

## Иммуногистохимическое исследование экспрессии Ki-67, p53 и Notch1 в аденокарциномах предстательной железы различной степени злокачественности

© Г.Ю. КУДРЯВЦЕВ<sup>1</sup>, Л.В. КУДРЯВЦЕВА<sup>1</sup>, Л.М. МИХАЛЕВА<sup>2</sup>, Н.А. СОЛОВЬЕВА<sup>1</sup>, И.И. БАБИЧЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования** — определить прогностическую значимость экспрессии Ki-67, p53 и Notch1 в диагностике рака предстательной железы.

**Материал и методы.** Исследован операционный и диагностический материал, полученный от пациентов с доброкачественной гиперплазией, простатической интраэпителиальной неоплазией и раком предстательной железы различной степени злокачественности, всего 98 пациентов. Определение клеточных антигенов осуществлялось при помощи моноклональных кроличьих антител к белку Ki-67 (Clone SP6), мышиных антител к белку p53 (Clone Y5), рекомбинантных антител к белку Notch1 (Clone EP1238Y).

**Результаты.** Выявлены статистически значимые различия при сравнении показателей экспрессии Ki-67, p53 и Notch1. Установлена достоверная прямая корреляционная связь между показателями экспрессии Ki-67, p53 и прогностическими группами рака предстательной железы, основанными на морфологической классификации по Глиссону ( $r_s=0,736, p<0,001$ ;  $r_s=0,682, p=0,035$  соответственно), а также выявлена сильная обратная связь между экспрессией Notch1 и прогностическими группами рака предстательной железы ( $r_s=-0,425, p<0,001$ ).

**Заключение.** Экспрессия Notch1 в сочетании с низкой пролиферативной активностью клеток и отсутствием белка p53 (Y5) может свидетельствовать о сохранности механизма апоптоза в опухолевых клетках, что расширяет показания к консервативному лечению рака предстательной железы.

**Ключевые слова:** иммуногистохимия, рак предстательной железы, апоптоз, Ki-67, p53 (Y5), Notch1.

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кудрявцев Г.Ю. — <https://orcid.org/0000-0001-7921-9758>; e-mail: kgosha@mail.ru

Кудрявцева Л.В. — <https://orcid.org/0000-0002-4085-3919>

Михалева Л.М. — <https://orcid.org/0000-0003-2052-914X>

Соловьева Н.А. — <https://orcid.org/0000-0002-0757-6796>

Бабиченко И.И. — <https://orcid.org/0000-0001-5512-6813>

**Автор, ответственный за переписку:** Кудрявцев Г.Ю. — e-mail: kgosha@mail.ru

### КАК ЦИТИРОВАТЬ:

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;82(5):42–49. <https://doi.org/10.17116/patol20208205142>

## Immunohistochemical study of Ki-67, p53 and Notch1 expressions in prostate cancer of different grades

© G.Yu. KUDRYAVTSEV<sup>1</sup>, L.V. KUDRYAVTSEVA<sup>1</sup>, L.M. MIKHALEVA<sup>2</sup>, N.A. SOLOVIEVA<sup>1</sup>, I.I. BABICHENKO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

### ABSTRACT

**Objective.** To determine the prognostic value of the expression of Ki-67, p53, and Notch1 in the diagnosis of prostate cancer.

**Material and methods.** Surgical and diagnostic materials obtained from patients with benign prostatic hyperplasia, prostate intraepithelial neoplasia, and prostate cancer of different grades underwent studies; a total of 98 patients were examined. Cell antigens were determined using rabbit anti-Ki-67 monoclonal antibodies (Clone SP6), mouse anti-p53 monoclonal antibodies (Clone Y5), and recombinant anti-Notch1 antibodies (Clone EP1238Y).

**Results.** Comparing Ki-67, p53, and Notch1 expression indices revealed statistically significant differences. There was a significant direct correlation between Ki-67 and p53 expression indices and prostate cancer grade groups based on the morphological Gleason grading system ( $r_s=0.736; p<0.001$ ;  $r_s=0.682; p=0.035$ , respectively) and a strong inverse correlation between Notch1 expression and prostate cancer grade groups ( $r_s=-0.425, p<0.001$ ).

**Conclusion.** Notch1 expression in conjunction with the low proliferative activity of cells and the absence of p53 (Y5) protein may suggest that the mechanism of apoptosis is preserved in tumor cells, which expands indications for medical treatment of prostate cancer.

**Keywords:** immunohistochemistry, prostate cancer, apoptosis, Ki-67, p53 (Y5), Notch1.

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Kudryavtsev G.Yu. — <https://orcid.org/0000-0001-7921-9758>; e-mail: kgosha@mail.ru

Kudryavtseva L.V. — <https://orcid.org/0000-0002-4085-3919>

Mikhaleva L.M. — <https://orcid.org/0000-0003-2052-914X>

Solovieva N.A. — <https://orcid.org/0000-0002-0757-6796>

Babichenko I.I. — <https://orcid.org/0000-0001-5512-6813>

**Corresponding author:** Kudryavtsev G.Yu. — e-mail: kgosha@mail.ru

## TO CITE THIS ARTICLE:

Kudryavtsev G.Yu., Kudryavtseva L.V., Mikhaleva L.M., Solovieva N.A., Babichenko I.I. Immunohistochemical study of Ki-67, p53 and Notch1 expressions in prostate cancer of different grades. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2020;82(5):42–49. (In Russ.) <https://doi.org/10.17116/patol20208205142>

В настоящее время отмечается высокая частота встречаемости рака предстательной железы (РПЖ) особенно среди мужчин старше 50 лет [1], и это заставляет искать новые подходы к выбору лечения. На сегодняшний день «золотым стандартом» лечения РПЖ остается радикальная простатэктомия (РПЭ). Однако для локализованного рака также достаточно широко применяют консервативные методы: активное наблюдение (в случае значимой сопутствующей патологии) и/или гормональную терапию. При местнораспространенном РПЖ предпочтение отдается хирургическому лечению (РПЭ), которое зачастую дополняется гормональной и/или лучевой терапией. При метастатических вариантах РПЖ, как правило, проводится консервативное лечение, которое включает комбинированную химио- и гормонотерапию [2]. Широко применяемая с конца 1980-х годов брахитерапия хорошо зарекомендовала себя при лечении локализованного РПЖ ранних стадий, причем некоторые исследования показали, что 10-летняя выживаемость сопоставима с результатами после РПЭ [3].

Вместе с широким введением в практику скрининговых методов исследования концентрации простатспецифического антигена (ПСА) в крови, а также в связи с увеличением числа биопсийных исследований число выявленных случаев РПЖ неуклонно растет. Сумма баллов по классификации Глисона при гистологическом исследовании остается одним из ведущих прогностических критериев и оказывает влияние на показатели выживаемости пациентов [4]. Так, 20-летний период наблюдения с последующим анализом, опубликованный Р. Albertsen и соавт. [5], убедительно продемонстрировал, что у мужчин с РПЖ высокой степени дифференцировки выявлен низкий риск прогрессирования заболевания даже после длительного наблюдения или монотерапии с андрогенной депривацией. В случаях, когда морфологическая картина соответствовала 8 баллам и выше по классификации Глисона, отмечены значительно худшие показатели выживаемости: через 20 лет выжили только 3 из 217 пациентов.

Система классификации Дональда Глисона, которая хорошо зарекомендовала себя и применяется повсеместно при постановке диагноза РПЖ, с момента первого упоминания не один раз претерпевала значительные изменения. Так, на согласительной конференции Международного общества уропатологов в 2014 г. были скорректированы критерии верификации отдельных групп в классификации Глисона и, что наиболее важно, впервые упоминается такое понятие, как «прогностические группы» [6]. Предложенные 5 прогностических групп основаны на системе классификации Глисона и представляют собой более точ-

ное и оптимальное отражение прогноза заболевания, основанного на показателях безрецидивного течения. С 2016 г. ВОЗ приняла эти изменения и рекомендует патологам отражать в заключении патоморфологического исследования не только сумму баллов по Глисона, но и прогностическую группу [7].

Несмотря на накопленные знания, до сих пор большое количество споров ведется вокруг проблемы достоверной оценки «агрессивности» течения различных гистологических вариантов РПЖ. Крупное обзорное наблюдение, охватывающее более 6000 аутопсийных исследований, показало, что в возрастной категории старше 80 лет бессимптомный РПЖ обнаруживался при 47,8% вскрытий [8]. Благодаря своему медленному течению многие пожилые мужчины, у которых в течение жизни встречаются тяжелые сопутствующие заболевания, с большей вероятностью умирают от сопутствующей патологии, а не от РПЖ. Столь высокие показатели скрытого, бессимптомно протекающего РПЖ демонстрируют индолентный характер течения отдельных форм, что делает нецелесообразными некоторые виды терапии, так как их побочный эффект может оказать значительное негативное влияние на качество жизни пациентов [9].

Учитывая вариабельность прогностических факторов и широкую распространенность РПЖ, необходимы глубокое изучение основных молекулярных механизмов онкогенеза и разработка достоверных биомаркеров для ранней диагностики и рационального лечения. Одними из таких иммуногистохимических (ИГХ) маркеров могут стать антитела к белку Notch1.

История изучения этой группы белков началась в начале XX века с описания особого фенотипа *Drosophila melanogaster*, уникальное очертание крыла которой, как впоследствии было установлено, связано с мутацией гена *Notch* [10]. Дальнейшие исследования установили, что сигнальный путь Notch широко распространен среди различных видов млекопитающих и, несмотря на относительную простоту передачи сигнала, играет значительную роль в развитии организма и поддержании гомеостаза. Такой сигнальный путь принимает участие в дифференцировке стволовых клеток, однако в разных органах его функция в значительной мере специфична [11]. Обнаружено влияние сигнального пути на метаболизм, в частности на обмен жиров и чувствительность к инсулину [12]. Показана роль этого пути в развитии агрессивных форм рака молочной железы [13], яичников [14], острого Т-лимфобластного лейкоза [15] и др.

**Цель исследования** — определить прогностическую значимость экспрессии белков Ki-67, p53 и Notch1 в аденокарциномах предстательной железы.

## Материал и методы

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—2019 гг.

В работу включен материал, полученный от 98 пациентов, средний возраст которых — 68,6 года (от 47 до 94 лет). Материал после оперативных вмешательств исследовался чаще — 35 случаев РПЭ, 29 операций ТУР, образцы тонкоигольной аспирационной биопсии простаты получены от 34 пациентов.

После проведенного гистологического исследования диагноз РПЖ верифицирован у 84 больных. В оставшихся случаях диагностирована железисто-стромальная гиперплазия без признаков малигнизации.

Гистологическое и ИГХ-исследования материала проводили в соответствии со стандартным протоколом, в качестве первичных антител использовали моноклональные рекомбинантные антитела к белку Notch1 (Clone EP1238Y, Abcam, США), моноклональные мышьиные антитела к белку p53 (Clone Y5, Eritomics, США). Данное антитело вступает в реакцию с мутантной изоформой белка p53. Пролиферативную активность клеток оценивали при помощи моноклональных кроличьих антител к белку Ki-67 (Clone SP6, Cell Marque, США). ИГХ-реакцию проводили с использованием системы детекции QUANTO на Autostainer 360 (Thermo Fisher Scientific, США). Докрашивание срезов осуществляли гематоксилином Майера. Препараты исследовали под микроскопом (AxioPlan 2 imaging, Karl Zeiss, Германия) с фотофиксацией (AxioCam ERc 5s, Karl Zeiss, Германия).

Для количественной оценки пролиферативной активности, а также экспрессии белка p53 проводили подсчет соотношения окрашенных ядер на 300 клеток при увеличении 400 крат. 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%; сильная экспрессия (3 балла) — более 33% ядер клеток в ткани были положительными. Степень экспрессии белка Notch1 оценивали как 0 баллов при отсутствии окраски, 1 балл при окраске менее 10% клеток, 2 балла при 10—50% и 3 балла при более 50% окрашенных клеток. Также проводили качественную оценку интенсивности окраски: 0 баллов — при отсутствии сигнала; 1 балл — при слабой окраске; 2 балла — при умеренной; 3 балла — при ярко выраженном окрашивании. Окончательный балл, использованный в анализе, рассчитывали путем умножения полученных баллов степени и интенсивности экспрессии с максимальным баллом, равным 9. Приняты следующие обозначения:  $M$  — средняя величина,  $SD$  — среднеквадратическое отклонение. Статистический анализ осуществляли при помощи программы STATISTICA 10.0 в среде Windows 10. С помощью  $W$ -критерия Шапиро—Уилка определяли характер выборки, с помощью  $U$ -критерия Манна—Уитни — достоверность различий выборок с распределением, отличным от нормального, которые считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Корреляционные отношения оценивали с помощью коэффициента Спирмена, для оценки силы связи коэффициентов корреляции использовали шкалу Чеддока.

## Результаты исследования

Диагноз смешанной (железисто-стромальной) гиперплазии предстательной железы при гистологическом исследовании был верифицирован у 14 (14,3%) пациентов. Во всех случаях РПЖ (84, или 85,7%) гистологически была диагностирована ацинарная аденокарцинома различной степени злокачественности: наиболее высокодифференцированная форма, соответствующая 6 баллам (3+3) по классификации Глисона (1-я прогностическая группа), обнаружена в 31 исследовании; карцинома с морфологической картиной 3+4=7 баллов (2-я прогностическая группа) выявлена в 17 исследованиях; 4+3=7 баллов (3-я прогностическая группа) — в 14 исследованиях. В оставшихся 22 наблюдениях опухоль характеризовалась наименее благоприятным прогнозом: в 14 случаях морфологическое заключение соответствовало 4+4=8 баллам по Глисона (4-я прогностическая группа), а в 8 случаях общая сумма баллов по Глисона равнялась либо 9 (4+5, 5+4), либо 10 (5+5). Следует отметить, что среди наблюдений доброкачественного поражения предстательной железы, а также в группах относительно высокодифференцированных карцином (1-я, 2-я, 3-я прогностические группы) встречались фокусы желез с признаками простатической интраэпителиальной неоплазии (ПИН) высокой степени, которые оценивались отдельно в 24 наблюдениях.

**Экспрессия Ki-67.** Более чем в половине (55%) случаев доброкачественного поражения предстательной железы выявлена слабая экспрессия маркера Ki-67. При исследовании фокусов пролиферативной активности клеток эпителия на участках ПИН этот уровень экспрессии зарегистрирован в 83,3% случаев. Среди наблюдений опухолей с наиболее благоприятным прогнозом (1-я прогностическая группа) в подавляющем большинстве случаев продемонстрирована слабая и умеренная экспрессия маркера пролиферации (64,5% и 29% наблюдений соответственно). Во 2-й прогностической группе 6 (42,8%) наблюдений характеризовались слабой пролиферативной активностью, а еще 7 (50%) — умеренной. В 3-й прогностической группе подавляющее большинство наблюдений (7, или 63,6%) отнесено в подгруппу с умеренной экспрессией Ki-67. Низкодифференцированные опухоли преимущественно характеризовались высокой степенью экспрессии маркера Ki-67: среди наблюдений карцином 4-й прогностической группы сильная экспрессия наблюдалась в 6 (42,8%) случаях, тогда как в 5-й прогностической группе этот показатель встретился в 7 (87,5%) наблюдениях.

Достоверные различия наблюдались почти во всех группах сравнения, лишь при сопоставлении экспрессии Ki-67 в ядрах клеток железистого эпителия при доброкачественной гиперплазии предстательной железы и ПИН получена разница, приближенная к статистически значимой ( $p=0,071$ ). При сравнении 2-й и 3-й прогностических групп статистически значимой разницы не получено ( $p=0,47$ ). Наиболее значимые различия выявлены при сравнении показателей в наблюдениях низкодифференцированных опухолей и доброкачественных поражений предстательной железы, а также ПИН ( $p=0,23E-7$  и  $p=1,61E-7$  соответственно) (табл. 1).

Корреляционный анализ показал сильную прямую связь между экспрессией Ki-67 и выраженностью клеточной атипии, что находит свое отражение в увеличении порядка прогностической группы ( $r_s=0,736$ ,  $p=0,00002$ ).

**Таблица 1.** Сопоставление показателей экспрессии белка Ki-67 среди различных заболеваний предстательной железы (двусторонний *t*-тест)

Показатель	<i>n</i>	Экспрессия Ki-67 ( <i>M</i> ± <i>SD</i> в баллах)						
		доброкачественная гиперплазия (0,65±0,587)	простатическая интраэпителиальная неоплазия (0,92±0,408)	аденокарцинома предстательной железы				
				прогностическая группа				
				1-я (1,23±0,560)	2-я (1,64±0,633)	3-я (1,82±0,603)	4-я (2,35±0,633)	5-я (2,88±0,354)
Доброкачественная гиперплазия	20	—	0,0710	0,0015	0,00023	0,00013	0,00002	0,23E-7
Простатическая интраэпителиальная неоплазия	24	—	—	0,0260	0,00029	0,000058	3,07E-7	1,61E-7
1-я прогностическая группа	31	—	—	—	0,0460	0,0083	0,00001	0,65E-7
2-я прогностическая группа	14	—	—	—	—	0,4700	0,0093	0,00057
3-я прогностическая группа	11	—	—	—	—	—	0,0470	0,0015
4-я прогностическая группа	14	—	—	—	—	—	—	0,048

**Экспрессия p53.** Доброкачественная гиперплазия предстательной железы в исследовании характеризовалась отсутствием экспрессии «мутантной» формы белка p53, среди 24 наблюдений ПИН слабая экспрессия белка обнаружена лишь в 1 случае. Среди всех наблюдений РПЖ антитела клона Y5 показали положительную реакцию с белком p53 в 47 (60,3%) случаях. Различные прогностические группы опухолей отличались гетерогенностью по экспрессии этого белка: благоприятные в прогностическом плане опухоли (1-я прогностическая группа) продемонстрировали слабую экспрессию белка в 11 (35,5%) наблюдениях, во 2-й прогностической группе положительная экспрессия определялась уже в 50% наблюдений (в 6 случаях — слабая, в 1 случае — умеренная). Наблюдения, в которых была обнаружена морфологическая картина, соответствующая 4+3=7 баллам по Глисона (3-я прогностическая группа), характеризовались наличием белка p53 более чем в половине исследованных случаев (8, или 72,7%). В 4-й прогностической группе половина исследованных наблюдений продемонстрировали умеренный (6 случаев) и высокий (1 случай) уровень экспрессии белка. В группе с наихудшим прогнозом (5-я прогностическая группа) в целом преобладали случаи с выраженной экспрессией p53: 75% показали наличие сильной (4 наблюдения) и умеренной (2 наблюдения) иммунореактивности.

Попарный анализ выявил отсутствие статистически значимой разницы при данном размере выборки между экспрессией белка в группах доброкачественной гиперплазии предстательной железы и ПИН ( $p=0,389$ ), а также в 1-й и 2-й прогностических группах ( $p=0,295$ ); при сравнении 4-й и 5-й прогностических групп разницы приближалась к статистически значимой ( $p=0,053$ ). Наиболее выраженной оказалась разницы при сопоставлении показателей экспрессии между доброкачественными поражениями предстательной железы и аденокарциномами 5-й прогностической группы ( $p=5,1E-7$ ) (табл. 2).

Корреляционный анализ показал среднюю прямую связь между экспрессией p53 и увеличением морфологической градации по системе Глисона ( $r_s=0,682$ ,  $p=0,0035$ ).

**Экспрессия Notch1.** В исследовании белок Notch1 обнаружен в гладкомышечных клетках стромы предстательной железы, эндотелиальных клетках сосудов микроциркуляторного русла, а также в клетках железистого эпителия. Наиболее высокие показатели экспрессии этого белка как качественные, так и количественные обнаружены в базальных клетках эпителия ацинарных желез при доброкачественной гиперплазии. Схожие показатели экспрессии зарегистрированы в фокусах интраэпителиальной неоплазии, однако белок определялся не только в клетках базального слоя, но и в цитоплазме гиперплазированных люминальных эпителиоцитов. Средний показатель выраженности экспрессии в фокусах ПИН был меньше, чем в наблюдениях с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (1,04±0,806 и 1,61±0,820 соответственно;  $p=0,036$ ). Выявляемость данного белка среди клеток РПЖ составила 39,7% (31 наблюдение из 78), причем 16 наблюдений относились к высокодифференцированным формам с наилучшим прогнозом, лишь в 1 случае с положительной слабой экспрессией была установлена наиболее неблагоприятная 5-я прогностическая группа (см. рисунок).

При попарном сравнении всех исследуемых групп статистически значимые различия обнаружены практически во всех выборках. Пороговые значения статистически значимой разницы зарегистрированы при сравнении экспрессии белка в 1-й и 2-й прогностических группах ( $p=0,051$ ), а при сравнении 2-й и 3-й прогностических групп, а также 4-й и 5-й прогностических групп статистически значимых различий не обнаружено ( $p=0,083$  и  $p=0,87$  соответственно). Наиболее значимая разница обнаружена при сравнении экспрессии белка в наблюдениях доброкачественного поражения предстательной железы и карцином, соответствующих 5-й прогностической группе ( $p=0,00015$ ) (табл. 3).

Тест ранговой корреляции продемонстрировал наличие статистически значимой умеренной обратной связи между выраженностью экспрессии белка Notch1 и увеличением анаплазии железистой ткани предстательной железы ( $r_s=-0,425$ ,  $p=0,0001$ ).

Таблица 2. Сопоставление показателей экспрессии белка p53 (Y5) среди различных заболеваний предстательной железы (двусторонний t-тест)

Показатель	n	Экспрессия p53 (Y5) ( $M \pm SD$ в баллах)						
		доброкачественная гиперплазия (0,00±0,0)	простатическая интраэпителиальная неоплазия (0,04±0,204)	аденокарцинома предстательной железы				
				прогностическая группа				
				1-я (0,35±0,486)	2-я (0,57±0,646)	3-я (1,09±0,831)	4-я (1,43±0,851)	5-я (2,13±1,13)
Доброкачественная гиперплазия	20	—	0,3890	0,0038	0,00072	0,000028	0,0000013	5,1E-7
Простатическая интраэпителиальная неоплазия	24	—	—	0,0070	0,0013	0,00003	7,47E-7	3,4E-7
1-я прогностическая группа	31	—	—	—	0,2950	0,0062	0,00008	0,000018
2-я прогностическая группа	14	—	—	—	—	0,0110	0,0092	0,0042
3-я прогностическая группа	11	—	—	—	—	—	0,0450	0,0300
4-я прогностическая группа	14	—	—	—	—	—	—	0,0530

Таблица 3. Сопоставление показателей экспрессии белка Notch1 среди различных заболеваний предстательной железы (двусторонний t-тест)

Показатель	n	Экспрессия Notch1 ( $M \pm SD$ в баллах)						
		доброкачественная гиперплазия (1,61±0,821)	простатическая интраэпителиальная неоплазия (1,04±0,806)	аденокарцинома предстательной железы				
				прогностическая группа				
				1-я (0,55±0,568)	2-я (0,50±0,519)	3-я (0,45±0,522)	4-я (0,14±0,363)	5-я (0,12±0,353)
Доброкачественная гиперплазия	20	—	0,0360	0,00002	0,0040	0,0038	0,00013	0,00015
Простатическая интраэпителиальная неоплазия	24	—	—	0,0190	0,0420	0,0390	0,0072	0,00031
1-я прогностическая группа	31	—	—	—	0,0510	0,0458	0,0190	0,0340
2-я прогностическая группа	14	—	—	—	—	0,0830	0,0180	0,0310
3-я прогностическая группа	11	—	—	—	—	—	0,0170	0,0490
4-я прогностическая группа	14	—	—	—	—	—	—	0,8700

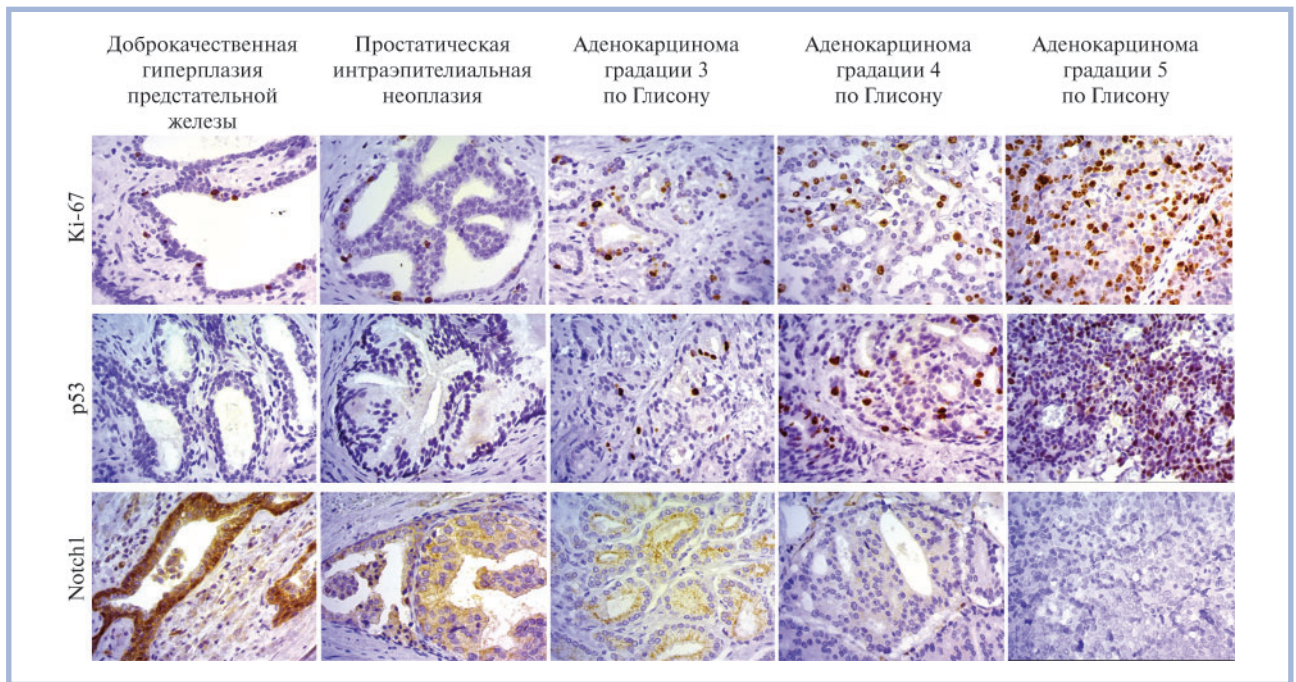
Корреляционные связи между экспрессией белков и клинично-морфологическими показателями приведены в табл. 4.

## Обсуждение

Изучение ядерного белка Ki-67 и его ассоциации с механизмами деления клетки открыли новые перспективы в изучении патоморфоза онкологических заболеваний. В разное время антитела к данному белку применяли для изучения различных злокачественных новообразований, включая рак молочной железы, легких, мозга, желудка, поджелудочной железы и др. [16, 17]. Подавляющее большинство исследований доказало связь повышенной экспрессии Ki-67 с неблагоприятным прогнозом онкологического

заболевания [18, 19]. РПЖ не стал исключением: высокая пролиферативная активность связана с повышенным риском послеоперационного рецидива при локализованном РПЖ, а также с вероятностью возникновения отдаленных метастазов и общей выживаемостью у пациентов, получавших лучевую терапию в комбинации с андрогенной депривацией [20]. Наши предыдущие работы также продемонстрировали значимую прямую корреляцию между количеством пролиферирующих опухолевых клеток и гистологической градацией опухоли по Глиссону [21].

Белок p53 регулирует контроль клеточного цикла и пролиферацию клеток, а также собственный путь апоптоза [22]. Этот белок действует как фактор транскрипции, ответственный за предотвращение пролиферации клеток после повреждения ДНК. Когда происходят мутации в ге-



Выраженность экспрессии Ki-67, p53, Notch1 при различных заболеваниях предстательной железы,  $\times 200$ .

Ki-67, P53, and Notch1 expression in different prostate diseases,  $\times 200$ .

**Таблица 4.** Корреляционные взаимоотношения различных клинко-морфологических и иммуногистохимических характеристик аденокарциномы предстательной железы

Показатель	Возраст	Прогностическая группа	Стадия заболевания	Экспрессия		
				Ki-67	p53	Notch1
Возраст	x	-0,007 ( $p=0,361$ , $n=78$ )	-0,351 ( $p=0,07$ , $n=78$ )	-0,009 ( $p=0,642$ , $n=98$ )	0,134 ( $p=0,325$ , $n=98$ )	0,042 ( $p=0,429$ , $n=98$ )
Прогностическая группа		x	0,402 ( $p=0,048$ , $n=78$ )	0,736 ( $p=0,00002$ , $n=78$ )	0,682 ( $p=0,035$ , $n=78$ )	-0,425 ( $p=0,0001$ , $n=78$ )
Стадия заболевания			x	0,325 ( $p=0,012$ , $n=78$ )	0,212 ( $p=0,056$ , $n=78$ )	-0,342 ( $p=0,0034$ , $n=78$ )
Экспрессия Ki-67				x	0,648 ( $p=0,00001$ , $n=98$ )	-0,521 ( $p=0,00003$ , $n=98$ )
Экспрессия p53					x	-0,449 ( $p=0,00001$ , $n=98$ )

не Trp53, клетки, которые содержат поврежденную ДНК, не восстанавливаются, что приводит к неспособности остановить клеточный цикл или инициировать апоптоз [23]. Данные исследований прогностической значимости экспрессии белка p53 в тканях РПЖ в целом несколько более противоречивы по сравнению с данными исследований прогностической значимости экспрессии Ki-67, однако большинство авторов сходятся во мнении, что наблюдается положительная корреляция между выявлением p53 и неблагоприятным течением заболевания [24].

Работ, посвященных изучению роли белка Notch1 в развитии РПЖ, немного, а исследователи не пришли к единому мнению относительно его значимости: с одной стороны, показана повышенная экспрессия этого белка

среди случаев метастатического и низкодифференцированного рака [25, 26], с другой стороны, исследователи X. Wang и соавт., а также J. Whelan и соавт. [27, 28] установили, что концентрация Notch1-позитивных клеток выше в наблюдениях доброкачественного поражения предстательной железы по сравнению с аденокарциномой.

Notch-рецепторы представляют собой трансмембранные белки с односторонней передачей сигнала. Передача сигнала инициируется связыванием лиганда, расположенного на поверхности одной клетки, с рецептором, находящимся на соседней. Комплементарное взаимодействие лиганда с рецептором запускает механизм протеолитического расщепления и высвобождения внутриклеточного домена Notch. Последний транслоцируется в ядро и превраща-

ется в транскрипционно-активный комплекс, способный инициировать реализацию ряда генов. Такой сигнальный путь регулирует различные жизненно важные биологические процессы, такие как органогенез, определение судьбы клеток и гомеостаз тканей в многочисленных системах [29].

В настоящем исследовании продемонстрирована выраженная прямая корреляционная связь между степенью экспрессии Ki-67 и градицией опухоли по Глиссону, а высокая частота встречаемости этого маркера среди наблюдений РПЖ поздних стадий позволяет говорить о данном белке как о прогностически значимом маркере течения заболевания. Аналогичная связь, хоть и меньшая по силе, обнаружена при оценке экспрессии p53. Используемые в эксперименте моноклональные антитела выявляют преимущественно «мутантную» форму белка p53, в связи с этим средние показатели экспрессии оказались относительно небольшими, а при доброкачественной гиперплазии вовсе отсутствовали. Увеличение количества p53-положительных клеток в опухолях из наименее благоприятной прогностической группы свидетельствует о накоплении мутаций в гене и увеличении степени анаплазии. Мутантный белок p53 лишен ряда функций, присущих «дикой» форме, в частности функции взаимодействия с промотором апоптоза, белком Вах.

Обнаруженная в ходе исследования положительная экспрессия белка Notch1 определялась преимущественно в образцах доброкачественного поражения предстательной железы, на участках ПИН и в меньшей степени — в случаях высококодифференцированных аденокарцином. 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 прогрессивное снижение средних показателей экспрессии белка Notch1 при нарастании клеточной анаплазии в РПЖ, что продемонстрировано в настоящей работе. Слабая экспрессия данного белка отмечена в 48,3% наблюдений высококодифференцированных карцином из 1-й прогностической группы и лишь в 12,5% случаев опухолей из 5-й прогностической группы. 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 продукт экспрессии мутантного гена *TP53* 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 экспрессия белка Notch1 и, как следствие, активность данного сигнального пути исчезает.

## Заключение

Несмотря на отсутствие единого мнения относительно роли сигнального пути Notch в прогрессировании РПЖ, по-видимому, эффекты могут зависеть от множества факторов, а активация этого пути при различных условиях может привести к противоречивым результатам. Настоящее исследование продемонстрировало, что экспрессия Notch1 в предстательной железе при разных заболеваниях отражает активность защитных механизмов апоптоза в клетках, именно поэтому данный белок выявляется преимущественно при доброкачественных заболеваниях и высококодифференцированных аденокарциномах 1-й и 2-й прогностических групп. Продемонстрирована выраженная экспрессия белка Notch1 в наблюдениях с низкой пролиферативной активностью, а также обратная корреляционная связь между детекцией данного белка и p53 «мутантного» типа, поскольку последний характеризует выраженную неоплазию с потерей механизма апоптоза. Таким образом, наличие экспрессии Notch1 на фоне низкой пролиферативной активности клеток и отсутствие белка p53 (Y5) свидетельствуют об эффективности механизма апоптоза в опухолевых клетках и могут служить показаниями к консервативному лечению РПЖ.

## Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — И.И. Бабиченко  
Сбор и обработка материала — Л.М. Михалева  
Статистическая обработка — Н.А. Соловьева  
Написание текста — Г.Ю. Кудрявцев, Л.В. Кудрявцева  
Редактирование — И.И. Бабиченко

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

**The authors declare no conflict of interest.**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Grossman D, Curry S, Owens D, Bibbins-Domingo K, Caughey A, et al. Screening for prostate cancer: US preventive services task force recommendation statement. *JAMA*. 2018;319(18):1901-1913. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.3710>
- Носов Д.А., Гладков О.А., Королева И.А., Матвеев В.Б., Митин Т., Попов А.М. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака предстательной железы. *Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO*. 2018;8(3, Прил. 2):458-470.  
Nosov DA, Gladkov OA, Koroleva IA, Matveev VB, Mitin T, Popov AM. Practical guidelines for the drug therapy of prostate cancer. *Zlokačestvennyye opukholi: Praktičeskie rekomendatsii RUSSCO*. 2018;8(3, Suppl 2):458-470. (In Russ.)
- Goy BW, Burchette R, Soper MS, Chang T, Cosmatos HA. Ten-year treatment outcomes of radical prostatectomy vs external beam radiation therapy vs brachytherapy for 1503 patients with intermediate-risk prostate cancer. *Urology*. 2020;136:180-189. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2019.09.040>
- Verma S, Rajesh A, Morales H, Lemen L, Bills G, Delworth M, Gaitonde K, Ying J, Samartunga R, Lamba M. Assessment of aggressiveness of prostate cancer: correlation of apparent diffusion coefficient with histologic grade after radical prostatectomy. *AJR Am J Roentgenol*. 2011;196(2):374-381. <https://doi.org/10.2214/AJR.10.4441>
- Albertsen PC, Hanley JA, Fine J. 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 2005;293(17):2095-2101. <https://doi.org/10.1001/jama.293.17.2095>
- Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 International Society of Urological Pathology

- gy (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma: definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(2):244-252. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000530>
7. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of tumours of the urinary system and male genital organs — Part A: Renal, penile, and testicular tumours. *Eur Urol*. 2016;70(1):93-105. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029>
  8. Jahn JL, Giovannucci EL, Stampfer MJ. The high prevalence of undiagnosed prostate cancer at autopsy: implications for epidemiology and treatment of prostate cancer in the Prostate-specific Antigen-era. *Int J Cancer*. 2015;137(12):2795-2802. <https://doi.org/10.1002/ijc.29408>
  9. Etzioni R, Penson D, Legler JM, Tommaso D, Boer R, Gann PH, Feuer EJ. Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(13):981-990. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.13.981>
  10. Morgan TH. The theory of the gene. *The American Naturalist*. 1917;51(609):513-544. <https://doi.org/10.1086/279629>
  11. Koch U, Lehal R, Radtke F. Stem cells living with a Notch. *Development*. 2013;140(4):689-704. <https://doi.org/10.1242/dev.080614>
  12. Bi P, Kuang S. Notch signaling as a novel regulator of metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(5):248-255. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.02.006>
  13. Xing F, Okuda H, Watabe M, Kobayashi A, Pai SK, Liu W, Pandey PR, Fukuda K, Hirota S, Sugai T, Wakabayashi G, Koeda K, Kashiwaba M, Suzuki K, Chiba T, Endo M, Mo YY, Watabe K. Hypoxia-induced Jagged2 promotes breast cancer metastasis and self-renewal of cancer stem-like cells. *Oncogene*. 2011;30(39):4075-4086. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.122>
  14. Groeneweg JW, Foster R, Growdon WB, Verheijen RH, Rueda BR. Notch signaling in serous ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2014;7:95. <https://doi.org/10.1186/s13048-014-0095-1>
  15. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP IV, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306(5694):269-271. <https://doi.org/10.1126/science.1102160>
  16. Nishimukai A, Yagi T, Yanai A, Miyagawa Y, Enomoto Y, Murase K, Imamura M, Takatsuka Y, Sakita I, Hatada T, Miyoshi Y. High Ki-67 expression and low progesterone receptor expression could independently lead to a worse prognosis for postmenopausal patients with estrogen receptor-positive and HER2-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2015;15(3):204-211. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2014.12.007>
  17. Genç CG, Falconi M, Partelli S, Muffatti F, van Eeden S, Dogliani C, Klumpen HJ, van Eijck C, Nieveen E. Recurrence of pancreatic neuroendocrine tumors and survival predicted by Ki67. *Ann Surg Oncol*. 2018;25(8):2467-2474. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6518-2>
  18. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, Ortmann O. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(2):539-552. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2560-8>
  19. Saricanbaz I, Karahacioglu E, Ekin O, Bora H, Kilic D, Akman-su M. Prognostic significance of expression of CD133 and Ki-67 in gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(19):8215-8219. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.19.8215>
  20. Byun SS, Lee M, Hong SK, Lee H. Elevated Ki-67 (MIB-1) expression as an independent predictor for unfavorable pathologic outcomes and biochemical recurrence after radical prostatectomy in patients with localized prostate cancer: A propensity score matched study. *PLoS One*. 2019;14(11):e0224671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224671>
  21. 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 РУДН. Серия: Медицина*. 2019;23(4):364-372. Kudryavtsev GYu, Kudryavtseva LV, Mikhaleva LM, Babichenko II. Immunohistochemical study of tumor cells proliferative activity at different graduations. *RUDN Journal of Medicine = Vestnik RUDN. Seriya: Meditsina*. 2019;23(4):364-372. (In Russ.) <https://doi.org/10.22363/2313-0245-2019-23-4-364-372>
  22. Kudahetti S, Fisher G, Ambroisine L, Foster C, Reuter V, Eastham J, Möller H, Kattan MW, Cooper CS, Scardino P, Cuzick J, Berney DM. p53 immunohistochemistry is an independent prognostic marker for outcome in conservatively treated prostate cancer. *BJU Int*. 2009;104(1):20-24. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2009.08407.x>
  23. Humpton TJ, Vousden KH. Regulation of cellular metabolism and hypoxia by p53. *Cold Spring Harbor Perspect Med*. 2016;6(7):a026146. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026146>
  24. 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 РУДН. Серия: Медицина*. 2020;24(2):145-155. Kudryavtsev GY, Kudryavtseva LV, Mikhaleva LM, Kudryavtseva YY, Solovyeva NA, Osipov VA, Babichenko II. Immunohistochemical study of P53 protein expression in different prostate cancer Gleason grading groups. *RUDN Journal of Medicine = Vestnik RUDN. Seriya: Meditsina*. 2020;24(2):145-155. (In Russ.) <https://doi.org/10.22363/2313-0245-2020-24-2-145-155>
  25. Zhu H, Zhou X, Redfield S, Lewin J, Miele L. Elevated Jagged-1 and Notch-1 expression in high grade and metastatic prostate cancers. *Am J Transl Res*. 2013;5(3):368-378.
  26. Sethi S, Macoska J, Chen W, Sarkar FH. Molecular signature of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer bone metastasis. *Am J Transl Res*. 2011;3(1):90-99.
  27. Wang XD, Leow CC, Zha J, Tang Z, Modrusan Z, Radtke F, Aguet M, de Sauvage FJ, Gao WQ. Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation. *Dev Biol*. 2006;290(1):66-80. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.11.009>
  28. Whelan JT, Kellogg A, Shewchuk BM, Hewan-Lowe K, Bertrand FE. Notch-1 signaling is lost in prostate adenocarcinoma and promotes PTEN gene expression. *J Cell Biochem*. 2009;107(5):992-1001. <https://doi.org/10.1002/jcb.22199>
  29. Espinoza I, Miele L. Deadly crosstalk: Notch signaling at the intersection of EMT and cancer stem cells. *Cancer Lett*. 2013;341(1):41-45. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.08.027>

Поступила 13.05.2020

Received 13.05.2020

Принята в печать 17.06.2020

Accepted 17.06.2020