокачественных опухолей у мужчин). В 2018 году количество впервые диагностированных пациентов с раком простаты достигло 10735 в год. (Старинский В.В. 2019).

За последние 5 лет количество пациентов с РПЖ в нашей стране увеличилось, в частности, в 2015 году - 372, в 2016 году - 443, в 2019 году количество пациентов достигло 483 (рост на 23%). Также наблюдается рост заболеваемости, которая в 2015 году составила 1,2 пациента на 100 тысяч населения, в 2019 году этот показатель составил 1,5. (Тилляшайхов М.Н. и др., 2020). [1]. Диагностическая ценность комплекса рутинных методов обследования пациентов с болезнями предстательной железы в настоящее время преимущественно определяется исследованием уровня простат-специфического антигена (ПСА) и его фракций, ТРУЗИ, пальцевого ректального исследования и МРТ, обладающих довольно низкой специфичностью.



Иммуногистохимические исследования проводятся для анализа различных процессов. Это исследование важно для определения молекулярных структур в клетках, изучения клеточной локализации, а также изучения распространения или гистогенеза опухолевых заболеваний. Кроме того, наблюдение за этими процессами при развитии предраковых процессов, определение прогностически наблюдаемых осложнений заболеваний является одной из основ иммуногистохимии. Результаты иммуногистохимического исследования играют ключевую роль в определении стадии опухоли и тактики лечения, динамическом наблюдении и контроле лечебных процессов. По выводам некоторых ученых, иммуногистохимия имеет большое значение при выявлении групп риска, способных вызывать опухолевые заболевания.

CD34 — мембранный белок, молекула межклеточной адгезии, играющая роль на ранних стадиях кроветворения. CD34 опосредует связывание стволовых клеток с внеклеточным матриксом костного мозга или непосредственно со стромальными клетками. Белок служит каркасом (скаффолдом) для прикрепления специфических гликанов, что позволяет стволовым клеткам прикрепляться к лектинам, продуцируемым стромальными клетками или другими компонентами костного мозга. Кроме того, сильно гликозилированный CD34 обеспечивает углеводные лиганды для селектинов.

При раке предстательной железы белок CD34 является мембранным белком, играющим роль на ранних стадиях кроветворения, молекулой межклеточной адгезии (слипания между клетками). Он служит специальным местом для прикрепления специфических гликанов к белкам, что позволяет стволовым клеткам прикрепляться к лектинам, продуцируемым стромальными клетками или другими компонентами костного мозга. Кроме того, сильно гликолизированный CD34 обеспечивает углеводные лиганды для селектинов. [2]

p53- белок, контролирующий протекание процессов клеточного цикла, а также наличие повреждений в геноме, которые могут привести к дальнейшему развитию патологии. wr53-зависимый апоптоз является сильным селектором, препятствующим накоплению мутаций, а если они уже появились, то wr53-зависимый апоптоз позволяет уничтожить такие потенциально опасные для организма клетки. Ген супрессор опухоли имеет мутации в 50 процентах всех типов рака. Этот ген кодирует фактор транскрипции, который контролирует входение клетки в клеточный цикл. Многие внутриклеточные системы, следящие за «здоровьем» клетки, передают сигналы о «сбоях в работе» белку w p53.[1] С его помощью клетка решает, делиться или нет. Если клетка непоправимо повреждена, белок wr53 запускает цепочку событий, которые заставляют клетку «самоубиться» — процесс, известный как апоптоз. Клетки, не имеющие w p53 или неправильно функционирующие, не способны к такой саморегуляции и продолжают делиться даже тогда, когда это опасно для организма.[4] Как и все опухолевые супрессоры, w p53 контролирует нормальное течение клеточного цикла. p53 — фактор транскрипции, регулирующий клеточный цикл, этот реагент действует как супрессор образования злокачественных опухолей и ген p53 считается антионкогеном.[5]

Иммуногистохимическое исследование было проведено нами на кафедре патоморфологии РСНПМЦОиР, для чего было отобрано 60 больных раком предстательной железы и 30 исследовано с помощью реагентов CD34 и 30 исследовано – p53.

Материалы и методы

Когорта пациентов, включенных в исследования составила 60 мужчин, средний возраст $69,2 \pm 2,17$ лет. 60 пациентов с верифицированным раком предстательной железы различной степени анаплазии.

Иммуногистохимическое исследование проводили на иммуногистопротессоре Bond Leica Australia (Австралия) для изучения экспрессии клеток с использованием моноклональных антител CD34 и p53. Данному исследованию были подвергнуты 30 больных местнораспространенным раком предстательной железы. Полученные результаты оценивали с помощью реагента CD34 путем изучения васкуляризации опухоли и характера метастазирования в соседние органы. Результаты исследования оценивали по отрицательным и положительным реакциям. У всех 30 пациентов реакция была 100% положительной. Побочных реакций не наблюдалось.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA 10.0, с последующим математическим анализом полученных материалов. Корреляционные взаимоотношения между числом Глисона опухоли, ПСА, индексом пролиферации клеток, выраженностью продукции оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (r).

Результаты и обсуждение.

В 10 (33,3%) случаях при высококодифференцированных типах аденокарциномы обнаружено наличие 5-10 сосудов в области 15ок x 40об. Визуализировались эпителиальные злокачественные клетки предстательной железы, имеющие микроскопические проявления полиморфизма, имеющие луковично-железистое строение, ядра гипохромные, имеют патологические митозы; наблюдалось формирование ангиоматоза с сосудами вокруг клеток эпителия и соединительной ткани, стенка сосудов окрашивалась в коричневый цвет (рис 4.2).

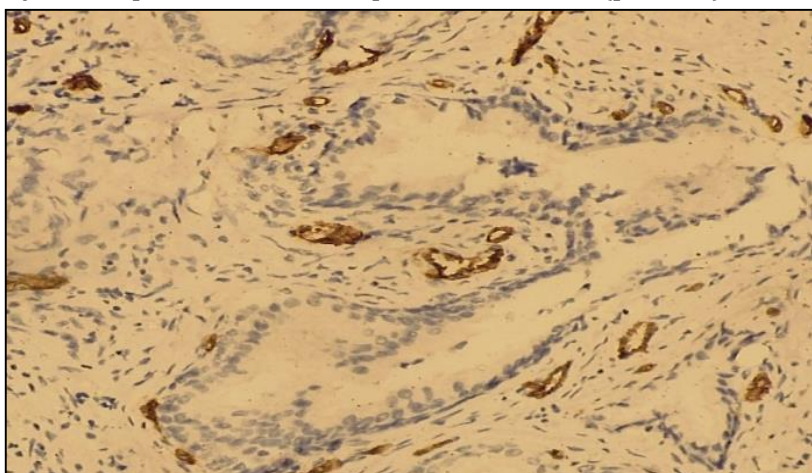


Рисунок 4.2. Положительная реакция реагента CD34 при высококодифференцированной аденокарциноме предстательной железы.

Отчетливо видно наличие до 5-10 сосудов на одном сухом участке IGX - хромаген Dab. Объектив 10. Окуляр 40

В 10 (33,3%) случаях высокодифференцированных типах аденокарцином отчетливо видно, что плотность сосудов составляет до 15-20 сосудов в области 15 ок х 40 об. Визуализировались эпителиальные злокачественные клетки предстательной железы с микроскопическими проявлениями полиморфизма, имеющие луковичное и железистое строение, гиперхромные ядра и патологические митозы; наблюдалось формирование ангиоматоза с сосудами вокруг клеток эпителия и соединительной ткани, стенка сосудов окрашивалась в коричневый цвет (рис.4.3).

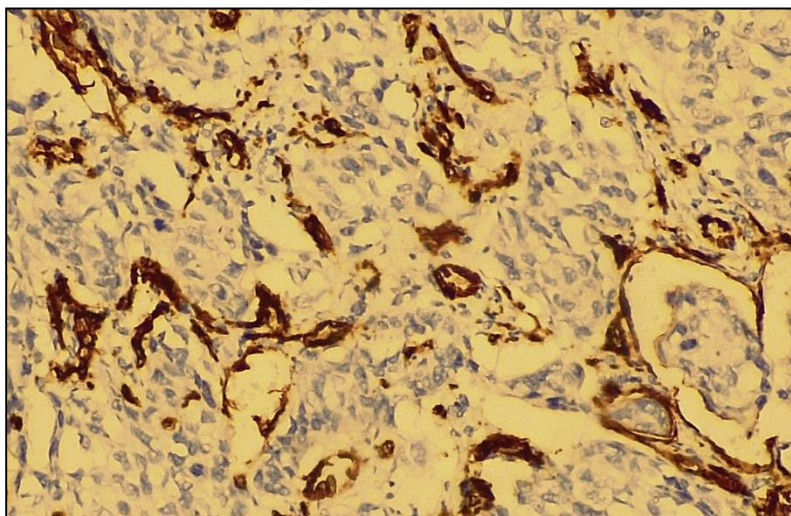


Рисунок 4.3. Положительная реакция реагента CD34 при умеренно дифференцированной аденокарциноме предстательной железы. Хорошо видно наличие до 15-20 жилок на одном сухом участке IGX - хромаген Dab. Объектив 10. х Окуляр 40.

В выделенных 10 (33,3%) типах низкодифференцированной аденокарциномы продемонстрировано наличие 20-30 сосудов в области 15ок х 40об. Если рассматривать полученные результаты под микроскопом, то это представлено окрашиванием эндотелиальных клеток на стенках сосудов, что в нашем исследовании помогло оценить плотность сосудов по типу низкодифференцированной аденокарциномы. При этом тот факт, что опухолевая ткань богата кровеносными сосудами, свидетельствовал о высокой степени выраженности метастазирования и агрессивности опухоли по отношению к соседним органам. Эпителиальные злокачественные клетки предстательной железы, имеющие микроскопические проявления полиморфизма, имеют сегментарное и железистое строение, ядра их гиперхромны и имеют патологические митозы. Ангиоматоз сосудов и соединительной ткани формировался вокруг эпителиальных клеток, стенка сосудов окрашивалась в темно-коричневый цвет (рис.4.4).

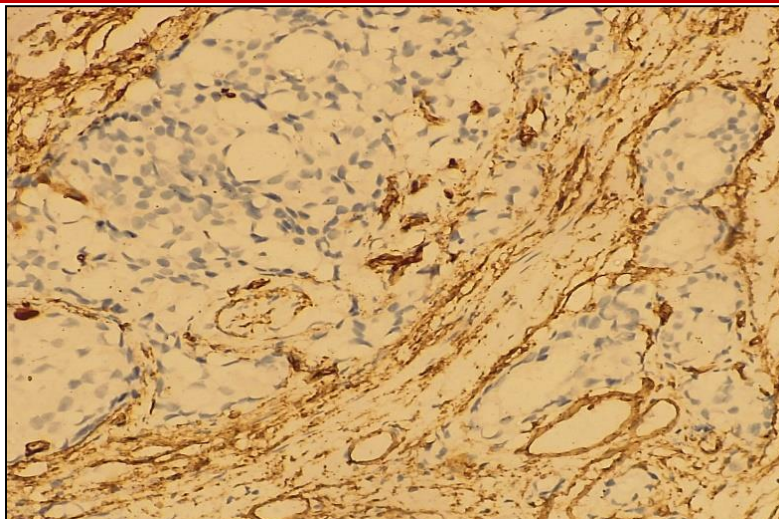


Рисунок 4.4. Положительная реакция реагента CD34 при низкодифференцированной аденокарциноме предстательной железы. Хорошо видно наличие до 20-30 прожилок на одном сухом участке IGX - хромаген Dab. Объектив 10. Окуляр 40.

Результаты исследования биоптатов с помощью реагента CD34 представлены в таблице 4.10.

Таблица 4.10

Результаты исследования с CD по плотности сосудов в поле зрения (n=30)

	G-1 (10)	G-2 (10)	G-3 (10)
Плотность сосудов в поле зрения	5-10	15-20	20-30

Антигеном для антител при раке предстательной железы является белок p53, контролирующий протекание процессов клеточного цикла, а также наличие повреждений в геноме, которые могут привести к дальнейшему развитию патологии, исследование которым и было проведено у 30 больных раком предстательной железы. Результаты оценивались как легкая, средняя и выраженная положительные реакции. Степень дифференцировки 30 больных, включенных в исследование, оценивали путем отбора из 10 больных. Из них 10 (33,3%) были высокодифференцированными аденокарциномами, 4 (13,3%) имели слабopоложительную, 5 (16,7%) - умеренно положительную и 1 (3,3%) - высокоположительную реакцию. Эпителиальные злокачественные клетки предстательной железы, имеющие микроскопические проявления полиморфизма, имеют фиброзно-железистое строение, имеют гиперхромные ядра и патологические митозы, а клетки эпителия окрашены в бурую окраску. (рис. 4.5).

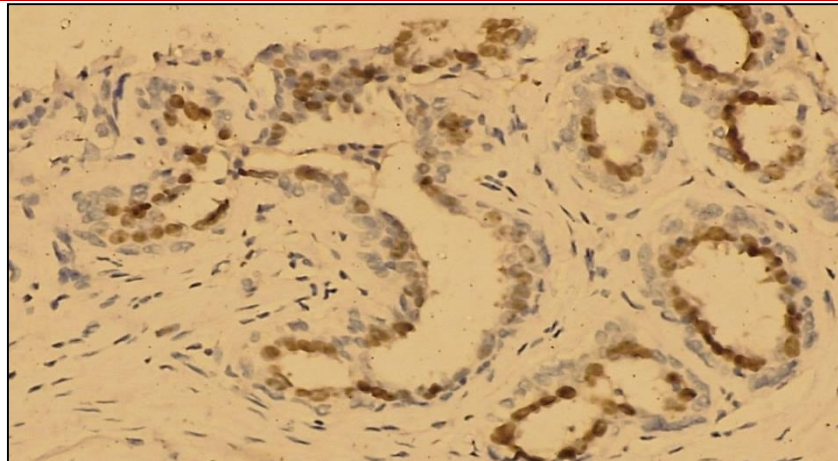


Рисунок 4.5. Средняя положительная реакция на реагент p53 при высокодифференцированной аденокарциноме предстательной железы. IGX – Даб Хромаген. Объектив x 10. Окуляр 40.

При высокодифференцированной аденокарциноме из 10 (33,3%) отобранных пациентов у 4 (13,3%) была слабо положительная реакция на реагент p53, у 5 (16,7%) — умеренно положительная и у 1 (3,3%) — высокая положительная реакция. Негативной реакции не наблюдалось (рис.4.6).

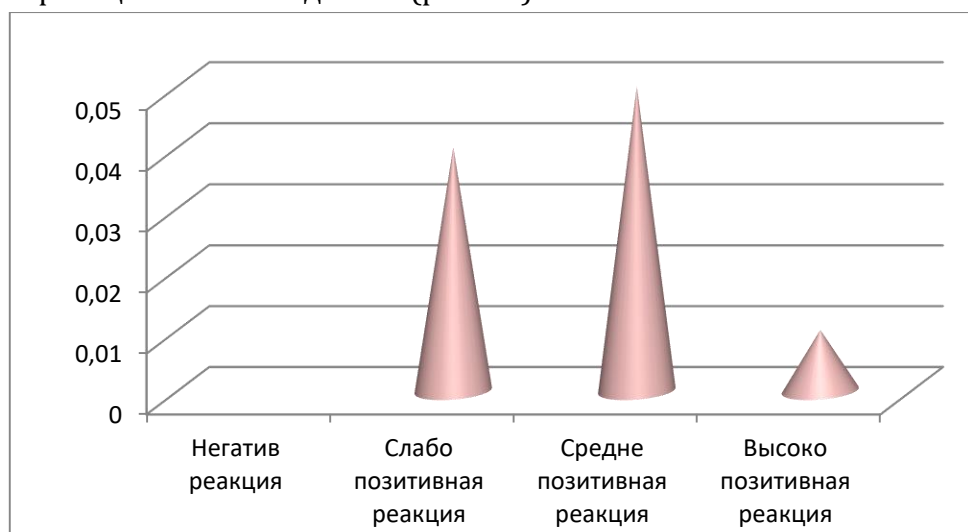


Рис.4.6 Распределение пациентов по реакции на p53 при высокодифференцированной аденокарциноме

При раке предстательной железы результаты p53 оценивали по легкой, средней и тяжелой положительной реакции. Степень дифференцировки 30 больных, включенных в исследование, оценивали путем отбора из 10 больных. Из них 10 были высокодифференцированными аденокарциномами, из них 3 (33,3%) имели слабopоложительную реакцию, 4 (13,3%) - среднеположительную реакцию и 3 (10%) - высокоположительную реакцию. Эпителиальные злокачественные клетки предстательной железы, имеющие микроскопические проявления полиморфизма, имеют фиброзно-железистое строение, ядра гиперхромны, а клетки эпителия с патологическими митозами окрашены в коричневый цвет (рис. 4.6).

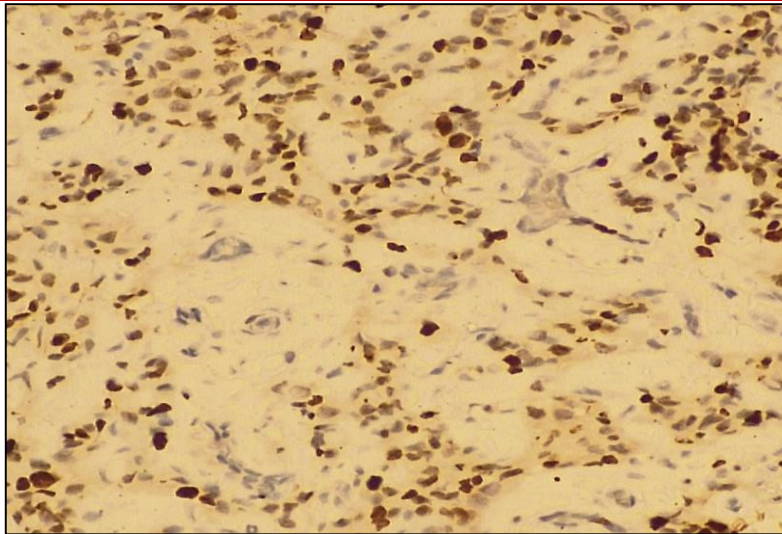


Рисунок 4.7. Среднеположительная реакция на реагент p53 при умеренно дифференцированной аденокарциноме предстательной железы. IGX - Даб Хромаген. Объектив 10. х Окуляр 40.

Среди отобранных 10 пациентов с умеренно дифференцированной аденокарциномой у 3 (30%) больных была слабоположительная реакция, у 4 (40%) — больных умеренно положительная реакция и у 3 (30%) больных высокая положительная реакция на реагент p53. Негативной реакции не наблюдалось (рис.4.8).



Рис.4.6 Распределение пациентов по реакции на p53 при умереннодифференцированной аденокарциноме

У больных раком предстательной железы с низкодифференцированной аденокарциномой результаты p53 оценивали по результатам легкой, средней и тяжелой положительной реакции. Степень дифференцировки 30 больных, включенных в исследование, оценивали путем отбора из 10 больных. 10 (33,3%) из них были низкодифференцированными аденокарциномами, из них 1 (3,3%) имели слабоположительную реакцию, 3 (9,9%) - умеренноположительную реакцию и 6 (30%) - высокоположительную реакцию (рис.4.7). Эпителиальные злокачественные клетки предстательной железы, имеющие микроскопические проявления полиморфизма,

имеют фиброзно-железистое строение и ядра гипохромные, а клетки эпителия с патологическими митозами окрашенном в коричневый цвет (рис.4.8).

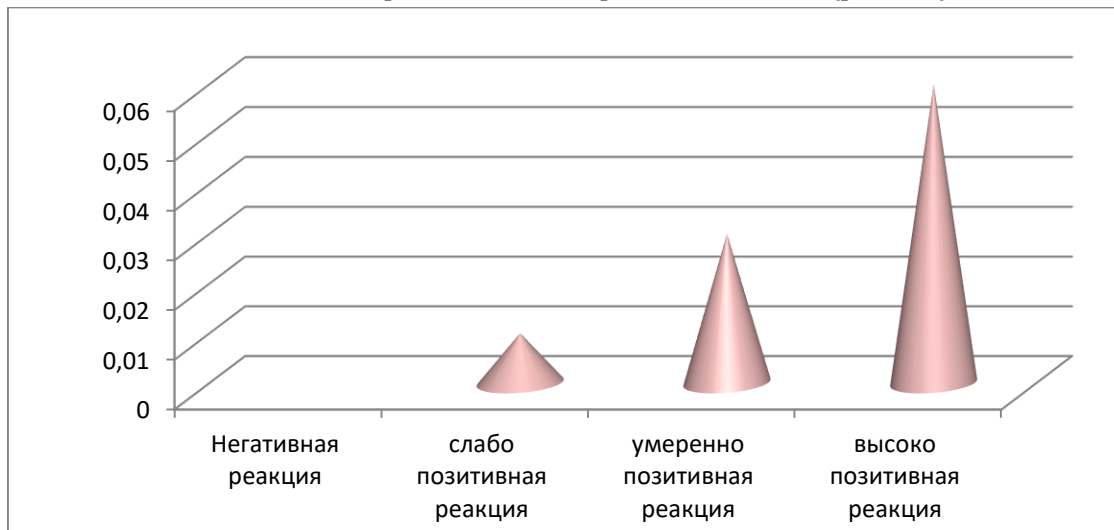


Рис.4.7 Распределение пациентов по реакции на p53 при умереннодифференцированной аденокарциноме

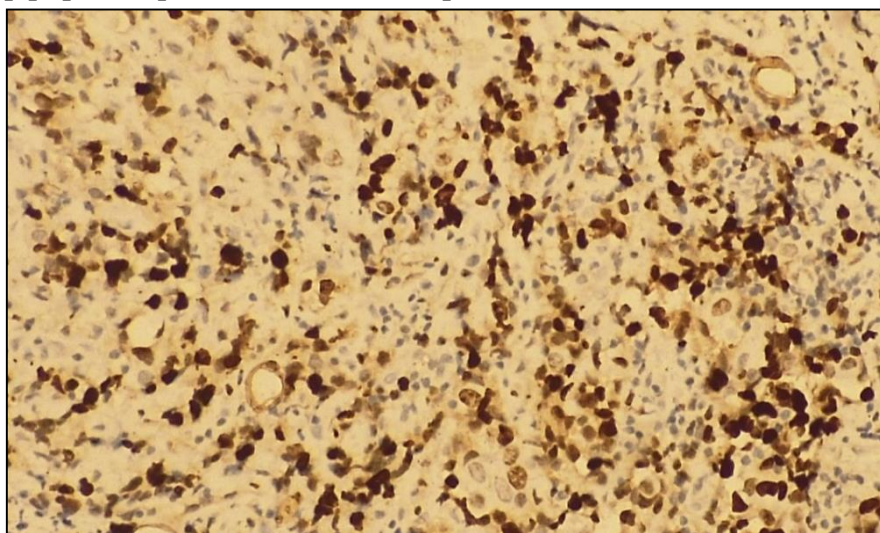


Рисунок 4.8. Высокая положительная реакция реагента p53 при низкодифференцированной аденокарциноме предстательной железы. IGX – Даб Хромаген. Объектив 10. x Окуляр 40.

Гистологические и иммуногистохимические результаты изучения анамнеза заболевания показали, что низкий уровень дифференцировки рака предстательной железы может привести к дальнейшему развитию патологии и тяжелым осложнениям заболевания.

При анализе результатов иммуногистохимического исследование, было выявлено наибольшее количество с экспрессии гена Р 53 у больных в стадии Т3N1M0 в обеих исследуемых группах у 6 и 4 соответственно по группам.

Таблица 2.4.

Распределение пациентов МРПЖ по определением экспрессия гена Р 53 по стадиям заболевания, n=21



Группы	экспрессия гена Р	T1bN1M0	T2N1M0	T3N1M0
Основная группа n=86	12 (13.9 %)	2 (2.3%)	4 (4.6%)	6 (6.9%)
Контрольная группа n=81	9 (11.1%)	2 (2.4%)	3 (3.7%)	4 (4.9%)

Выводы

В рамках проведенного исследования доказана диагностическая и прогностическая ценность ИГХ маркеров, таких как определение плотности микрососудов белка pP53 и CD34; распределения и плотности микрососудов в клетках; уровня продукции белков типа pP53 и CD34 и ингибитора TIMP-1. Важным критерием в нашем исследовании явилось ПМС, которая зависит от локализации опухоли и при прорастании в шейку мочевого пузыря и семенные пузыри она резко возрастает ($75,7 \pm 5,2$ и $79,8 \pm 4,8$ соответственно), тогда как при случайно обнаруженной опухоли или при поражении одной доли ($63,7 \pm 3,1$ и $61,7 \pm 4,7$ соответственно) ее показатели значительно низкие. Также напрямую связана с размерами опухоли, чем больше размер опухоли, тем выше показатель ПМС (показатель ПМС $51,3 \pm 4,1$ когда опухоль до 1,5 см и показатель ПМС $74,7 \pm 4,5$ при размере опухоли более 2,5 см), отмечается значительный рост показателя ПМС. При сравнении связи от уровня ПСА, можно отметить, что при уровне до 10 нг/мл показатель ПМС равен $53,4 \pm 4,3$, тогда как при уровне более 100,1 нг/мл показатель резко возрастает ($75,2 \pm 4,1$). Необходимо отметить, что значительной разницы показателя ПМС в зависимости от гистологической дифференцировки нами не были отмечены. Установить связь ПМС от возраста пациентов статистически оказались недостоверными, так как сравнивались только две возрастные группы и нами не были замечены значительные отличия между показателями ПМС. Полученные результаты открывают перспективы дальнейших исследований в этой области, среди которых оценка прогностической ценности других маркеров болезней предстательной железы, выявление взаимосвязи ИГМ маркеров и эффективности лечения различных болезней предстательной железы.

References:

1. Абдуллин ИИ, Коссов ФА, Камолов БШ, Орлов ОС, Баранова ЕО, Григорьев НА, Панов ВО, Тюрин ИЕ, Долгушин БИ: Современные возможности мрт/узи fusion-биопсии в диагностике рака предстательной железы Вопросы урологии и андрологии 2017, 5(2):37-44.
2. Алексеев Б, Ньюшко К: Радикальная простатэктомия с расширенной тазовой лимфаденэктомией и адъювантная гормональная терапия у больных лимфогенно-диссеминированным раком предстательной железы. Онкоурология 2011, 7:118-121.
3. Кушлинский Н.Е. Молекулярные и клеточные маркеры пролиферации, дифференцировки, метастазирования и неоангиогенеза при раке предстательной железы. Избранные главы гериатрической урологии. Ньюдиамед. 2000; 227-273.



4. Березин А.Е. Регуляторы активности матричных металлопротеиназ как новые биологические маркеры кардиоваскулярного ремоделирования: обзор литературы. Український медичний часопис. 2011; (1):36-43.
5. Brehmer B, Biesterfeld S, Jakse G. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2003;6:217-222. doi:10.1038/sj.pcan.4500657
6. Evans A.J. Alpha-methylacyl CoA race-mase (P504S): overview and potential uses in diagnostic pathology as applied to prostate needle biopsies // J. Clin. Pathol. 2003. Vol. 56. P. 892-897.
7. Nassar A., Amin M.B., Sexton D.G., Cohen C. Utility of alpha-methylacyl coen-zyme A racemase (p504s antibody) as a diagnostic immunohistochemical marker for cancer // Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2005. Vol. 13. № 3. P. 252-255.
8. Rubin M.A., Bismar T.A., Andren O., Mucci L., Kim R., Shen R., Ghosh D., Wei J.T., Chinnaiyan A.M., Adami H.O., Kantoff P.W., Johansson J.E. Decreased alpha-methylacyl CoA racemase expression in localized prostate cancer is associated with an increased rate of biochemical recurrence and cancer-specific death // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005. Vol. 14. № 6. P. 1424-1432.
9. Jiang Z., Li C., Fischer A., Dresser K., Woda B.A. Using an AMACR (P504S)/34betaE12/p63 cocktail for the detection of small focal prostate carcinoma in needle biopsy specimens // Am J. Clin. Pathol. 2005. Vol. 123. № 2. P. 231-236.
10. Epstein JI PSA and PAP asimmunohistochemical markers in prostatecancer // Urol Clin North Am.1993. Vol. 20. P. 757-770.
11. Schnoor M. Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. J Immunol. 2008; (180):5707-19. doi:10.4049/jimmunol.180.8.5707