

INFLUENCE CONDITION OF NEOANGIOGENESIS AT EXPRESSION OF PROTEIN NUCLEOFOSMINUM/B23 AND ACTIVITY NUCLEOLAR APPARATUS OF RENAL CELLS CANCER

Bobrov I.P.¹, Cherdantseva T.M.², Myadelets M.N.³, Lepilov A.V.⁴, Klimachev I.V.⁵, Dolgatov A.Yu.⁶, Lazarev A.F.⁷, Avdalyan A.M.⁸ (Russian Federation)

Email: Bobrov539@scientifictext.ru

¹Bobrov Igor Petrovich – Doctor of Medical Science, Senior Researcher;

²Cherdantseva Tatyana Mikhajlovna – Professor, Doctor of medical Science;

³Myadelets Mikchail Nicolaevich – Assistant;

⁴Lepilov Alexander Vasilevich – Professor, Doctor of medical Science, Head of Department;

⁵Klimachev Ilya Vladimirovich – Assistant;

⁶Dolgatov Andrey Yurievich – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor,

DEPARTMENT OF PATHOLOGICAL ANATOMY,

ALTAI STATE MEDICAL UNIVERSITY;

⁷Lazarev Alexander Fedorovich – Professor, Doctor of medical Science, Director of branch;

⁸Avdalyan Achot Miruzhanovich – Doctor of Medical Science, Senior Researcher,

ALTAI BRANCH OF RUSSIAN ONCOLOGIC RESEARCH CENTER NAMED AFTER N.N. BLOKHIN,
BARNAUL

Abstract: in this scientific work, authors analyzed expression nucleoli protein nucleofosminum/B23 and options of morphofunctional activity of nucleolar apparatus of neoplasm's cells at renal-cell cancer depending on the neoangiogenesis of neoplasm. 109 resected kidneys was investigated about cancer. The following parameters was explored: the number of nucleoli per nucleus; area of nucleoli-forming zones and number of fibrillar centers, percentage ring-shaped, transitional and nucleolonemal morphofunctional variants of nucleoli per one nucleus. Expression of protein nucleofosminum/B23 and CD34 was found with immunohistochemical method. Is shown,

that expression of nucleofosminum/B23 and options of nucleolar apparatus was authentically increased in cells of carcinoma with low density of microcirculatory track. Hypoxia in badly-vascularized neoplasms caused hyperexpression of nucleofosminum/B23 and rising the nucleolar activity of neoplasm's cells, it is result of progression of renal-cells cancer.

Keywords: neoangiogenesis, nucleofosminum, nucleus, kidneys cancer.

ВЛИЯНИЕ СОСТОЯНИЯ НЕОАНГИОГЕНЕЗА НА ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКА НУКЛЕОФОЗМИНА/B23 И АКТИВНОСТЬ НУКЛЕОЛЯРНОГО АППАРАТА КЛЕТОК ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА

Бобров И.П.¹, Черданцева Т.М.², Мяделец М.Н.³, Лепилов А.В.⁴, Климачев И.В.⁵, Долгатов А.Ю.⁶, Лазарев А.Ф.⁷, Авдалян А.М.⁸ (Российская Федерация)

¹Бобров Игорь Петрович – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник;

²Черданцева Татьяна Михайловна – профессор, доктор медицинских наук;

³Мяделец Михаил Николаевич – ассистент кафедры;

⁴Лепилов Александр Васильевич – профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой;

⁵Климачев Илья Владимирович – ассистент кафедры;

⁶Долгатов Андрей Юрьевич – доцент, кандидат медицинских наук,

кафедра патологической анатомии,

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования Алтайский государственный медицинский университет;

⁷Лазарев Александр Федорович – доктор медицинских наук, профессор, директор филиала;

⁸Авдалян Ашот Миружанович – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник,

Алтайский филиал Российского онкологического центра им. Н.Н. Блохина,

г. Барнаул

Аннотация: в работе авторы провели анализ экспрессии ядрышкового белка нуклеофозмина/B23 и параметров морфофункциональной активности нуклеолярного аппарата опухолевых клеток при почечно-клеточном раке в зависимости от состояния неоангиогенеза в опухоли. Исследовано 109 почек, резецированных по поводу рака. Изучены следующие параметры нуклеолярного аппарата: количество ядрышек на 1 ядро; площадь ядрышкообразующих зон и число фибриллярных центров на 1 ядро; процентное содержание на 1 ядро кольцевидных, переходных и нуклеолонемных морфофункциональных вариантов ядрышек. Экспрессию белков нуклеофозмина/B23 и CD34 выявляли иммуногистохимическим методом. Показано, что экспрессия нуклеофозмина/B23 и параметры нуклеолярного аппарата

достоверно возрастали в клетках карцином с низкой плотностью микроциркуляторного русла. Гипоксия в плохо васкуляризованных новообразованиях вызывает гиперэкспрессию нуклеофозмина/B23 и повышение нуклеолярной активности опухолевых клеток, что приводит к прогрессии почечно-клеточного рака.

Ключевые слова: неоангиогенез, ядрышко, рак почки.

В последнее время внимание исследователей обращено на изучение феномена гипоксии в опухоли [5, 15]. Показано, что гипоксия, возникающая в микроокружении опухолевых клеток, играет ключевую роль в активации метаболизма неоплазии и это имеет большое клиническое и прогностическое значение [7, 4, 13]. Гипоксия индуцирует факторы активирующие транскрипцию генов, которые вызывают ответ на гипоксическое воздействие [8, 6]. К факторам, индуцируемым гипоксией, прежде всего, относятся наиболее изученные на сегодняшний момент белки семейства HIF (hypoxia-inducible factors): HIF-1 α , HIF-2 α , и HIF-3 α [12]. Данные белки переключают метаболизм опухолевых клеток с аэробного на анаэробный путь получения энергии, что придает клеткам значительно большие возможности к инвазии и метастазированию.

Нуклеофозмин/B23 полифункциональный ядрышковый фосфопротеин с молекулярной массой 38 kD и его функциями являются: участие в промежуточных и поздних стадиях сборки прерибосом, транспорт белковых компонентов рибосом из ядра в цитоплазму, контроль дублирования centrosom [10]. Имеются данные, что синтез данного белка может активироваться гипоксией. Экспериментальными исследованиями показано, что при недостатке кислорода в ядрышках клеток культур злокачественных клеток отмечается гиперэкспрессия нуклеофозмина/B23 [9]. Гиперэкспрессия нуклеофозмина/B23 имеет прогностическое значение при ряде локализаций рака [1, 11, 14]. Исследования морфофункциональной активности нуклеолярного аппарата и экспрессии нуклеофозмина/B23 в условиях гипоксии при раке почки в литературе отсутствуют.

Целью исследования явилось изучение экспрессии белка нуклеофозмина/B23 и морфофункциональной активности нуклеолярного аппарата в клетках почечно-клеточного рака в зависимости от фактора гипоксии.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужили 109 почек, резецированных по поводу рака в Алтайском филиале РОНЦ им. Н.Н. Блохина Росздрава России, г. Барнаул. Средний возраст больных составил 58,0 $\pm$ 0,8 лет. Мужчин было 53 (48,6%), женщин – 56 (51,4%). При изготовлении гистологических препаратов применялся метод тканевых матриц. В каждом случае из парафиновых блоков (блоков-доноров) после предварительного просмотра гистологического препарата иглой-панчером с внутренним диаметром 2,0 мм забирали столбики ткани опухоли. Далее столбики (10-15 шт.) помещали в парафиновые блоки-реципиенты размером 20x20 мм. С парафиновых блоков-реципиентов при помощи полуавтоматического роторного микротомы изготавливали серийные гистологические срезы толщиной 4 мкм и переносили на стекла (с двух парафиновых блоков на одно стекло).

Изучение ядрышек опухолевых клеток осуществляли при окрашивании гистохимическими и иммуногистохимическими методами. Гистохимическое окрашивание ядрышек проводили по методу Daskal Y., et al., 1980, в нашей модификации [2]. Докраску ядра осуществляли 1% раствором метилового зеленого. Ядрышки классифицировали в соответствии с морфофункциональной классификацией ядрышек Челидзе П.В. и Зацепиной О.В. (1988). [3]. Вычисляли следующие параметры нуклеолярного аппарата: среднее количество ядрышек на 1 ядро; среднюю площадь ядрышкообразующих зон (ЯОЗ) на 1 ядро; среднее количество фибриллярных центров (ФЦ) на 1 ядро; среднее содержание кольцевидных (КЯд), переходных (ПЯд) и нуклеолонемных (НЯд) типов ядрышек на 1 ядро.

Иммуногистохимическое выявление ядрышкового белка нуклеофозмина/B23 проводили с применением моноклональных антител – nucleophosmin n/B23, клон mouse mAb23 (фирма «Labvision»). Оценивали интегральную оптическую плотность (ИОП) нуклеофозмина/B23 в ядрышке с использованием системы компьютерного анализа изображения, состоящей из микроскопа Leica DME, цифровой камеры Leica EC3 (Leica Microsystems AG, Германия), персонального компьютера и программного обеспечения ВидеоТест-Морфология 5.2. Значения ИОП нуклеофозмина/B23 выражали в условных единицах (у.е.).

В целях исследования плотности микроциркуляторного русла (ПМЦР) в опухоли проводили иммуногистохимическое окрашивание эндотелия сосудов на CD34 (клон QBEnd/10, фирма Ventana). Препараты фотографировали цифровым фотоаппаратом в 5 полях зрения при увеличении x 400 и сохраняли фотоснимок в формате JPG. Затем проводили обработку снимков в программе Adobe Photoshop 6.0. и осуществляли подсчет среднего числа сосудов в 5 полях зрения в программе Image Tool 3.0. с помощью инструмента Count and Tag.

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 6.0. При сопоставлении средних величин использовали критерий значимости Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Коррелятивные взаимоотношения оценивали с помощью критерия Пирсона.

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенного исследования показали, что ПМЦР в опухолях почки в среднем составила $30,9 \pm 2,2$ в 5 полях зрения, пределы колебаний числа сосудов варьировали от 3,6 до 104, медиана составила 28 сосудов. Поскольку медиана количества сосудов была равна 28, то это значение нами было выбрано за критическую точку васкуляризации опухоли, позволяющую разделить больных на 2 группы. 1 группу составили больные с хорошо васкуляризованными опухолями, содержащими > 28 сосудов, 2 группу составили больные с плохо васкуляризованными опухолями, имеющими < 28 сосудов, т.е. находящимися в состоянии гипоксии.

При исследовании нуклеофозмина/B23 экспрессия белка была четко видна во всех опухолевых клетках, при этом выявлялась только ядрышковая локализация в виде окрашивания нуклеолы в цвета от светло-желтого до бурого. В целом в клетках ПКР ИОП белка нуклеофозмина/B23 составила $1551,1 \pm 51,35$ у.е. на 1 ядро, пределы колебаний ИОП составили от 118,9 до 15779,1 у.е., медиана составила – 890 у.е. В группе больных с хорошо васкуляризованными карциномами ИОП белка составила $963,7 \pm 66,3$ у.е., а в группе пациентов с плохо васкуляризованными опухолями ИОП достоверно возрастала до $2036,0 \pm 79,15$ у.е. ($p = 0,0000001$) (рис. 1, 2; таблица 1). ИОП нуклеофозмина/B23 коррелировала с ПМЦР опухоли ($r = 0,46$; $p = 0,0001$); с наличием некроза в опухоли ($r = 0,43$; $p = 0,0001$); с размером опухоли ($r = 0,45$; $p = 0,0001$) и наличием метастазов ($r = 0,40$; $p = 0,0001$).

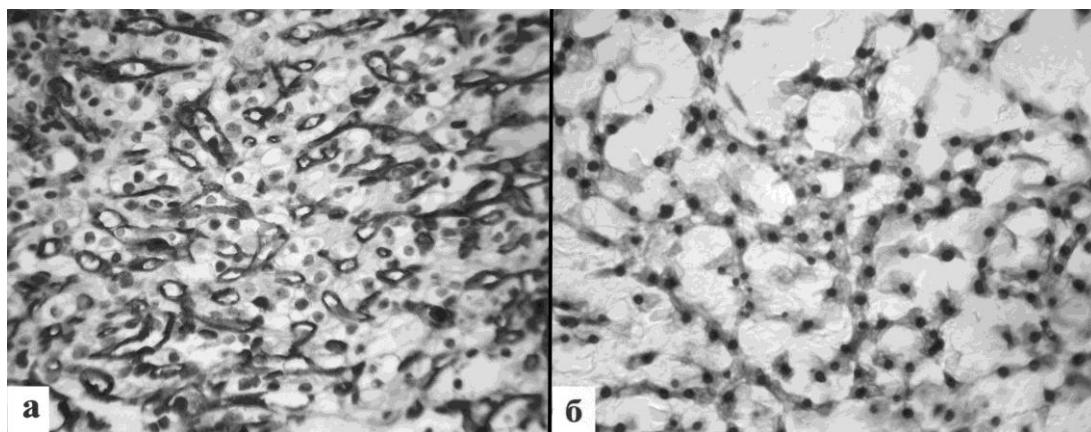


Рис. 1. Опухоль с высокой ПМЦР и низкой ИОП нуклеофозмина/B23 на 1 ядро: а – иммуногистохимическая реакция на CD34, увеличение $\times 400$; б – иммуногистохимическая реакция на нуклеофозмин/B23, увеличение $\times 1000$

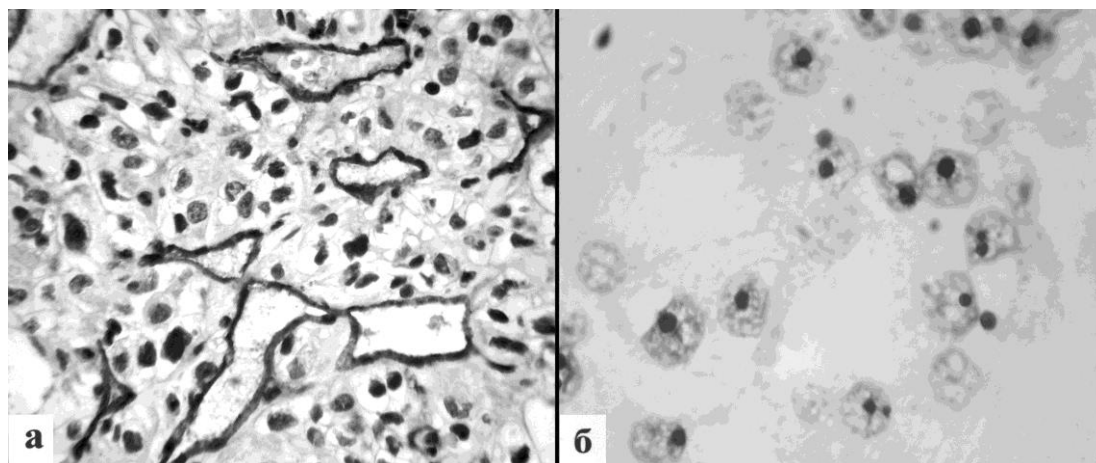


Рис. 2. Опухоль с низкой ПМЦР и высокой ИОП нуклеофозмина/B23 на 1 ядро: а – иммуногистохимическая реакция на CD34, увеличение $\times 400$; б – иммуногистохимическая реакция на нуклеофозмин/B23, увеличение $\times 1000$

При исследовании нуклеолярного аппарата обнаружено, что количество ядрышек в опухолях с высокой ПМЦР составило $1,6 \pm 0,05$ на 1 ядро, а в карциномах с низкой ПМЦР оно достоверно возрастало до $1,8 \pm 0,04$ ($p = 0,0009$). Средняя площадь ЯОЗ на 1 ядро в опухолях с высокой ПМЦР равнялась $1,7 \pm 0,06$ $\mu\text{м}^2$, а с низкой – $2,9 \pm 0,08$ $\mu\text{м}^2$ ($p = 0,0000001$). Содержание КЯд, ПЯд и НЯд в ядрах клеток

опухолей с высокой ПМЦР составило 27,3%, 52,7%, 19,9%, а в карциномах с низкой ПМЦР 21,7%, 40,2% и 38,6% соответственно. В новообразованиях с низкой ПМЦР значительно возросло количество ФЦ на 1 ядро до $10,9 \pm 0,4$, по сравнению с карциномами с высокой ПМЦР ($5,0 \pm 0,2$) ($p = 0,0000001$) (таблица 1).

Таблица 1. Параметры нуклеолярного аппарата опухолевых клеток ПКР в зависимости от ПМЦР опухоли

Параметры нуклеолярной активности	ПМЦР	
	< 28 сосудов	> 28 сосудов
ИОП нуклеофозмина/B23 (у.е.)	$2036,0 \pm 79,15^*$	$963,7 \pm 66,3^*$
Число ядрышек на 1 ядро	$1,8 \pm 0,04^*$	$1,6 \pm 0,05^*$
Площадь ЯОЗ (мкм^2)	$2,9 \pm 0,08^*$	$1,7 \pm 0,06^*$
Число ФЦ на 1 ядро	$5,0 \pm 0,2^*$	$10,9 \pm 0,4^*$
Число КЯд на 1 ядро (%)	21,7	27,3
Число ПЯд на 1 ядро (%)	40,2	52,7
Число НЯд на 1 ядро (%)	38,6	19,9

Примечание: * $p < 0,05$.

Таким образом, результатами проведенного исследования показано, что в плохо васкуляризированных карциномах, по сравнению с хорошо васкуляризированными, отмечали возрастание экспрессии ядрышкового белка нуклеофозмина/B23. Данный феномен оказывал влияние на морфофункциональные характеристики нуклеолярного аппарата опухолевых клеток ПКР. Так, в клетках опухоли возрастали количество ядрышек и площадь ядрышкообразующих зон на 1 ядро. Также, гиперэкспрессия нуклеофозмина/B23 в ядрах клеток сопровождалась изменением распределения морфофункциональных типов нуклеол: в опухолях с низкой ПМЦР уменьшалось число кольцевидных и переходных вариантов ядрышек и возрастало содержание нуклеолонемных типов ядрышек. Данные перестройки нуклеолярного аппарата в конечном итоге проводили к значительному увеличению количества фибриллярных центров в ядрышках опухолевых клеток опухолей с низкой ПМЦР.

Как показано современными исследованиями, гипоксия оказывает значительное влияние на прогрессию и метастазирование опухоли, что имеет большое прогностическое значение. Данное исследование показало, что одним из патогенетических механизмов воздействия фактора низкой оксигенации на прогрессию опухоли является активация экспрессии ядрышкового протеина нуклеофозмина/B23, гиперэкспрессия которого приводит к увеличению темпов роста опухолевых клеток за счет возрастания рибосомального синтеза. Понимание механизмов активации и регуляции экспрессии нуклеофозмина/B23 важно еще и в связи с тем, что в настоящее время активно разрабатываются таргетные препараты, ингибирующие данный белок, которые могут позволить улучшить качество и продлить жизнь онкологическим больным.

Список литературы / References

1. Авдалян А.М., Кобяков Д.С., Климачев В.В. и др. Экспрессия нерибосомального ядрышкового белка нуклеофозмина/B23 в гладкомышечных образованиях тела матки // Бюллетень эспериментальной биологии и медицины, 2015. № 8. С. 259-264.
2. Бобров И.П., Авдалян А.М., Климачев В.В., Лазарев А.Ф., Гervальд В.Я., Долгатов А.Ю., Самуйленкова О.В., Ковригин М.В., Кобяков Д.С. Модификация гистохимического метода выявления ядрышковых организаторов на гистологических срезах // Архив патологии, 2010. № 3. С. 35-37.
3. Челидзе П.В., Зацепина О.В. Морфофункциональная классификация ядрышек // Успехи современной биологии, 1988. № 2. С. 252-268.
4. Chang J., Erler J. Hypoxia – mediated metastasis // Exp. Med. Biol., 2014. Vol. 772. P. 55-81.
5. Dhani N, Fyles A, Hedley D, Milosevic M. The clinical significance of hypoxia in human cancers // Semin. Nucl. Med., 2015. № 2. P. 110-21.
6. Hashimoto T., Shibasaki F. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch // Front. Pediatr., 2015. № 3. P. 33-38.

7. *Huang D., Li C., Zhang H.* Hypoxia and cancer cell metabolism // *Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 2014. № 3. P. 214-219.
8. *Kenneth N.S., Rocha S.* Regulation of gene expression by hypoxia // *Biochem. J.*, 2008. № 1. P. 19-29.
9. *Li J., Zhang X., Sejas D.P., Bagby G.C., Pang Q.* Hypoxia-induced Nucleophosmin Protects Cell Death through Inhibition of p53 // *The Journal of biological chemistr.*, 2004. Vol. 279. P. 41275-41279.
10. *Okuwaki M.* The structure and functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein // *J. Biochem.*, 2008. № 4. P. 441-448.
11. *Yang Y.F., Zhang X.Y., Yang M., He Z.H., Peng N.F., Xie S.R., Xie Y.F.* Prognostic role of nucleophosmin in colorectal carcinomas // *Asian. Pac. J. Cancer Prev.*, 2014. Vol. 15. P. 2021-2026.
12. *Yang S.L., Wu C., Xiong Z.F., Fang X.* Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function // *Mol. Med. Rep.*, 2015. № 2. P. 2411-2 416.
13. *Yun Z., Lin Q.* Hypoxia and regulation of cancer cell stemness // *Adv Exp Med Biol.*, 2014. Vol. 772. P. 41-53.
14. *Xu D.H., Liu F., Li X., Chen X.F., Jing G.J., Wu F.Y., Shi S.L., Li Q.F.* Regulatory role of nucleophosmin during the differentiation of human liver cancer cells // *Int. J. Oncol.*, 2014. Vol. 45. P. 264-272.
15. *Zeng W., Liu P., Pan W., Singh S.R., Wei Y.* Hypoxia and hypoxia inducible factors in tumor metabolism // *Cancer Lett.*, 2015. № 2. P. 263-267.