

# Експресія CD44 та CD24 у пухлинній тканині у хворих на рак передміхурової залози

Ю.В. Жильчук<sup>1</sup>, В.С. Сакало<sup>1</sup>, В.М. Григоренко<sup>1</sup>, А.В. Сакало<sup>1</sup>, Т.В. Задворний<sup>2</sup>, М.Ю. Лук'янова<sup>2</sup>, В.Ф. Чехун<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ДУ «Інститут урології НАМН України», м. Київ

<sup>2</sup>Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України, м. Київ

Метою дослідження було оцінювання прогностичного значення маркерів стовбурових пухлинних клітин CD44 і CD24 у тканині передміхурової залози (ПЗ) після радикальної простатектомії у 102 хворих на рак ПЗ (РПЗ).

При імуногістохімічному дослідженні (ІГХ) експресії CD24 і CD44 в якості первинних антитіл використовували моноклональні антитіла (clone SN3b, Thermo Scientific, USA) і CD44 / HCAM (clone 156-3C11, Diagnostic BioSystems, USA). Позитивною експресією CD24 і CD44 вважали кількість імунопозитивних клітин більше 10%. Для візуалізації результатів ІГХ використовували реактиви EnVision system (Dako LSAB2 system, Denmark). Гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном Майєра. Результати аналізували з використанням оптичного мікроскопа XSP-137-ВР (фірма JNOEC, збільшення  $\times 200-400$ ).

Виявлено кореляцію між експресією CD24 і CD44 і стадією захворювання. При рівні ПСА  $>15$  нг/мл спостерігається збільшення експресії маркерів. Відзначено кореляцію між експресією CD44<sup>+</sup> і CD24<sup>-</sup> і виникненням біохімічного рецидиву ( $r=0,4$ ;  $p<0,05$ ). Визначення у тканині пухлини клітин з маркерами CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> може бути додатковим критерієм прогнозування перебігу РПЗ.

**Ключові слова:** рак передміхурової залози, стовбурові пухлинні клітини, маркери CD24 і CD44.

Рак передміхурової залози (РПЗ) – одне з поширених захворювань серед чоловіків, є гетерогенною пухлиною з вираженою агресивністю. Сучасна терапія включає тактику активного спостереження, променеве лікування, радикальну простатектомію, гормональне та хіміотерапевтичне лікування.

На сьогодні досліджені деякі маркери пухлинних стовбурових клітин РПЗ: CD24, CD44, CD49f, CD133, CD166 і  $\alpha 2\beta 1$ -інтегрин, які були досліджені окремо і в комбінаціях.

CD44 та CD24 є молекулами клітинної адгезії, які беруть участь у диференціації, рості, апоптозі та прогресуванні пухлини [1, 7, 8]. Hurt і співавтори (2008) визначили CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> субпопуляцію клітин передміхурової залози (ПЗ) людини, як маркери пухлинних стовбурових клітин, що мають здатність рости на неадгезивних сферах у відновлювальному середовищі з сироваткою крові. Лише CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> популяція клітин мала потенціал до формування пухлин у NOD/SCID мишей [2].

**Мета дослідження:** оцінити прогностичне значення маркерів пухлинних стовбурових клітин (CD44, CD24) у тканині РПЗ.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Ретроспективно проаналізовано результати обстеження та лікування 102 хворих на РПЗ I–III стадій, які знаходились на лікуванні у ДУ «Інститут урології НАМН України» та Київському міському клінічному онкологічному центрі протягом 2014–2015 років.

Клінічний діагноз встановлювали на підставі визначення загального простатичного специфічного антигену (ПСА) у сироватці крові, пальцевого ректального дослідження ПЗ, КТ дослідження, трансректального УЗД ПЗ, остеосцинтиграфії, рентгенографії органів грудної порожнини. Верифікація діагнозу – за даними трансректальної мультифокальної біопсії ПЗ.

Стадію пухлини визначали згідно з міжнародною класифікацією TNM (7-е видання, 2009). Гістологічний тип пухлини встановлювали відповідно до класифікації ВООЗ (2006).

При імуногістохімічному (ІГХ) дослідженні експресії CD24 та CD44 в якості первинних антитіл використовували моноклональні антитіла (clone SN3b, Thermo Scientific, USA) та CD44/HCAM (clone 156-3C11, Diagnostic BioSystems, USA) відповідно до інструкції виробника. За позитивну експресію CD24 та CD44 вважали кількість імунопозитивних клітин більше 10%. Для візуалізації результатів ІГХ використано реактиви EnVision system (Dako LSAB2 system, Denmark), гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном Маєра. Результати аналізували з використанням оптичного мікроскопа XSP-137-ВР (фірма JNOEC, збільшення  $\times 200-400$ ).

Для виявлення біохімічного рецидиву після простатектомії планові обстеження проводили один раз на 2 міс протягом 2 років. Наявність біохімічного рецидиву визначали при підвищенні рівня ПСА  $>0,2$  нг/мл протягом двох послідовних обстежень.

Статистичне оброблення отриманих результатів проводили з використанням методів варіаційної статистики (STATISTICA 6.0). Для оцінювання зв'язку експресії маркерів з клінічними характеристиками хворих використовували коефіцієнт Пірсона ( $p\leq 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Клінічна характеристика 102 хворих на РПЗ I–III стадій наведена у табл. 1. Розподіл хворих за стадіями: I – 1%, II – 68,6%, III – 31,4%. Вік пацієнтів – від 51 до 81 року, середній вік –  $58,0\pm 3,1$  року. Результати комплексного обстеження хворих виявили відсутність регіонарних та віддалених метастазів.

Хворі були розподілені на підгрупи залежно від показника Глісона: помірно диференційована аденокарцинома (Глісон 6 та 7 – 25,5% та 56,8% відповідно) та низько диференційована аденокарцинома (Глісон 8 та 9 – 12,7% та 5,0% відповідно). Позитивний статус хірургічного краю був у 35,2%, негативний – у 64,8%.

За рівнем ПСА розподіл наступний: I група – до 4 нг/мл (12,7%), II група – 4–10 нг/мл (57,8%) та III група – більше 10 нг/мл (29,6%).

У 36,3% хворих було діагностовано біохімічний рецидив РПЗ. При цьому найбільшу частоту рецидивів спостерігали протягом одного року після операції. ІГХ дослідження вия-

Загальна клінічна характеристика хворих на РПЗ I–III стадій

Показник	Кількість хворих	
	n	%
Загальна кількість хворих	102	100
<i>Вік хворих (роки)</i>		
Середній	58,0±3,1	
Коливання віку	51-81	
<i>Рівень ПСА</i>		
<4 нг/мл	13	12,7
4–10 нг/мл	59	57,8
>10 нг/мл	30	29,5
<i>Стадія РПЗ за TNM</i>		
Стадія I	1	1,0
Стадія II	69	67,7
Стадія III	32	31,4
<i>Градація за Глісоном</i>		
6 балів	26	25,5
7 балів	58	56,8
8 балів	13	12,7
9 балів	5	5,0
<i>Хірургічний край</i>		
Позитивний	36	35,2
Негативний	66	64,8
<i>Біохімічний рецидив</i>		
Встановлено	37	36,3
Не виявлено	65	63,7

Таблиця 2

Розподіл пухлин за експресією дослідних маркерів CD24, CD44 та CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-low</sup>

Маркери ПСК	Кількість пухлин з експресією n (%)	Кількість пухлин без експресії n (%)
CD24	52 (51,0)	50 (49,0)
CD44	77 (75,5)	25 (24,5)
CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-low</sup>	33 (32,4)	69 (67,6)

вило гетерогенність пухлин за експресією дослідних маркерів, так, наявність CD24 та CD44 визначено у 51,0% та 75,5% відповідно (мал. 1).

Розподіл пухлин за експресією дослідних маркерів наведено у табл. 2. Позитивна експресія CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-low</sup> становила 32,4%.

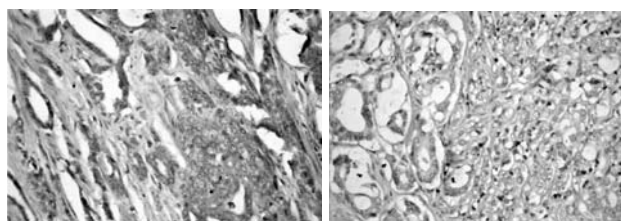
Результати експресії маркерів залежно від стадії подано на мал. 2.

Найбільша кількість CD44 та CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-low</sup> позитивних пухлин визначена у III стадії (77% та 53% відповідно) у порівнянні з II стадією (65% та 28% відповідно). Кількість CD24<sup>+</sup> у II та III стадіях практично однакова (40,5% та 40% відповідно). Виявлено статистично вірогідну кореляцію між експресією CD44 та CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-low</sup> та стадією ( $r=0,45$ ;  $p \leq 0,05$  та  $r=0,65$ ;  $p \leq 0,05$  відповідно).

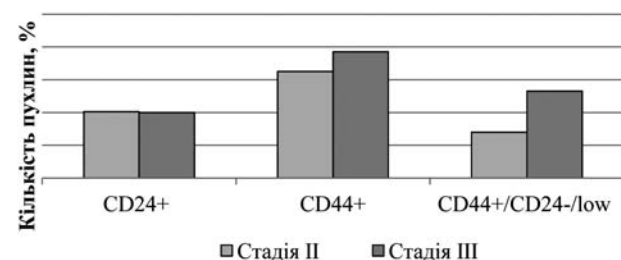
Залежність експресії від градації за Глісоном наведено на мал. 3.

Виявлено вірогідну кореляцію до збільшення кількості пухлин з фенотипом CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-low</sup> зі зростанням балів за Глісоном. Так, при Глісоні 6 фенотип CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-low</sup> зустрічається у 44% випадків, при Глісоні 7 та 8 – у 75% відповідно, при Глісоні 9 – 100% ( $p \geq 0,05$ ).

Залежність експресії маркерів ПСК від рівня ПСА наведено у табл. 3.



Мал. 1 Експресія CD44 (А) та CD24 (Б) у клітинах РПЗ, ІГХ (×400)



Мал. 2. Розподіл експресії маркерів залежно від стадії

Залежність експресії маркерів ПСК від рівня ПСА

Рівень ПСА	Кількість пухлин з експресією CD24 %/(n)	Кількість пухлин без експресії CD24 %/(n)	Кількість пухлин з експресією CD44 %/(n)	Кількість пухлин без експресії CD44 %/(n)	Кількість пухлин з експресією CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-/low</sup> %/(n)	Кількість пухлин без експресії CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-/low</sup> %/(n)
ПСА <15 нг/мл	50,0 (26)	47,0 (23)	40,7 (31)	72,0 (18)	36,4 (12)	53,6 (37)
ПСА >15 нг/мл	50,0 (26)	53,0 (27)	<b>59,7 (46)*</b>	28,0 (7)	<b>64,3 (21)*</b>	46,4 (32)

Примітка: \* - різницю у порівнянні з показником групи із рівнем ПСА >15 нг/мл статистично підтверджено (p<0,05).

Таблица 4

Зв'язок експресії маркерів з розвитком біохімічного рецидиву

Біохімічний рецидив	Кількість пухлин з експресією CD24 %/(n)	Кількість пухлин без експресії CD24 %/(n)	Кількість пухлин з експресією CD44 %/(n)	Кількість пухлин без експресії CD44 %/(n)	Кількість пухлин з експресією CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-/low</sup> %/(n)	Кількість пухлин без експресії CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-/low</sup> %/(n)
Встановлено	48,1 (25)	76,0 (38)	44,0 (34)	12,0 (3)	75,8 (25)	17,4 (12)
Не виявлено	51,9 (27)	24,0 (12)*	56,0 (43)	88,0 (22)	24,2 (8)*	82,6 (57)

Примітка: \* - різницю у порівнянні з показником групи з виявленим біохімічним рецидивом статистично підтверджено (p<0,05).

Виявлено, що рівень ПСА >15 нг/мл асоціюється з вірогідним підвищенням CD44 та CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> (p≥0,05).

Стосовно рівня експресії маркерів та діагностуванням біохімічного рецидиву встановлено, що частота біохімічного рецидиву вірогідно пов'язана з фенотипами CD24<sup>-</sup> та CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup>. Залежність різних фенотипів та виникненям біохімічного рецидиву наведено у табл. 4.

Отримана інформація узгоджується з літературними даними. Показано, що гіперекспресія CD44 збільшувалась пропорційно ступеня диференціювання за Глісоном [3]. Проте існують дослідження, які довели статистично значущу негативну кореляцію між експресією CD44 та показником Глісона [4-6]. Представлені результати демонструють поліфункціональність ПСК та їхній зв'язок з агресивністю РПЗ. Дослідження ракових стовбурових клітин може пояснити механізми ініціації пухлини, прогресування та метастазування. Зокрема встановлено, що мікро РНК 34а може викликати інгібіцію експресії CD44 [9].

**ВИСНОВКИ**

1. Виявлено кореляцію між експресією CD44 і CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> та стадією захворювання (r=0,45; p≤0,05 та r=0,65; p≤0,05 відповідно).

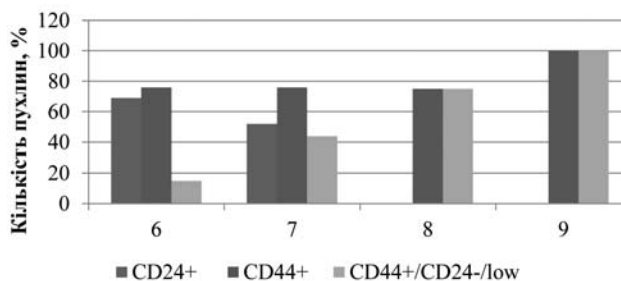
2. Показники ПСА у сироватці хворих на рак передміхурової залози (РПЗ) (>15 нг/мл) асоціюються з підвищеним рівнем експресії CD44 та CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup>.

**Експресия CD44 и CD24 в опухолевой ткани у больных раком предстательной железы**

**Ю.В. Жильчук, В.С. Сакало, В.Н. Григоренко, А.В. Сакало, Т.В. Задворный, М.Ю. Лукьянова, В.Ф. Чехун**

Целью исследования была оценка прогностического значения маркеров стволовых опухолевых клеток CD44 и CD24 в ткани предстательной железы (ПЖ) после радикальной простатэктомии у 102 больных раком ПЖ (РПЖ).

При иммуногистохимическом исследовании (ИГХ) экспрессии CD24 и CD44 в качестве первичных антител использовали моноклональные антитела (clone SN3b, Thermo Scientific, USA) и CD44 / HSCAM (clone 156-3C11, Diagnostic BioSystems, USA). Положительной экспрессией CD24 и CD44 считали количество иммуно-



Мал. 3. Залежність експресії від показника Глісона

3. Показано, що у хворих з фенотипом пухлинних клітин CD24<sup>-</sup> та CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> частота виникнення рецидиву у 3 рази вища у порівнянні з хворими з CD44<sup>+</sup>; виявлено кореляцію між рівнем експресії CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> та розвитком біохімічного рецидиву (r=0,4; p≤0,05).

4. Визначення у тканині РПЗ клітин з маркерами CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> може бути додатковим критерієм для прогнозування перебігу РПЗ, зокрема для прогнозування ризику виникнення рецидиву.

позитивных клеток более 10%. Для визуализации результатов ИГХ использовали реактивы EnVision system (Dako LSAB2 system, Denmark). Гистологические срезы окрашивали гематоксилином Майера. Результаты анализировали с использованием оптического микроскопа XSP-137-BP (фирма JNOEC, увеличение ×200-400).

Виявлена кореляція між експресією CD24 і CD44 і стадією захворювання. При урвні ПСА >15 нг/мл отмечено увеличение экспрессии маркеров. Отмечена кореляция между экспрессией CD44<sup>+</sup> и CD24<sup>-</sup> и возникновением биохимического рецидива (r=0,4; p<0,05). Определение в ткани опухоли клеток с маркерами CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> может быть дополнительным критерием прогнозирования течения РПЖ.

**Ключевые слова:** рак предстательной железы, стволовые опухолевые клетки, маркеры CD24 и CD44.

**Expression of CD44 and CD24 in tumor tissue from patients with prostate cancer**

**Yu. V. Zhilchuk, V. S. Sakalo, V. N. Grigorenko, A. V. Sakalo, T. V. Zadvorny, M. Yu. Lukyanova, V. F. Chahun**

The aim was to evaluate the prognostic value CD44 and CD24 stem cells of tumor markers in prostate tissue after radical prostatectomy in 102 patients with prostate cancer.

Immunohistochemical study (IHC) expression of CD24 and CD44 in primary antibodies using monoclonal antibodies (clone SN3b, Thermo Scientific, USA), and CD44/HCAM (clone 156-3C11, Diagnostic BioSystems, USA). The positive expression of CD24 and CD44 was

considered the number of immunopositive cells for more than 10%. To visualize the results of IHC reagents used EnVision system (Dako LSAB2 system, Denmark). Histological sections were stained with Mayer's hematoxylin. The results are analyzed using an optical microscope XSP-137-BP (firm JNOEC, Ч200-400).

The correlation between the expression of CD24 and CD44, and stage of disease. When PSA levels >15 ng/mL was an increase expression markers. There was a correlation between expression CD44+ and CD24-, and the emergence of biochemical recurrence ( $r=0,4$ ;  $p<0,05$ ). Determination of cells in the tumor tissue markers CD44+CD24-/low can be additional criterion for prognosis of prostate cancer.

**Key words:** prostate cancer, stem tumor cell markers CD24 and CD44.

**Сведения об авторах**

**Жильчук Ю.В.** – ГУ «Институт урологии НАМН Украины», 04053, г. Киев, ул. В. Винниченко, 9а

**Сакало В.С.** – ГУ «Институт урологии НАМН Украины», 04053, г. Киев, ул. В. Винниченко, 9а

**Григоренко В.М.** – ГУ «Институт урологии НАМН Украины», 04053, г. Киев, ул. В. Винниченко, 9а

**Сакало А.В.** – ГУ «Институт урологии НАМН Украины», 04053, г. Киев, ул. В. Винниченко, 9а

**Задворный Т.В.** – Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 45; тел.: (044) 259-01-83

**Лукьянова М.Ю.** – Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 45; тел.: (044) 259-01-83

**Чехун В.Ф.** – Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 45; тел.: (044) 259-01-83

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Zhang K Zhou S, Wang L, Wang J, et al., Current Stem Cell Biomarkers and Their Functional Mechanisms in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2016 Jul 19;17(7).
2. Hurt E.M., Kawasaki B.T., Klarmann G.J., Thomas S.B. et al. CD44+CD24<sup>+</sup> prostate cells are early cancer progenitor stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br. J. Cancer* 2008, 98, 756–765.
3. Zhang XH, Sakamoto H, Takenaka I. Accumulation of p53 and expression of CD44 in human prostatic cancer and benign prostatic hyperplasia: an immunohistochemical study. *Br J Urol* 1996; 77: 441-444.
4. Vis AN, Noordzij MA, Fitoz K, et al. Prognostic value of cell cycle proteins p27(kip1) and MIB-1, and the cell adhesion protein CD44s in surgically treated patients with prostate cancer. *J Urol* 2000; 164: 2156-2161.
5. Kallakury BV, Sheehan CE, Ambros RA, et al. Correlation of p34cdc2 cyclin-dependent kinase over-expression, CD44s downregulation, and HER-2/neu oncogene amplification with recurrence in prostatic adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1302-1309.
6. Makarewicz R, Zyromska A, Andrusiewicz H. Comparative analysis of biological profiles of benign prostate hyperplasia and prostate cancer as potential diagnostic, prognostic and predictive indicators. *Folia Histochem Cytobiol* 2011; 49: 452-457.
7. Korsi K., Malicka-Durczak A., Brkborowicz J. / Expression of stem cell marker CD44 in prostate cancer biopsies predicts cancer grade in radical prostatectomy specimens // *Pol J Pathol* 2014; 65 (4): 291-295.
8. Ugolkov AV, Eisengart LJ, Luan C, Yang XJ. Expression analysis of putative stem cell markers in human benign and malignant prostate. *Prostate* 2011; 71: 18-25.
9. C. Liu, K. Kelnar, B. Liu et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44, *Nature Medicine*, vol. 17, no. 2, pp. 211–216, 2011.

Статья поступила в редакцию 13.12.2016