

ПОЧКОВАНИЕ ОПУХОЛИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ И ЕГО ПРЕДИКТОРНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

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

Кафедра патологической анатомии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

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.

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

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 x20).

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 пациентов	Среднее количество 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).

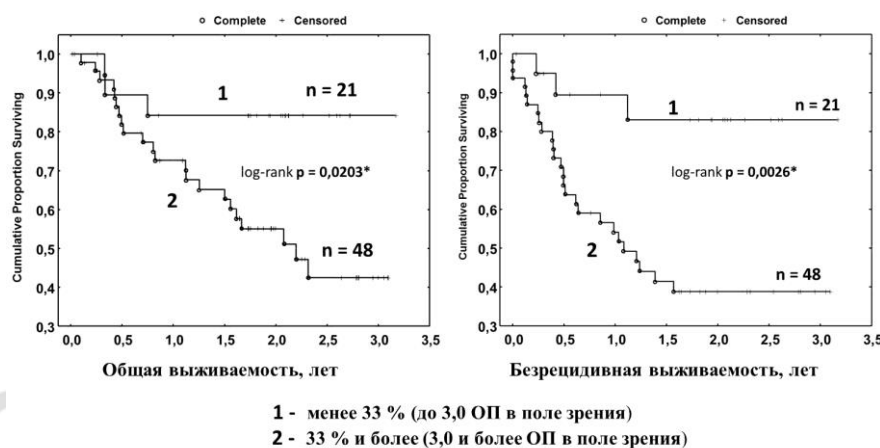


Рисунок 1 - Выживаемость у пациентов с III-IV клинической стадией в зависимости от уровня опухолевого почкования

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).

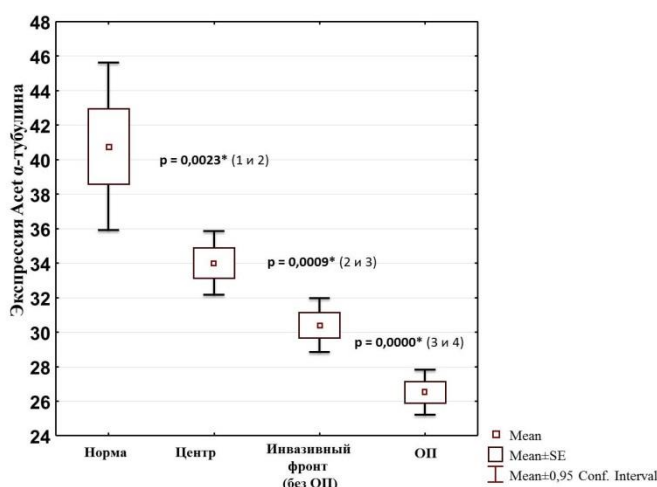


Рисунок 2 – Экспрессия ацетилированного α -тубулина в исследуемых областях

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.

K.G. Ruksha

**TUMOR BUDDING IN COLORECTAL CANCER
AND ITS PREDICTIVE SIGNIFICANCE**

Tutor Associate professor A. S. Portyanko

Department of Pathology

Belarusian State Medical University, Minsk

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. Pathol./ – 2009. – Vol.33, N1. – P. 134-141
9. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. HDAC6 is a microtubule-Associate d deacetylase // Nature 2002. - P. 417, 455–458.
10. Портянко А.С., Перевощиков П.А., Станисевич М.А. Экспрессия тирозинированного и

69-я научно практическая конференция студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы современной медицины и фармации-2015»

ацетилированного альфа-тубулина при болезни Крона и язвенном колите / Матер.68-й научно-практической конференции «АПСМиФ 2012». – Минск, 2012. – ст. 1-11-13.