

ОПУХОЛЕВОЕ ПОЧКОВАНИЕ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ И ЕГО ПРЕДИКТОРНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Рукша К.Г., Портянко А.С.

*Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра патологической анатомии
г. Минск*

Ключевые слова: колоректальный рак, опухолевое почкование, тубулин, микротрубочки, цитоскелет

Резюме. Данная работа посвящена изучению связи опухолевого почкования при колоректальном раке с клиническими параметрами и содержанием ацетилированного α -тубулина. Установлено, что высокий уровень опухолевого почкования в области инвазивного фронта, а также статистически значимое снижение экспрессии ацетилированного α -тубулина в опухолевых клетках являются предикторами резистентности опухоли к химиотерапии.

Resume. The study investigates the link of tumor budding in colorectal cancer to clinical features and the expression of acetylated α -tubulin. High grade of tumor budding at the deepest invasive margin of colorectal cancer as well as the statistically significant loss of the expression of acetylated α -tubulin in tumor cells were revealed to be predictive markers of tumor resistance to anticancer drug therapy.

Keywords: colorectal cancer, tumor budding, tubulin, microtubules, cytoskeleton

Актуальность. Во всем мире колоректальный рак (КРР) занимает четвертое место по смертности от злокачественных новообразований. Каждый год выявляется более миллиона новых случаев КРР, а умирают от этой болезни более 500 тыс. пациентов [1]. Во многом это связано с ограниченной эффективностью применяющихся в лечении противоопухолевых препаратов, в связи с чем перспективной представляется разработка химиотерапевтических агентов, направленных на подавление миграционной способности клеток опухоли.

Инвазивный фронт опухоли является отражением динамического процесса дедифференцировки клеток колоректальной аденокарциномы, известного как эпителиально-мезенхимальный переход. Гистологическим феноменом, отражающим этот процесс является опухолевое почкование (ОП) – присутствие единичных клеток или кластеров до 5 клеток в области инвазивного фронта. В процессе дедифференцировки клетки эпителия приобретают мезенхимальный фенотип, характеризующийся высокой миграционной способностью, инвазивностью, резистентностью к апоптозу и повышенной продукцией компонентов внеклеточного матрикса [2]. Опухолевое почкование ассоциируется с неблагоприятным клиническим течением заболевания [3] и является дополнительным прогностическим фактором (International Union Against Cancer) [4,5].

Известно, что движение клеток, вариантом которого является инвазия, тесно связано с перестройкой структур цитоскелета, в частности, с полимеризационной динамикой микротрубочек. Микротрубочки представляют интерес в качестве точки приложения для противоопухолевых препаратов (Vinca алкалоиды, производные

таксанов, колхицин). Основным структурным компонентом микротрубочек является тубулин – белок, представленный α , β и γ субъединицами. γ -субъединицы принимают участие в заякоривании микротрубочки в клеточном центре, а α и β субъединицы составляют основу перестраивающихся положительно заряженных концов микротрубочек. По количеству известных изоформ и посттрансляционных модификаций тубулина являются очень модифицируемыми белками, что хорошо описано в научной литературе [6], однако изменение их структуры и биологические функции при различных патологических процессах остаются малоисследованной областью.

Цель: установить связь опухолевого почкования с клиническими параметрами и содержанием ацетилированного α -тубулина.

Задачи:

1. Выявить связь между опухолевым почкованием и стадией TNM, а также прогнозом течения заболевания и химиочувствительностью
2. Определить особенности экспрессии ацетилированного α -тубулина в нормальных колоноцитах и опухолевых клетках.
3. Установить роль изменения содержания ацетилированного α -тубулина в прогнозе течения и химиочувствительности колоректального рака.

Материал и методы.

Исследование проводилось на гистологическом операционном материале 125 пациентов (55 мужчин и 70 женщин, средний возраст $64,6 \pm 11,1$ лет) с колоректальным раком, прооперированных в Минском городском клиническом онкологическом диспансере в период с 2009 по 2011 г. Фрагменты операционного материала фиксировались в 10% нейтральном забуференном формалине и заключались в парафин, после чего из блоков изготавливались срезы толщиной 4 мкм.

Оцениваемые препараты были иммуногистохимически окрашены с использованием антител к цитокератину (AE1/AE3). Подсчет среднего количества опухолевых почек проводился в пяти последовательных неперекрывающихся полях зрения (объектив $\times 20$).

При проведении двойной иммунофлюоресценции использовалась комбинация антител к ацетилированному α -тубулину и антител к цитокератину AE1/AE3.

Съемка производилась на микроскопе Leica DM5000B с флуоресцентной осью на увеличении $\times 200$ с использованием цифровой камеры Leica DFC420C. В каждом гистологическом препарате производилась съемка 5 неперекрывающихся полей зрения в области центра и в области инвазивного фронта, а также в нормальной неопухолевой ткани (для 11 случаев). Анализ изображений проводился с помощью программы ImageJ ver. 1.48r.

Статистический анализ производился с использованием пакетов Statistica 10 (StatSoft, Inc.) и Microsoft Excel 2010.

Результаты и их обсуждение. Опухолевое почкование присутствовало в 95,2 % анализируемых случаев. Среднее количество опухолевых почек в пяти

последовательных неперекрывающихся полях зрения варьировало от 0 до 31,2. При оценке связи уровня опухолевого почкования с клиническими параметрами по системе классификации TNM было обнаружено, что уровень опухолевого почкования достоверно выше в группах пациентов с большей глубиной инвазии первичной опухоли в кишечную стенку (pT1-pT2) ($p = 0,0315$), наличием регионарных (N1-2) ($p = 0,0002$) и отдаленных (M1) ($0,0001$) метастазов, а также в группах с более высокой (III-IV) клинической стадией заболевания ($p = 0,0002$). Кроме того, была выявлена прямая умеренная корреляционная связь между средним количеством опухолевых почек в поле зрения и отношением лимфоузлов с обнаруженными метастазами к количеству всех удаленных лимфоузлов. (Spearman $\rho = 0,4$; $p = 0,0000$) .Статистически значимой связи между уровнем опухолевого почкования и полом, возрастом, а также право- или левосторонней локализацией опухоли выявлено не было (таблица 1).

Таблица 1. Среднее количество опухолевых почек в группах сравнения по клиническим параметрам (возраст, пол, локализация, стадия TNM)

Сравниваемые группы пациентов	Сравниваемые параметры	Общее количество во пациенто в	Среднее количество во ОП	Значение p	Медиана	Доверительный интервал	
						- 95 %	+ 95%
Т – первичная опухоль	pT1-T2	15	2,79	$p = 0,0315^*$	1,40	2,34	5,05
	pT3-T4	110	5,90		3,80	5,69	7,43
N - регионарные лимфатические узлы	N0	58	3,91	$p = 0,0002^{**}$	1,90	4,66	6,76
	N1-2	67	6,93		5,40	5,54	7,82
M – отдаленные метастазы	M0	104	4,64	$p = 0,0001^{**}$	2,70	4,87	6,41
	M1	21	9,94		8,00	5,79	10,93
Клиническая стадия	1-2 стадия	56	3,88	$p = 0,0002^{**}$	1,90	4,68	6,82
	3-4 стадия	69	6,87		5,60	5,52	7,74

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$

Для оценки влияния опухолевого почкования на общую и безрецидивную выживаемость пациенты были разделены на группы с I-II (группа 1) и III-IV (группа 2) клинической стадией заболевания. Согласно действующим протоколам лечения злокачественных новообразований пациентам с I-II клинической стадией показано хирургическое лечение, в то время как пациенты с III-IV клинической стадией дополнительно проходят курсы химиотерапии, основу которых составляют флуорурацил, препараты платины и кальция фолинат [7] .

Было установлено, что в группах пациентов с III-IV клинической стадией заболевания более высокое среднее количество ОП в области инвазивного фронта (3,0 и более ОП в поле зрения) достоверно ассоциируется с более низкой общей ($p = 0,0203^*$) и безрецидивной ($p = 0,0026^{**}$) выживаемостью , что, с учетом

проводимого на этих стадиях химиотерапевтического лечения, позволяет считать высокий уровень опухолевого почкования предиктором резистентности опухоли к химиотерапии (рисунок 1).

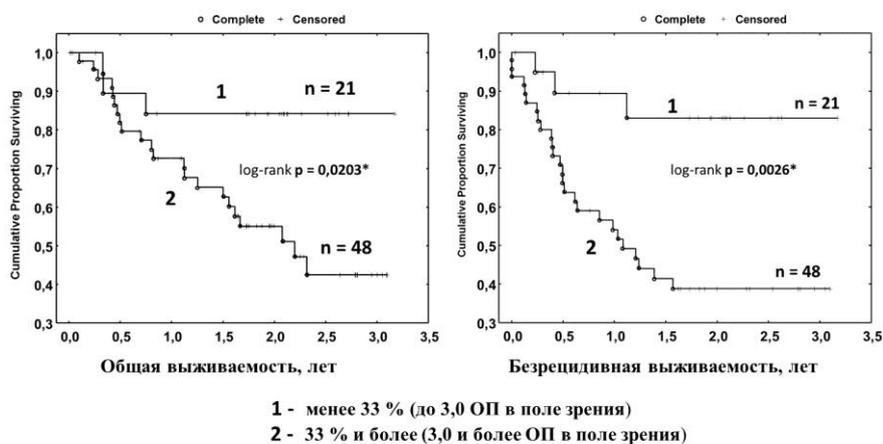


Рис. 1 - Выживаемость у пациентов с III-IV клинической стадией в зависимости от уровня опухолевого почкования

Полученные результаты не противоречат имеющимся научным данным о связи опухолевого почкования с неблагоприятным течением колоректального рака в послеоперационный период. [4,8].

При оценке двойной иммунофлюоресценции экспрессия ацетилированного α -тубулина присутствовала во всех случаях. Был обнаружен статистически значимый нисходящий градиент экспрессии ацетилированного α -тубулина от центра к инвазивному фронту ($p = 0,0023$) и опухолевым почкам ($p = 0,0009$), а также снижение экспрессии в опухоли по сравнению с нормой ($p = 0,0000$) (рисунок 2).

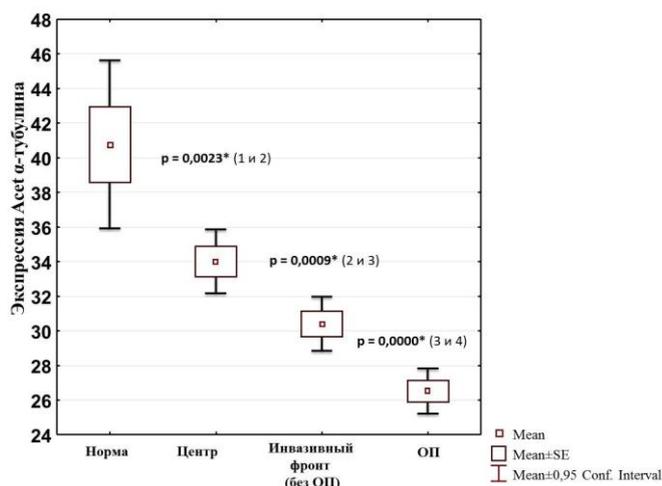


Рис. 2 – Экспрессия ацетилированного α -тубулина в исследуемых областях

Период общей и безрецидивной выживаемости был достоверно более коротким у пациентов со сниженной экспрессией ацетилированного α -тубулина как в центре опухоли ($p = 0,0073$ для центра опухоли и $p = 0,0210$ для области

опухолевых почек), так и в области опухолевых почек ($p = 0,0210$ для центра опухоли и $p = 0,1035$ для области опухолевых почек). Выявленная взаимосвязь определяет значимость уровня экспрессии ацетилированного α -тубулина как предиктора химиорезистентности опухоли к лечению.

На сегодняшний день роль ацетилированного α -тубулина, как и других белков микротрубочек, в развитии и прогрессии патологических состояний изучена недостаточно. Согласно имеющимся данным, ацетилированный α -тубулин преобладает в структуре более стабильных микротрубочек, образующих реснички, жгутики, базальные тельца [6]. Ранее проводились исследования, указывающие на возможную роль ацетилированного α -тубулина в регуляции клеточной подвижности: гиперэкспрессия деацетилазы гистонов (HDAC 6) приводила к снижению содержания ацетилированного α -тубулина и, как следствие, к приобретению клетками способности к хемотаксическому движению [9]. Было установлено снижение экспрессии ацетилированного α -тубулина при хронических воспалительных заболеваниях кишечника в участках активного воспаления и повреждения кишечного эпителия [10], где высоко интенсивны процессы регенерации поврежденной ткани. В нашем исследовании уровень экспрессии ацетилированного α -тубулина снижался от нормальных колоноцитов к менее дифференцированным клеткам инвазивного фронта, а наиболее низкий уровень экспрессии был характерен для опухолевых почек, которые, как известно, являются недифференцированными клетками с повышенной миграционной способностью, претерпевающими эпителиально-мезенхимальный переход. Помимо инвазии опухоли, этот процесс имеет место на этапе эмбриогенеза, при заживлении ран, регенерации тканей, фиброзе. Таким образом, можно заключить, что экспрессия ацетилированного α -тубулина является характеристикой степени дифференцировки и подвижности клеток, что представляет интерес с позиции разработки противоопухолевых препаратов.

Выводы:

1. Присутствие недифференцированных клеток с высокой миграционной способностью в области инвазивного фронта – опухолевых почек ассоциируется с большей глубиной инвазии первичной опухоли (pT3-T4), наличием метастазов в регионарные лимфоузлы (N1-2) и отдаленных метастазов (M1), а также более высокой (III-IV) клинической стадией заболевания.

2. В ходе исследования была установлена связь уровня экспрессии ацетилированного α -тубулина с низкой дифференцировкой клеток опухоли: обнаружен нисходящий градиент экспрессии этого белка от нормы к центру опухоли, инвазивному краю и опухолевым почкам.

3. Высокий уровень опухолевого почкования в области инвазивного фронта, а также снижение экспрессии ацетилированного α -тубулина в клетках опухоли являются предикторами химиорезистентности опухоли.

Литература

1. CA : Cancer J. Clin. / Jemal A. , Ferlay J et al. – 2011. – Vol.61, N 2. – P. 69-90
2. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells / Kalluri R. // J. Clin Invest 2009. – 119. – P. 1417-9.
3. Ueno H., Price A.B., Wilkinson K.H., et al. / Ann. Surg. – 2004. – Vol. 240. – P. 832-839
4. Compton CC, Fielding LP, Burgart et al. Prognostic factors in colorectal cancer. // College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med 2000. – P. 979-994
5. Jass J.R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. // Histopathology 2007.– P. 113-130
6. Luduena R.F., Banerjee A. The isotypes of tubulin: distribution and functional significance / The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology / Ed. by Fojo T. NY: Humana Press. 2008. - P. 123–175.
7. Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований / под ред. О.Г. Суконко, С.А. Красного. – М.: Профессиональные издания, 2012. – с. 97-112
8. Wang. L.M., Kevans D., Mulcahy H. et al. // Am. J. Surg. Path./ – 2009. – Vol.33, N1. – P. 134-141
9. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase // Nature 2002. - P. 417, 455–458.
10. Портянко А.С., Перевошиков П.А., Станилевич М.А. Экспрессия тирозинированного и ацетилированного альфа-тубулина при болезни Крона и язвенном колите / Матер.68-й научно-практической конференции «АПСМиФ 2014». – Минск, 2012. – ст. 1-11-13