



ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРИ ЛОКАЛЬНОМ И ГЕНЕРАЛИЗОВАННОМ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ПОЧКИ

Е.М.Франциянц, А.Н.Шевченко, Е.А.Дженкова, Н.С.Карнаухов, Т.Н.Гудцова, А.А.Бреус*, Е.В.Филатова, Д.А.Швырев

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63

Резюме

Цель исследования. Провести сравнительный анализ экспрессии следующих маркеров: Ki-67, циклин D1, E-кадгерин, CD44, MMP-9, VEGF, P53, виментин в опухолевой ткани почки при светлоклеточном раке в зависимости от распространенности опухолевого процесса.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужил операционный материал 100 больных светлоклеточным раком почки, находившихся на лечении в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» МЗ РФ с 2015 по 2018 г. У 50 пациентов диагностирован локальный рак ($T_{1-3}N_0M_0$), у 50 – генерализованный ($T_{1-4}N_0M_1$). Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования материал фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 24 ч и заключали в парафин. Депарафинизацию и восстановление антигенной активности материала проводили в РТ-модуле (Thermo Fisher Scientific) с использованием Трис-буфера pH=9, в течение 20 мин при 98 °С. Постановку ИГХ-реакции проводили в иммуногистостейнере Autostainer 480S (Thermo Fisher Scientific). Применяли систему детекции UltraVision Quanto Detection System (Thermo Fisher Scientific), хромоген – DAB. Используемые антитела: E-кадгерин (EP700Y) Cell Marque, 1:100; CD 44 (EPR1013Y) Cell Marque 1:150; Ki-67 (SP6) Spring Bio, 1:200; P53 (DO-7) Cell Marque, 1:200; циклин D1 (EP12) Dako, 1:200; VEGF Thermo Fisher, 1:100; Vimentin (V9) Dako, 1:150; MMP-9 (EP100902) Eritomics, 1:100. Результаты реакций с маркерами оценивали, подсчитывая количество окрашенных клеток в каждом 3-м поле зрения всего препарата при увеличении объектива ×200 в микроскопе AXIO Scope.A1 (Carl Zeiss). Полученные результаты выражали в процентах – доля окрашенных клеток по отношению ко всем клеткам опухоли в поле зрения. Для статистической обработки результатов использовали параметрические методы статистики. Достоверность разницы между двумя средними определяли по значению t-критерия Стьюдента для несвязанных совокупностей.

Результаты. При светлоклеточном раке почки в целом отмечался невысокий уровень пролиферативной активности, однако при генерализованном, по сравнению с локальным ($8\pm0,5\%$ и $5\pm0,6\%$ соответственно), он достоверно выше ($P<0,05$) также при генерализованном раке наблюдалась гиперэкспрессия циклина D1– $70\pm3,9\%$, против $14,4\pm2,3\%$ при локальных стадиях, $P<0,05$. При генерализованном раке почки по сравнению с локальным более выражены процессы эпителиально-мезенхимальной трансформации (достоверное усиление экспрессии виментина на 28% и CD44 на 16,6% ($P<0,05$), снижение экспрессии E-кадгерина на 24% ($P<0,05$), а также активация процессов неоангиогенеза (достоверное повышение уровня экспрессии VEGF на 32%, ($P<0,05$)). Белок P53 отсутствовал в клетках локального рака почки и был крайне низким при генерализованном – $3,8\pm0,7\%$. Один из основных маркеров деградации внеклеточного матрикса MMP-9 был примерно на одинаковом уровне при обеих стадиях: при локальном – $50\pm6\%$ и $49,6\pm7,2\%$ при генерализованном, разница показателей недостоверна ($P<0,05$).

Заключение. Прогрессия светлоклеточного рака почки от локальной формы к генерализованной сопровождается гиперэкспрессией циклина D1, снижением экспрессии E-кадгерина при одновременном увеличении экспрессии виментина (нарастание признаков эпителиально-мезенхимальной трансформации), повышением экспрессии CD44 и VEGF.

Ключевые слова:

светлоклеточный рак почки, локальный, генерализованный, Ki-67, циклин D1, виментин, CD44, E-кадгерин, VEGF, MMP-9, P53

Оформление ссылки для цитирования статьи

Франциянц Е.М., Шевченко А.Н., Дженкова Е.А., Карнаухов Н.С., Гудцова Т.Н., Бреус А.А., Филатова Е.В., Швырев Д.А. Особенности экспрессии иммуногистохимических маркеров при локальном и генерализованном светлоклеточном раке почки. Исследования и практика в медицине. 2020; 7(1): 16–24. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2020-7-1-2>

Для корреспонденции

Бреус Анна Александровна – соискатель ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация.

Адрес: 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63

E-mail: annabreus999@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0252-8725>

Информация о финансировании. Работа проведена при поддержке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 21.11.2019, принята к печати 01.02.2020, опубликована 13.03.2020.

FEATURES OF EXPRESSION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS IN LOCAL AND GENERALIZED CLEAR CELL KIDNEY CANCER

Elena M. Frantsiyants, Aleksei N. Shevchenko, Elena A. Dzhenkova, Nikolai S. Karnaukhov, Tatyana A. Gudtskova, Anna A. Breus*, Elena V. Filatova, Dmitrii A. Shvyrev

National Medical Research Centre for Oncology,
63 14 line, Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

Abstract

Purpose of the study. To conduct a comparative analysis of the expression of the following markers: Ki-67, cyclin D1, E-cadherin, CD44, MMP-9, VEGF, P53, vimentin in renal tumor tissue in clear cell kidney cancer depending on the prevalence of the tumor process.

Materials and methods. The material for the study was the operating material of 100 patients with light cell kidney cancer who were treated at the National Medical Research Centre for Oncology of the Russian Federation Health Ministry from 2015 to 2018. 50 patients were diagnosed with local cancer (T1–3a0m0), 50 – generalized cancer (T1–4N0M1). For the immunohistochemical (IHC) study, the material was fixed in 10% neutral formalin for 24 hours and encased in paraffin. Dewaxing and restoration of antigenic activity of the material was carried out in the RT module (Thermo Fisher Scientific) using Tris buffer pH=9, for 20 minutes at 98 °C. the Formulation of the IGC reaction was carried out in the immunohistostainer «Autostainer 480S» (Thermo Fisher Scientific). Used system detection UltraVision Quanto Detection System (Thermo Fisher Scientific), and the Chromogen DAB. Antibodies used: E-cadherin (EP700Y) Cell Marque, 1: 100; CD 44 (EPR1013Y) Cell Marque 1:150; Ki-67 (SP6) Spring Bio, 1:200; P53 (DO-7) Cell Marque, 1:200; cyclin D1 (EP12) Dako, 1:200; VEGF Thermo Fisher, 1:100; Vimentin (V9) Dako, 1:150; MMP-9 (EP100902) Epitomics, 1:100. The results of the reactions with markers were evaluated by counting the number of colored cells in each 3rd field of view of the entire drug at magnification of the X200 lens in the AXIO Scope microscope. A1 (Carl Zeiss). The results were expressed as a percentage—the proportion of stained cells in relation to all tumor cells in the field of vision. Parametric methods of statistics were used for statistical processing of the results. The reliability of the difference between the two averages was determined by the student's t-test for unrelated populations.

Results. In clear cell kidney cancer, a low level of proliferative activity was observed in General, but in generalized, compared with local, it was significantly higher ($P<0.05$) ($8\pm0.5\%$ and $5\pm0.6\%$, respectively), and in generalized cancer, there was an over-expression of Cyclin D1— $70\pm3.9\%$, compared to $14.4\pm2.3\%$ in local stages, $P<0.05$. In generalized kidney cancer, epithelial-mesenchymal transformation processes are more pronounced in comparison with local cancer (a significant increase in Vimentin expression by 28% and CD44 by 16.6% ($P<0.05$), a decrease in E-cadherin expression by 24% ($P<0.05$), and activation of neo-angiogenesis processes (a significant increase in VEGF expression by 32%, $P<0.05$). The P53 protein was absent in local kidney cancer cells and was extremely low when generalized — $3.8\pm0.7\%$. One of the main markers of extracellular matrix degradation MMP-9 was approximately at the same level at both stages: at local— $50\pm6\%$ and $49.6\pm7.2\%$ at generalized, the difference in indicators is not reliable ($P<0.05$).

Conclusion. Progression of clear cell kidney cancer from local to generalized forms is accompanied by hyperexpression of cyclin D1, a decreased e-cadherin expression while increasing vimentin expression (increasing signs of epithelial-mesenchymal transformation), an increase in CD44 and VEGF expression.

Keywords:

light Cell kidney cancer, local, generalized, Ki-67, cyclin D1, Vimentin, CD44, E-cadherin, VEGF, MMP-9, P53

For citation

Frantsiyants E.M., Shevchenko A.N., Dzhenkova E.A., Karnaukhov N.S., Gudtskova T.N., Breus A.A., Filatova E.V., Shvyrev D.A. Features of expression of immunohistochemical markers in local and generalized clear cell kidney cancer. Research and Practical Medicine Journal (Issled. prakt. med.). 2020; 7(1): 16–24. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2020-7-1-2>

For correspondence

Anna A. Breus – applicant at National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Address: 63 14 line, Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

E-mail: annabreus999@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0252-8725>

Information about funding. This work was supported by the Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Centre for Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation.

Conflict of interest. Authors report no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Возможности иммуногистохимического (ИГХ) метода позволяют использовать его не только в диагностических целях, но и для поиска новых мишеней для противоопухолевой терапии, факторов прогноза течения заболевания и биологического поведения опухоли, изучения механизмов онкогенеза и прогрессии опухолей. В настоящее время продолжается изучение молекулярных прогностических факторов при раке почки (РП), что имеет большое практическое значение в консультировании пациентов, стратификации больных по группам риска, индивидуальном подборе таргетной терапии. В нашем исследовании мы решили прибегнуть к определению следующих ИГХ-маркеров.

Ki-67 – маркер пролиферативной активности. Антиген экспрессируется только во время деления клетки, в периоде ее покоя экспрессия маркера отсутствует. Ki-67 в большинстве новообразований является предсказывающим фактором – он определяет, насколько агрессивен рост опухоли [1, 2].

Циклин D1 – это протеин с молекулярной массой 36 кДа, также известный как PRAD-1 или bcl-1. В норме циклин D1 регулирует переход из G1-в S-фазу и достигает своего максимума в G1-фазе клеточного цикла. Циклин D1 – протоонкоген, сверхэкспрессия которого обнаружена во многих человеческих опухолях различного генеза. Мутации, амплификация и избыточная экспрессия гена циклина D1, приводящая к сверхэкспрессии циклина D1, является звеном в процессе клеточной трансформации [3, 4].

E-кадгерин – одна из ключевых молекул межклеточной адгезии. В норме его экспрессия локализуется в мембране клеток. Нарушения межклеточной адгезии характерны для большинства злокачественных опухолей эпителиального происхождения. Потеря или снижение уровня экспрессии E-кадгерина приводит к увеличению инвазивного потенциала опухолевой ткани [5].

CD44 – также молекула клеточной адгезии, играет важную роль в прогрессировании опухоли и метастазировании. В ряде исследований CD44 был признан маркером раковых стволовых клеток в нескольких типах раковых заболеваний, что было предметом недавних исследований [6,7,8].

Семейство матриксных металлопротеиназ (MMPs) состоит из 20 энзимов, способных расщеплять почти все компоненты внеклеточного матрикса соединительных тканей. Известно, что экспрессия MMP-9 играет важную роль в процессе метастазирования опухолей различного генеза [9].

VEGF (vascular endothelial growth factor) – важный маркер неоангиогенеза, без которого невозможен

опухолевый рост. VEGF – мощный митоген клеток эндотелия сосудов. Предполагается, что именно этот фактор является специфическим медиатором, обеспечивающим повышенную проницаемость сосудов в опухолях [10].

Виментин представляет собой цитоплазматический промежуточный филамент, который характерен для мезенхимальных клеток и обычно не экспрессируется в эпителиальных клетках. Гиперэкспрессия виментина и взаимосвязь с метастатическим опухолевым процессом были зафиксированы при меланоме, раке молочной железы, раке шейки матки, раке простаты и почечноклеточном раке.

В настоящее время хорошие результаты показывают исследования, посвященные изучению уровня различных маркеров как в опухолевом очаге, так и в интактной ткани [11, 12], таким образом, был выбран ряд маркеров, характеризующих различные процессы опухолевой трансформации и прогрессирования заболевания при светлоклеточном РП.

Цель исследования: провести сравнительный анализ экспрессии следующих маркеров: Ki-67, циклин D1, E-кадгерин, CD44, MMP-9, VEGF, P53, виментин в опухолевой ткани почки при светлоклеточном раке в зависимости от распространенности опухолевого процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования был одобрен этическим комитетом ФГБУ РНИОИ МЗ РФ (ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России) № 22 от 18 ноября 2015 г. Обязательным условием включения в исследование было добровольное информированное согласие всех больных, поступивших на хирургическое и комплексное противоопухолевое лечение в отделение онкоурологии РНИОИ. Исследование проведено в соответствии с международными стандартами GCP. Все больные проходили обследование и лечение в ФГБУ РНИОИ Минздрава России с 2015 по 2018 г. Материалом для исследования послужил операционный материал 100 больных с гистологически подтвержденным светлоклеточным раком почки: 50 пациентов с локальным раком (T1–2N0 M0), 50 – с генерализованным (T3–4N0 M1).

Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования операционный материал (ткань опухоли почки) фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 24 ч и заключали в парафин. Депарафинизацию и восстановление антигенной активности проводили в РТ-модуле Thermo Fisher Scientific с использованием Трис-буфера pH=9, в течение 20 мин при 98 °С. Постановку ИГХ-реакции проводили в им-

муногистостейнере Autostainer 480S (Thermo Fisher Scientific). Применяли систему детекции UltraVision Quanto Detection System (Thermo Fisher Scientific), хромоген – DAB. Использованные антитела: Ki-67 (SP6) Spring Bio, 1:200; Cyclin D1 (EP12) Dako, 1:200; Е-кадгерин (EP700Y) Cell Marque, 1:100; виментин (V9) Dako, 1:150; VEGF Thermo Fisher, 1:100; CD 44 (EPR1013Y) Cell Marque 1:150; MMP-9 (EP100902) Epitomics, 1:100; P53 (DO-7) Cell Marque, 1:200.

Результаты реакций с маркерами оценивали, подсчитывая количество окрашенных клеток в каждом 3-м поле зрения всего препарата при увеличении объектива $\times 200$ в микроскопе DM3000 (Leica). Полученные результаты выражали в процентах – доля окрашенных клеток по отношению ко всем клеткам опухоли в поле зрения.

Для статистической обработки результатов использовали параметрические методы статистики для показателей вариационного ряда: средняя арифметическая (M), ошибка средней (m), медиана (Me), коэффициент вариации (C.V.). Достоверность разницы между двумя средними определяли по значения t-критерия Стьюдента для несвязанных совокупностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия Ki-67 в опухолевых клетках в группе больных с генерализованным раком находилась на низком уровне, среднее значение при локальном раке составило $5 \pm 0,6\%$, при генерализованном – $8 \pm 0,5\%$. Разница показателей экспрессии Ki-67 в исследуемых группах была достоверна ($P < 0,05$). Наибольший уровень этого маркера как при локальном, так и при генерализованном раке не превышал 10%, однако медиана при локальном процессе находилась на отметке 3%, в то время как при генерализованном составила 10% (табл. 1).

Иная картина наблюдалась по уровню экспрессии циклина D1. При генерализованной стадии заболевания отмечалась гиперэкспрессия этого маркера – не менее чем в 40% опухолевых клеток. В ряде случаев этот маркер экспрессировали до 80–90% клеток опухоли. Результаты представлены в таблице 1.

В нашем исследовании при генерализованном РП экспрессия Е-кадгерина была почти вдвое ниже, чем при локальном: $29 \pm 3,1\%$ и $53 \pm 7,2\%$ соответственно (разница показателей достоверна, $P < 0,05$). В генерализованном РП она не превышала 35%, в то время как при локальном, в части опухолей, достигала 65%. Медиана при локальном РП равнялась 15%, при генерализованном – 25%, с небольшим коэффициентом вариации – 21,3% (табл. 2).

Уровень экспрессии CD44 также отличался почти вдвое в сравниваемых группах, однако, в обратной зависимости. Разница средних показателей экспрессии CD44 между локальным и генерализованным раком почки была достоверна с $P < 0,05$ (табл. 2).

Виментин значимо чаще экспрессировали клетки опухоли при генерализованной форме РП ($P < 0,05$). Диапазон значений от 0 до 60% сказался на величине коэффициента вариации – 114,8, что указывало на крайнюю вариабельность значений этого показателя (см. табл. 2).

Один из основных маркеров деградации внеклеточного матрикса MMP-9 был примерно на одинаковом уровне при обеих стадиях РП: $50 \pm 6\%$ при локальном и $49,6 \pm 7,2\%$ при генерализованном, разница показателей недостоверна $P > 0,07$ (см. табл. 2). Можно лишь отметить, что при генерализованном РП чаще обнаруживалась экспрессия MMP-9 во внеклеточном пространстве, а при локальном – в виде секрета в цитоплазме опухолевых клеток.

При генерализованном РП экспрессия VEGF была достоверно выше на 22% по сравнению с локальным, где она составила $85 \pm 1,6\%$ (достигла в некоторых опу-

Таблица 1. Экспрессия маркеров пролиферации при локальном (n=50) и генерализованном раках почки (n=50)
Table 1. Expression of proliferation markers in local (n=50) and generalized kidney cancers (n=50)

ИГХ-маркер / IHC markers	Форма рака почки / Form of kidney cancer	Статистический показатель / Statistical indicator			
		min/max, %	M \pm m, %	Me, %	C.V.
Ki-67	Локальный / Local	2/10	$5 \pm 0,6^*$	3	61,9
	Генерализованный / Generalized	5/10	$8 \pm 0,5^*$	10	31,3
Cyclin D1	Локальный / Local	5/30	$14,4 \pm 2,3^*$	7	76,8
	Генерализованный / Generalized	40/90	$70 \pm 3,9^*$	70	27,7

Примечание: разница показателей помеченных одинаковыми символами (* или *) достоверна с $P < 0,05$
 Note: the difference between indicators marked with the same symbols (* or *) is significant with $P < 0.05$

хотя 100% и не опускалась ниже 80%). Отмечалась очень низкая вариабельность этого показателя – коэффициент вариации составил всего 9,3 (табл. 3).

Белок P53, известный как супрессор опухолевого роста – продукт мутантного гена P53, отсутствовал в клетках локального РП. При генерализованном РП среднее значение этого показателя было крайне низким – $3,8 \pm 0,7\%$, лишь в нескольких случаях достигал отметки в 10%, в основном встречался в единичных клетках, а в части опухолей он вовсе отсутствовал (см. табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате сравнительного изучения ряда ИГХ-маркеров при локальном и генерализованном РП мы установили следующее.

Пролиферативная активность опухолевых клеток при различных стадиях РП в целом находилась на невысоком уровне, однако разница показателей была значима. На низкий уровень маркера пролиферации Ki-67 при светлоклеточном РП указывают и другие исследователи, и при этом отмечают, что

Таблица 2. Экспрессия маркеров адгезии и деградации внеклеточного матрикса при локальном (n=50) и генерализованном (n=50) раке почки
Table 2. Expression of markers of adhesion and degradation of the extracellular matrix in local (n=50) and generalized (n=50) kidney cancer

ИГХ-маркер / IHC markers	Форма рака почки / Form of kidney cancer	Статистический показатель/ Statistical indicator			
		min/max, %	M±m, %	Me, %	C.V.
Е-кадгерин / E-cadherin	Локальный / Local	10/65	53±7,2*	15	44,8
	Генерализованный / Generalized	5/35	29±3,1*	25	21,3
CD44	Локальный / Local	5/30	19,8±5,3*	10	81,1
	Генерализованный / Generalized	20/65	36,4±5,9*	40	38,8
Виментин / Vimentin	Локальный / Local	0/60	39±9,1 [▲]	10	114,8
	Генерализованный / Generalized	25/80	67±6,1 [▲]	70	44,3
MMP-9	Локальный / Local	20/90	50±6	30	59,2
	Генерализованный / Generalized	30/90	49,6±7,2	60	71,6

Примечание: разница показателей помеченных одинаковым символом (*, *, ▲) достоверна с P<0,05
Note: the difference between indicators marked with the same symbol (*, *, ▲) is significant with P<0.05

Таблица 3. Маркеры неоваскуляризации, супрессора опухолевого роста и эпителиально-мезенхимальной трансформации при локальном (n=50) и генерализованном (n=50) раке почки
Table 3. Markers of neoangiogenesis, tumor growth suppressor, and epithelial-mesenchymal transformation in local (n=50) and generalized (n=50) kidney cancer

ИГХ-маркер / IHC markers	Форма рака почки / Form of kidney cancer	Статистический показатель/ Statistical indicator			
		min/max, %	M±m, %	Me, %	C.V.
VEGF	Локальный / Local	15/60	53±7,9*	40	73,3
	Генерализованный / Generalized	80/100	85±1,6*	85	9,3
P53	Локальный / Local	0	0*	0	0
	Генерализованный / Generalized	0/10	3,8±0,7*	3	95,2

Примечание: разница показателей помеченных одинаковыми символами (*, *) достоверна с P<0,05
Note: the difference between indicators marked with the same symbols (*, *) is significant with P<0.05

экспрессия Ki-67 более 5% является неблагоприятным фактором для возникновения метастазов при РП [13]. При генерализованном раке среднее значение Ki-67 составило $8 \pm 0,5\%$ и не опускалось менее 5%.

Выявлено, что для генерализованных форм РП характерна гиперэкспрессия циклина D1, при локальном РП этот показатель варьировал в пределах от 5 до 30% опухолевых клеток. Наличие ядерной гиперэкспрессии циклина D1 ассоциировано со снижением общей выживаемости больных различными злокачественными новообразованиями. Как известно, гиперэкспрессия происходит за счет амплификации или гиперэкспрессии гена *PRAD1*, кодирующего циклин D1 [3, 14]. Повышенная продукция циклина D1 способствует инициации клеточного деления. Таким образом, определение экспрессии циклина D1 при светлоклеточном РП является более информативным для выявления прогрессирования заболевания, чем уровень экспрессии Ki-67.

При генерализованных стадиях РП, по сравнению с локальными, мы обнаружили достоверное снижение экспрессии Е-кадгерина при одновременном усилении экспрессии клетками виментина, что можно расценивать как процессы эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) опухолевых клеток светлоклеточного РП при прогрессировании заболевания. ЭМТ часто встречается в раках различной локализации, определяя клиническое поведение опухоли, в частности, повышая ее инвазивность, выживание клеток, вызывая иммуносупрессию [15, 16, 17]. Одним из главных морфологических признаков ЭМТ является обособление опухолевых клеток вследствие нарушения в них клеточно-клеточной адгезии, обусловленной потерей экспрессии Е-кадгерина. В части случаев опухолевые клетки при этом экспрессируют и соединительнотканый маркер виментин. Обнаружение ЭМТ имеет большое практическое значение, так как изменение формы опухолевых клеток, приобретение фибробластоподобной формы сопровождаются усилением инвазивных свойств опухоли [18].

Мы выявили достоверное повышение уровня экспрессии CD44 при прогрессировании РП. При генерализованном раке по сравнению с локальным на 16,6% выше был средний уровень экспрессии CD44, достигая максимального значения 65% с медианой 40%. В то время как при локальном не превышал 30%, и медиана составила 10%. Согласно данным современных исследований, у многих типов опухолевых клеток уровень экспрессии CD44 оказывается повышенным и может коррелировать с их инвазивной активностью [6, 7]. Таким образом, повышенный уровень экспрессии CD44 в РП может свидетельствовать о процессах опухолевой про-

грессии и быть эффективным инструментом для прогнозирования течения данного заболевания.

Экспрессия MMP-9 при генерализованных формах рака чаще наблюдалась во внеклеточном пространстве, а при локальных – в виде секрета в цитоплазме опухолевых клеток. Это указывает, что при генерализованном раке в большей степени выражены процессы, способствующие деградации внеклеточного матрикса, что облегчает инвазию опухолевых клеток. Однако достоверной разницы в уровне экспрессии MMP-9 при локальном и генерализованном РП нами не выявлено.

Известный супрессор опухолевого роста белок P53, продукт мутантного гена, часто экспрессируется в больших количествах при разных локализациях многих злокачественных опухолей, однако при РП в опухолевых клетках при локальной форме мы его не обнаружили, а при генерализованной стадии его экспрессия была очень низкой ($3,8 \pm 0,7\%$ опухолевых клеток). Таким образом, для РП этот показатель не является значимым для определения прогрессии и склонности опухоли к метастазированию, а преобладающее значение имеет, по нашим данным, циклин D1.

Из множества проангиогенных факторов, участвующих в физиологическом и патологическом ангиогенезе, наиболее важным эффектором является VEGF. По результатам нашего исследования, в клетках опухоли при генерализованных формах по сравнению с локальными было выявлено достоверное повышение уровня экспрессии VEGF на 32%, причем от 80 до 100% процентов опухолевых клеток продуцировали ангиогенный фактор. При локальном РП этот показатель был очень variabelен и колебался от 15 до 60% с медианой 40%. Таким образом, большинство опухолевых клеток при генерализованном раке продуцируют фактор роста эндотелия сосудов, обеспечивая тем самым процессы неоангиогенеза. Вопросы ангиогенеза в опухолевой ткани представляют, несомненно, большой интерес также в связи с разработкой методов антиангиогенной терапии [19, 20]. Наличие при генерализованном РП мишени для антиангиогенной терапии позволяет надеяться на успешное применение ее для лечения этого заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогрессия светлоклеточного РП характеризуется ИГХ-признаками ЭМТ (снижение экспрессии Е-кадгерина при одновременном увеличении экспрессии виментина), неоангиогенеза (повышение экспрессии CD44 и VEGF) и высокой пролиферативной активностью гиперэкспрессия циклина D1.

Список литературы

1. Ващенко Л. Н., Карнаухов Н. С., Гудцова Т. Н., Кварчия М. В. Сопоставление уровня экспрессии маркеров пролиферации Ki-67 и циклина D1 в тройном негативном раке молочной железы с различным андрогеновым статусом. *Современные проблемы науки и образования*. 2018;(4):146.
2. Глушанкова Н. А., Житняк И. Ю., Рубцова С. Н. Роль эпителиально-мезенхимального перехода в опухолевой прогрессии. *Биохимия*. 2018; 83(12):1802–1811. <https://doi.org/10.1134/S0320972518120059>
3. Basakran NS. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med J*. 2015 Mar; 36(3):273–279. <https://doi.org/10.15537/smj.2015.3.9622>
4. Pestell RG. New roles of cyclin D1. *Am J Pathol*. 2013 Jul; 183(1):3–9.
5. Кит О. И., Франциянц Е. М., Шевченко А. Н., Бреус А. А., Погорелова Ю. А., Нескубина И. В. Уровень некоторых факторов роста семейства VEGF при светлоклеточном раке почки. *Известия высших учебных заведений северо-кавказский регион серия: естественные науки*. 2018; 1(197):124–129.
6. Lin J, Ding D. The prognostic role of the cancer stem cell marker CD44 in ovarian cancer: a meta-analysis. *Cancer Cell Int*. 2017 Jan 5; 17:8. <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0376-4>
7. Morath I, Hartmann TN, Orian-Rousseau V. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016; 81(Pt A):166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009>
8. Basakran NS. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med J*. 2015 Mar; 36(3):273–9. <https://doi.org/10.15537/smj.2015.3.9622>
9. Morath I, Hartmann TN, Orian-Rousseau V. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016; 81(Pt A):166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009>
10. Lin J, Ding D. The prognostic role of the cancer stem cell marker CD44 in ovarian cancer: a meta-analysis. *Cancer Cell Int*. 2017; 17:8. <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0376-4>
11. Бреус А. А., Франциянц Е. М., Кит О. И., Шевченко А. Н., Нескубина И. В., Дженкова Е. А. и др. Половые различия в содержании компонентов инсулиноподобного сигнального пути в тканях почки при локальном и генерализованном светлоклеточном раке почки. *Современные проблемы науки и образования*. 2019;(5):81.
12. Нефедова Н. А., Давыдова С. Ю. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и гипоксия-индуцибельного фактора (HIF) в опухолевом ангиогенезе. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;(3):51.
13. Гервальд В. Я., Сеченов Е. И., Черданцева Т. М., Бобров И. П., Климачев В. В., Авдалян А. М. и др. Экспрессия маркера пролиферации Ki-67 при раке почки: клиничко-морфологические сопоставления. *Сибирский онкологический журнал*. 2012;(S1):43–44.
14. Li Z, Liu J, Zhang X, Fang L, Zhang C, Zhang Z, et al. Prognostic Significance of Cyclin D1 Expression in Renal Cell Carcinoma: a Systematic Review and Meta-analysis. *Pathol Oncol Res*. 2019 Nov 20. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00776-0>
15. Pestell RG. New roles of cyclin D1. *Am J Pathol*. 2013 Jul; 183(1):3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.03.001>
16. Morel A-P, Hinkal GW, Thomas C, Fauvet F, Courtois-Cox S, Wierinckx A, et al. EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet*. 2012; 8(5): e1002723. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002723>
17. Roy SS, Gonugunta VK, Bandyopadhyay A, Rao MK, Goodall GJ, Sun L-Z, et al. Significance of PELP1/HDAC2/miR-200 regulatory network in EMT and metastasis of breast cancer. *Oncogene*. 2014 Jul 10; 33(28):3707–3716. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.332>
18. Ващенко Л. Н., Карнаухов Н. С., Гудцова Т. Н., Кварчия М. В. Сопоставление уровня экспрессии маркеров пролиферации Ki-67 и циклина D1 в тройном негативном раке молочной железы с различным андрогеновым статусом. *Современные проблемы науки и образования*. 2018;(4):146.
19. Кузнецов М. Б., Колобов А. В. Исследование влияния антиангиогенной монотерапии на прогрессию гетерогенной опухоли с помощью методов математического моделирования. *Компьютерные исследования и моделирование*. 2017; 9(3):487–501. <https://doi.org/10.20537/2076-7633-2017-9-3-487-501>
20. Скворцов В. А., Манихас Г. М. Циклин D1 и его прогностическая значимость в планировании эндокринной терапии у женщин постменопаузального возраста при раке молочной железы. *Врач-аспирант*. 2012; 50(1.3):401–406.

References

1. Vashchenko LN, Karnaukhov NS, Gudtskova TN, Kvarchiya MV. Comparison of the level of expression of markers of proliferation Ki-67 and cyclin D1 in the triple negative breast cancer with a different androgen status. *Modern Problems of Science and Education*. 2018;(4):146. (In Russian).
2. Glushankova NA, Zhitnyak IYu, Rubtsova SN. Role of epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. *Biochemistry*. 2018; 83(12):1802–1811. (In Russian). <https://doi.org/10.1134/S0320972518120059>
3. Basakran NS. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med J*. 2015 Mar; 36(3):273–279. <https://doi.org/10.15537/smj.2015.3.9622>
4. Pestell RG. New roles of cyclin D1. *Am J Pathol*. 2013 Jul; 183(1):3–9.
5. Kit OI, Frantsiyants EM, Shevchenko AN, Breus AA, Pogorelova YuA, Neskubina IV. Levels of some VEGF family members in clear cell renal cell carcinoma. *University News North-Caucasian Region. Natural sciences series*. 2018; 1(197):124–129. (In Russian).
6. Lin J, Ding D. The prognostic role of the cancer stem cell marker CD44 in ovarian cancer: a meta-analysis. *Cancer Cell Int*. 2017 Jan 5; 17:8. <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0376-4>
7. Morath I, Hartmann TN, Orian-Rousseau V. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016; 81 (Pt A):166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009>

8. Basakran NS. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med J.* 2015 Mar; 36(3):273–9. <https://doi.org/10.15537/smj.2015.3.9622>
9. Morath I, Hartmann TN, Orian-Rousseau V. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016; 81(Pt A):166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009>
10. Lin J, Ding D. The prognostic role of the cancer stem cell marker CD44 in ovarian cancer: a meta-analysis. *Cancer Cell Int.* 2017; 17:8. <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0376-4>
11. Breus AA, Frantsiyants EM, Kit OI, Shevchenko AN, Nesukubina IV, Dzhenkova EA, et al. Sexual differences in the content of insulin-like signaling pathway components in kidney tissues in local and generalized clear cell kidney cancer. *Modern Problems of Science and Education.* 2019;(5):81. (In Russian).
12. Nefedova NA, Davydova SYu. He role of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor in tumor's angiogenesis. *Modern Problems of Science and Education.* 2015;(3):51. (In Russian).
13. Gerval'd VYa., Sechenov EI., Cherdantseva TM., Bobrov IP., Klimachev VV., Avdalyan AM., et al. Expression of the Ki-67 proliferation marker for kidney cancer: clinical and morphological comparisons. *Siberian journal of oncology.* 2012;(S1):43–44. (In Russian).
14. Li Z, Liu J, Zhang X, Fang L, Zhang C, Zhang Z, et al. Prognostic Significance of Cyclin D1 Expression in Renal Cell Carcinoma: a Systematic Review and Meta-analysis. *Pathol Oncol Res.* 2019 Nov 20. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00776-0>
15. Pestell RG. New roles of cyclin D1. *Am J Pathol.* 2013 Jul; 183(1):3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.03.001>
16. Morel A-P, Hinkal GW, Thomas C, Fauvet F, Courtois-Cox S, Wierinckx A, et al. EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet.* 2012; 8(5): e1002723. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002723>
17. Roy SS, Gonugunta VK, Bandyopadhyay A, Rao MK, Goodall GJ, Sun L-Z, et al. Significance of PELP1/HDAC2/miR-200 regulatory network in EMT and metastasis of breast cancer. *Oncogene.* 2014 Jul 10; 33(28):3707–3716. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.332>
18. Vashchenko LN, Karnaukhov NS, Gudtskova TN, Kvarchiya MV. Comparison of the level of expression of markers of proliferation Ki-67 and cyclin D1 in the tripl negative breast cancer with a different androgen status. *Modern Problems of Science and Education.* 2018;(4):146. (In Russian).
19. Kuznetsov MB, Kolobov AV. Mathematical investigation of antiangiogenic monotherapy effect on heterogeneous tumor progression. *Computer Research and Modeling.* 2017; 9(3):487–501. (In Russian). <https://doi.org/10.20537/2076-7633-2017-9-3-487-501>
20. Skvortsov VA, Manikhas GM. Cyclin D1 and it's prognostic value in planning of endocrine therapy of women of postmenopausal age with breast cancer. *Postgraduate Doctor.* 2012; 50(1.3):401–406. (In Russian).

Информация об авторах:

Франциянц Елена Михайловна – д.б.н., профессор, заместитель генерального директора по науке, руководитель лаборатории «Изучение патогенеза злокачественных опухолей» ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3618-6890>, SPIN: 9427-9928

Шевченко Алексей Николаевич – д.м.н., профессор, заведующий отделением онкоурологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9468-134X>, SPIN: 2748-2638

Дженкова Елена Алексеевна – д.б.н., доцент, ученый секретарь ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. SPIN: 6206-6222

Карнаухов Николай Сергеевич – к.м.н., заведующий патологоанатомического отделения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. SPIN: 3100-0820

Гудцкова Татьяна Александровна – научный сотрудник патологоанатомического отделения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация.

Бреус Анна Александровна* – соискатель ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0252-8725>

Филатова Елена Валерьевна – к.м.н., старший научный сотрудник отделения онкоурологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7904-4414>, SPIN: 7517-1549

Швырев Дмитрий Александрович – к.м.н., научный сотрудник отделения онкоурологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. SPIN: 7496-4043

Information about authors:

Elena M. Frantsiyants – Dr. Sci. (Biol.), professor, deputy director general for science, head of laboratory for the study of the pathogenesis of malignant tumors at National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3618-6890>, SPIN: 9427-9928

Aleksei N. Shevchenko – Dr. Sci. (Med.), professor, head of the department of oncology at National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9468-134X>, SPIN: 2748-2638

Elena A. Dzhenkova – Dr. Sci. (Biol.), associate professor, scientific secretary at National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation. SPIN: 6206-6222

Nikolai S. Karnaukhov – Cand. Sci. (Med.), head of the pathology department at National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation. SPIN: 3100-0820

Tatyana A. Gudtskova – research fellow of the pathology department at National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Anna A. Breus* – applicant at National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0252-8725>

Elena V. Filatova – Cand. Sci. (Med.), senior researcher of the department of oncology at National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7904-4414>, SPIN: 7517-1549

Dmitrii A. Shvyrev – Cand. Sci. (Med.), researcher of the department of oncology at National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation. SPIN: 7496-4043

Участие авторов:

Франциянц Е.М. – концепция и дизайн исследования.

Шевченко А.Н. – написание текста.

Бреус А.А. – обработка материала.

Карнаухов Н.С. – техническое редактирование, подготовка иллюстраций.

Гудцова Т.Н. – оформление библиографии.

Дженкова Е.А. – научное редактирование.

Швырёв Д.А. – забор операционного материала.

Филатова Е.В. – сбор, анализ, интерпретация данных, подготовка статьи.

Authors contribution:

Elena M. Frantsiyants – research concept and design.

Aleksei N. Shevchenko – text writing.

Anna A. Breus – material processing

Nikolai S. Karnaukhov – technical editing, preparation of illustrations.

Tatyana A. Gudtskova – bibliography design.

Elena A. Dzhenkova – scientific editing

Dmitrii A. Shvyrev – collection of operational material.

Elena V. Filatova – collection, analysis, interpretation of data, preparation of the article.