

*М. Ю. Малько*

## **ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ МИКРОТРУБОЧЕК В КЛЕТКАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ**

*Научный руководитель канд. мед. наук, доц. А. С. Портянко*

*Кафедра патологической анатомии,*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

**Резюме.** Работа посвящена изучению экспрессии  $\beta I$ - и  $\beta III$ -изотипов тубулина в колоректальной аденокарциноме. Установлено, что низкий уровень экспрессии  $\beta I$ -тубулина и высокий уровень экспрессии  $\beta III$ -тубулина в клетках опухоли (преимущественно инвазивного фронта) определяют ее резистентность к химиотерапии, высокую вероятность прогрессирования заболевания, а также летального исхода.

**Ключевые слова:** микротрубочки, тубулин, колоректальная аденокарцинома.

**Resume.** The article is devoted to research of  $\beta I$ - and  $\beta III$ -isotypes of tubulin in colorectal carcinoma cells. It was found that low level of an  $\beta I$ -tubulin expression and the high level of an  $\beta III$ -tubulin expression in tumor cells (of mainly invasive front) determine its chemotherapy resistance, high risk of disease progressing and also lethal outcomes.

**Keywords:** microtubules, tubulin, colorectal adenocarcinoma.

**Актуальность.** Микротрубочки являются компонентом цитоскелета клетки и играют важную роль в обеспечении ее жизнедеятельности, участвуя в поддержании пространственной формы, обеспечении подвижности, внутриклеточном транспорте, формировании митотического веретена и правильной ориентации хромосом во время митоза. Белок тубулин – основной компонент микротрубочек – состоит из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, для каждой из которых существуют генетически запрограммированные

изотипы и посттрансляционные модификации [1]. Изотипы тубулинов неравномерно распределены в тканях [2], существуют данные и об их функциональном различии [3]. В условиях развития патологического процесса в клетке может измениться спектр синтезируемых изотипов [4], что предположительно приведет и к изменению ее свойств. Так, установлено, что для микротрубочек, сформированных из  $\alpha\beta$ III-тубулина, характерна высокая динамическая нестабильность [5], что, вероятно, способствует повышению миграционной способности клетки; экспрессия в клетке  $\beta$ III-тубулина ассоциирована с устойчивостью ее к действию свободных радикалов [3]; опухоли, экспрессирующие  $\beta$ III-изотип, отличаются устойчивостью к Vinс-алкалоидам, таксанам [6]. Поэтому определение спектра изменений экспрессии тубулинов, синтезирующихся в опухолевой клетке, имеет важное значение в понимании механизмов инвазии и метастазирования, химиорезистентности, а также для определения мишеней для химиотерапии.

**Цель:** оценить изменения экспрессии  $\beta$ I- и  $\beta$ III-изотипов тубулина в колоректальной аденокарциноме, а также их влияние на исход заболевания.

**Задачи:**

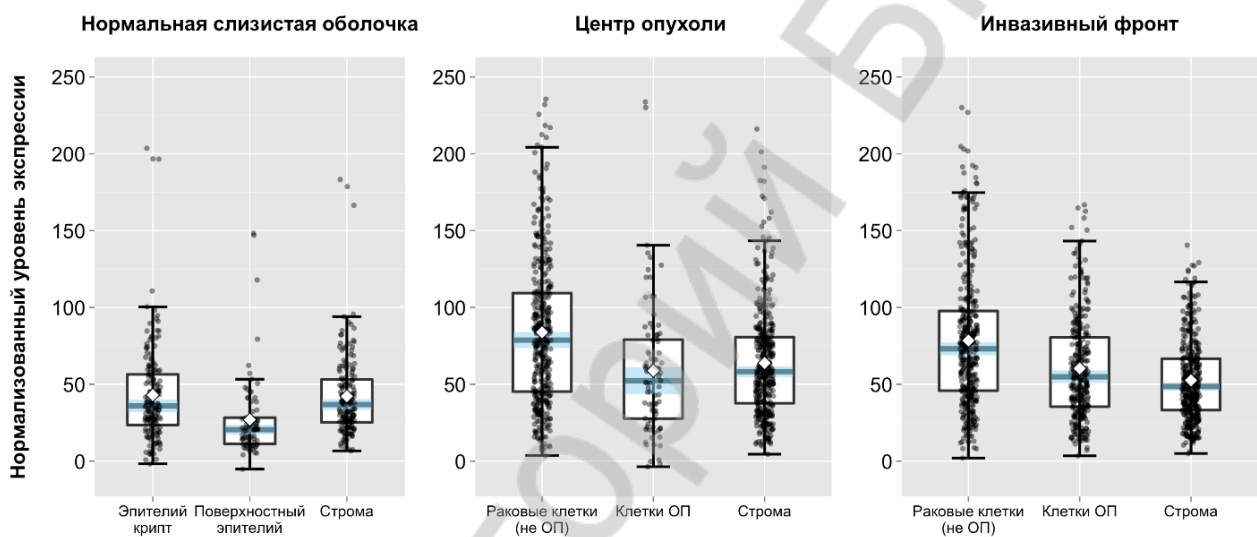
1. Выявить особенности экспрессии  $\beta$ I- и  $\beta$ III-изотипов тубулина в разных компартментах колоректальной аденокарциномы (центр, инвазивный фронт)
2. Оценить связь экспрессии  $\beta$ I- и  $\beta$ III-изотипов тубулина с преобладающим гистоархитектоническим типом опухоли.
3. Установить роль изменения экспрессии  $\beta$ I- и  $\beta$ III-тубулинов в прогнозе течения и химиочувствительности опухоли, вероятностью прогрессирования и летального исхода.

**Материалы и методы.** Для работы были использованы 125 колоректальных аденокарцином (далее КРАК) от 124 пациентов. Среди пациентов 44 % (55 случаев) составляли мужчины, средний возраст 63,56 лет и 56% (69 случаев) – женщины, средний возраст 65,56 лет.

Была проведена двойная иммунофлуоресцентная окраска с моноклональными антителами к цитокератину,  $\beta$ I- и  $\beta$ III- тубулинам. Съемка производилась на микроскопе с флуоресцентной осью по 3 случайным непересекающимся полям зрения из центральной зоны, инвазивного фронта и из участков нормальной слизистой оболочки. Для каждого поля зрения была определена конфигурация желез (простые, сложные, иррегулярные железы и мелкие комплексы). Для обработки изображений использовался программный пакет eCognition. Статистическая обработка производилась с использованием пакета RStudio, v. 0.98.1103. Сравнение групп проводилось при помощи двустороннего теста Манна-Уитни с поправкой Бонферрони ( $p_{mu}$ ). Результаты измерений изображены в виде боксовых диаграмм, комбинированных со скаттерграммой (бокс – межквартильный размах, «усы» - границы статистически значимых значений, медиана изображена в виде полосы, а среднее значение обозначено  $\diamond$ , голубая зона вокруг медианы – 95 % доверительный интервал медианы). Кривые выживаемости строились по методу Каплан-Майера, для сравнения выжи-

ваемости в группах использовался лог-ранк тест. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

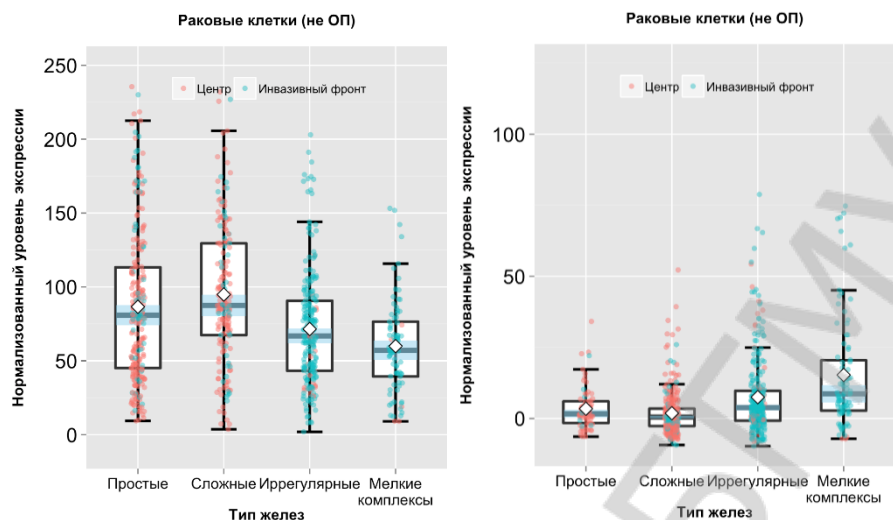
**Результаты и их обсуждение.** Экспрессия  $\beta$ I-тубулина присутствовала как в нормальной слизистой оболочке, так и в клетках КРАК. Было обнаружено увеличение экспрессии белка в опухолевых клетках по сравнению с нормальными колоноцитами, при этом отмечено достоверное снижение ее от центра опухоли к инвазивному краю ( $p < 0,05$ ) и опухолевым почкам (ОП), которые представляют собой изолированные недифференцированные клетки или кластеры до 5 клеток в области наиболее глубокой инвазии и характеризуются изменением эпителиального фенотипа на мезенхимальный ( $p < 0,05$ ) (рис. 1).



**Рисунок 1** – Экспрессия  $\beta$ I-тубулина в нормальной слизистой толстой кишки и в КРАК.

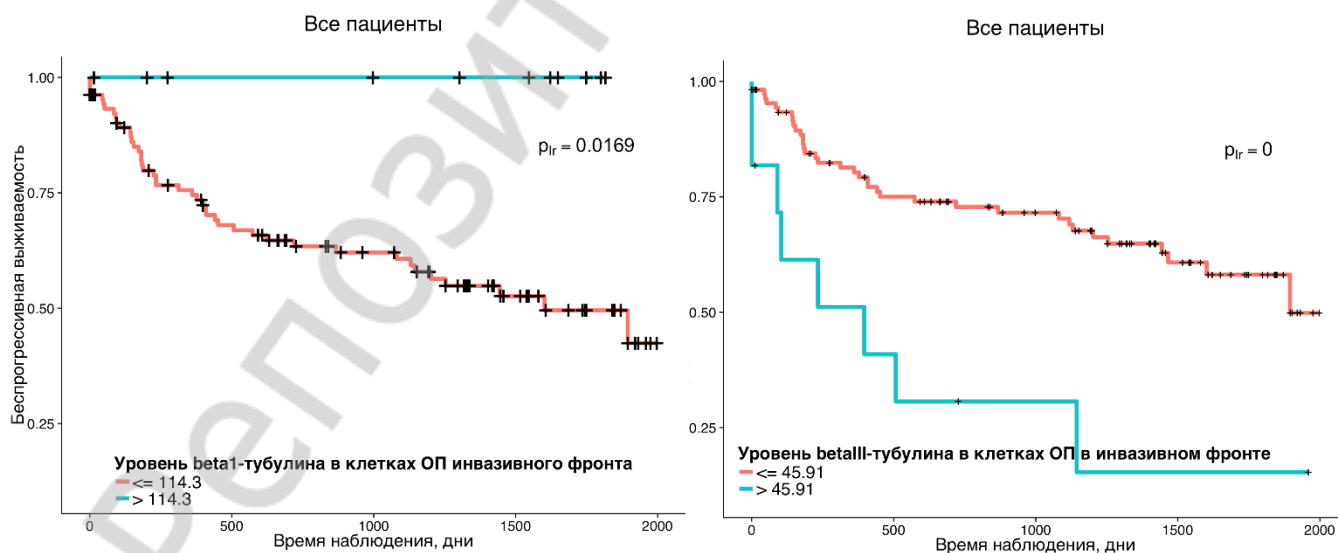
Также во всех случаях наблюдалось положительное окрашивание опухолевых клеток антителами к  $\beta$ III-тубулину, который в нормальной слизистой оболочке толстой кишки обнаруживался в единичных (предположительно нейроэндокринных) клетках. Было выявлено статистически достоверное увеличение экспрессии белка от центра опухоли к инвазивному краю ( $p < 0,05$ ) и ОП ( $p < 0,001$ ).

При оценке экспрессии  $\beta$ I- и  $\beta$ III-изотипов в КРАК разного гистоархитектонического типа было выявлено, что опухоли, образованные преимущественно простыми и сложными трубочками, характеризовались более высоким уровнем экспрессии  $\beta$ I-изотипа и более низким уровнем экспрессии  $\beta$ III-изотипа по сравнению с аденокарциномами, сформированными в основном иррегулярными трубочками и мелкими комплексами клеток (рис. 2).



**Рисунок 2** – Экспрессия  $\beta$ I- и  $\beta$ III-тубулина в зависимости от преобладающего типа строения КРАК.

При анализе выживаемости пациентов было установлено, что общая выживаемость всех пациентов зависела от интенсивности экспрессии исследуемых изоформ в раковых клетках и строении центра и инвазивного фронта опухоли (более низкая летальность ассоциировалась с высокой экспрессией  $\beta$ I- и низкой экспрессией  $\beta$ III-изоформ), в то время как продолжительность беспрогрессивного периода зависела от уровня экспрессии белков в опухолевых почках инвазивного края (высокая беспрогрессивная выживаемость у пациентов с высоким уровнем экспрессии  $\beta$ I- и низким уровнем экспрессии  $\beta$ III-тубулина) (рис. 3).



**Рисунок 3** – Влияние экспрессии  $\beta$ I- и  $\beta$ III-изоформ тубулина на беспрогрессивную выживаемость.

Анализ влияния экспрессии изоформ тубулина на химиочувствительность

опухоли проводился в группе пациентов, принимающих 5-флуорурацил (5-ФУ+). Было выявлено статистически значимое увеличение беспрогрессивного периода в случаях с низкой экспрессией  $\beta$ III-тубулина, что свидетельствует об участии этого изоформа в формировании химиорезистентного клона опухолевых клеток.

Влияние интенсивности экспрессии  $\beta$ I-тубулина на чувствительность к 5-флуорурацилу подтверждено не было, однако у пациентов с III-IV клинической стадией выявлено статистически достоверное увеличение беспрогрессивной выживаемости при увеличении экспрессии  $\beta$ I-тубулина в инвазивном фронте опухоли, на основании чего также можно предположить влияние  $\beta$ I-изоформа на устойчивость КРАК к химиотерапии.

$\beta$ I-тубулин – наиболее широко распространенный у млекопитающих изоформ  $\beta$ -тубулина, присутствующий почти во всех исследованных тканях. Этот белок жизненно необходим для клетки, обеспечивая, предположительно, внутриклеточный транспорт и митоз [3]. Интенсивность экспрессии  $\beta$ I-изоформа влияет на подвижность клетки: сверхэкспрессия белка ассоциируется с дефектами адгезии [7]. В ходе исследования было установлено, что в условиях опухолевого роста происходит увеличение экспрессии данного изоформа, при этом наблюдается нисходящий градиент экспрессии от центра опухоли к инвазивному фронту с минимальным уровнем в ОП, что не противоречит данным о значении  $\beta$ I-тубулина для миграционной способности клеток.

$\beta$ III-тубулин характеризуется более узким распределением и обнаруживается в норме в нейронах и клетках Сертоли. Особенности аминокислотной последовательности белка обеспечивают его устойчивость к действию свободных радикалов, что подтверждается данными о снижении жизнеспособности клеток в условиях окислительного стресса при подавлении экспрессии  $\beta$ III-тубулина [3], а также его синтезом только в клетках, где в норме образуется избыточное количество монооксида азота [8].

В опухолевых клетках экспрессия  $\beta$ III-тубулина встречается достаточно часто, что может быть связано с невосприимчивостью этого изоформа к действию свободных радикалов, которые в большом количестве образуются в опухолях. Также для микротрубочек, сформированных из  $\beta$ III-изоформа тубулина, характерна более высокая динамичность по сравнению с микротрубочками из других  $\beta$ -изоформ, что может способствовать повышению миграционной способности клетки. Согласно результатам проведенного исследования, в КРАК экспрессия  $\beta$ III-тубулина увеличивается от центра опухоли к инвазивному фронту с максимальным уровнем в ОП – кластерах клеток с высокой миграционной активностью, что согласуется с данными о защитной роли этого изоформа в условиях свободно-радикального окисления и его влиянием на подвижность клеток.

#### **Выводы:**

1 В клетках колоректального рака происходит увеличение экспрессии  $\beta$ I-тубулина и выявляется отсутствующий в нормальных колоноцитах  $\beta$ III-тубулин.

2 Экспрессия исследуемых изоформ  $\beta$ -тубулина зависит от степени дифференцировки опухолевых клеток: в менее дифференцированных клетках наблюдается увеличение уровня  $\beta$ III-тубулина и относительное снижение уровня  $\beta$ I-тубулина.

3 Общая и беспрогрессивная выживаемость, химиочувствительность опухоли зависят от интенсивности экспрессии исследуемых белков: более благоприятный прогноз имеют КРАК с высоким уровнем экспрессии  $\beta$ I- и низким уровнем экспрессии  $\beta$ III-изоформ тубулина.

*M. Y. Malko*

## **FEATURES OF THE STRUCTURE OF MICROTUBULES IN COLORECTAL CARCINOMA CELLS**

*Tutor Associate professor A. S. Portyanko*

*Department of Pathology,  
Belarusian State Medical University, Minsk*

### **Литература**

1. Ludueña R.F. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. // *Int. Rev. Cytol.* 1998; 178: 207-275.
2. Mary Carmen Roach, Virginia L. Boucher et al. Preparation of a Monoclonal Antibody Specific for the Class I Isoform of  $\beta$ -Tubulin: The  $\beta$  Isoforms of Tubulin Differ in Their Cellular Distributions Within Human Tissues / *Cell Motility and the Cytoskeleton* 39:273–285 (1998).
3. Guo J., Walss-Bass C., Ludueña R.F. The beta isoforms of tubulin in neuronal differentiation. // *Cytoskeleton.* 2010; 67(7): 431-441.
4. Differentiation of human colon cancer cells changes the expression of beta-tubulin isoforms and MAPs [Text]\* / G. Carles, D. Braguer, C. Dumontet, et al. // *Brest Journal Cancer.* – 1999. 80: 1162-1168.
5. Panda D, Miller HP, Banerjee A et al (1994) Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isoform composition. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11358–11362.
6. Seve P, Dumontet C. Is class III  $\beta$ -tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *Lancet Oncol* 2008;9:168–175.
7. Over-expression of betaI tubulin in MDCK cells and incorporation of exogenous betaI tubulin into microtubules interferes with adhesion and spreading / R. Lezama [et al.] // *Cell Motil. Cytoskeleton.* 2001; 50(3): 147-160.
8. Mungrue I.N., Bredt D.S. nNOS at a glance: implications for brain and brawn. // *J. Cell Sci.* 2004; 117(13): 2627-2629.