

Прогностическое значение экспрессии апоптозрегулирующих белков Вах и р53 в раке предстательной железы

Белорусский государственный медицинский университет

В работе исследована экспрессия белков-регуляторов апоптоза Вах и р53 в раке предстательной железы. Было отмечено, что снижение экспрессии проапоптотического белка Вах наблюдалось в 55,77% изученных образцов, а мутантный р53 присутствовал в 58,65% случаев. Была отмечена статистически достоверная отрицательная корреляционная связь между экспрессией Вах и суммой Глисона в опухоли, а также прямая связь между экспрессией мутантного р53 и суммой Глисона. Экспрессия Вах и р53 также коррелировали между собой. Снижение экспрессии Вах и наличие мутантного р53 были неблагоприятными прогностическими факторами у пациентов после радикальной простатэктомии.

Ключевые слова: рак предстательной железы, апоптоз, Вах, р53, сумма Глисона, прогностическое значение, радикальная простатэктомия.

Рак предстательной железы (РПЖ) – одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований у мужчин во всем мире. В патогенезе его, как и многих других опухолей, большую роль играют нарушения процесса апоптоза. Они обычно связаны с изменением функциональной активности ряда апоптоз-регулирующих белков. Наиболее изученными регуляторами апоптоза являются белок р53 [1] и белки семейства Bcl-2 [4], в частности, основной проапоптотический белок этого семейства – Вах. Показана возможность этих белков влиять друг на друга [2]. Белок р53 в норме в клетках иммуногистохимическим (ИГХ) методом не выявляется, но при его мутациях, приводящих к утрате его проапоптотических свойств, увеличивается содержание данного белка в клетке и время его полужизни, что ведет к возможности выявления его при ИГХ окрашивании. Таким образом, в нашем исследовании определялась экспрессия в клетках именно мутантной формы р53, являющейся по сути антиапоптотической. Исследование экспрессии регуляторов апоптоза в опухолях различных локализаций показало их прогностическое значение у пациентов после различных видов лечения [3]. Дальнейшее изучение регуляторов апоптоза в раке простаты позволит разработать методы лечения, позволяющие увеличивать гибель опухолевых клеток.

Цель исследования – изучить экспрессию в РПЖ регуляторов апоптоза Вах и р53, выявить их связь с рядом клинико-морфологических характеристик опухоли, их прогностическое значение у пациентов после радикальной простатэктомии (РПЭ).

Материалы и методы. Образцы ткани РПЖ были получены от 104 пациентов при РПЭ. Средний возраст пациентов составил $65,31 \pm 6,13$ лет, срок наблюдения от 3,0 до 111,6 месяцев. Гистологические срезы толщиной 4 мкм окрашивались гематоксилином и эозином и иммуногистохимически с использованием антител к Вах (производства ДАКО, Дания, разведение 1:50) и р53 (ДАКО, готовый раствор). Положительным контролем в обоих случаях выступала ткань рака молочной железы с известной позитивностью, отрицательным – исключение первичного антитела. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc, США). Для корреляционного анализа использовался непараметрический тест Спирмена, прогностической значимости – анализ выживаемости по Каплану-Майеру с проверкой достоверности лог-ранговым методом.

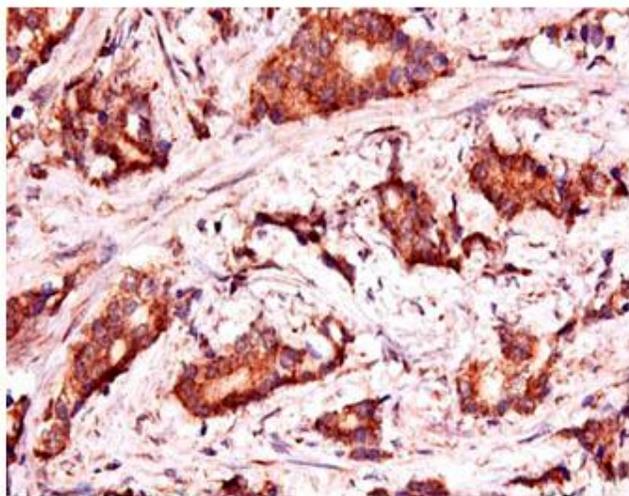


Рисунок 1 – РПЖ, ацинарный тип строения, показатель Глисона 3-4.

ИГХ окрашивание с антителами к Вах. Высокая интенсивность экспрессии Вах в опухолевых клетках. Хромоген диаминобензидин, контрокрашивание гематоксилином Майера. ×40

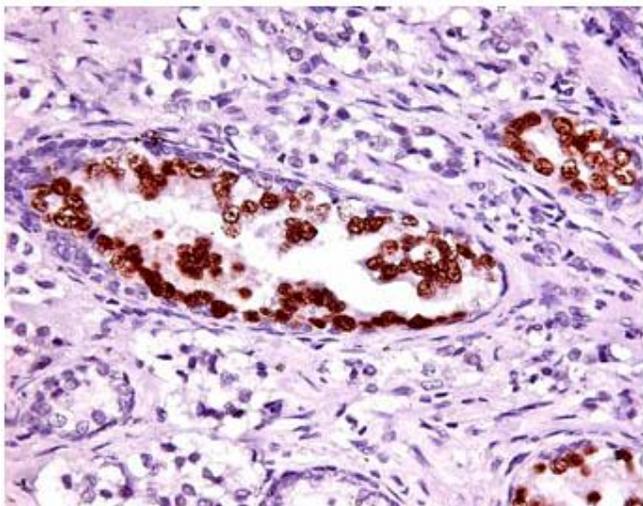


Рисунок 2 – РПЖ (показатель Глисона 3) и простатическая интраэпителиальная неоплазия (ПИН) высокой степени. ИГХ окрашивание с антителами к р53. Выраженная экспрессия р53 в виде сильно позитивных ядер опухолевых клеток в очагах РПЖ (справа вверху) и ПИН (в центре). Хромоген диаминобензидин, контрокрашивание гематоксилином Майера. х40.

Результаты исследования. Гистологическим типом рака простаты во всех изученных образцах была аденокарцинома. Степень дифференцировки опухоли определялась по модифицированной системе Глисона. При этом в 15 (14,42%) случаях определялась сумма Глисона в 4 балла, 5 баллов – в 17 (16,35%) случаях, 6 и 8 баллов – по 25 (24,04%) образцов, 7 баллов – в 14 (13,46%), 9 баллов – в 6 (5,77%), 10 – в 2 (1,92%) образцах.

При ИГХ исследовании экспрессии Вах выявлялось цитоплазматическое окрашивание, в ядрах клеток данный белок не определялся. Экспрессия белка оценивалась по двум критериям – доле иммунопозитивных клеток в образце и интенсивности их окрашивания. Полученные при этом данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Оценка экспрессии белка Вах в раке предстательной железы.

Балл	Характеристика	Число случаев	% случаев
Количество иммунопозитивных клеток			
2	<20%	1	0,96
4	20 – 50%	31	29,81
6	>50%	72	69,23
Интенсивность окрашивания			
1	Слабая	21	20,19
2	Умеренная	37	35,58
3	Сильная	46	44,23

Затем для каждого образца вычислялась сумма полученных баллов. Она составила 3 балла в 1 (0,96%) случае, сумма в 4 балла получена не была, 5 баллов были получены в 14 (13,46%) случаях, 6 баллов – в 17 (16,35%), 7 – в 6 (5,77%), 8 баллов – в 20 (19,23%) случаях, 9 баллов – в 46 (44,23%) образцах. Таким образом, почти в половине образцов экспрессия Вах была оценена как максимально возможная (9 баллов), в остальных она была в различной степени снижена.

При изучении экспрессии мутантного белка р53 определялась его ядерная локализация, при этом цитоплазма клеток не проявляла иммунореактивности. Полуколичественная оценка экспрессии р53 учитывала только долю клеток с позитивно окрашенными ядрами, независимо от интенсивности их окрашивания. При этом были получены следующие результаты (таблица 2).

Таблица 2. – Оценка экспрессии белка p53 в раке простаты.

Балл	Характеристика	Число случаев	% случаев	% случаев	Число случаев	Характеристика	Балл
0	Отсутствие	43	41,35	41,35	43	Нет	0
1	<5%	15	14,40	58,65	61	Есть	1
2	5 – 50%	22	21,20				
3	50 – 90%	20	19,20				
4	>90%	4	3,85				

Отметим, что мутантный p53 был выявлен более, чем в половине исследованных образцов РПЖ, что соответствует данным литературы о высокой частоте мутаций этого белка в опухолях различных локализаций.

Для установления взаимосвязей между экспрессией белков Вах и p53 и некоторыми характеристиками опухоли проводился корреляционный анализ с использованием теста Спирмена. Были установлены статистически достоверные (для всех приведенных коэффициентов корреляции $p < 0,01$) корреляционные связи между экспрессией Вах и степенью дифференцировки опухоли (с первичным показателем Глисона $r = -0,482$, вторичным показателем Глисона $r = -0,580$, суммой Глисона $r = -0,608$), экспрессией p53 и степенью дифференцировки ($r = 0,356$, $r = 0,305$, $r = 0,357$, соответственно). Также отмечалась корреляционная связь между экспрессией Вах и p53 ($r = -0,660$), что свидетельствует о связи уровней апоптоз-регулирующих белков при противоположной направленности их влияния на развитие РПЖ. Корреляция доли Вах-позитивных клеток и интенсивности их окрашивания оказалась относительно невысокой ($r = -0,627$, $p < 0,01$), что свидетельствует о том, что число клеток, экспрессирующих Вах и количество этого белка в одной клетке (косвенно отражаемое интенсивностью окрашивания) изменяются, вероятно, неодновременно. Также нами не было обнаружено ни одного образца, где снижение доли Вах-позитивных клеток сочеталось бы с нормальной интенсивностью их окрашивания; это позволило нам предположить, что в процессе развития опухоли вначале снижается содержание Вах в клетке, что выражается в снижении интенсивности ее окрашивания, а затем в некоторых клетках экспрессия его исчезает и это ведет к снижению доли Вах-позитивных клеток.

Мы также сравнили экспрессию Вах и p53 с определявшимися нами ранее в тех же образцах РПЖ индексом пролиферативной активности (ИПА) и количеством нейроэндокринных клеток (НЭК). При этом установлены следующие коэффициенты корреляции (для всех $p < 0,01$): между Вах и ИПА $r = -0,614$, Вах и НЭК $r = -0,514$, между p53 и ИПА $r = 0,638$, p53 и НЭК $r = 0,524$. Следует отметить относительно высокий коэффициент корреляции между экспрессией p53 и ИПА опухоли, что свидетельствует о повышении пролиферативной активности в опухолях с мутациями гена-супрессора p53.

Прогностическое значение указанных маркеров определялось по методу Каплана-Майера. Учитывалось наступление следующих неблагоприятных исходов: возникновение биохимического рецидива ($n = 40$), появление отдаленных метастазов ($n = 9$), смерть пациента ($n = 2$). Для оценки прогностического значения белка Вах все случаи были разделены на 2 группы: с максимально возможной суммарной оценкой экспрессии Вах в 9 баллов и с меньшим числом баллов, что было расценено как снижение экспрессии Вах, независимо от того, за счет какого из компонентов суммы происходило это снижение. Установлено, что снижение экспрессии Вах прогностически более неблагоприятно, чем максимальный уровень экспрессии. Однако было также показано [3], что отрицательное прогностическое значение может иметь не только снижение, но и повышение экспрессии Вах, в связи с чем мы решили проверить, как влияет на прогноз различная степень экспрессии Вах. В группе со сниженной экспрессией были выделены 2 подгруппы: с суммой баллов 7 – 8 (умеренное снижение экспрессии) и 6 и менее баллов (выраженное снижение экспрессии). Анализ показал, что в нашем исследовании наилучший прогноз был у пациентов с максимальной экспрессией Вах, а чем сильнее была снижена экспрессия этого белка, тем хуже был прогноз. Прогностическое значение экспрессии p53 определялось при разделении образцов на случаи с отсутствием p53 и его наличием, независимо от доли p53-позитивных клеток. При этом установлено, что наличие мутированного p53 значительно ухудшало прогноз у пациентов. В подтверждение этого можно сказать, что в группе с отсутствием p53 ни в одном случае не было отмечено биохимического рецидива, и лишь у 1 пациента отмечено появление отдаленных метастазов.

Выводы. В 44,23% исследованных образцов отмечено снижение экспрессии белка Вах; экспрессия мутантного p53 наблюдалась в 58,65% случаев. Отмечена достоверная корреляционная связь между экспрессией Вах и p53 и степенью дифференцировки опухоли, ее пролиферативной активностью и количеством НЭК в опухоли. Снижение экспрессии Вах и наличие мутантного p53 являются достоверными неблагоприятными прогностическими факторами у пациентов после радикальной простатэктомии.

Литература

1. Harris, C. C. Clinical implications of the p53 Tumor-Suppressor Gene / C. C. Harris, M. Hollstein // The New England Journal of Medicine. 1993. Vol. 329. P. 1318–1327.
2. Miyashita, T. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human Bax gene / T. Miyashita, J. C. Reed // Cell. 1995. Vol. 80. P. 293–299.
3. Molecular Markers of Outcome after Radiotherapy in Patients with Prostate Carcinoma. Ki-67, Bcl-2, Bax, and Bcl-x / A. Pollack [et al.] // Cancer. 2003. Vol. 97, № 7. P. 1630–1638.
4. Reed, J. C. Bcl-2 and the Regulation of Programmed Cell Death / J. C. Reed // The Journal of Cell Biology. 1994. Vol. 124. P. 1–6.