

На правах рукописи

Колегова Елена Сергеевна

БЕЛКИ КЛЕТОЧНОЙ ПОДВИЖНОСТИ И ИХ РЕГУЛЯЦИЯ В
ПАТОГЕНЕЗЕ И ПРОГНОЗЕ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ У
БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

14.01.12 – онкология

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск - 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Научные руководители: Кондакова Ирина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор
Завьялов Александр Александрович, доктор медицинских наук

Официальные оппоненты:

Пикин Олег Валентинович доктор медицинских наук, Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, торакальное хирургическое отделение, руководитель

Степовая Елена Алексеевна доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, профессор кафедры

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Москва

Защита состоится «___» _____ 201__ года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.279.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу г. Томск, пер. Кооперативный 5

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <http://tnimc.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2019_ года
Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Фролова И.Г.

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. Рак легкого является одной из часто встречающихся злокачественных опухолей и наиболее распространённой причиной смертности от онкологической патологии [Каприн А.Д., 2018]. Среди гистологических вариантов злокачественных опухолей легкого наиболее часто встречается немелкоклеточный рак (НМРЛ). Пятилетняя выживаемость больных НМРЛ не превышает 55%. В связи с этим активно развиваются методы комбинированного лечения, включающие сочетание радикального хирургического вмешательства с лучевой и/или лекарственной противоопухолевой терапией (Добродеев А.Ю., 2016; Горбунова В.А., 2017; Miller K.D., 2016; Postmus, P., 2017).

Метастазирование НМРЛ не изучено в достаточной мере на молекулярном уровне. Значимыми процессами, определяющими метастатический потенциал опухолевых клеток, являются нарушение адгезивных свойств и способность к активному перемещению в экстраклеточном матриксе, важную роль в которых играет реорганизация актинового цитоскелета. В этой связи наиболее актуально изучение актин-связывающих белков, к числу которых относятся циклаза-ассоциированный протеин (САР1) и кофилин, а также белка, находящегося в комплексе с молекулами межклеточной адгезии – β -катенина. САР1 ускоряет обусловленную кофилином разборку актиновых филаментов и освобождает мономеры актина с последующей их полимеризацией для формирования актин-богатых структур, таких как филоподии и ламеллоподии (Хуеа В., 2013; Zhou G.-L., 2014). Большое влияние на процессы локомоции и адгезии оказывает β -катенин, участвуя в формировании межклеточных контактов. Уменьшение количества мембранных катенин-кадгериновых комплексов сопровождается накоплением фосфорилированного β -катенина в цитозоле с последующим его перераспределением в ядро, где он активирует TCL/LEF транскрипционные факторы и повышает пролиферативную и миграционную активности клеток (Кондакова И.В., 2014). В настоящее время данные белки не изучены достаточно при метастазировании НМРЛ.

Для регуляции работы белков и контроля их нормального функционирования в клетке существует система контроля качества клеточного протеома, включающая шапероны и протеазы. Молекула HspB5 (α B-кристаллина) – малого белка теплового шока, является истинным шапероном и при этом ассоциирована с лимфогенным и гематогенным метастазированием при опухолевых заболеваниях (van de Schootbrugge C., 2013). Внутриклеточные протеолитические системы (протеасомная и кальпаиновая) самостоятельно участвуют в деградации белков актинового цитоскелета и актин-связывающих белков, таких как филамины, гельзолин и кофилин, а также β -катенина (Heuz M.L., 2008; Ni X. G., 2008; Le Devedec S.E., 2010; Yoo Y., 2010). Доказано, что процесс развития опухоли тесно связан с функционированием протеолитических систем (van Kasteren S.I., 2014). Все выше сказанное свидетельствует о том, что изучение роли белков CAP1, кофилина, β -катенина, их возможных регуляторов HspB5 и внутриклеточных протеолитических систем позволило бы расширить представления о молекулярных механизмах метастазирования рака легкого.

Также актуальным в настоящее время представляется изучение особенностей функционирования перечисленных белков в зависимости от проводимой терапии и исхода заболевания, что может послужить основой для разработки новых критериев, позволяющих прогнозировать течение рака легкого.

Степень разработанности темы исследования

Работы, связанные с изучением вовлеченности белков клеточной подвижности в опухолевую прогрессию, активно проводятся. Было показано участие CAP1 в патогенезе рака нескольких локализаций: при раке поджелудочной железы, молочной железы, плоскоклеточном раке пищевода, плоскоклеточной карциноме головы и шеи (Какурина Г.В., 2013, 2015; Li M., 2013; Liu X., 2014). Тем не менее, CAP1 является одним из малоизученных актин-связывающих белков при опухолевой прогрессии в общем и при НМРЛ, в частности. CAP1 может участвовать в деполимеризации актина совместно с кофилином (Zhou G.L., 2014). Кофилин играет ключевую роль в регуляции клеточного цикла и в патогенезе опухолей (Chen B., 2015; Zhang H.H., 2015). Большое влияние на процессы пролиферативной и

миграционной активности клеток оказывает β -катенин, участвуя в формировании межклеточных контактов и в клеточном сигналинге. Сигнальный путь, активирующийся β -катенином, оказывает стимулирующее влияние на рост и инвазию немелкоклеточного рака легкого, как и на опухоли других локализаций (Huang С. 2015). В настоящее время не достаточно изучена возможная регуляция данных белков при метастазировании рака легкого.

Внутриклеточную регуляцию белков осуществляет система контроля качества клеточного протеома. На клеточной культуре НМРЛ подтверждено участие 26S протеасомы в деградации белков апоптоза и клеточного цикла (Geng Y., 2017; Kakumu T., 2017). Показано, что кальпаины принимают участие в активации рецептора EGFR, важного участника патогенеза НМРЛ (Kim I.U., 2018). Относительно HspB5 существуют противоречивые данные о его значимости при НМРЛ (Cherneva R., 2010; Campbell-Lloyd A.J., 2013; Qin H., 2014). Вероятно, этот белок может иметь большое значение при комбинированном лечении НМРЛ, в частности, при термохимиолучевой терапии. Таким образом, система контроля качества клеточного протеома, а именно протеасомы, кальпаины и HspB5, могут служить важным фактором опухолевой прогрессии при НМРЛ.

Цель исследования: изучить белки клеточной подвижности, их регуляцию и определить прогностическую значимость при прогрессировании у больных немелкоклеточным раком легкого.

Задачи исследования:

1. Определить уровень мРНК и содержание актин-связывающих белков (CAP1 и кофилина), уровень фракций β -катенина, белка теплового шока HspB5, активность протеасом и кальпаинов, содержание общего пула протеасом, экспрессию мРНК кальпаина 1 и 2 в неизменной ткани легкого, в опухоли и в лимфогенных метастазах у больных раком легкого.

2. Оценить связь изучаемых показателей с основными клинико-морфологическими параметрами опухолевого процесса.

3. Изучить изменение экспрессии мРНК и содержания белков клеточной подвижности и характеристики компонентов системы контроля клеточного протеома при проводимой терапии.

4. Определить взаимосвязь между содержанием молекулярных показателей для оценки возможных механизмов регуляции белков клеточной подвижности в тканях первичной опухоли и метастазах в регионарных лимфоузлах.

5. Определить прогностическую значимость белков клеточной подвижности и регулирующих их систем в отношении исхода заболевания (2-х летней общей, безрецидивной и безметастатической выживаемости) у больных немелкоклеточным раком легкого.

Научная новизна

Впервые исследованы белки клеточной подвижности (CAP1, кофилин и фосфорилированная и общая формы β -катенина) и функционирование компонентов системы контроля качества клеточного протеома (протеасом, кальпаинов и HspB5) в тканях у больных НМРЛ и показано увеличение содержания белков клеточной подвижности, а также усиление протеасом- и кальпаин-зависимого протеолиза в опухоли по сравнению с неизменной тканью легкого. Впервые установлено повышение уровня CAP1 и снижение содержания кофилина при росте экспрессии их мРНК, а также увеличение фосфорилированной фракции β -катенина на фоне снижения его общей фракции и снижение активности кальпаинов в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов при увеличении критерия T. Впервые показано повышение уровня CAP1 и его мРНК в опухолевой ткани при лимфогенном метастазировании НМРЛ. Было выявлено нелинейное изменение уровня кофилина, его мРНК, фракций β -катенина и активности протеасом в зависимости от N.

Впервые изучаемые показатели оценены при проведении термохимиолучевой терапии (ТХЛТ) и показано, что в регионарных лимфоузлах это воздействие приводит к снижению уровня CAP1 на фоне повышения экспрессии его мРНК; повышению содержания общей фракции β -катенина при снижении содержания его фосфорилированной формы; а также повышению активности протеасом, кальпаинов и содержания HspB5.

Впервые в тканях НМРЛ выявлена связь между активностью внутриклеточных протеиназ и содержанием белков клеточной подвижности: показано возможное участие химотрипсинподобной активности протеасом в деградации β -катенина; каспазаподобной

активности протеасом – САР1 и кофилина; активности кальпаинов – кофилина.

Впервые показано, что высокая активность протеасом является неблагоприятным фактором в отношении общей выживаемости; высокий уровень САР1 – неблагоприятным фактором в отношении безметастатической выживаемости.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные имеют фундаментальную значимость для понимания молекулярных механизмов прогрессирования НМРЛ. Получены новые знания о вероятных механизмах регуляции содержания белков, ответственных за подвижность и адгезию, протеолитическими системами в тканях рака легкого.

Практическую значимость работы составляют результаты исследования, которые могут послужить дополнительными критериями прогноза течения НМРЛ. Полученные данные о повышении общей и безметастатической двухлетней выживаемости больных при низких активности протеасом и уровня САР1 свидетельствуют о возможности использования этих показателей в качестве новых кандидатных маркеров для оценки прогноза течения заболевания больных НМРЛ после операции.

Методология и методы исследования

В основе методологии диссертационной работы – современные теоретические и практические представления о прогрессировании злокачественных новообразований.

Диссертационное исследование выполнялось в несколько этапов с использованием диагностических, клинических, морфологических, молекулярно-генетических, аналитических и статистических методов. На первом этапе сравнили изменение экспрессии мРНК и содержания белков клеточной подвижности (САР1, кофилина и фракций β -катенина) и функционирования компонентов системы контроля качества клеточного протеома (протеасом, кальпаинов и HspB5) в опухолевой ткани по сравнению с неизменной, определили связь показателей с основными клиничко-морфологическими параметрами опухолевого процесса и при проводимой терапии. Целью второго этапа явилась оценка взаимосвязи между содержанием молекулярных показателей для оценки возможных механизмов регуляции белков клеточной

подвижности в тканях первичной опухоли и метастазах в регионарных лимфоузлах. На заключительном этапе исследования была определена прогностическая значимость белков клеточной подвижности и регулирующих их систем в отношении исхода заболевания (2-х летней общей, безрецидивной и безметастатической выживаемости), в результате чего были предложены дополнительные маркеры прогрессии НМРЛ.

Положения, выносимые на защиту

1. Содержание белков клеточной подвижности (CAP1, кофилина, фосфорилированной и общей форм β -катенина) и активность внутриклеточных протеолитических систем (протеасом и кальпаинов) увеличиваются в опухолевой ткани НМРЛ по сравнению с неизменной тканью и изменяются при лимфогенном метастазировании.

2. Существуют связи активности протеасом и уровня белков клеточной подвижности CAP1, кофилина и β -катенина; кальпаинов и уровня актин-связывающего белка кофилина в ткани первичной опухоли при НМРЛ.

3. Определение уровня CAP1 и активности протеасом в ткани первичной опухоли НМРЛ дает возможность прогнозировать развитие неблагоприятного исхода и безметастатическую выживаемость у больных НМРЛ в послеоперационном периоде.

Степень достоверности результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением работы на достаточном клиническом материале с использованием современных и высокотехнологичных молекулярно-биологических методов исследований. Полученные результаты статистически обработаны с помощью современных методов доказательной медицины.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации доложены и обсуждены на Всероссийских конференциях молодых ученых-онкологов «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (г. Томск, 2016-2017), Международной конференции «Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications» (г. Томск 2017), Объединенном научном форуме, Международной

научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (г. Москва, 2017), Международной научно-практической конференции «Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии» (г. Томск, 2017), Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (г. Томск, 2018), IV Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2018» (г. Санкт-Петербург, 2018)

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований: Грант № 17-304-50020 мол_нр «Функционирование протеасом и кальпаинов в опухолевой прогрессии немелкоклеточного рака легкого», Грант № 18-415-703003 р_мол_а «Роль актин-связывающих белков в формировании метастазов немелкоклеточного рака легкого». Получена стипендия Президента РФ молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2018) в рамках темы научного исследования: Разработка технологии прогнозирования злокачественных метастазов немелкоклеточного рака легкого.

Внедрение результатов исследования в практику

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя состоит в планировании и разработке дизайна исследования, формулировке цели и задач исследования, самостоятельном изучении и анализе литературы по теме исследования. Автором определен методологический подход, самостоятельно выполнен весь комплекс запланированных методов, проведена статистическая обработка данных, интерпретация результатов, подготовка их к публикации, оформление диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 120 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка условных сокращений и указателя литературы, включающего 195 литературных источников, из них 30 отечественных и 165 иностранных. Работа содержит 21 таблицу и иллюстрирована 23 рисунками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническая характеристика больных

Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан (Указ Президента РФ от 24.12.1993 №2288), получено разрешение этического комитета института. В исследование было включено 60 пациентов с НМРЛ ($T_{2-3}N_{0-2}M_0$) в возрасте от 44 до 77 лет (средний возраст $58,9 \pm 1,1$ лет). Все больные были разделены на две клинические группы: I группа: 40 больных НМРЛ, которым выполнялось радикальное хирургическое лечение. II группа: 20 больных НМРЛ, с предоперационной термохимиолучевой терапией (ТХЛТ) (рисунок 1).

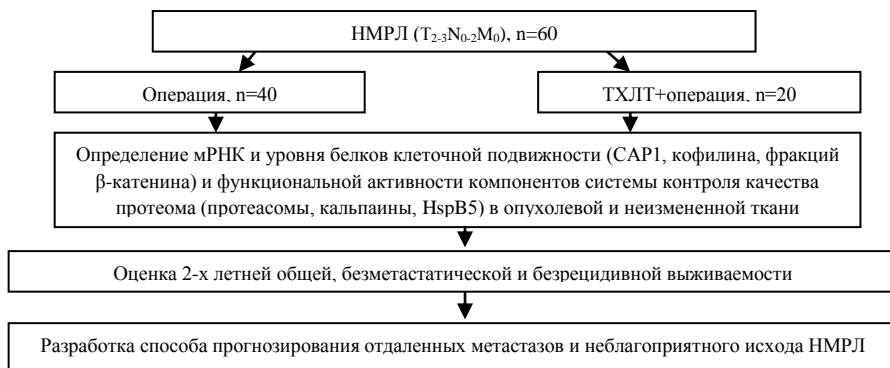


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Методика ТХЛТ. В рамках комбинированного лечения больным проводилось 2 курса предоперационной химиотерапии по схеме: паклитаксел 175 мг/м² в/в 1-й день, карбоплатин – расчет дозы по АУС 6 в/в 1-й день (интервал между курсами химиотерапии – 3

недели). Лучевая терапия проводилась в режиме классического фракционирования 2 Гр, 5 дней в неделю до СОД 40 Гр на фоне локальной гипертермии, которая проводилась на аппарате Celsius TSC в режиме: 2 сеанса в неделю, всего 8 сеансов, при температуре $\geq 42^{\circ}\text{C}$, время сеанса 40-60 минут.

Материалом для исследования служили образцы тканей первичных опухолей, лимфогенных метастазов и неизменной ткани легкого, взятой на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли, а также ткань неизменных лимфоузлов. Весь полученный материал имел гистологическую верификацию. Образцы тканей замораживали и хранили при -80°C .

Методы исследования

Для получения осветленных гомогенатов замороженные образцы ткани (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-НСl буфере (рН=7,5), содержащем 2 мМ АТФ для определения активности протеасом и не содержащем АТФ – для активности кальпаинов, 5 мМ хлорид магния, 1 мМ дитиотреитол, 1мМ ЭДТА и 100 мМ хлорид натрия. Гомогенат центрифугировали 60 минут при 10000g и 4°C . Надосадочную жидкость (осветленный гомогенат) использовали для дальнейших исследований.

Химотрипсиноподобную (ХПА) и каспазаподобную активность (КПА) протеасом определяли в осветленных гомогенатах опухолевой и неизменной ткани легкого по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-АМС и Cbz-LLG-АМС (Sigma, США), соответственно. Определение активности кальпаинов (АК) проводили в осветленных гомогенатах по гидролизу Suc-LLVY-АМС (Sigma, США). Для оценки активности примесных протеаз применяли специфический ингибитор протеасом – MG132 (Sigma, США) и ингибитор кальпаинов – MG101 (Sigma, США). Активность протеасом и кальпаинов выражали в единицах активности на 1мг белка (10^3 Ед/мг белка). Содержание белка определяли по методу Лоури.

Содержание субъединиц тотального пула протеасом ($\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$), кофилина и фракций β -катенина (общий β -катенин и фосфо(Ser45)- β -катенин) оценивали с помощью метода Вестерн-блоттинг с применением первичных моноклональных антител к искомым белкам в разведении 1:1000 и вторичных анти-мышинных,

анти-кроличьих антител (1:2000) (Cell Signaling Technology, США). За 100% был принят уровень изучаемых белков в неизменной ткани. Проводилась стандартизация значений на содержание β -актина (Cell Signaling Technology, США). Результаты выражали в процентах от содержания изучаемого белка в неизменной ткани.

РНК выделяли с использованием набора *diaGene* (Qiagen, США) согласно стандартному протоколу. Проверка качества РНК проводилась при помощи автоматического электрофореза на приборе 2200 TapeStation (Agilent Technologies Inc., США). Качество РНК оценивалось автоматически с помощью показателя RIN (от 4 до 6). Концентрация РНК составила 80-250 нг/мкл. Реакция обратной транскрипции проводилась при помощи специфичных праймеров к мРНК с использованием готовой реакционной смеси «РеалБест Мастер микс ОТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). Количественная ПЦР в режиме реального времени проводилась на амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). В качестве референсного гена использовался GAPDH. Расчет уровня экспрессии генов производили по методу Pfaffl, 2001 год.

Содержание белков CAP1 и HspB5 определяли с помощью иммуноферментного метода (Cusabio, США; MyBioSource, США соответственно). Оптическую плотность образцов и стандартов измеряли на микропланшетном ридере Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны, указанной в инструкции производителя. Расчет концентрации определяемых белков осуществляли с помощью программного обеспечения ScanIt.

Статистическая обработка результатов, проводилась с помощью программ IBM SPSS Statistics v.20.0. Статистически значимыми считались различия при уровне значимости $p < 0,05$. Проверка нормальности распределения исследуемых выборок проводилась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Различия между группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, Краскала-Уоллиса с поправкой Бонферони для независимых выборок. Для оценки взаимосвязи признаков использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена, методы линейной и логистической регрессии. Прогностическая значимость признаков в отношении выживаемости оценена с использованием обобщенного критерия Гехана-Вилкоксона. Кривые кумулятивной выживаемости

строились по методу Каплана-Майера. Проверка значимости показателей в отношении безметастатической и общей выживаемости осуществлялась с помощью ROC-анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе исследованы экспрессия мРНК и уровень активизирующих белков САР1, кофилина, содержание фракций β -катенина, показатели протеасомной, кальпаиновой систем, уровень HspB5 в опухолевой и неизменной ткани больных НМРЛ.

В опухолевой ткани НМРЛ наблюдалось увеличение уровня САР1 (таблица 1), кофилина и β -катенина (рисунок 2), а также повышение показателей протеолитических систем (таблица 1, рисунок 3) в сравнении с неизменной тканью легкого.

Таблица 1 – Содержание САР1, активность протеасом, кальпаинов и содержание HspB5 в опухолевой, неизменной и метастатической ткани у больных немелкоклеточным раком легкого

Показатель	Неизменная ткань	Первичная опухоль	Лимфогенные метастазы	p
	n=40	n=40	n=31	
САР1 (пг/мл)	671,0 (587,0; 711,0)	834,0 (714,0; 859,0)	775,0 (725,0; 844,0)	$p_{12}=0,007$; $p_{13}=0,034$; $p_{23}=0,601$
ХПА (10^3 Ед/мг белка)	11,5 (5,9; 19,5)	41,4 (24,7; 78,8)	36,6 (21,8; 56,3)	$p_{12}<0,001$; $p_{13}<0,001$; $p_{23}=0,114$
КПА (10^3 Ед/мг белка)	14,2 (10,2; 19,8)	31,4 (16,8; 63,5)	27,4 (11,6; 44,8)	$p_{12}=0,038$; $p_{13}=0,009$; $p_{23}=0,225$
АК (10^3 Ед/мг белка)	36,4 (17,0; 57,2)	87,7 (467,0; 178,4)	67,01 (32,81; 161,11)	$p_{12}=0,047$; $p_{13}=0,010$; $p_{23}=0,445$
HspB5 (пг/мл)	400,0 (344,0; 444,0)	365,0 (294,0; 403,0)	343,0 (297,0; 382,0)	$p_{12}=0,294$; $p_{13}=0,153$; $p_{23}=0,750$

Примечание – (здесь и далее) ХПА – химотрипсинподобная активность протеасом, КПА – каспазаподобная активность протеасом, АК – активность кальпаинов.

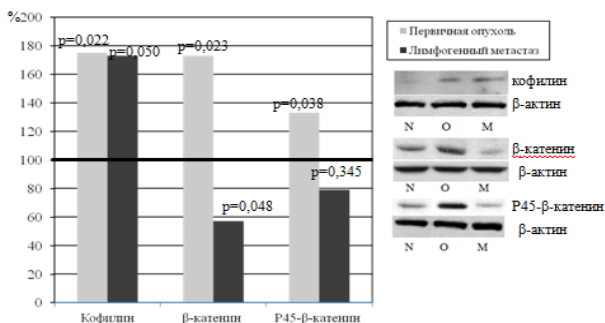


Рисунок 2 – Содержание кофилина и фракций β -катенина в ткани первичной опухоли и ткани лимфогенных метастазов

Примечание – (здесь и далее) за 100% принят уровень белка в неизменной ткани; N – неизменная ткань легкого, O – ткань первичной опухоли, M – ткань лимфогенных метастазов.

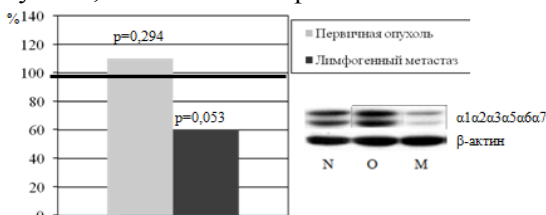


Рисунок 3 – Содержание субъединиц $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ протеасом в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов

Увеличение содержания белков клеточной подвижности в опухоли по сравнению с неизменной тканью может свидетельствовать не только об инвазии опухолевых клеток, но и об активном делении и процессах выживания. При этом в опухоли наблюдалось повышение активности протеасом и кальпаинов. Вероятно, это происходит вследствие возрастающей интенсивности внутриклеточных процессов.

На следующем этапе работы было оценено изменение изучаемых показателей от TNM стадии. Отмечалось повышение уровня CAP1 и его мРНК в 1,1-4,4 раза в ткани первичной опухоли с увеличением ее размера с $T_2N_{0-2}M_0$ до $T_3N_{0-2}M_0$. Уровень мРНК кофилина также увеличивался в 3,3 раза с ростом опухоли, но уровень белка в той же ткани на стадии $T_3N_{0-2}M_0$ резко снижается в 3 раза по сравнению со стадией $T_2N_{0-2}M_0$ (таблица 2). Вполне возможно, что в опухолевой клетке активны механизмы

посттрансляционной модификации кофилина. Ниже при выяснении связей между изучаемыми белками было показано, что кофилин может подвергаться деградации и модуляции ХПА протеасом и АК (рисунок 4). С увеличением Т и в ткани первичной опухоли наблюдалось снижение содержания общего β -катенина при двукратном увеличении его фосфорилированной фракции. При увеличении Т было отмечено снижение активности кальпаинов в 2,4 раза и экспрессии мРНК кальпаинов в 3,0 и 4,1 раза, соответственно (таблица 2).

Таблица 2 – Содержание CAP1, кофилина, экспрессия их мРНК, фракций β -катенина, активность и экспрессия мРНК кальпаинов в ткани первичной опухоли в зависимости от Т

Показатель	$T_2N_{0.2}M_0$	$T_3N_{0.2}M_0$	p
	n=23	n=17	
CAP1 (пг/мл)	522,5 (266,5; 846,0)	428,0 (266,5; 723,0)	0,182
CAP1	1,1 (0,3; 2,3)	4,6 (2,6; 9,9)	0,005
Кофилин (% к неизменной ткани)	187,0 (150,0; 199,0)	70,0 (56,00; 101,00)	0,033
CFL	1,6 (0,3; 3,4)	5,2 (4,4; 5,8)	<0,001
β -катенин (% к неизменной ткани)	117,0 (88,0; 143,0)	61,0 (58,0; 70,0)	0,016
P45- β -катенин (% к неизменной ткани)	65,0 (36,0; 88,0)	140,0 (118,0; 200,0)	0,041
АК (10^3 Ед/мг белка)	113,3 (69,7; 194,6)	47,0 (36,06; 87,70)	0,022
CAPN1	24,6 (21,1; 27,1)	8,2 (8,2; 12,0)	<0,001
CAPN2	28,8 (20,7; 31,9)	7,0 (4,4; 7,7)	<0,001

При метастазировании в регионарные лимфоузлы наблюдались нелинейные изменения изучаемых показателей в ткани первичной опухоли (таблица 3). При $T_{2.3}N_1M_0$ наблюдалось повышение уровня экспрессии мРНК и содержания CAP1 и кофилина, а также содержания β -катенина по сравнению с первичными опухолями $T_{2.3}N_0M_0$; а затем, при $T_{2.3}N_2M_0$ содержание кофилина и фракций β -катенина снижались. Протеасомная же система клетки демонстрировала обратные изменения: при $T_{2.3}N_1M_0$ снижались

ХПА и КПА протеасом, а при $T_{2-3}N_2M_0$ активности резко возрастали, при снижении содержания их тотального пула.

Таблица 3 – Содержание САР1, кофилина, экспрессия их мРНК, фракций β -катенина, активность и содержание протеасом в ткани первичной опухоли в зависимости от N

Показатель	$T_{2-3}N_0M_0$	$T_{2-3}N_1M_0$	$T_{2-3}N_2M_0$	p
	n=9	n=22	n=9	
САР1 (пг/мл)	299,0 (240,5; 330,0)	756,0 (567,0; 858,0)	504,0 (332,0; 532,0)	$p_{12}=0,007$; $p_{13}=0,014$; $p_{23}=0,915$
САР1	1,7 (1,4; 2,0)	3,4 (2,7; 3,9)	1,6 (0,7; 1,9)	$p_{12}=0,021$; $p_{13}=0,842$; $p_{23}=0,014$
Кофилин (% к неизменной ткани)	71,0 (24,0; 98,0)	108,0 (103,0; 203,0)	19,0 (18,0; 38,0)	$p_{12}=0,020$; $p_{13}=0,180$; $p_{23}=0,027$
CFL	2,0 (1,0; 2,1)	5,4 (4,3; 6,0)	0,4 (0,1; 0,6)	$p_{12}=0,050$; $p_{13}=0,055$; $p_{23}<0,001$
β -катенин (% к неизменной ткани)	32,0 (21,0; 39,0)	117,0 (102,0; 140,0)	48,0 (40,0; 63,0)	$p_{12}=0,016$; $p_{13}=0,322$; $p_{23}=0,025$
P45- β -катенин (% к неизменной ткани)	43,0 (27,0; 55,0)	133,0 (108,0; 183,0)	51,0 (27,0; 69,0)	$p_{12}=0,013$; $p_{13}=0,745$; $p_{23}=0,002$
ХПА (10^3 Ед/мг белка)	50,2 (44,4; 55,5)	26,5 (9,9; 32,2)	41,4 (32,5; 100,0)	$p_{12}=0,045$; $p_{13}=0,154$; $p_{23}=0,034$
КПА (10^3 Ед/мг белка)	50,5 (47,7; 54,8)	23,4 (18,1; 40,8)	57,5 (47,8; 63,0)	$p_{12}=0,027$; $p_{13}=0,729$; $p_{23}=0,012$
$\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ (% к неизменной ткани)	100,0 (87,0; 172,0)	108,0 (90,0; 148,0)	26,0 (11,0; 43,0)	$p_{12}=0,695$; $p_{13}=0,074$; $p_{23}=0,014$

Изменение количества белков возможно за счет их деградации протеолитическими системами в опухолевых клетках, что и было показано нами далее (рисунок 4). Методами корреляционного анализа и линейной регрессии было показано, что ХПА протеасом может участвовать в деградации САР1 и кофилина, КПА протеасом – может регулировать содержание β -катенина в клетке, а АК – оказывает влияние на содержание кофилина.

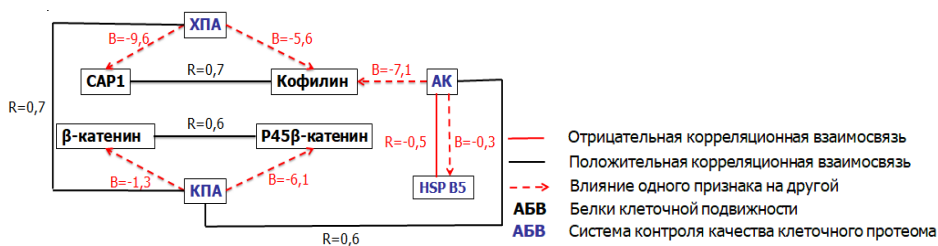


Рисунок 4 – Корреляционные и регрессионные связи компонентов системы контроля качества клеточного протеома и белков клеточной подвижности в ткани первичной опухоли

Примечание – R – коэффициент корреляции Спирмена, B – коэффициент в уравнении линейной регрессии.

На следующем этапе работы проведено изучение влияния ТХЛТ на исследуемые показатели. Все значимые изменения происходили в лимфатических узлах, в то время как в ткани первичной опухоли оставались без изменений (таблица 4). Повышалась содержание общей фракции β -катенина при снижении уровня его фосфорилированной формы в лимфогенных метастазах при проведении ТХЛТ, что говорит о стабилизации межклеточных контактов и торможении Wnt/ β -катенин-сигнального пути в опухолевом клоне. Наблюдалось снижение уровня CAP1 на фоне повышения количества его мРНК при ТХЛТ в лимфогенных метастазах, при этом возрастала активность протеасом и кальпаинов. Видимо, в клетках возникает необходимость утилизации разрушенных химиотерапией белков, в связи с чем, активизируются протеолитические системы клетки. HspB5 значимо изменялся только в ответ на ТХЛТ. Как истинный белок теплового шока в ответ на повреждающий фактор он увеличивается в концентрации и функционирует как шаперон.

Эффективность ТХЛТ оценивалась по результатам инструментального исследования по шкале RECIST. Под объективным ответом подразумевалась полная (1 случай, 5%) и частичная (17 случаев, 85%) регрессия опухоли, под отсутствием объективного ответа – стабилизация (2 случая, 10%) и прогрессирование (0 случаев, 0%). Из-за отсутствия адекватной группы сравнения между пациентами с объективным ответом (18 человек) и с его отсутствием (2 человека), анализ влияния изучаемых показателей на эффективность ТХЛТ не исследовали.

Таблица 4 – Содержание и экспрессия мРНК *CAP1*, содержание фракций β -катенина, активность протеасом и кальпаинов в ткани лимфогенных метастазов в зависимости от проводимой терапии

Показатель	ТХЛТ-	ТХЛТ+	p
	n=40	n=20	
<i>CAP1</i> (пг/мл)	652,0 (501,0; 801,0)	480,0 (308,5; 509,0)	0,054
<i>CAP1</i>	0,3 (0,1; 1,4)	6,6 (3,3; 9,8)	0,021
β -катенин (% к неизменной ткани)	68,0 (29,0; 119,0)	146,0 (117,0; 203,0)	0,035
P45- β -катенин (% к неизменной ткани)	121,0 (82,0; 152,0)	72,0 (52,0; 82,0)	0,047
ХПА (10 ³ Ед/мг белка)	39,6 (18,3; 63,2)	104,4 (99,2; 319,2)	0,002
КПА (10 ³ Ед/мг белка)	32,6 (12,7; 57,1)	101,6 (87,6; 208,8)	0,009
АК (10 ³ Ед/мг белка)	89,6 (33,1; 108,8)	279,8 (144,3; 349,5)	0,045
HspB5 (пг/мл)	247,0 (197,0; 288,0)	377,0 (255,0; 391,0)	0,034

Исследуемые белки проанализированы в отношении исходов 2-летней общей, безрецидивной и безметастатической выживаемости. Уровень *CAP1* в ткани первичной опухоли может быть предложен как дополнительный маркер безметастатической выживаемости при гематогенном метастазировании (чувствительность 80%, специфичность 96%) (рисунок 5), а ХПА и КПА протеасом – как дополнительные маркеры неблагоприятного исхода у больных НМРЛ (чувствительность 80% и 83%, специфичность 90% и 88% соответственно) (рисунок 6).

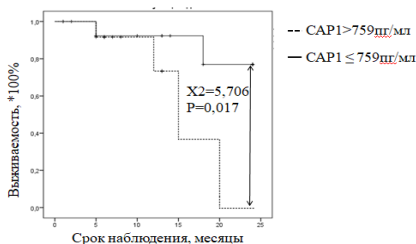


Рисунок 5 – Показатели 2-летней безметастатической выживаемости в зависимости от уровня *CAP1* в тканях первичной опухоли

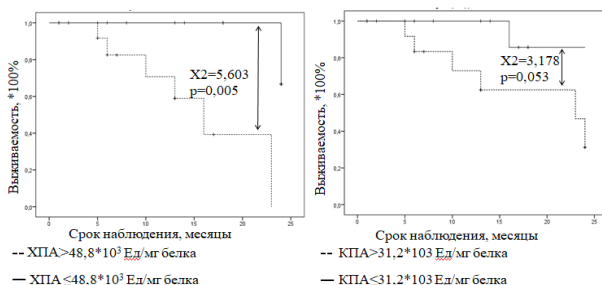


Рисунок 6 – Показатели 2-летней общей выживаемости в зависимости от активности протеасом в тканях первичной опухоли

По итогам проведенного исследования разработана схема, отражающая патогенетическую роль изученных показателей в прогрессировании НМРЛ (рисунок 7).

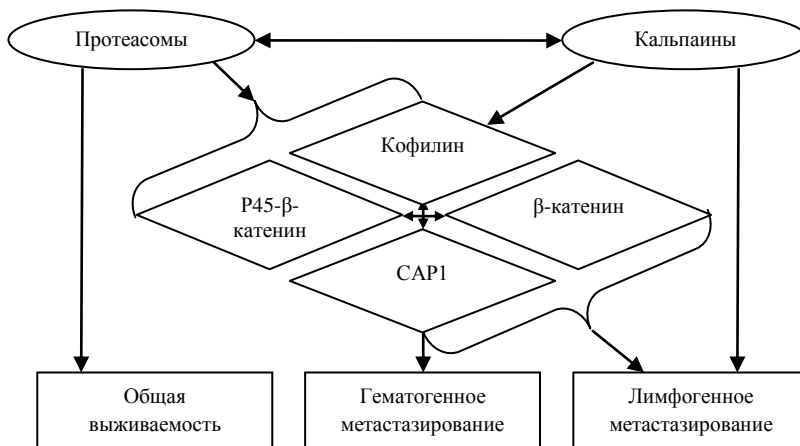


Рисунок 7 – Вклад белков клеточной подвижности и компонентов системы контроля качества клеточного протеома в прогрессирование НМРЛ.

Исходя из совокупности эмпирических знаний и полученных в работе данных, можно утверждать, что белки клеточной подвижности и система контроля качества клеточного протеома играют важную роль в патогенезе НМРЛ, обуславливая его прогрессирование. САР1, кофилин и β-катенин способствуют метастазированию опухолей. Участие протеолитических систем в

прогрессировании заболевания связано с регуляцией ими различных белков, в том числе и белков, ассоциированных с клеточной подвижностью. Кроме того, САР1 и активность протеасом оказывает влияние на характер течения и прогноз заболевания, что позволило выделить дополнительные информативные критерии прогноза общей и безметастатической выживаемости у больных НМРЛ.

Выводы

1. В опухолевой ткани НМРЛ выявлено увеличение содержания САР1 в 1,2 раза, кофилина в 1,7 раз, фракций β -катенина в 1,3-1,8 раз, а также активностей протеасом и кальпаинов в 2,2-3,6 раз по сравнению с неизменной тканью легкого ($p < 0,05$).

2. У больных НМРЛ с $T_3N_{0-2}M_0$ отмечается повышение в 1,6 раз содержания САР1 и снижение в 3 раза содержания кофилина при увеличении экспрессии их мРНК в 4,4 и 3,3 раза соответственно в ткани первичной опухоли; повышение в 1,8 раз фосфорилированной фракции β -катенина на фоне снижения в 2,2 раза его общей фракции и снижение активности кальпаинов в 2,5-5,0 раз относительно показателей больных с $T_2N_{0-2}M_0$ ($p < 0,05$).

3. Выявлено повышение уровня САР1 и его мРНК; нелинейное изменение содержания кофилина, экспрессии его мРНК, содержания фракций β -катенина и активности протеасом в опухолевой ткани НМРЛ при поражении регионарных лимфоузлов с уровня $T_{2-3}N_0M_0$ до $T_{2-3}N_2M_0$.

4. Показано, что белки клеточной подвижности и внутриклеточные протеазы подвержены воздействию ТХЛТ в регионарных метастазах: выявлено снижение в 1,4 раза содержания САР1 и в 1,7 раз содержания общей фракции β -катенина на фоне повышения в 2,2 раза содержания его фосфорилированной фракции; протеасомы и кальпаины отвечают повышением своей активности в 2,6-3,1 раз, а малый белок теплового шока HspB5 – увеличением своего количества в 1,5 раза ($p < 0,05$).

5. Обнаружены связи между увеличением химотрипсинподобной активности протеасом и снижением содержания β -катенина; увеличением каспазаподобной активности протеасом и снижением содержания САР1 и кофилина; увеличением активности кальпаинов и снижением содержания кофилина в ткани первичной опухоли.

6. Высокие химотрипсинподобная (более $48,8 \cdot 10^3$ Ед/мг белка) и каспазаподобная (более $31,2 \cdot 10^3$ Ед/мг белка) активности протеасом являются неблагоприятным фактором в отношении общей выживаемости; высокий уровень САР1 (более 759,0 пг/мл) является неблагоприятным фактором в отношении отдаленного метастазирования. Данные показатели могут быть использованы в качестве дополнительных критериев оценки прогноза течения немелкоклеточного рака легкого.

Практические рекомендации

По результатам проведенного исследования у больных НМРЛ целесообразно учитывать уровень САР1 и ХПА и КПА протеасом в ткани опухоли как дополнительные маркеры течения заболевания:

1. При формировании группы повышенного риска развития гематогенных метастазов у больных НМРЛ после операции необходимо учитывать уровень САР1 в ткани опухоли. Значение белка САР1 выше 759 пг/мл нужно считать неблагоприятным фактором в отношении отдаленного метастазирования.

2. При формировании группы повышенного риска неблагоприятного исхода у больных НМРЛ после операции необходимо учитывать ХПА и КПА протеасом в ткани опухоли. Значение ХПА выше $48,8 \cdot 10^3$ Ед/мг белка и КПА выше $31,2 \cdot 10^3$ Ед/мг белка – считать неблагоприятным фактором в отношении развития неблагоприятного исхода.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Шашова, Е.Е. Внутриклеточный и циркулирующий пулы протеасом: значение при злокачественных новообразованиях различных локализаций [текст] / Е.Е. Шашова, Е.С. Колегова, И.В. Кондакова и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – № 6. – С. 76-82

2. Колегова, Е.С. Малые белки теплового шока и убиквитин-протеасомная система при злокачественных опухолях [текст] / Е.С. Колегова, И.В. Кондакова, А.А. Завьялов // Вопросы онкологии. – 2016. – № 3. – С. 401-405.

3. Шашова, Е.Е. Изменение активности протеасом и кальпаинов при метастазировании рака легкого и рака молочной железы человека [текст] / Шашова Е.Е., Колегова Е.С., Завьялов А.А. и др. // Бюллетень экспериментальной

биологии и медицины. – 2017. – Т. 163, № 4. – С. 486-489. DOI: 10.1007/s10517-017-3834-7

4. Какурина, Г.В. Аденилатциклаза-ассоциированный протеин 1: структура, регуляция и участие в клеточных процессах [текст] / Г.В. Какурина, Е.С. Колегова, И.В. Кондакова // Биохимия. – 2018. – Т. 83, № 1. – С. 127-136. DOI: 10.1134/S0006297918010066

5. Колегова, Е.С. Функционирование протеасом при лимфогенном метастазировании немелкоклеточного рака легкого [текст] / Е.С. Колегова, И.В. Кондакова, А.А. Завьялов и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 165, № 4. – С. 481-484.

6. Колегова, Е.С. Аденилилциклаза ассоциированный протеин 1 в тканях плоскоклеточной карциномы головы и шеи и аденокарциномы легкого [текст] / Е.С. Колегова, Г.В. Какурина, И.В. Кондакова и др. // Сборник тезисов 1-го Российского онкологического научно-образовательного форума с международным участием «Белые Ночи – 2015». – Санкт-Петербург, 2015. – С. 455-456.

7. Колегова, Е.С. Активность протеасом и кальпаинов при немелкоклеточном раке легкого [текст] / Е.С. Колегова // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии: сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева. (Томск, 13 мая, 2016 года) / под ред. Е.Л. Чойнзонова, Э.В. Галажинского, Н.В. Чердынцевой. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2016. – С. 85-87.

8. Kakurina G.V. Adenylyl cyclase-associated protein 1 in metastasis of squamous cell carcinoma of the head and neck and non-small cell lung cancer [текст] / G.V. Kakurina, E.S. Kolegova, O.V. Cheremisina [et al.] // Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications (PC'16): proceedings of the international conference on physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications 2016. / Ed. Elazar Y. Gutmanas, Oleg B. Naimark, Yurii P. Sharkeev // AIP Conference Proceedings, 2016. – 1760:020023 (2016).

9. Кондакова И.В. Внутриклеточные протеолитические системы: новый класс маркеров для ранней диагностики и прогноза течения злокачественных опухолей [текст] / И.В. Кондакова, Е.Е. Шашова, Л.В. Спирина и др. // Злокачественные опухоли. – 2017. –

Т. 7, № 3, спецвыпуск 1. – С. 47-51. DOI: 10.18027/2224-5057-2017-7-3s1-47-51

10. Колегова, Е.С. Аденилилциклаза-ассоциированный протеин 1 у больных немелкоклеточным раком легкого [текст] / Е.С. Колегова, Д.Н. Костромицкий // Сборник материалов XII Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической онкологии», 27–28 апреля 2017 г., г. Томск / под ред. Е.Л. Чойнзонова, Э.В. Галажинского, Н.В. Чердынцевой. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2017. – С.65-66.

11. Колегова, Е.С. Аденилатциклаза-ассоциированный протеин 1 в прогрессии плоскоклеточной карциномы головы и шеи и немелкоклеточного рака легкого [текст] / Е.С. Колегова, Г.В. Какурина, И.В. Кондакова и др. // Научные труды: Объединенный научный форум. Международная научная конференция по биоорганической химии «XII Чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова». VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды». Под ред.: В.Т. Иванова, А.Г. Габиева. – Москва, 2017. – С. 69.

12. Колегова, Е.С. Внутриклеточные протеолитические системы как маркеры прогрессии немелкоклеточного рака легкого [текст] / Е.С. Колегова, И.В. Кондакова, А.А. Завьялов и др. // Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию ЦНИЛ СибГМУ (1-3 ноября 2017 г., Томск, Россия) / под ред. А.Г. Першиной. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2017. – с. 18.

13. Колегова, Е.С. Аденилатциклаза-ассоциированный протеин 1 и кофилин в тканях немелкоклеточного рака легкого [текст] / Е.С. Колегова, Д.Н. Костромицкий, А.Ю. Добродеев и др. // Тезисы. Форум «белые ночи». – Санкт-Петербург: Изд-во АННМО, 2018. – С. 63

14. Kakurina G. The relationship of the genes expression of actin-binding proteins with metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck and non-small cell lung cancer [текст] / G. Kakurina, E. Kolegova, I. Kondakova [et al.] // Systems Biology and Biomedicine (SBioMed-2018) : Symposium (21–22 Aug. 2018, Novosibirsk, Russia); Abstracts / Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; Research Institute of Clinical and

Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2018.– p. 55

15. Kakurina G.V. mRNA expression of cellular movement proteins and calpains 1 and 2 in metastasis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer [текст] / G.V. Kakurina, E.S. Kolegova, I.V. Kondakova [et al.] // The 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research: Proceedings of the International Symposium. Tomsk, 17–19 Sep. 2018 / Ed. E. L. Choynzonov, E. V. Galazhinskiy, N. V. Cherdyntseva, J.G. Kzhyshkowska; Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, National Research Tomsk State University. – Tomsk: Publishing house of Tomsk University, 2018. – p. 39-40.

16. Колегова, Е.С. Роль белков клеточной адгезии и подвижности в прогрессировании немелкоклеточного рака легкого [текст] / Е.С. Колегова, Д.Н. Костромицкий // Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: сборник материалов конгресса молодых ученых, 24–25 мая 2018 г. / под ред. Е.Л. Чойнзонова, Э.В. Галажинского, С.В. Попова, Н.А. Бохана, В.А. Степанова, В.В. Жданова; Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томский государственный университет. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2018. – С. 252-255.

Список используемых сокращений

АК – активность кальпаинов

КПА – каспазаподобная активность

мРНК – матричная РНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

ХПА – химотрипсинподобная активность

ТХЛТ – термохимиолучевая терапия

САР1 – аденилатциклаза-ассоциированный протеин 1 (adenylyl cyclase-associated protein 1)

HspB5 – белок теплового шока B5 (heat shock protein B5)

Типография

Научное издание

Фамилия Имя Отчество

Название темы диссертации

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата(доктора) медицинских наук

*Подписано в печать 27.03.2014. Формат 60×90/16.
Усл. печ. л. 1,37. Уч.-изд. л. 1,0.
Тираж 100 экз. Заказ № 33.*

Название типографии
Контакты типографии:
Адрес
Телефон
Ел почта
Сайт (при наличии)