

УДК: 616-006-092.18:547.96

ЗАВИСИМОСТЬ УРОВНЯ БЕЛКА-ТРАНСЛОКАТОРА TSPO И ЦИТОХРОМА P450SCC ОТ ГИСТОТИПА ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ

Р.А. Зуков, Т.Г. Рукша, Ю.А. Дыхно, Э.В. Семенов, Н.В. Боякова

*Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1,
e-mail: zukov_rus@mail.ru*

Описаны особенности экспрессии белка-транслокатора (TSPO) и цитохрома P450_{scc} (CYP 450_{scc}) у больных почечно-клеточным раком (ПКР). Установлена зависимость уровня экспрессии TSPO от стадии и гистологического варианта рака почки. Изменение уровня экспрессии CYP 450_{scc} в клетках опухоли свидетельствует об изменении выраженности стероидогенеза при различных гистотипах ПКР. Полученные данные важны для понимания патогенеза рака почки, а также могут иметь прогностическое значение.

Ключевые слова: почечно-клеточный рак, TSPO, цитохром P450_{scc}, стероидогенез.

THE DEPENDENCE OF TRANSLOCATOR PROTEIN TSPO LEVEL AND CYTOCHROME P450SCC FROM HISTOTYPE OF TUMOR IN PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA

R.A. Zukov, T.G. Ruksha, Yu.A. Dykhno, E.V. Semenov, N.V. Boyakova
*V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University
1, Partizan Zheleznyak Street, 660022-Krasnoyarsk, Russia,
e-mail: zukov_rus@mail.ru*

The features of expression of translocator protein (TSPO) and cytochrome P450_{scc} (CYP 450_{scc}) in patients with renal cell carcinoma (RCC) were described in the article. The dependence of level expression of TSPO from stage and histological subtypes of renal cell carcinoma were established. The changing of expression level of CYP 450_{scc} in tumor cells indicates a change of severity of steroidogenesis in different histological subtypes of RCC. These findings were important for interpretation the pathogenesis of RCC and also they could have prognostic value.

Key words: renal cell carcinoma, TSPO, cytochrome P450_{scc}, steroidogenesis.

Translocator protein (TSPO) с молекулярной массой 18 кДа – внутриклеточный белок, участвующий в большинстве основных процессов жизнедеятельности клетки: стероидогенезе, иммунном ответе, стресс-адаптации, клеточной пролиферации и апоптозе [1, 7, 9, 18]. Наиболее изученной функцией TSPO является его участие в транспорте низкомолекулярных клеточных метаболитов, в том числе холестерина, через внешнюю митохондриальную мембрану. Транспорт холестерина является ключевым звеном в синтезе стероидных гормонов [8]. После перемещения к внутренней митохондриальной мембране холестерин преобразуется в прегненолон под действием фермента цитохром P450_{scc} (CYP450_{scc}) и вспомогательных электрон-транспортирующих белков, локализующихся на матричной поверхности внутренней митохондриальной мембраны. Синтезированный прегненолон транспортируется из митохондрий в

эндоплазматический ретикулум клетки, где подвергается ферментативному воздействию, что является окончательным этапом синтеза стероидных гормонов [17].

Уровень TSPO повышается при многих злокачественных новообразованиях, что объясняют усиленным метаболизмом холестерина для пластических нужд трансформированных клеток с высоким пролиферативным потенциалом [15]. В этой связи в нашей работе исследованы особенности экспрессии TSPO и фермента, метаболизирующего холестерин на начальном этапе стероидогенеза у больных почечно-клеточным раком (ПКР) с целью изучения регуляторных механизмов развития, прогрессирования и метастазирования опухоли, а также для определения возможности использования данных белков в качестве молекулярных мишеней для прогнозирования и лечения данного заболевания.

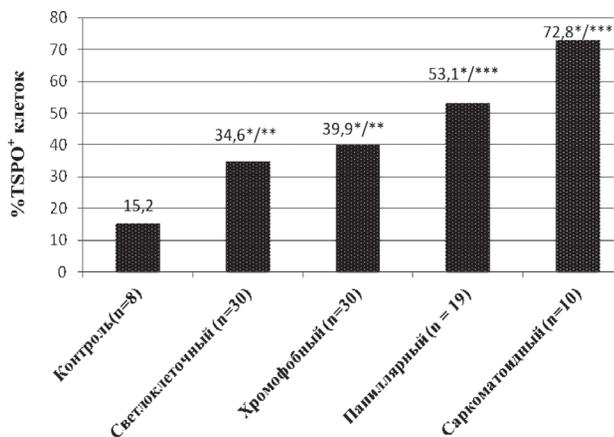


Рис. 1. Уровень экспрессии TSPO при различных гистологических вариантах ПКР. Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($\alpha < 0,05$); ** – статистически значимые различия по сравнению с саркоматоидным и папиллярным вариантами ПКР ($\alpha < 0,05$); *** – статистически значимые различия по сравнению с другими гистологическими вариантами ПКР ($\alpha < 0,05$)

Материал и методы

Под наблюдением находились 89 больных ПКР, оперированных в объеме радикальной нефрэктомии (n=79) или резекции почки (n=10). Полученная во время операции ткань почки фиксировалась в 10 % растворе формалина, заливалась в парафин, после чего изготавливались срезы для иммуногистохимического окрашивания. В качестве контроля использовалась ткань здоровой почки (n=8). Образцы подвергались морфологическому исследованию для определения стадии заболевания и гистологического варианта ПКР. Параллельно срезы толщиной до 5 мкм окрашивались по стандартной методике с моноклональными антителами к TSPO (Trevigen, разведение 1:400) и CYP450ssc (Corgen Inc., разведение 1:500). Для выполнения иммуногистохимического протокола использова-

лась система NovoLink Polymer Detection System (Leica Microsystems, Newcastle, United Kingdom). На последнем этапе препараты докрасивались гематоксилином. Подсчет положительно окрашенных клеток производился при $\times 400$. При ПКР оценивалось количество положительно окрашенных клеток на 100 опухолевых клеток, в контроле – на 100 клеток нормальной почечной ткани.

Статистическая обработка осуществлялась с помощью критерия Н-Крускала–Уоллеса.

Результаты и обсуждение

Среди наблюдаемых больных ПКР были 42 (47,2 %) женщины и 47 (52,8 %) мужчин. Возраст пациентов составил 42–82 года. При морфологическом исследовании I стадия заболевания выявлена у 12,4 % больных, III стадия – у 70,8 % и IV стадия – у 16,8 %. Гистологически определялись следующие варианты ПКР: светлоклеточный (n=30), хромофобный (n=30), папиллярный (n=19), саркоматоидный (n=10). Достоверных различий в уровне экспрессии TSPO и цитохрома P450ssc в зависимости от пола и возраста выявлено не было. Распределение уровня экспрессии TSPO и цитохрома P450ssc в нормальной почечной ткани и опухолевых очагах в зависимости от стадии ПКР представлено в таблице.

Уровень экспрессии TSPO в зависимости от гистотипа ПКР распределился следующим образом: в контрольной группе – 15,2 %; при светлоклеточном ПКР – 34,6 %, при хромофобном ПКР – 39,9 %, при папиллярном ПКР – 53,1 %, при саркоматоидном ПКР – 72,8 %. Различия между уровнем TSPO+ клеток при всех вариантах ПКР и в контроле, а также между светлоклеточным, хромофобным, папиллярным и саркоматоидным вариантами были статистически значимы ($\alpha < 0,05$). Не выявлено достоверных различий между светлоклеточным и хромофобным вариантами ПКР (рис. 1).

Таблица

Уровень экспрессии TSPO и цитохрома P450ssc у больных ПКР в зависимости от стадии заболевания

Группы больных	TsPO+	Цитохром P450ssc+
Контрольная группа (n=8)	15,2 %	98,6 %
ПКР I стадии (n=11)	47,3 %*	74,2 %*
ПКР III стадии (n=63)	40,5 %*	67,9 %*
ПКР IV стадии (n=15)	60,3 %* **	66,7 %*

Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой ($\alpha < 0,05$); ** – статистически значимые различия по сравнению с другими стадиями ПКР ($\alpha < 0,05$).

Известно, что повышение экспрессии TSPO характерно для злокачественных новообразований молочной железы, простаты, толстой кишки, эндометрия, яичников, центральной нервной системы [2, 7, 9]. Повышение экспрессии TSPO наиболее выражено в опухолях и линиях раковых клеток, обладающих высоким злокачественным потенциалом [8, 9]. Так, уровень экспрессии TSPO значительно повышен при простатической интраэпителиальной неоплазии, первичном раке простаты и метастазах по сравнению с нормальной тканью простаты и доброкачественной гиперплазией предстательной железы. Кроме того, уровень TSPO коррелирует с частотой прогрессирования рака простаты, поскольку уровень белка прямо пропорционально повышается с ростом баллов по шкале Gleason и распространенностью опухоли [7, 9, 12].

Внутриклеточная локализация TSPO связана преимущественно с митохондриями, но при этом данный белок также выявлен в аппарате Гольджи, лизосомах, пероксисомах, ядре и плазматической мембране [18]. Немаловажным для оценки результатов нашего исследования является тот факт, что TSPO, меченные с помощью антител и флуоресцентных лигандов, локализуются в агрессивных опухолях в основном в ядре или вокруг него, а в нормальных клетках и слабоагрессивных опухолях преобладает цитоплазматическая локализация [10]. Учитывая биологические особенности ПКР, а также его высокую метастатическую активность, мы также наблюдали TSPO⁺ клетки в опухолевых очагах и нормальной почечной ткани с преимущественно ядерной локализацией.

Нами установлено повышение уровня экспрессии TSPO у больных ПКР в сравнении с экспрессией данного белка в нормальной почечной ткани, что свидетельствует о нарушении его функционирования в опухолевых очагах. Кроме того, интересные данные получены при сопоставлении уровня экспрессии TSPO при различных стадиях и гистологических вариантах ПКР. Так, установлена зависимость уровня экспрессии TSPO от стадии опухолевого процесса: у больных с IV стадией ПКР отмечаются более высокие показатели экспрессии белка, чем при I и III стадиях заболевания (таблица). Зависимость уровня экспрессии TSPO от распространенности опухолевого процесса продемонстрирована у больных раком молочной

железы: помимо значительного повышения экспрессии TSPO в опухолевых клетках по сравнению с нормальной тканью молочной железы, показана отрицательная корреляция между уровнем TSPO и безрецидивной выживаемостью у пациенток без метастазов в лимфоузлы [8]. У больных колоректальным раком доказано прогностическое значение гиперэкспрессии TSPO при III стадии заболевания, в то же время при IV стадии такой корреляции не выявлено [13].

Различия между уровнем TSPO⁺ клеток установлены нами при различных гистологических вариантах ПКР. Самый высокий уровень TSPO⁺ клеток определен при саркоматоидном варианте (72,7 %), промежуточное значение имеет папиллярный рак (53,1 %), наиболее низкий уровень экспрессии TSPO установлен при светлоклеточном (34,6 %) и хромофобном (39,9 %) вариантах рака почки. Полученные данные об уровне экспрессии TSPO сопоставимы с прогностической значимостью гистотипов ПКР. Одни авторы отмечают наиболее благоприятный прогноз у пациентов с хромофобным ПКР по сравнению с папиллярным и светлоклеточным вариантами [16], другие исследователи описывают менее благоприятный прогноз у больных со светлоклеточным вариантом по сравнению с папиллярным и хромофобным [5]. Наличие саркоматоидного характера опухоли во всех доступных исследованиях ассоциировано с крайне неблагоприятным прогнозом [5, 14].

Уровень экспрессии цитохрома P450scс при всех гистологических вариантах ПКР отличался от уровня экспрессии данного фермента в нормальной почечной ткани. Кроме того, статистически значимо ($\alpha < 0,05$) отличалось распределение уровня цитохром P450scс⁺ клеток при хромофобном раке почки в сравнении с другими вариантами, а также между папиллярным и саркоматоидным типами ПКР (рис. 2).

Повышение уровня экспрессии цитохрома P450scс (98,6 %) на фоне низкого уровня TSPO⁺ клеток (15,2 %) в нормальной почечной ткани может являться свидетельством того, что большая часть холестерина, транспортируемого в клетки почечного эпителия в норме, метаболизируется в прегненолон. Действительно, было показано, что в нормальной почечной ткани возможен синтез стероидных гормонов, хотя биологический смысл данного факта является неизученным [6].

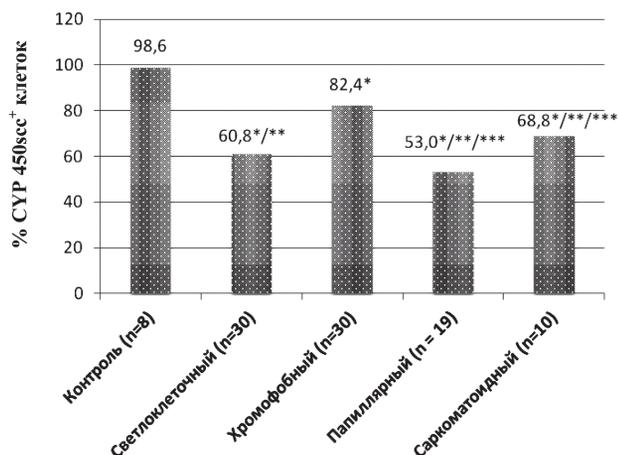


Рис. 2. Уровень экспрессии цитохрома P450scc при различных гистологических вариантах ПКР. Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($\alpha < 0,05$); ** – статистически значимые различия между хромофобным и другими гистологическими вариантами ПКР ($\alpha < 0,05$); *** – статистически значимые различия между папиллярным и саркоматоидным вариантами ПКР ($\alpha < 0,05$)

Снижение уровня экспрессии цитохрома P450scc в клетках почечно-клеточного рака, вероятнее всего, говорит о подавлении стероидогенеза в опухолевых очагах. Причем уровень его не зависит от стадии ПКР, однако отмечается влияние гистологического варианта на распределение цитохром P450scc⁺ клеток. Наиболее высокий уровень экспрессии цитохрома P450scc определяется при хромофобном варианте (82,4 %), промежуточное значение имеет светлоклеточный рак (60,8 %), наиболее низкий уровень экспрессии фермента установлен при папиллярном варианте рака почки (53 %). Однозначно интерпретировать данные при саркоматоидном варианте ПКР невозможно, поскольку он не является самостоятельным гистологическим подтипом и в той или иной степени может встречаться при любых гистологических формах ПКР, одновременно указывая на неблагоприятный прогноз [5, 14].

Несмотря на наличие достаточного количества убедительных данных об изменении уровней экспрессии TSPO при многих видах злокачественных новообразований, роль TSPO в канцерогенезе остается невыясненной. Предполагается, что TSPO может служить транспортером холестерина в опухолевые клетки, которые, как известно, обладают высокой способностью к аккумуляции и метаболизму последнего, что может быть обусловлено как по-

вышением пластических процессов в опухолевых клетках, так и изменениями механизмов передачи сигнала в клетку через биологические мембраны [4]. С другой стороны, показано, что уровень TSPO модулируется митоген-активируемыми протеинкиназами, MAPK сигнальным механизмом, активация которого происходит при развитии ряда онкологических заболеваний [3]. Известно, что стероидные гормоны могут изменять уровень клеточной пролиферации, регулировать выраженность апоптоза, а также прогрессию и метастазирование опухолевых клеток и, таким образом, патологическая гиперактивация MAPK может приводить к повышению синтеза стероидных гормонов, в свою очередь, выступающих в качестве регуляторов вышеуказанных патологических процессов [11].

Таким образом, у больных ПКР нарушено функционирование TSPO и функционально связанного с ним белка-фермента, играющего важную роль в стероидогенезе, – цитохрома P450scc. Выявленная зависимость уровня экспрессии TSPO от стадии и гистологического варианта в соотношении с клиническими данными позволяют предположить возможное использование TSPO в качестве молекулярной мишени для прогнозирования течения заболевания. Установленные особенности экспрессии цитохрома P450scc в клетках опухоли свидетельствуют об изменении выраженности стероидогенеза при ПКР и возможном функциональном перераспределении внутриклеточного холестерина на обеспечение пролиферативных процессов. Дальнейшие исследования механизмов внутриклеточного транспорта холестерина с участием TSPO помогут пролить свет на патогенетические аспекты развития данного заболевания, особенности регуляции процессов пролиферации опухолевых клеток, а также понять механизмы прогрессирования и метастазирования почечно-клеточного рака.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гырылова С.Н., Комина А.В., Рукша Т.Г. Индукция апоптоза клеток меланомы лигандом TsPO PK11195 // Сибирский онкологический журнал. 2011. № 1 (43). С. 40–43.
2. Alana M., Kassiou S., Kassiou M. The translocator protein // J. Nucl. Med. 2011. Vol. 52. P. 677–680.
3. Batareseh A., Li J., Papadopoulos V. Protein kinase C epsilon regulation of translocator protein (18 kDa) TsPO gene expression is mediated through a MAPK pathway targeting STAT3 and c-Jun transcription factors // Biochemistry. 2010. Vol. 49. P. 4766–4778.
4. Batareseh A., Papadopoulos V. Regulation of translocator protein 18kDa (TSPO) expression in health and disease states // Mol. Cell. Endocrinol. 2010. Vol. 327. P. 1–12.

5. Cheville J.C., Lohse C.M., Zincke H. et al. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma // *Amer. J. Surg. Pathol.* 2003. Vol. 27. P. 612–624.
6. Dalla Valle L., Toffolo V., Vianello S. et al. Expression of cytochrome P450scc mRNA and protein in the rat kidney from birth to adulthood // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004. Vol. 88. P. 79–89.
7. Fafalios A., Akhavan A., Parwani A.V. et al. Translocator protein blockade reduces prostate tumor growth // *Clin. Cancer Res.* 2009. Vol. 15. P. 61–77.
8. Galiègue S., Casellas P., Kramar A. et al. Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in breast cancer and its relationship with survival // *Clin. Cancer Res.* 2004. Vol. 10. P. 2058–2064.
9. Han Z., Slack R.S., Li W., Papadopoulos V. Expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in human tumors: relationship to breast, colorectal, and prostate tumor progression // *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 2003. Vol. 23. P. 225–238.
10. Hardwick M., Fertikh D., Culty M. et al. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol // *Cancer Res.* 1999. Vol. 59. P. 831–842.
11. Kabat C.C., Etgen A.M., Rohan T.E. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010. Vol. 19. P. 2421–2427.
12. Li W., Hardwick M.J., Rosenthal D. et al. Peripheral-type benzodiazepine receptor overexpression and knockdown in human breast cancer cells indicate its prominent role in tumor cell proliferation // *Biochem. Pharmacol.* 2007. Vol. 73. P. 491–503.
13. Maaser K., Hopfner M., Jansen A. et al. Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal cancer cells // *Br. J. Cancer.* 2001. Vol. 85. P. 1771–1780.
14. Molina A.M., Tickoo S.K., Ishill N. et al. Sarcomatoid-variant renal cell carcinoma: treatment outcome and survival in advanced disease // *Am. J. Clin. Oncol.* 2011. Vol. 34 (5). P. 454–459.
15. Mukherjee S., Das S.K. Translocator protein (TSPO) in breast cancer // *Curr. Mol. Med.* 2012. Vol. 12. P. 443–457.
16. Patard J.-J., Leray E., Rioux-Leclercq N. et al. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience // *J. Clin. Oncol.* 2005. Vol. 23. P. 2763–2771.
17. Simpson E.R., Waterman M.R. Regulation by ACTH of steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex // *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 1983. Vol. 61. P. 692–707.
18. Veenman L., Papadopoulos V., Gavish M. Channel-Like Functions of the 18-kDa Translocator Protein (TSPO): Regulation of Apoptosis and Steroidogenesis as Part of the Host-Defense Response // *Curr. Pharm. Des.* 2007. Vol. 13. P. 2385–2405.

Поступила 14.03.13