

*И. Ю. Жерко, К. Г. Рукиша **
**ЭКСПРЕССИЯ ТКАНЕВОЙ ТРАНСГЛУТАМИНАЗЫ В
КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЕ**

Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. А. С. Портянко,
Кафедра патологической анатомии,*

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

** Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», г. Минск*

***Резюме.** В ходе данного исследования были определены некоторые закономерности экспрессии тканевой трансглутаминазы в колоректальной аденокарциноме. Выявлено, что экспрессия фермента в строме опухоли статистически значимо повышается по сравнению с нормальной слизистой оболочкой. Показано влияние уровня фермента в компонентах опухоли на прогноз для пациентов с различной стадией заболевания.*

***Ключевые слова:** тканевая трансглутаминаза, колоректальный рак, прогноз*

Resume. Expression patterns of tissue transglutaminase (tTG) in colorectal cancer were determined. Normalized level of tTG was significantly higher in the tumor stroma than in the cytoplasm of cancer cells both in the center and in the invasive front. tTG expression level influence on the prognosis for patients on different clinical stages was estimated.

Keywords: tissue transglutaminase, colorectal cancer, prognosis

Актуальность. Колоректальный рак (КРР) на сегодняшний день является четвертой по частоте злокачественной опухолью, приводящей к смерти [1]. Несмотря на разрабатываемые схемы скрининга, как во всем мире, так и в Республике Беларусь, КРР зачастую выявляется на поздних стадиях с распространенным метастатическим поражением [1]. Сегодня в изучении КРР научная мысль направлена на поиск ключевых звеньев патогенеза опухолевого процесса, а также молекул-предикторов прогрессии опухоли. Трансглутаминазы – широко распространенная группа ферментов, обеспечивающих посттрансляционную модификацию белковых молекул. Второй тип – это тканевая трансглутаминаза (тТГ). Функционирование тТГ связывают со множеством биологических процессов, задействованных в росте и прогрессии опухолей, таких как пролиферация и дифференцировка клеток, стабилизация белков внеклеточного матрикса [3]. Тем не менее, данные о роли тТГ в развитии КРР на сегодняшний день противоречивы, в том числе нерешенным остается вопрос о влиянии экспрессии фермента на прогноз течения КРР.

Цель: определение закономерностей экспрессии тТГ клетками КРР и установление роли данного фермента в прогрессии КРР.

Материал и методы. Исследование проведено на гистологическом операционном материале 125 колоректальных аденокарцином от 124 пациентов (55 мужчин и 69 женщин). Возраст на момент операции составил $64,6 \pm 11,1$ года. Все пациенты были прооперированы в учреждении здравоохранения «Минский городской клинический онкологический диспансер» (УЗ МГКОД) одним хирургом в период с ноября 2009 г. по апрель 2011 г. Клинико-морфологическая характеристика опухолей приведена в таблице 1.

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика опухолей.

Локализация опухоли	
Слепая – поперечная кишка	32
Селезеночный изгиб – прямая кишка	93
Категория pT	
pT1–2	15
pT3–4	110
Вовлечение регионарных лимфоузлов	
pN0	59
pN1–2 (1-3 лимфоузла)	66
Вовлечение апикального лимфоузла	
Нет	85
Да	25
Не обнаружен	15
Синхронные отдаленные метастазы	
Нет	104
Да	21
Клиническая стадия	
I–II	56
III–IV	69
Гистологическая степень злокачественности	
G1	14
G2	78
G3	33

Иммуногистохимическое окрашивание было выполнено на срезах парафиновых блоков с применением моноклональных мышинных антител к тканевой трансглутаминазе (разведения 1:1000, Abcam). В качестве хромогена использовался диаминобензидин (ДАКО, Дания), в качестве контрокрашивания – гематоксилин Майера. При проведении отрицательного контрольного окрашивания исключалось первичное антитело к тТГ. В качестве положительного контроля использовали мышечную пластинку слизистой оболочки толстой кишки, обладающую заведомо интенсивным иммуногистохимическим окрашиванием.

Съемка производилась на микроскопе Leica DM5000 цифровой камерой Leica DFC420c с применением объектива $\times 20$. В гистологических препаратах КРР снималось по 3 случайных непересекающихся поля зрения из центральной зоны, и 3 непересекающихся последовательных поля зрения из инвазивного фронта каждой опухоли. Для 50 случаев были сделаны микрофотографии 3 непересекающихся последовательных полей зрения прилежащей неопухолевой слизистой оболочки. В каждом поле зрения автоматически выделялись и сегментировались два компартмента: эпителиальный и стромальный. В дальнейшем определялась интенсивность экспрессии тТГ по отношению к площади компартмента. Нормализованный уровень экспрессии (НУЭ) рассчитывался по формуле:

$$\text{НУЭ} = \frac{\text{Уровень экспрессии тТГ в компартменте}}{\text{Уровень экспрессии тТГ в положительном контроле}} \times 100$$

Статистический анализ производился с использованием пакета RStudio, v. 0.98.1103 (RStudio, Inc., США). RStudio, v. 0.98.1103 (RStudio, Inc., США). Сравнение групп проводили при помощи двустороннего теста Манна-Уитни с поправкой Бонферрони (p_{mu}). Влияние на выживаемость и прогрессию опухоли в различных группах оценивалось при помощи построения кривых Каплана-Майера и их сравнения лог-ранг тестом (plr).

Результаты и их обсуждение.

При иммуногистохимическом окрашивании неопухолевой слизистой оболочки толстой кишки фермент в значительном количестве выявлялся лишь в гладкомышечных элементах и эндотелиальных клетках. В опухоли фермент визуализировался как в раковых клетках, так и в стромальном компоненте. (Рисунок 1)

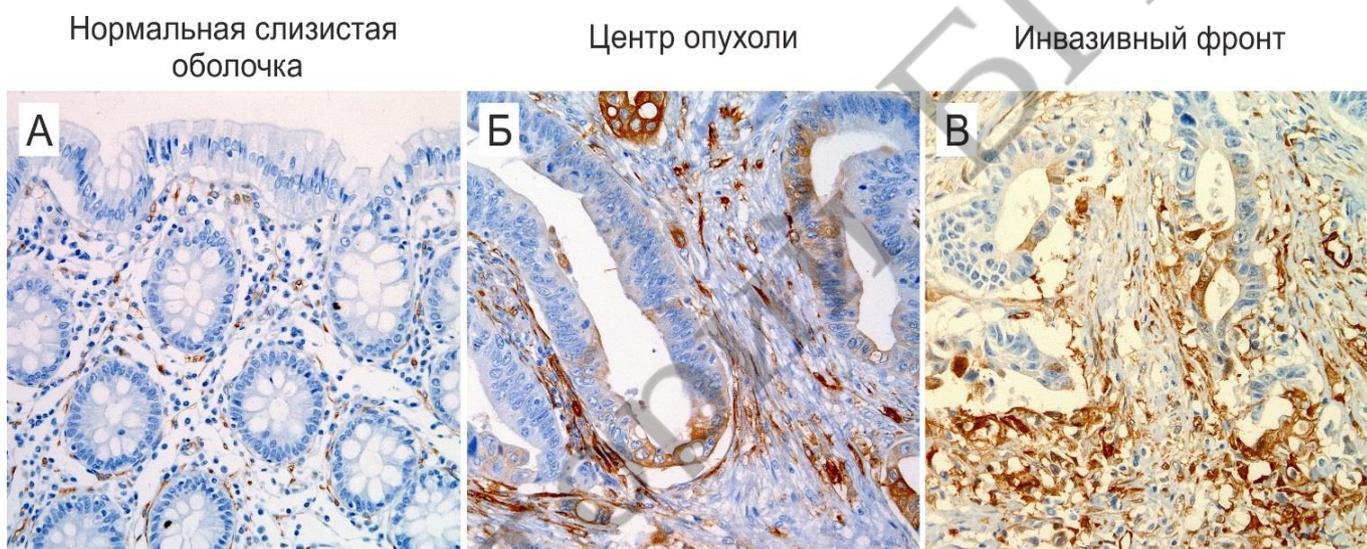


Рисунок 1 – Иммуногистохимическое окрашивание антителами к тТГ, $\times 200$. Хромоген – DAB, контрокрашивание гематоксилином Майера

Известно, что уровень фермента в тканях повышается при метаболических расстройствах типа гипоксии, свободнорадикального стресса, что и имеет место в опухоли [3].

Было выявлено значительное повышение стромальной экспрессии тТГ как в центре, так и в инвазивном фронте КРР ($p < 0,001$) (Рисунок 2), причем больший уро-

вень тТГ в строме центра опухоли был связан с лучшей опухолеспецифической выживаемостью (Рисунок 3) и с меньшей вероятностью прогрессии заболевания (Рисунок 4), что в наибольшей степени было характерно для пациентов с I-II стадией КРР.

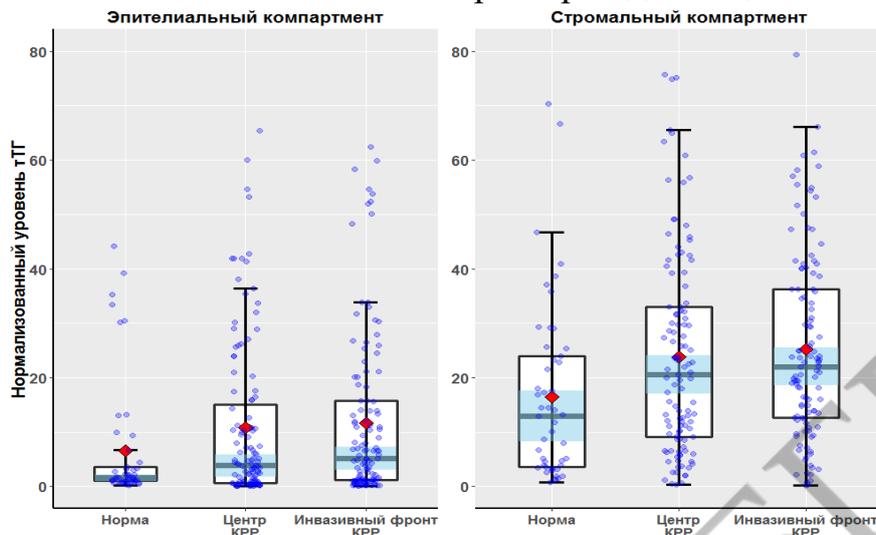


Рисунок 2 – НУЭ тТГ в нормальной слизистой оболочке толстой кишки, центре и инвазивном фронте КРР

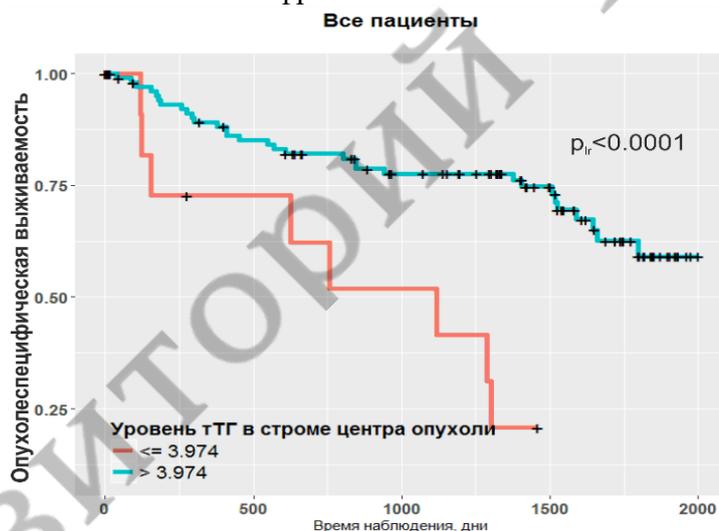


Рисунок 3 – Опухолеспецифическая выживаемость пациентов с КРР в зависимости от НУЭ тТГ

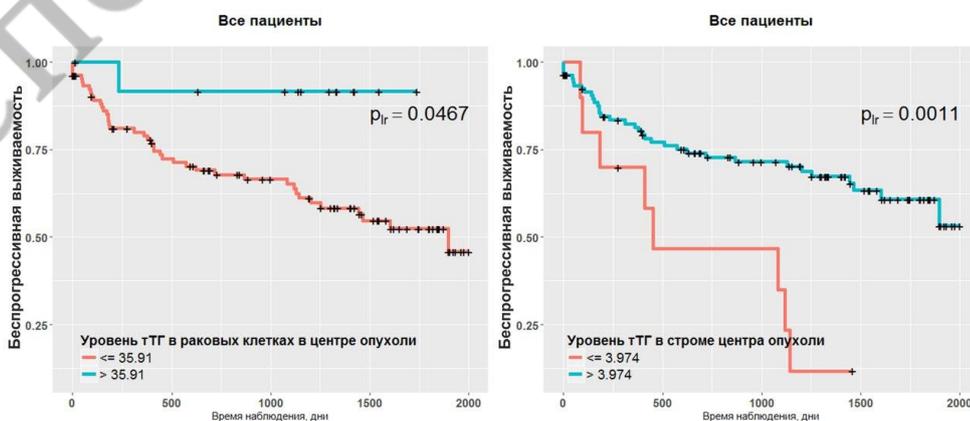


Рисунок 4 – Беспрогрессивная выживаемость пациентов с КРР в зависимости от НУЭ тТГ

Также нами была установлена связь повышения тТГ в строме центра опухоли с меньшим размером опухоли ($p=0,010$ и $p=0,009$ для pT3 и pT4 соответственно). Полученные результаты могут объясняться способностью тТГ формировать необратимые «сшивки» белков внеклеточного матрикса и таким образом стабилизировать строму опухоли и замедлять ее рост.

Более благоприятным прогноз в отношении прогрессии опухоли был и при повышении уровня фермента в раковых клетках опухолевого центра (Рисунок 4). Эта закономерность более характерна для более высоких клинических стадий заболевания, при которых имеет место метастазирование опухоли. В большинстве экспериментальных исследований на культурах, выделенных из рака молочной железы, нейробластомы, повышение экспрессии тТГ в опухолевых клетках ассоциируется с наличием отдаленных метастазов [5]. Действительно, тТГ, ассоциированная с $\beta 1$ -интегрином на мембране клетки, является корцептором для взаимодействия с молекулами внеклеточного матрикса и тем самым обуславливает большую подвижность клетки [3], в то время как активированная тТГ в цитозоле, напротив, может ограничивать миграционную способность за счет трансаминирования и «сшивок» ряда внутриклеточных белков. Таким образом, снижение содержания тТГ в раковых клетках центра опухоли может быть связано с их большим метастатическим потенциалом и быть маркером неблагоприятного течения заболевания.

Выводы.

1. тТГ в строме опухоли выполняет функцию стабилизации экстрацеллюлярного матрикса путем формирования устойчивых к механическому и протеолитическому разрушению белковых структур, что препятствует росту опухоли и метастазированию. 2. Повышение уровня экспрессии тТГ в клетках КРР, возможно, играет роль в подавлении метастатической активности клеток. 3. Более высокий уровень тТГ как в раковых клетках, так и в строме центра опухоли способствует менее агрессивному течению заболевания и является маркером благоприятного прогноза.

*I. Zherko, K. Ruksha**

EXPRESSION OF TISSUE TRANSGLUTAMINASE IN COLORECTAL CANCER

Tutors: A. Portyanko

*Department of General pathology,
Belarusian State Medical University, Minsk*

** N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus*

Литература

1. World cancer report. edited by Bernard W. Stewart and Christopher P. Wild // International Agency for Research on Cancer. 2014; 953.
2. Li B, Cerione R. A., Antonyak M. Tissue transglutaminase and its role in human cancer progression // Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 2011; 78: 247–293.
3. Chhabra A., Verma A., Menta K. Tissue transglutaminase promotes or suppresses tumors depending on cell context // Anticancer research. 2009; 29: 1909–1920.