

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКЗОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ CD82, MMP9, В ПАРЕНХИМЕ И МЕЖКЛЕТОЧНОМ ВЕЩЕСТВЕ ПРИ РАКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Мозеров С.А.^{1,2}, Малютина М.Д.², Комин Ю.А.², Пашкин С.Б.³, Мозерова Е.С.²,
Ширяева А.И.⁴

¹Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск;

²НИЯУ МИФИ Обнинский институт атомной энергетики (ИАТЭ), Обнинск, e-mail: yura.komin@yandex.ru;

³Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург;

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург

В основе исследования лежит идея распознавания антигенов онкосом на основании иммунного окрашивания с целью прогнозирования развития метастазов и рецидива злокачественных новообразований. Идея основана на знаниях о генетических свойствах эукариотических клеток образовывать микровезикулы для обеспечения межклеточной коммуникации, механизмы которой были раскрыты в 2013 г. Ротманом, Шекманом и Зюдофом, также доказавшим комплементарность антигенов мембран экзосом и клеток-мишеней. Целью исследования было определение метастатического потенциала рака толстой кишки на основании анализа иммуногистохимического окрашивания антигенов онкосом (CD82, MMP9) в парафиновых срезах. Было проведено обследование 10 парафиновых блоков пациентов, больных инвазивным раком толстой кишки T1-3 N0-4 M0-1, из архива базы МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России: 5 пациентов с инвазивным раком толстой кишки без развития метастазов в течение двух лет после комбинированного лечения, 5 пациентов с инвазивным раком толстой кишки с развитием метастазов в течение двух лет после комбинированного лечения. Для иммунного окрашивания использовались распространенные в практике патологоанатомического отделения антитела CD 82, MMP 9. Было проведено выявление корреляционных взаимосвязей между количеством окрашенных онкосом и клиническими признаками. Выявлено, что по интенсивности и локализации иммунного окрашивания онкосом можно определить метастатический потенциал опухоли и риск возникновения рецидива у пациента.

Ключевые слова: рак толстой кишки, иммуногистохимия, метастазы, рецидив, онкосомы, лечение.

DISTRIBUTION OF EXOSOMES CONTAINING CD82, MMP9 IN THE PARENCHYMA AND INTERCELLULAR SUBSTANCE IN COLON CANCER

Mozerov S.A.^{1,2}, Malyutina M.D.², Komin Yu.A.², Pashkin S.B.³, Mozerova E.S.²,
Shiriaeva A.I.⁴

¹A. Tsyb Medical Radiological Research Centre - branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk;

²Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, Obninsk, e-mail: yura.komin@yandex.ru;

³Herzen State Pedagogical University of Russia, Saint-Petersburg;

⁴Federal state budgetary institution «State research and testing Institute of military medicine» of the Ministry of defense of the Russian Federation, Saint-Petersburg

The research is based on the idea of recognition of antigens by oncosomes on the basis of immune staining, in order to predict the development of metastases and recurrence of malignant neoplasms. The idea is based on knowledge about the genetic properties of eukaryotic cells to form microvesicles to provide intercellular communication, the mechanisms of which were discovered in 2013 by Rotman, Shekman and Sudof, who also proved the complementarity of antigens of exosome membranes and target cells. The aim of the study was to determine the metastatic potential of colon cancer based on the analysis of immunohistochemical staining of oncosome antigens (CD82, MMP9) in paraffin sections. 10 paraffin blocks of patients with invasive colon cancer T1-3 N0-4 M0-1 were examined from the archive of the mrnc database. A. F. Tsyba-branch of the Federal state budgetary institution «NMIRC» of the Ministry of health of Russia: 5 patients with invasive colon cancer without metastases within two years after combined treatment, 5 patients with invasive colon cancer with metastases within two years after combined treatment. For immune staining, CD 82 and MMP 9 antibodies, which are common in the practice of the pathology Department, were used. The correlation between the number of oncos stained and clinical signs was revealed. It was revealed that the intensity and localization of immune

staining with oncosomes can determine the metastatic potential of the tumor and the risk of recurrence in the patient.

Keywords: colon cancer, immunohistochemistry, metastases, relapse, oncosome, treatment.

Рак дистальных отделов кишечника занимает одну из основных позиций в структуре заболеваемости, инвалидности и смертности населения от злокачественных новообразований в мире и в России. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) рак толстой кишки составляет 9% случаев онкологических заболеваний, а опухоли этой локализации занимают в мире 3-е место по заболеваемости и 4-е место по смертности среди злокачественных опухолей [1].

В последние годы достигнуты внушительные успехи в изучении молекулярной биологии рака толстой кишки. Описаны основные механизмы и этапы развития опухоли, изучены стадии канцерогенеза, продемонстрирована роль воспалительных изменений, различных молекулярных механизмов, а также отдельных молекул в возникновении рака. Имеющиеся данные служат источником для создания молекулярно-генетической классификации колоректального рака, выявления биомаркеров роста опухоли и поиска новых подходов к лечению [2].

За последнее время доказаны 4 основных механизма развития колоректального рака, среди которых выделяют: хромосомную нестабильность, микросателлитную нестабильность, «метилиаторный» фенотип (CpG island methylator phenotype) и зубчатый (англ. – serrated) путь развития. Каждый механизм имеет специфические алгоритмы прогресса злокачественной опухоли и линейку индивидуальных генетических и эпигенетических трансформаций [3].

Распространенным (до 90%) путем роста колоректального рака является хромосомная нестабильность: описываемый тип генетических изменений встречается в 80–90% случаев. Хромосомная нестабильность провоцирует развитие анеуплоидии и стабильных аберраций хромосом, что в результате приводит к неблагоприятным прогнозам. Доказано, что этот путь связан с мутациями гена-супрессора опухолевого роста *APC* (ген аденоматозного полипоза толстой кишки). Кроме этого, хромосомная нестабильность связана с мутациями других генов – *SMAD2* и *SMAD4*, принимающих участие в транспортировке импульса внутри клетки, трансформирующего ростового фактора-бета, и гена *KRAS*, белковый продукт которого принимает участие в регулировании многих основных клеточных процессов: роста, гибели, ангиогенеза и метастазирования [3].

Следующим, не менее частым, путем развития злокачественного процесса является микросателлитная нестабильность, определяемая в 20% случаев у больных раком толстой кишки в области печеночного изгиба и в 5% – в области селезеночного изгиба и прямой кишки. Возникновение микросателлитной нестабильности связано с нарушением

восстановления ДНК во время репликации за счет изменений в генах белка системы восстановления ошибок репликации (Mismatch repair system, MRS). В спорадических случаях колоректального рака дефицит системы репарации ДНК возникает за счет снижения экспрессии генов системы MRS из-за гиперметилирования их промоторов [4]. Еще одним путем развития колоректального рака является так называемый метилиаторный фенотип – тип эпигенетической нестабильности, возникающий за счет наличия гиперметилированных промотерных сайтов (CpG island). И тогда происходит снижение активности генов-супрессоров роста опухоли. В этой ситуации у больных нередко определяются мутации в генах *KRAS*, *BRAF* и TP53 [5].

Таким образом, в настоящее время без иммуногистохимических и молекулярно-генетических исследований с целью диагностики, прогнозирования опухолей разных локализаций не обходится ни одна современная патоморфологическая лаборатория. Современная литература содержит огромный объем информации, посвященной диагностической иммуногистохимии. В нашей статье мы хотели бы обратить внимание морфологов на исследование ИГХ-позитивных мелких частиц (от 50 до 100 нм), которые не принимаются во внимание диагностами и расцениваются как фоновое окрашивание. В клинической практике онкосомы (экзосомы) выделяют различными путями: ультрацентрифугированием, методом эксклюзионной хроматографии, иммуноаффинностью и осаждением с помощью химического реагента [6].

С целью выявления экзосом исследовались паренхиматозные элементы опухоли, просвет опухолевых желез, стромальные элементы вблизи и в перипухолевой ткани, а также свободнолежащие экзосомы в межклеточной среде.

Материалы и методы исследования

В исследование включен 21 пациент (10 мужчин и 11 женщин) с гистологически верифицированным диагнозом рака толстой кишки. Половозрастные характеристики: средний возраст пациентов составил 61 год.

Подготовка материала для иммуногистохимического исследования проводилась по стандартным протоколам.

Полученный материал подвергали фиксации 10%-ным нейтральным забуференным раствором формалина, впоследствии заливали в парафин. Для гистологического исследования готовили срезы толщиной 3–4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование проводилось из парафиновых срезов толщиной 3–4 микрона с антителами фирмы Novocastra (KAI-1/CD82, MMP-9) в соответствующем разведении для каждого антитела. Парафиновые срезы монтировались на стеклах, покрытых поли-L-лизином. Их подвергались депарафинизации в ксилоле (4 раза по

5 минут) и регидратации в спиртах нисходящей концентрации (100%, 96%, 70%) по 5 минут в каждом.

Для иммуногистохимического исследования блокирование эндогенной пероксидазы проводилось охлажденной 3%-ной перекисью водорода в течение 10 минут. С целью восстановления антигенной структуры клеток фиксированного в формалине и заключенного в парафин материала использовалось прогревание гистологических срезов в водяной бане в течение 20 минут в 0,01 М цитратном буферном растворе (рН 6.0). Инкубация с первичными антителами проводилась при комнатной температуре в течение 60 минут. Для визуализации продуктов иммунной реакции использована полимерная система EnVision (Dako), в качестве хромогенного субстрата применяется раствор диаминобензидина, ядра докрашены гематоксилином.

Результаты исследования и их обсуждение

ММР 9

Как известно, одним из ведущих факторов, определяющих инвазивные свойства опухоли, а также способность к метастазированию, являются матриксные металлопротеиназы, в том числе и ММР-9.

Матриксные металлопротеиназы (ММРs) – группа ферментов, основополагающей функцией которых является перестройка межклеточного вещества (ЕСМ) [7]. ММР-9, известный и как желатиназа В, – один из сложнейших ферментов по своей структурной составляющей и регулированию своей выполняемой функциональной активности. Активность ММР-9 контролируется многоуровневыми процессами: 1) клеточные взаимодействия и регуляция транскрипции гена цитокинами; 2) регулирование активации профермента другими ферментами (сериновыми протеазами и другими ММР); 3) специфическая и неспецифическая ингибиторная регуляция. В регуляции также принимают участие хемотаксические факторы. Гликозилирование опосредованно влияет на функциональную активность желатиназы В.

Основной функцией ММР является деградация компонентов внеклеточного матрикса. ММР ассоциированы с патологическими состояниями, такими как ревматоидный артрит, болезнь коронарных сосудов и рак. ММР-9 способствует росту опухолевых клеток при метастазировании. Он играет важную роль в опухолевой инвазии и метастазировании, в ангиогенезе [8, 9, 10]. Показан повышенный уровень ММР-9 при колоректальном раке, остром лейкозе, злокачественных новообразованиях молочной железы, мочевого пузыря и меланоме. ММР-9 ассоциирован с метастазами в легких и инвазией глиомы [11].

Тканевой ММР-9 может служить независимым прогностическим маркером при колоректальном раке; количественное определение экспрессии ММР-9 может быть

полезным в поиске пациентов, которые находятся в группе высокого риска развития рецидива заболевания. Иммуногистохимическая экспрессия MMP-9 достоверно положительно коррелирует с глубиной инвазии колоректального рака, метастазированием лимфатических узлов и отдаленным метастазированием. У пациентов с положительным окрашиванием MMP-9 значительно худшая выживаемость, чем у пациентов с отрицательным MMP-9 раком [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Собственное исследование показало, что распределение экзосом, содержащих MMP-9, выражено не только в паренхиматозных элементах опухоли, но и в просвете опухолевых желез, а также в большом количестве они обнаруживались в межклеточной среде (рис. 1). Однако не все опухоли имели положительную реакцию на MMP-9, что, возможно, говорит о более слабых инвазивных свойствах опухолевых клеток.

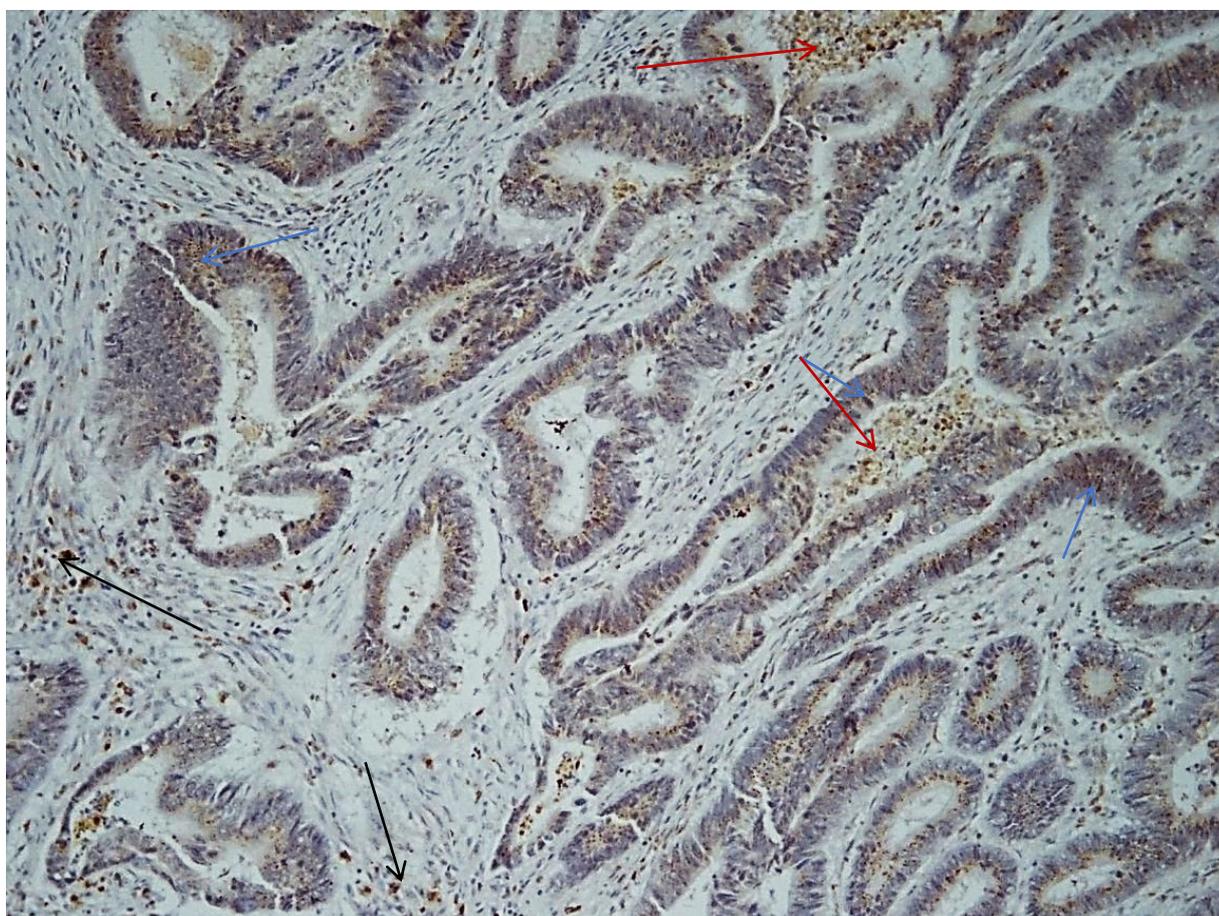


Рис. 1. Высокодифференцированная аденокарцинома, MMP-9, x100.

Синие стрелки – цитоплазматическое окрашивание в клетках опухоли, красные стрелки – в просвете желез, черные – в строме

CD 82

Фактор супрессии метастазов KAI-1/CD82 подавляет прогрессирование и метастазирование широкого спектра солидных злокачественных опухолей. Вездесуще

экспрессированный CD82 сдерживает миграцию клеток и клеточную инвазию, модулируя как клеточную матрицу, так и адгезивность клеток и ограничивая внешнюю сигнализацию про-моторики. Это ограничение по крайней мере способствует, если не определяет, метастаз-супрессивную активность, а также, вероятно, физиологические функции CD82. Как модулятор гетерогенности клеточной мембраны CD82 изменяет микродомены, трафик и топографию мембраны, перестраивая молекулярный ландшафт мембраны. Функциональная активность мембранных молекул и цитоскелетное взаимодействие клеточной мембраны впоследствии изменяются, далее следуют изменения клеточных функций. Учитывая его патологическое и физиологическое значение, CD82 является перспективным кандидатом для клинического прогнозирования и блокирования прогрессии опухоли и метастазирования, а также новым модельным белком для механистического понимания организации и гетерогенности клеточных мембран [Ошибка! Источник ссылки не найден].

Он взаимодействует с белками клеточной поверхности, включая интегрины, кадгеринны, CD4, CD8, IGSF8. Модулирует сигнал EGFR. Может подавлять инвазию, ингибируя интегрин-зависимые перекрестные помехи с рецептором с-Met и Src-киназами. Его регулирование с-мет сигнализации, видимо, влияет на раковые клетки миграции.

Собственные данные говорят о том, что распределение экзосом, содержащих CD-82, в большей степени отмечается в цитоплазме паренхиматозных элементов опухоли и в просвете опухолевых желез. Также положительную реакцию давали стромальные компоненты опухоли (рис. 2). Интересным фактом явилось неравномерное распределение окраски цитоплазмы опухолевых клеток – в одном случае положительная реакция наблюдалась по всей цитоплазме паренхиматозных элементов (рис. 2, красная фигурная скобка), в другом случае положительная реакция отмечалась только вблизи люминальной поверхности цитоплазмы (рис. 3, черная фигурная скобка).

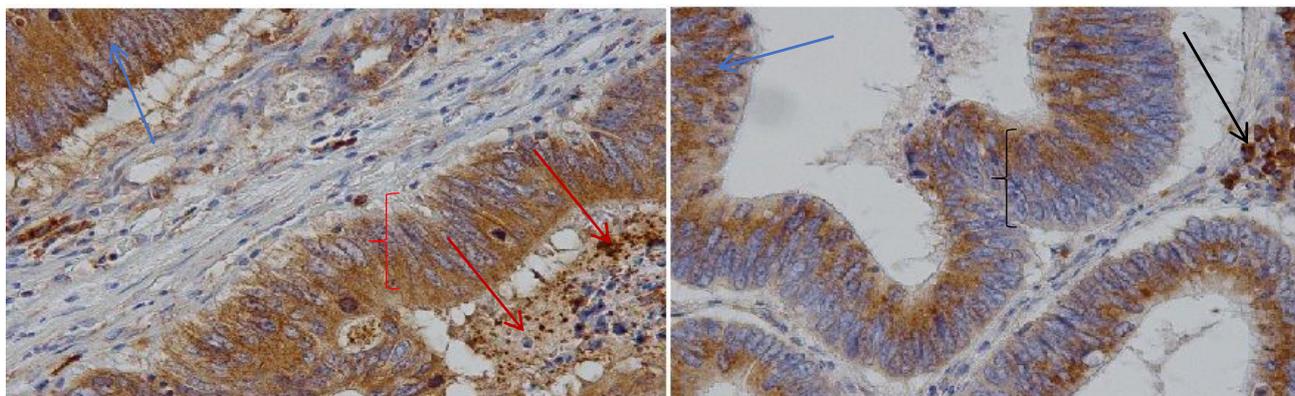


Рис. 2. Высоккодифференцированная аденокарцинома, CD-82, x400.

Синие стрелки – цитоплазматическое окрашивание в клетках опухоли, красные стрелки – в просвете желез

Рис. 3. Высоккодифференцированная аденокарцинома, CD-82, x400.

Синие стрелки – цитоплазматическое окрашивание в клетках опухоли, черные – в строме

Особенности распределения положительно реагирующих гранул в цитоплазме опухолевых клеток скорее всего говорят о злокачественном потенциале рака, т.е. определяют метастаз-супрессивную активность злокачественного новообразования.

Заключение

Сегодня в современной науке отсутствуют достоверные критерии, определяющие злокачественные новообразования с высокой способностью к распространению клеток из первичного очага в другие ткани и образованию в них новых опухолевых элементов. Показатели инвазии и метастазирования злокачественных клеток характеризуются их способностью к деструкции элементов межклеточного вещества — базальной мембраны и межтканевой стромы. Их деструкция и перемещение раковых клеток по межклеточному матриксу связаны с секрецией гидролаз, расщепляющих пептидные связи, как опухолевыми клетками, так и окружающими элементами. Но тем не менее в межклеточном матриксе находятся элементы, которые его укрепляют, таким является фактор супрессии метастазов KAI-1/CD82 [12].

Таким образом, описание распределения экзосом при иммуногистохимическом исследовании может служить дополнительным, независимым признаком злокачественного потенциала опухоли и требует дальнейшего исследования.

Список литературы

1. Torre L.A., Siegel R.L., Ward E.M., Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends-An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 2016. vol. 25. no. 1. P.16–27.
2. Sepulveda A.R., Hamilton S.R., Allegra C.J., Grody W., Cushman-Vokoun A.M., Funkhouser W.K. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *The Journal of molecular diagnostics*. 2017. vol. 19. no. 2. P.187–225.
3. Muller M.F., Ibrahim AEK., Arends M.J. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv*. 2016. vol.469. no. 2. P.125–134.
4. Setaffy L., Langner C. Microsatellite instability in colorectal cancer: clinicopathological significance. *Polish journal of pathology*. 2015. vol. 66. no. 3. P.203–218.
5. Rhee Y-Y., Kim K-J. CpG Island Methylator Phenotype-High Colorectal Cancers and Their Prognostic Implications and Relationships with the Serrated Neoplasia Pathway. *Gut Liver*. 2017. vol. 11. no. 1. P.38–46.
6. Белохвостов А.С., Румянцев А.Г. Онкомаркеры. Молекулярно-генетические,

иммунохимические, биохимические анализы. М.: Макс-Пресс, 2002. 90 с.

7. Klein T., Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids*. 2011. no. 41. P.271–290.
8. Березин А.Е. Регуляторы активности матриксных металлопротеиназ как новые биологические маркеры кардиоваскулярного ремоделирования: обзор литературы // Украинский медицинский журнал. 2011. № 1. С.36-43.
9. Nagase H., Visse R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and timsps. *Cardiovascular research*. 2006. no. 69. P.562–573.
10. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*. 2003. no. 92. P.827–839.
11. Crescitelli R., Lasser C., Szabo T.G., Kittel A., Eldh M., Dianzani I., Buzás E.I., Lötvall J. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, mi-crovesicles and exosomes. *Journal of extracellular vesicles*. 2013. no. 2. P.1-10.
12. Liu XQ., Rajput A., Geng L., Ongchin M., Chaudhuri A., Wang J. Restoration of transforming growth factor- β receptor II expression in colon cancer cells with microsatellite instability increases metastatic potential in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2011. vol. 286. no. 18. P. 16082–16090.