

УДК 616-006.66

## ЭКСПРЕССИЯ РНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА MUSASHI-2 КАК НЕГАТИВНЫЙ ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКОМ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Харин Л.В., Карнаухов Н.С., Бумбер Я.А., Волошин М.В., Кожушко М.А., Колесников Е.Н., Франциянц Е.М., Кит О.И.

*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России», Ростов-на-Дону, e-mail: kharinleonid@gmail.com*

РНК-связывающий белок Musashi-2 (MSI-2) играет важную роль в процессе развития нервной и гемопоэтической ткани, связан с экспрессией в стволовом пуле клеток. Регуляторная роль MSI-2 в канцерогенезе и прогрессии была показана в нескольких солидных и лимфопролиферативных опухолях. С целью изучения роли MSI-2 в развитии и метастазировании колоректального рака (КРР) было проведено исследование ИГХ-экспрессии MSI-2 в ткани нормального эпителия толстой кишки, первичной опухоли и метастатического очага у 25 пациентов с синхронным метастатическим КРР. Все пациенты перенесли резекцию первичной опухоли и метастатического очага. В ходе оценки экспрессии использовался полуколичественный метода h-score, где результат ранжируется от 0 до 300. Была показана достоверная разница ( $p < 0.00001$ ) экспрессии MSI-2 в ткани пациентов, 65 [55;70] в ткани толстой кишки; 160 [147;180] первичной опухоли и 280 [250;290] в метастатическом очаге. Уровень экспрессии в тканях был аппроксимирован на высокий и низкий, было показано, что высокая экспрессия MSI-2 как в первичной опухоли ( $p = 0.013$ ), так и в метастатическом очаге достоверно снижала продолжительность беспрогрессивной выживаемости (БПВ) ( $p = 0.005$ ). Достоверное снижение общей выживаемости (ОВ) было выявлено при высоком уровне MSI-2 в ткани метастатического очага ( $p < 0.0001$ ). Данное исследование позволяет судить об ИГХ-экспрессии MSI-2, как о негативном прогностическом факторе при метастатическом КРР. Для детального понимания роли MSI-2 в развитии и метастазировании КРР необходимы дальнейшие фундаментальные и клинические исследования.

Ключевые слова: колоректальный рак, метастазы, РНК-связывающие белки, Мусаши-2.

## EXPRESSION OF RNA-BINDING PROTEIN MUSASHI-2, AS A NEGATIVE PROGNOSTIC MARKER IN METASTATIC COLORECTAL CANCER

Kharin L.V., Karnaukhov N.S., Boumber Y.A., Voloshin M.V., Kozhushko M.A., Kolesnikov E.N., Frantsiyants E.M., Kit O.I.

*FGBU «Rostov Research Institute of Oncology», Rostov-on-Don, e-mail: kharinleonid@gmail.com*

RNA - binding protein Musashi-2 (MSI-2) plays an important role in the development of nervous and hemopoietic tissue, and is associated with expression in the stem cell pool. The regulatory role of MSI-2 in carcinogenesis and progression has been shown in several solid and lymphoproliferative tumors. In order to explore the role of MSI-2 in progression and metastasis of colorectal cancer (CRC), a study of IHC - MSI-2 expression in the normal colon epithelium, primary tumor and metastatic lesion were performed in 25 patients with synchronous metastatic CRC. All patients underwent resection of the primary tumor and metastatic lesion. During the evaluation of expression, the semi-quantitative method h-score was used, where the result ranges from 0 to 300. A significant difference ( $p < 0.00001$ ) of MSI-2 expression in the tissue of patients, 65 [55; 70] in the colon tissue was shown; 160 [147; 180] primary tumors and 280 [250; 290] in the metastatic lesion. The expression level in the tissues was approximated to high and low; it was shown that high expression of MSI-2 in both the primary tumor ( $p = 0.013$ ) and in the metastatic focus significantly reduced the duration of progressive-free survival (PFS) ( $p = 0.005$ ). A significant decrease in overall survival (OS) was detected with a high level of MSI-2 in the tissue of the metastatic focus ( $p < 0.0001$ ). This study makes it possible to judge MSI-2 IHC expression as a negative prognostic factor in metastatic CRC. For a detailed understanding of the role of MSI-2 in the development and metastasis of CRC, further fundamental and clinical research is needed.

Keywords: Colorectal cancer, metastasis, RNA-binding proteins, Musashi-2.

Колоректальный рак занимает лидирующие позиции по заболеваемости у мужчин и женщин во всём мире, ассоциирован с высоким риском отдалённого метастазирования, плохим прогнозом и является третьим по причине смерти от онкологических заболеваний [1]. Несмотря на увеличение числа пациентов с ранним выявлением опухоли и появление новых лекарственных препаратов – количество пациентов с распространёнными формами заболевания остаётся стабильно высоким [2]. В настоящее время отсутствует описанный механизм прогрессии, метастазирования и развития резистентности при колоректальном раке. Таким образом, поиск предиктивных маркеров прогрессии и рецидивирования колоректального рака является одной из приоритетных задач исследований в онкологии [2-4].

Семейство РНК-связывающих белков Musashi (MSI) выступает в роли посттрансляционных репрессоров таргетной мРНК и включает в себя два гомолога, MSI-1 и MSI-2 [4]. Ген MSI-2 у человека располагается в 17q22 и кодирует соответствующий РНК-связывающий белок, представленный в пуле стволовых клеток нервной, гемопоэтической и эпителиальной ткани [5]. В процессе эмбриогенеза MSI-2 участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки нервной и гемопоэтической систем [6]. Впервые сверхэкспрессия MSI-2 в злокачественном процессе была показана на мышинной модели хронического миелоидного лейкоза в 2010 году [7]. Повышенная экспрессия MSI-2 вызывала резистентность к паклитакселу *in vitro* в клетках рака яичника [8]. Позже было показано влияние MSI-2 на агрессивное течение рака молочной железы [4], трансформацию интраэпителиальной панкреатической неоплазии (PanIN) в протоковую аденокарциному поджелудочной железы [9].

Цель исследования: изучение роли РНК-связывающего белка MSI-2 в развитии и метастазировании КРР.

### **Материалы и методы исследования**

#### *Пациенты и гистологический материал*

Гистологический материал был получен от 25 пациентов с гистологически верифицированным КРР, имеющих синхронные резектабельные метастазы в печень и перенесших резекцию первичной опухоли и резекцию метастатического очага в клинике Ростовского научно-исследовательского онкологического института с 2013 по 2017 год. Средний возраст пациентов составил 52,2 года (33-71 год), в гендерном соотношении преобладали мужчины – 14 пациентов (56%), распространенность опухоли - Т чаще была представлена только IV и III, 13 (52%) и 12 (48%) пациентов соответственно, поражение лимфатических узлов представлено N<sub>1</sub> у 10 (40%) и N<sub>2</sub> у 15 (60%). Степень дифференцировки

опухоли в 11 (44%) случаях была низкой и в 14 (56%) умеренной. Локализация первичной опухоли была преимущественно левосторонняя – 16 (64%) пациентов, против правосторонней – у 9 (36%) пациентов. Никто из данных пациентов не получал предоперационную лекарственную или лучевую терапию. Общая и безрецидивная выживаемость определялась у пациентов с момента выполнения оперативного вмешательства.

#### *Тканевые матрицы и ИГХ-окрашивание*

Ткани нормального эпителия толстой кишки, первичной опухоли и метастатического очага были зафиксированы формальдегидом и погружены в парафин, затем при помощи тканевого 3 мм интродьюсера (Ted Pella, США) в предварительно изготовленную 36-луночную «донорскую» парафиновую форму с лунками диаметром 3 мм были введены столбики ткани из парафиновых блоков - «реципиентов». Далее «донорский» блок с образцами тканей нарезали и фиксировали на предметном стекле. ИГХ-окрашивание выполняли с использованием антитела к MSI-2 (ab50829, Abcam, США), в соответствии с инструкцией производителя.

#### *Оценка ИГХ-окрашивания*

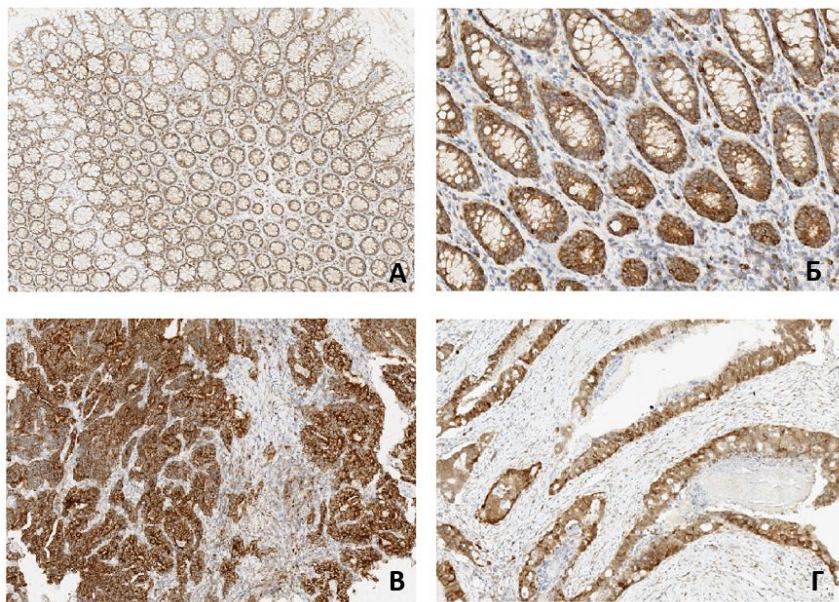
Окрашенные препараты сканировались на рабочей станции Leica Aperio. Оценку ИГХ-экспрессии MSI-2 проводили два патолога с использованием полуколичественного метода H-score, при котором уровень экспрессии определяется по формуле:  $[1 \times (\% \text{ клеток } 1+) + 2 \times (\% \text{ клеток } 2+) + 3 \times (\% \text{ клеток } 3+)]$  и варьируется от 0 до 300 баллов [10].

#### *Статистический анализ*

Полученные данные оценивали с использованием статистического программного обеспечения SPSS (Version 20, IBM Inc., США). Корреляция клинико-патологических факторов и экспрессии MSI-2 оценивали методом хи-квадрат или тестом Фишера. Кривые выживаемости были построены с использованием метода Каплана-Мейера для оценки БПВ и ОВ. Log-rank тест использовался для оценки различия выживаемости.

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

Наиболее выраженная экспрессия MSI-2 была обнаружена в опухолевых клетках первичной опухоли и метастатических очагов, где была представлена как цитоплазматически, так и ядерно, и фактически отсутствовала в клетках микроокружения опухоли (рисунок 1).



*Рис. 1. ИГХ-окрашивание с антителом к MSI-2:*

*А. Слизистая оболочка толстой кишки. Ув. 200,*

*Б. Слизистая оболочка толстой кишки. Ув. 300,*

*В. Метастатический очаг в печени. Ув. 200,*

*Г. Аденокарцинома сигмовидной кишки. Ув. 300*

После выполнения оценки экспрессии MSI-2 в ткани нормального кишечного эпителия, первичной опухоли и метастатического очага в печени у каждого из 25 пациентов полученные результаты позволили выявить статистически значимые различия (таблица 1). Статистика критерия Краскела-Уоллиса – 65,982. Наибольшая разница экспрессии MSI-2 была выявлена в ткани нормальной кишки и метастатического очага и составила 65 и 280 баллов соответственно. Установлены нижние и верхние границы значений (квартили). Для дальнейшей статистической обработки количественные показатели экспрессии Musashi 2 в нормальной ткани, первичной опухоли и метастазе были аппроксимированы в качественные путем разделения уровня экспрессии на высокий (High) и низкий (Low) по медиане 65, 160 и 280 ( $p < 0,00001$ ) соответственно (рисунок 2).

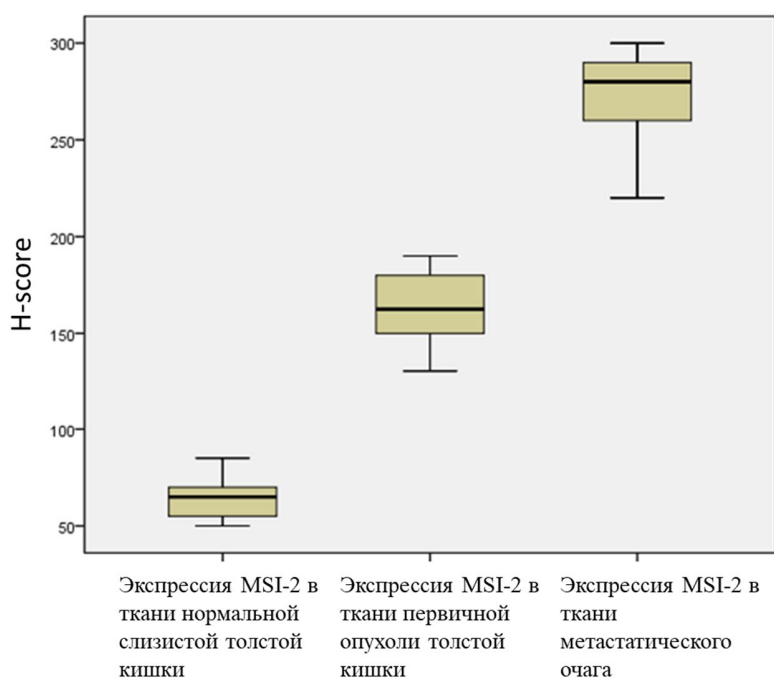


Рис. 2. Разделение уровня экспрессии MSI-2 в различных тканях пациентов с КРР

Сравнение показателей беспрогрессивной выживаемости (БПВ) и уровня экспрессии MSI-2 не показало статистически значимой разницы между низкой и высокой экспрессией в ткани нормальной кишки ( $p=0,910$ ). В то же время высокий уровень экспрессии MSI-2 как в первичной опухоли ( $p=0,013$ ), так и в метастатическом очаге достоверно снижал продолжительность БПВ ( $p=0,005$ ) (таблица 1).

Таблица 1

Сравнение уровня экспрессии MSI-2 в тканях пациента с показателями выживаемости без прогрессии

Клинико-патологические параметры	Среднее время выживания (БПВ) (месяцев, CI 95%)	Медиана выживания (месяцев, CI 95%)	Log-rank	p-value
<b>MSI-2 в нормальной ткани кишечного эпителия</b>				
Низкий	6.3 (4.2 - 8.4)	6.0 (2.9 - 9.1)	0,013	0,910
Высокий	6.3 (4.5 - 8.1)	7.0 (1.1 - 12.9)		
<b>MSI-2 в первичной опухоли</b>				
Низкий	8.3 (5.7 - 10.9)	9.0 (3.5 - 14.5)	6,201	0,013
Высокий	5.3 (4.0 - 6.6)	3.0 (1.3 - 4.7)		
<b>MSI-2 в метастатическом очаге</b>				
Низкий	8.6 (7.0 - 10.3)	9.0 (8.0 - 10.0)	7,939	0,005
Высокий	4.6 (3.2 - 6.0)	3.0 (2.5 - 3.5)		

Примечания: Log-rank – 0,013; 6,201; 7,939,  $p = 0,910; 0,013; 0,005$ .

При изучении связи экспрессии MSI-2 и продолжительности общей выживаемости (ОВ) достоверное снижение было показано только при высоком уровне MSI-2 в ткани метастатического очага ( $p < 0.0001$ ), но не первичной опухоли ( $p = 0,204$ ) и нормальной ткани кишки ( $p = 0,899$ ) (таблица 2).

Таблица 2

Сравнение уровня экспрессии MSI-2 в тканях пациента с показателями общей выживаемости

Клинико-патологические параметры	Среднее время выживания (месяцев, CI 95%)	Медиана выживания (месяцев, CI 95%)	Log-rank	p-value
<b>MSI-2 в нормальной ткани кишечного эпителия</b>				
Низкий	13.6 (9.9 - 17.3)	13.0 (10.5 - 15.5)	0,016	0,899
Высокий	14.5 (12.0 - 16.2)	13.5 (10.6 - 16.4)		
<b>MSI-2 в первичной опухоли</b>				
Низкий	16.6 (13.6 - 19.6)	17.0 (10.4 - 23.6)	1,611	0,204
Высокий	12.6 (9.9 - 15.3)	12.0 (9.4 - 14.6)		
<b>MSI-2 в метастатическом очаге</b>				
Низкий	18.4 (15.9 - 20.9)	19.0 (15.8 - 22.2)	<b>15,696</b>	<b>&lt;0.0001</b>
Высокий	10.6 (8.7 - 12.6)	11.0 (9.2 - 12.8)		

Примечания: Log-rank – 0,016; 1,611; 15,696,  $p = 0,899$ ; 0,204;  $<0,0002$ .

## Выводы

Совершенствование техники хирургического лечения и развитие лекарственной терапии не приводит к существенному снижению частоты локального рецидивирования и развития отдаленных метастазов. В данном положении поиск новых предиктивных биомаркеров прогрессии колоректального рака является чрезвычайно необходимым [4; 11]. Основываясь на полученных данных нашего исследования, мы можем заключить, что повышение интратуморальной экспрессии MSI2 является фактором негативного прогноза в отношении ВБП ( $p = 0,013$ ), а повышенная экспрессия MSI2 в метастатическом очаге – связана со значительным ( $P < 0.0001$ ) снижением ОВ.

Данные предшествующих исследований показали, что MSI-2, помимо физиологической роли в гемопоэтической и нервной ткани, играет значительную роль в канцерогенезе опухолей из данного типа тканей. MSI-2 в свою очередь демонстрирует важную роль в процессах трансформации кишечного эпителия [11]. Другие работы показывают значимое влияние MSI-2 на канцерогенез многих солидных опухолей, в частности гепатоцеллюлярной карциномы, где показано регулирование MSI-2 процессов эпителиально-мезенхимальной трансформации [12;

13].

Существенное различие экспрессии MSI-2 в ткани первичной опухоли и метастатического очага ( $p < 0.0001$ ) позволяет сделать предположение о значительной роли MSI-2 в процессах развития метастатического поражения, особенно ввиду отсутствия экспрессии MSI-2 в клетках микроокружения. Данные факты позволяют предположить возможность использования MSI-2 как предиктивного маркера негативного процесса при метастатическом КРР, и с другой стороны, как терапевтической цели либо компонента специфического сигнального пути в клетках КРР. Необходимо отметить, что проведение дальнейшего изучения роли MSI-2 в развитии, метастазировании и развитии резистентности КРР является следующим этапом исследования.

### Список литературы

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int. J. Cancer*. 2015. V. 136. Is. 5. P. E359-E386. DOI: 10.1002/ijc.29210.
2. Kraus S., Nabiochtchikov I., Shapira S., Arber N. Recent advances in personalized colorectal cancer research. *Cancer Lett.* 2014. Vol. 347. P. 15-21. DOI: 10.1016/J.CANLET.2014.01.025.
3. Norcic G. Liquid biopsy in colorectal cancer-current status and potential clinical applications *Micromachines*. 2018. V. 9. P. 300. DOI: 10.3390/mi9060300.
4. Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S., Enin Y.S., Gevorkyan Y.A., Zolotukhin P.V., Bumber Y., Kharin L.V., Panina S.B. A Proteomics Analysis Reveals 9 Up-Regulated Proteins Associated with Altered Cell Signaling in Colon Cancer Patients. *Protein J.* 2017. Vol. 36. P. 513. DOI: 10.1007/s10930-017-9746-6.
5. Sakakibara S. Nakamura Y., Satoh H., Okano H. Rna-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS. *J. Neurosci.* 2001. Vol. 21 (20). P. 8091-8107. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-20-08091.2001.
6. Sutherland J.M., McLaughlin E.A., Hime G.R., Siddall N.A. The Musashi family of RNA binding proteins: master regulators of multiple stem cell populations. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013. Vol. 786. P. 233-245. DOI: 10.1007/978-94-007-6621-1\_13.
7. Ito T., Kwon H.Y., Zimdahl B., Congdon K.L., Blum J., Lento W.E., Zhao C., Lagoo A.,

Gerrard G., Foroni L., Goldman J., Goh H., Kim S.H., Kim D.W., Chuah C., Oehler V.G., Radich J.P., Jordan C.T., Reya T. Regulation of myeloid leukaemia by the cell fate determinant Musashi. *Nature* 466. 2010. P. 765-768. DOI: 10.1038/nature09171.

8. Jeongsuk Lee, Sungkwan An, Yeong Min Choi, Junwoo Lee, Kyu Joong Ahn, Jae Ho Lee, Tae Jin Kim, In-Sook An, Seunghee Bae. Musashi-2 is a novel regulator of paclitaxel sensitivity in ovarian cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2016. Vol. 5 (49). P. 1945-1952. DOI: 10.3892/ijo.2016.3683.

9. Kun Guo, Jiujie Cui, Ming Quan, Dacheng Xie, Zhiliang Jia, Daoyan Wei, Liang Wang, Yong Gao, Qingyong Ma and Keping Xie. A novel KLF4-MSI2 signaling pathway regulates growth and metastasis of pancreatic cancer. *Clin. Cancer. Res.* 2016. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1064.

10. Hirsch F.R, Varella-Garcia Marileila, Bunn Paul A. Jr., Di Maria Michael V., Veve Robert, Barón Roy M. Bremnes Anna E., Chan Zeng, Wilbur A. Franklin. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J. Clin. Oncol.* 2003. Vol. 21 (20). P. 3798-3807. DOI: 10.1200/JCO.2003.11.069.

11. Shan Wang, Ning Li, Maryam Yousefi, Angela Nakauka-Ddamba, Fan Li, Kimberly Parada, Shilpa Rao, Gerard Minuesa, Yarden Katz, Brian D. Gregory, Michael G. Kharas, Zhengquan Yu, Christopher J. Lengner. Transformation of the intestinal epithelium by the MSI2 RNA-binding protein. *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6. P. 6517. DOI: 10.1038/ncomms7517.

12. Lu He, Xinke Zhou, Chen Qu, Lijuan Hu, Yunqiang Tang, Qiong Zhang, Min Liang, Jian Hong. Musashi2 predicts poor prognosis and invasion in hepatocellular carcinoma by driving epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell. Mol. Med.* 2014. Vol. 18 (1). P. 49-58. DOI: 10.1111/jcmm.12158.

13. Kudinov A.E., Karanicolas J., Golemis E.A., Boumber Y. Musashi RNA-Binding Proteins as Cancer Drivers and Novel Therapeutic Targets. *Clin. Cancer. Res.* 2017. Vol. 23 (9). P. 2143-2153. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2728.