

УДК 617.51/.53-006.61:576.322:577.2

Актинсвязывающие белки системного кровотока при раке гортани: связь с циркулирующими опухолевыми клетками и клетками иммунной системы

Г. В. Какурина*, М. Н. Стахеева, И. А. Бахронов, Е. Е. Середа, О. В. Черемисина, Е. Л. Чойнзонов, И. В. Кондакова

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, 634050 Россия

*E-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru

Поступила в редакцию 13.04.2021

Принята к печати 30.07.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11413

РЕФЕРАТ Рассмотрена перспективность использования актинсвязывающих белков (АСБ), циркулирующих в системном кровотоке, в качестве дополнительных прогностических факторов опухолевого заболевания. Оценка связи циркулирующих АСБ с их возможными клеточными источниками в системном кровотоке поможет определить их диагностическую ценность. С этой целью уровень АСБ, циркулирующих в кровотоке, сопоставлен с количеством АСБ в лейкоцитах и опухолевых клетках (ЦОК), циркулирующих в крови больных высокоагрессивным плоскоклеточным раком гортани. Уровень циркулирующих АСБ (кофилина (CFL1), профилина (PFN1), эзрина (EZR), фасцина (FSCN1) и белка 1, ассоциированного с аденилилциклазой (CAP1)) определяли с использованием иммуноферментного анализа. Экспрессию АСБ в клеточных пулах анализировали методом проточной цитофлуориметрии. В сыворотке крови больных раком гортани наиболее представлены белки FSCN1 и EZR. Лейкоциты и ЦОК различались уровнем экспрессии АСБ. Лейкоциты были в основном представлены пулами CAP1+ и FSCN1+, ЦОК – субпопуляциями CAP1+, FSCN1+ и EZR+. Уровень FSCN1 в сыворотке коррелировал с количеством лейкоцитов FSCN1+ и CFL1+. Возможно, уровень EZR в циркуляции связан с его экспрессией в ЦОК, а уровень CFL1 и PFN1 поддерживается их экспрессией лейкоцитами. Источником FSCN1 и CAP1 в крови могут быть как ЦОК, так и лейкоциты. Выявленные закономерности могут быть обусловлены тканевой специфичностью плоскоклеточного рака гортани и/или отражать иммунный ответ на опухолевый рост в целом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА актинсвязывающие белки, циркулирующие опухолевые клетки, лейкоциты, плоскоклеточный рак гортани.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РГ – плоскоклеточный рак гортани; АСБ – актинсвязывающие белки; ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки; CAP1 – белок 1, ассоциированный с аденилилциклазой; CFL1 – кофилин 1; PFN1 – профилин 1; EZR – эзрин; FSCN1 – фасцин 1.

ВВЕДЕНИЕ

Основной причиной смертности онкологических больных считается метастазирование. Изучение биологических процессов, связанных с метастазированием, важно для поиска прогностических маркеров опухолевой прогрессии [1]. Активно ведутся исследования по профилированию протеома сыворотки/плазмы крови онкологических больных с помощью масс-спектрометрических методов.

Плоскоклеточный рак гортани (РГ) – один из агрессивных типов рака, что делает его хорошей моделью для изучения механизмов метастазирования [2–4]. Ранее мы выявили различия в составе протеома сыворотки крови больных РГ и здоровых доноров, а также связь нескольких функционально различных белков, в том числе актинсвязывающего белка CAP1 (белок 1, ассоциированный с аденилилциклазой) [4], с метастазированием РГ.

Актинсвязывающие белки (АСБ) координируют перестройку актинового цитоскелета, которая тесно связана с метастазированием. Достаточно широко исследуется уровень АСБ в опухолях [5–7], АСБ, циркулирующие в системном кровотоке (цАСБ), изучены недостаточно. Ранее обнаружено изменение сывороточных уровней САР1, профилина 1 и фасцина 1 у больных РГ со стадией Т3-4N0-1M0 по сравнению с Т1N0M0 [8]. Уровень цАСБ в системном кровотоке, вероятно, может поддерживаться несколькими источниками, в том числе иммунными и циркулирующими опухолевыми клетками (ЦОК). Связь между цАСБ и их возможными клеточными источниками в системном кровотоке практически не изучена. Поэтому в настоящей работе уровень цАСБ в сыворотке крови сопоставлен с их экспрессией в популяциях лейкоцитов и ЦОК системного кровотока с целью определения связи между этими показателями. В качестве модели агрессивного типа опухоли с высокой вероятностью метастазирования использовали образцы периферической крови больных РГ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материал и характеристика групп

В исследование вошли 13 больных РГ, стадии Т2-4N0-2M0 (Т2-4N0M0 – четыре человека, Т2-4N1-2M0 – девять), с морфологически верифицированным диагнозом, которые не получали противоопухолевого лечения. Средний возраст больных составил 57 (52–63) лет. Сыворотку крови для иммуноферментного анализа получали по утвержденному протоколу и хранили при -80°C . При проведении проточной цитофлуориметрии использовали образцы свежесобранной крови. Все манипуляции проведены при условии добровольного участия и конфиденциальности в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 года. Исследование разрешено этическим комитетом НИИ онкологии ТНИМЦ. Все участники исследования подписали информированное согласие.

Методы исследования

Анализ цАСБ периферической крови проводили с помощью иммуноферментного метода на микропланшетном ридере Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции к наборам. Использовали наборы ELISA (Cloud-Clone Corp.): САР1 (SEB349Hu), PFN1 (SEC233Hu), CFL1 (SEB559Hu), FSCN1 (EB757Hu), EZR (SEB297Hu).

Экспрессию АСБ в лейкоцитах и ЦОК анализировали методом проточной цитофлуориметрии на цитофлуориметре BD FACS Canto II (BD, США). Общий пул лейкоцитов и популяции ЦОК идентифицировали, используя мечение клеток крови специфическими флуоресцентными маркерами CD45 (AF700 (BD)) и ЕpСАМ (PerCPCy5.5 (BD)) соответственно. Экспрессию АСБ в клеточных пулах оценивали с использованием моноклональных антител мыши против эзрина (pY353) человека, конъюгированных с AF488 (BD); поликлональных антител кролика против CFL1 человека, конъюгированных с APC (Cloud-Clone Corp); поликлональных антител кролика против PFN1 человека, конъюгированных с AF647 (Cloud-Clone Corp); поликлональных антител кролика против FSCN1 человека, конъюгированных с PE (Biorbyt); неконъюгированных моноклональных антител кролика против САР1 человека (Abcam, Великобритания); козьих антител против антител кролика, конъюгированных с AF488 (Abcam) в качестве вторых антител для САР1. Стратегия гейтирования включала этапы разделения клеток крови на CD45+ клетки (лейкоциты) и CD45- клетки. Из гейта CD45+ лейкоцитов выделяли гейты САР1+, EZR+, PFN1+, CFL1+, FSCN1+ клеток и определяли их количество в процентах от общего пула лейкоцитов. Из гейта CD45- клеток выделяли CD326 (ЕpСАМ)+ клетки, принимая их за циркулирующие опухолевые клетки, из ЦОК CD326 (ЕpСАМ)+ последовательно выделяли названные выше популяции и оценивали их количество в пуле ЦОК. Результаты выражали как % CD45+ и ЕpСАМ+ клеток, экспрессирующих указанные АСБ.

Статистический анализ

Данные обрабатывали с помощью программы IBM SPSS Statistics 22.0. Существование связи и ее силу оценивали с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Результаты представлены в виде Me (Q1; Q3), где Me – медиана, Q1 и Q3 – нижний и верхний квартили. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью иммуноферментного анализа мы определили содержание цАСБ в сыворотке крови больных РГ. Наибольшими были уровни FSCN1 и EZR, медианы которых составили 1.8 (0.43–8.1) и 2.1 (1.69–2.56) нг/мл соответственно, наименьшими – САР1, затем PFN1 и CFL1, медианы которых составили 0.11 (0.08–1.15), 0.28 (0.23–0.38) и 0.78 (0.63–1.14) нг/мл соответственно. Разброс со-

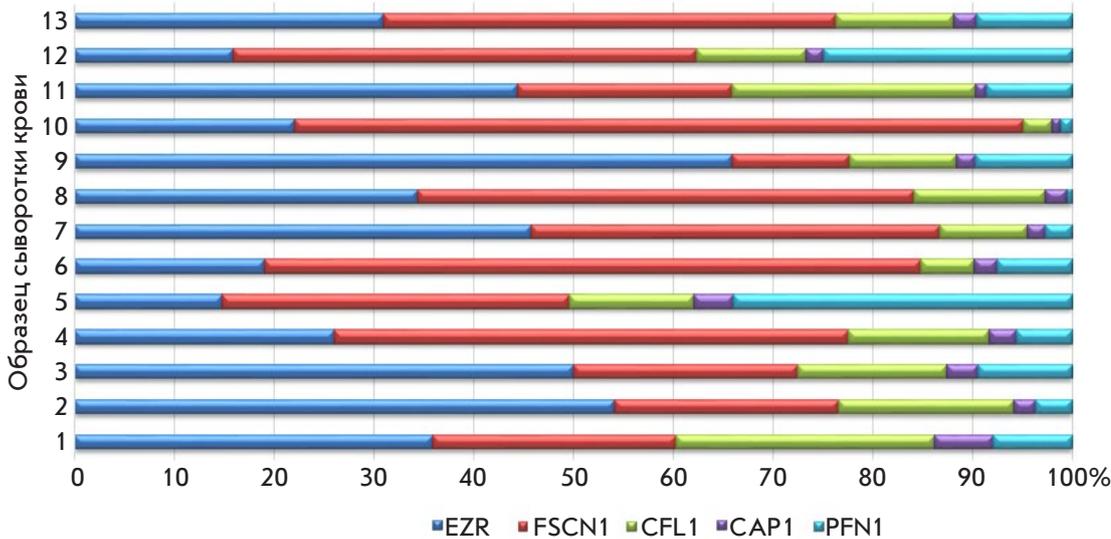


Рис. 1. Уровни циркулирующих актинсвязывающих белков в сыворотке крови больных плоскоклеточным раком гортани. По оси ординат – образцы сыворотки крови, взятые у больных РГ, по оси абсцисс – относительное количество актинсвязывающих белков, в % от суммарного содержания цАСБ, принятого за 100%

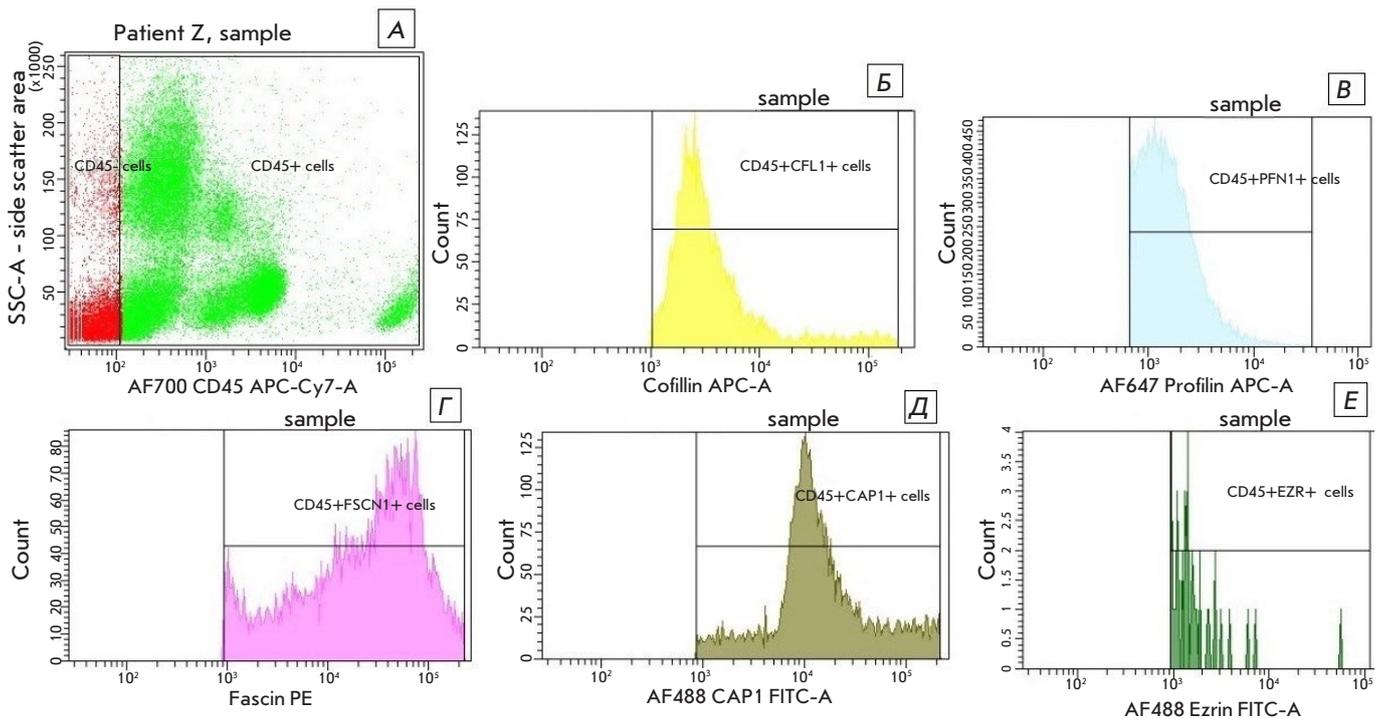


Рис. 2. Относительное количество лейкоцитов, экспрессирующих актинсвязывающие белки CD45+, у больных раком гортани. А – гейты CD45- и CD45+ клеток периферической крови. Гистограммы содержания актинсвязывающих белков в CD45+ клетках: Б – уровень CD45+ клеток, содержащих CFL1; В – уровень PFN1-содержащих CD45+ клеток; Г – уровень FSCN1-содержащих CD45+ клеток; Д – уровень CAP1-экспрессирующих и Е – уровень EZR-содержащих CD45+ клеток

держания каждого из этих белков в сыворотке крови больных РГ представлен на рис. 1.

Далее определено содержание АСБ в пулах ЦОК (CD45-CD326+) и лейкоцитов (CD45+CD326-) в цельной крови больных РГ. На представленной выборке больных РГ показано, что медиана уровня ЦОК CD45-CD326+ составила 0.006 (0.00–0.1) %

от всех клеточных элементов крови (на 50000 клеток крови). Выявлены различия в относительном содержании всех АСБ в популяциях ЦОК CD45-CD326+ и CD45+ лейкоцитов (рис. 2, 3).

Относительное количество CD45-CD326+ ЦОК и CD45+ лейкоцитов, экспрессирующих АСБ, у больных РГ представлено в таблице. У больных РГ ЦОК

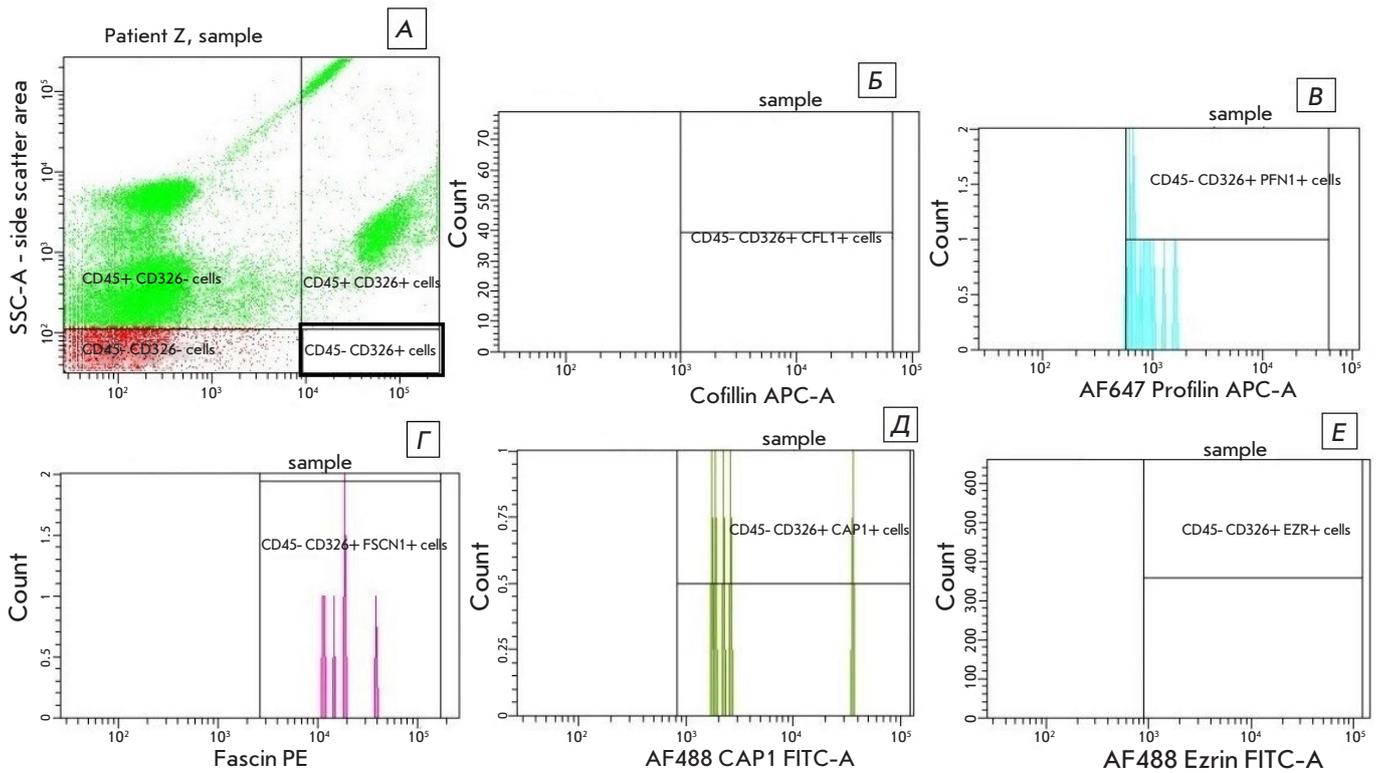


Рис. 3. Относительное количество содержащих актинсвязывающие белки опухолевых клеток (CD45-CD326+), циркулирующих в периферической крови больных раком гортани. А – гейт CD45-CD326+ клеток (ЦОК) периферической крови. Гистограммы содержания актинсвязывающих белков в ЦОК: Б – уровень ЦОК, содержащих CFL1; В – уровень PFN1-содержащих ЦОК; Г – уровень FSCN1-содержащих ЦОК; Д – уровень CAP1-экспрессирующих и Е – уровень EZR-содержащих ЦОК

CD45-CD326+ в основном представлены субпопуляциями FSCN1+ и CAP1+, медиана которых составила 91.8 (87.2–100) и 87.0 (61.5–100) % соответственно. Снижено содержание ЦОК CD45-CD326+, экспрессирующих PFN1 и CFL1: 0.2 (0.0–0.5) и 0.3 (0.0–0.5) % соответственно. Популяция CD45+ лейкоцитов представлена в основном CAP1+ и FSCN1+ клетками: 45.3 (4.6–55.3) и 34.5 (31.3–72.1) % соответственно. Понижено содержание субпопуляции EZR+ CD45+ лейкоцитов, доля которой составила 0.3 (0.14–0.91) %. EZR экспрессировался в основном ЦОК – 51.5 (39.3–85.4) %.

Анализ взаимосвязей уровня цАСБ и количества клеточных субпопуляций, экспрессирующих соответствующий белок, выявил связи средней силы. Так, уровень циркулирующего FSCN1 коррелировал с количеством FSCN+ и CFL1+ субпопуляциями CD45+ лейкоцитов ($r = 0.7$; $p = 0.03$). Также в кровотоке больных РГ выявлены связи между изучаемыми пулами, экспрессирующими АСБ. Отмечена отрицательная связь между пулом CD45-CD326+ лейкоцитов, содержащих FSCN+, и CD45+ лейкоцитами, содержащими FSCN+ ($r = -0.7$; $p = 0.01$)

Уровень актинсвязывающих белков (АСБ) в сыворотке крови, относительное количество CD45-CD326+ циркулирующих опухолевых клеток и CD45+ лейкоцитов, экспрессирующих актинсвязывающие белки, у больных плоскоклеточным раком гортани

цАСБ	Лейкоциты, CD45+, %	ЦОК, CD45-CD326+, %	Сыворотка крови, нг/мл
EZR	0.6 (0.3–1.0)	51.5 (39.3–85.4)	1.2 (0.9–1.7)
FSCN1	34.5 (31.3–72.1)	91.8 (87.2–100)	1.5 (0.8–2.2)
CFL1	12.0 (8.5–39.1)	0.3 (0.0–0.5)	0.5 (0.3–0.6)
CAP1	45.3 (4.6–55.3)	87.0 (61.5–100)	0.10 (0.06–0.14)
PFN1	5.7 (4.0–13.2)	0.2 (0.0–0.5)	0.2 (0.1–0.4)

и CFL1+ ($r = -0.7$; $p = 0.03$). Обнаружена положительная связь между CAP1+ CD326+ и CAP1+ CD45+ ($r = 0.7$; $p = 0.02$). На уровне лейкоцитарного пула выявлена связь между EZR+ и CFL1+ CD45+ лейкоцитами.

В настоящей работе показано, что содержание белков FSCN1 и EZR в системном кровотоке больных РГ было выше, чем других цАСБ. Установлено, что лейкоциты и ЦОК в периферической крови различаются экспрессией АСБ. Выявлена связь между сывороточным уровнем FSCN1 и количеством FSCN- и CFL1-содержащих CD45+ лейкоцитов. Отмечено, что в обеих клеточных популяциях была увеличена экспрессия CAP1 и FSCN1. Однако отмечены выраженные различия в содержании этих белков в ЦОК и лейкоцитах. Если практически все ЦОК содержали CAP1 и FSCN1, то доля CAP1+ и FSCN1+ лейкоцитов была ниже в 2 и 3 раза соответственно. В популяции CD45+ лейкоцитов практически отсутствовали клетки, содержащие EZR, в то время как доля EZR+ CD326+ составляла 51.5% от пула ЦОК. CFL1 и PFN1 содержались в лейкоцитах, но практически отсутствовали в ЦОК. Таким образом, опухолевые клетки, циркулирующие в крови больных РГ, могут экспрессировать несколько АСБ – EZR, CAP1 и FSCN1.

Сопоставляя результаты проточной цитофлуориметрии и иммуноферментного анализа, можно предположить, что присутствие EZR в циркуляции может быть связано с его наличием в ЦОК. Уровень циркулирующих в крови CFL1 и PFN1 поддерживается, вероятно, экспрессией этих белков лейкоцитами. Сывороточный уровень FSCN1 и CAP1 может быть связан как с ЦОК, так и с лейкоцитами.

Участие АСБ в патогенезе опухолевых заболеваний изучено в основном, исходя из результатов определения их тканевого уровня [7, 9, 10]. В качестве прогностического маркера опухолей

головы и шеи предложено использовать уровни фасцина в тканях опухолей этой локализации [https://www.proteinatlas.org; 11]. Итак, опубликованы результаты изучения АСБ в тканях новообразований, в которых наиболее вероятным и основным источником этих белков являются опухолевые клетки. Значение цАСБ при патологических состояниях, в том числе и при опухолях, изучено крайне мало. Например, показано, что внеклеточный гельзолин (pGSN) расщепляет актин, который может высвобождаться при повреждении клеток [12]. Вероятно, АСБ, изученные в представленной работе, также функционально активны в сыворотке крови, что может стать предметом следующих исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые получены данные о связи функционально различных АСБ, циркулирующих в системном кровотоке, с популяциями ЦОК и иммунных клеток, экспрессирующих соответствующие белки при раке гортани. Выявленные связи и различия в содержании АСБ в ЦОК и лейкоцитах могут быть связаны как со специфичностью опухоли этой локализации, так и/или отражать иммунный ответ организма на опухолевый рост в целом. Для окончательных выводов необходимо продолжение работы с увеличением количества больных РГ и включением дополнительных клинико-морфологических параметров. ●

*Работа поддержана грантом
РФФИ № 20-015-00151.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гапонова А.В., Родин С., Мазина А.А., Волчков П.В. // Acta Naturae. 2020. Т. 12. № 3(46). С. 4–23. doi: 10.32607/actanaturae.11010
- Bhawal R., Oberg A.L., Zhang S., Kohli M. // Cancers (Basel). 2020. V. 12. № 9. P. 2428. doi:10.3390/cancers12092428
- Gasparri R., Sedda G., Noberini R., Bonaldi T., Spaggiari L. // Proteomics Clin. Appl. 2020. V. 14. № 5. P. 1900138. doi: 10.1002/prca.201900138
- Какурина Г.В., Кондакова И.В., Черемисина О.В., Шишкин Д.А., Чойнзонов Е.Л. // Бюл. экп. биол. и мед. 2015. Т. 160. № 11. С. 648–651.
- Gross S.R. // Cell Adh Migr. 2013. V. 7. № 2. P. 199–213. doi: 10.4161/cam.23176
- Liu H., Cui J., Zhang Y., Niu M., Xue X., Yin H., Tang Y., Dai L., Dai F., Guo Y., et al. // IUBMB Life. 2019. V. 71. № 11. P. 1771–1784. doi: 10.1002/iub.2121
- Kakurina G.V., Kolegova E.S., Kondakova I.V. // Biochemistry (Moscow). 2018. V. 83. № 1. P. 45–53.
- Какурина Г.В., Шашова Е.Е., Черемисина О.В., Чойнзонов Е.Л., Кондакова И.В. // Сибирский онкологический журн. 2020. Т. 19. № 4. С. 88–93.
- Coumans J.V.F., Davey R.J., Moens P.D.J. // Biophys. Rev. 2018. V. 10. № 5. P. 1323–1335.
- Izdebska M., Zielińska W., Grzanka D., Gagat M. // BioMed. Res. Int. 2018. V. 2018. P. 4578373. doi: 10.1155/2018/4578373
- Papaspyrou K., Brochhausen C., Schmidtman I., Fruth K., Gouveris H., Kirckpatrick J., Mann W., Brieger J. // Oncol. Lett. 2014. V. 7(6). P. 2041–2046.
- Piktel E., Levental I., Durnaš B., Janmey P.A., Bucki R. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 9. P. 2516.