

УДК 616.65-006-018.2-037

РОЛЬ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ЦИКЛИНОВ В1 И D1, А ТАКЖЕ СТРОМАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ОЦЕНКЕ ПРОГНОЗА НОВООБРАЗОВАНИЯ

А.К. Гриб, С.А. Ляликов, В.А. Басинский,
С.Э. Савицкий, О.Е. Кузнецов

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

УЗО «Гродненская областная клиническая больница»

На основании анализа связей между продолжительностью жизни больных раком предстательной железы, уровнем экспрессии гладкомышечного актина в строме и сосудах, циклинов В1 и D1 в опухолевых, стромальных и эндотелиальных клетках, сосудистым компонентом, построена регрессионная модель прогнозирования выживаемости больных в послеоперационном периоде. Статистическая характеристика коэффициентов регрессии и уравнения в целом свидетельствует о достаточной надежности полученной модели.

Ключевые слова: рак предстательной железы, циклины, гладкомышечный актин, неоангиогенез, прогноз.

Based on the analysis of relations between the life span of prostate cancer patients, the expression level of unstriated actin in stroma and vessels, cyclins B1 and D1 in the tumor, stromal and endothelial cells and a vascular component a regression model of survival rate prognosis of patients in postoperative period has been formed. The statistical characteristic of regression indices and the equation as a whole is evidence of the sufficient reliability of the received model.

Key words: prostate cancer, cyclins, unstriated actin, neoangiogenesis, prognosis.

Актуальность проблемы

Циклинами называют белки, играющие важную роль в клеточной пролиферации. Они в комплексе с соответствующими циклинзависимыми киназами регулируют продвижение клетки по этапам клеточного цикла, а затем подвергаются убиквитин-зависимому протеолизу. В каждой стадии цикла активен определенный комплекс циклин-циклинзависимая киназа (Cdk). При переходе из покоящегося состояния (G0) в пресинтетическую фазу пролиферативного процесса (G1) образуется комплекс циклин D-Cdk4 (или Cdk6, в зависимости от типа клеток) Комплекс циклин E-Cdk2 активируется в поздней G1 фазе, циклин A-Cdk2 – в синтетическую (S) и начальный период премитотической (G2) фаз. Поздняя стадия G2 и переход к митозу контролируется комплексом циклин B-Cdk1. Синтез циклина D1 знаменует переход клетки из фазы G0 в G1. Комплекс циклин D-Cdk4/6 образуется в цитоплазме и транспортируется в ядро белками p21^{waf1}, p27Kip1 и p57Kip2. Примерно в середине G1-фазы циклин D-Cdk4/6 и активированный циклин E-Cdk2 фосфорилируют белок pRb, в результате чего высвобождаются транскрипционные факторы E2F-DP (E2F-1, -2, -3, -4, -5 и DP-1, -2, -3). Эти факторы регулируют активность ряда генов, продукты которых необходимы для начала и прохождения S-фазы, [1]. Циклин D1 полностью расщепляется к концу фазы G1. На ранних этапах S фазы происходит быстрая деградация циклина E, и Cdk2 связывается с циклином A, образуя комплекс, необходимый для репликации ДНК [2], и для нормального течения профазы митоза [3]. В конце G2 фазы циклин B связывается с Cdk1. Считает-

ся, что образование комплекса циклин B - Cdk1 является «точкой безвозвратности» («point of no return») митоза – моментом, после которого регуляторные воздействия уже не могут предотвратить вход в митоз [4]. К началу анафазы циклин B полностью деградирует.

Цель исследования: на основании анализа уровня экспрессии гладко-мышечного актина, циклинов В1 и D1, морфометрических параметров сосудистого компонента построить регрессионную модель для прогнозирования длительности жизни при раке предстательной железы.

Материалы и методы

Материалом для исследования стали 47 наблюдений рака предстательной железы, полученные при трансуретральной резекции за период с 1996 по 2000 годы. Проведено гистологическое исследование операционного материала с определением дифференцировки опухоли по Глиссону, оценка клинических данных с учетом наличия или отсутствия метастазов и продолжительности жизни больных. Для выявления циклинов В1 и D1 использовались мышинные моноклональные антитела анти В1-v152 анти-D1 клон DCS-6 в разведении 1:50, для выявления сосудов – антитела к рецепторам CD31, клон JC70A, гладкомышечного актина – клон 1A4.

При оценке результатов иммуногистохимической реакции применялись полуколичественные критерии, а также программы Aperio Image Scope и WCIF Image J.

Статистическая обработка результатов производилась с использованием пакета прикладных статистических программ Statistica 6.0

Результаты проведенного исследования

С помощью корреляционного анализа (Spearman) оценена связь между продолжительностью жизни пациентов и изученными морфологическими показателями. Выявлено, что достоверно отрицательно с числом прожитых месяцев связаны суммарная площадь сосудов ($r=-0,36, p=0,01$), общий их периметр ($r=-0,28, p=0,05$), средняя площадь сосуда ($r=-0,32, p=0,03$), фракция площади сосудов ($r=-0,37, p=0,01$), и площадь их внутреннего сечения ($r=-0,51, p=0,0003$). Продолжительность жизни непосредственно с уровнем экспрессии циклинов не коррелировала, однако была высоко достоверно положительно связана с отношением циклина B1 к D1 ($r=0,36, p=0,01$). Учитывая этот результат, проанализировано соотношение циклинов в опухолевых клетках, стромальной ткани и эндотелии сосудов. Оказалось, что в опухолевых клетках значительно чаще, чем в стромальных или эндотелиальных наблюдается дисбаланс B1 и D1 (табл. 1), причем в большем числе случаев отмечается превалирование экспрессии B1 по сравнению с D1.

Таблица 1 – Варианты соотношения циклинов B1 и D1 в различных видах клеток

Клетки	Соотношение уровня экспрессии циклинов		
	B1>D1	B1=D1	B1<D1
1 Опухолевые	30 (63,83%)	7 (14,89%)	10 (21,28%)
2 Стромальные	12 (25,53%)	33 (70,21%)	2 (4,26%)
3 Эндотелиальные	10 (21,28%)	34 (72,34%)	3 (6,38%)
P_{1-2}	<0,0004	<0,0001	<0,02
P_{1-3}	<0,0002	<0,0001	<0,05

На следующем этапе все анализируемые случаи распределены в группы в зависимости от величины экспрессии циклинов B1 и D1. При этом, с целью исключения влияния неспецифических ростовых факторов, группирование производили по скорректированному уровню экспрессии – разности, полученной при вычитании величины экспрессии соответствующего циклина в опухолевых и стромальных клетках в одном и том же образце.

$$D1_{\text{коррект}} = D1_{\text{опухоль}} - D1_{\text{строма}}$$

$$B1_{\text{коррект}} = B1_{\text{опухоль}} - B1_{\text{строма}}$$

Результаты группировки представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Распределение наблюдений в зависимости от величины скорректированной экспрессии циклинов B1 и D1

Величина D1 _{коррект}	4-6	1-3	4-6	1-3	1-3
Величина B1 _{коррект}	5-6	1-2	1-2	3-4	5-6
Количество случаев	15	11	6	8	7
Группа	1	2	3	4	5

Статистические показатели продолжительности жизни пациентов в послеоперационном периоде зависимости от вида сочетания скорректированной экспрессии циклинов B1 и D1 представлены на рисунке 1. Наиболее низкая выживаемость наблюдалась как при высокой, так и при низкой экспрессии обоих циклинов (1-я группа: $M=26,27$ месяцев, $SD=\pm 17,88$, 2-я группа: $M=36,27$ месяцев, $SD=\pm 26,18$). Самая высокая продолжительность имела место в 5-й группе при низкой экспрессии

циклина D1 и высокой – B1 ($M=70,14$ месяцев, $SD=\pm 35,84$, по сравнению с 1-й группой $p_{1-5}=0,02$, по сравнению со 2-й группой $p_{2-5}=0,04$).

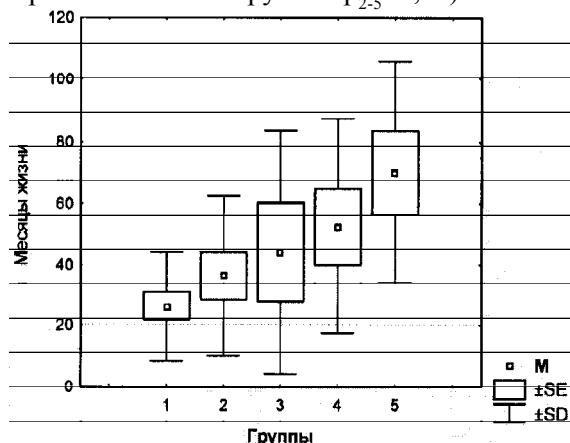


Рисунок 1 - Величины средней продолжительности жизни (M), ошибки средней ($\pm SE$) и среднего квадратического отклонения ($\pm SD$) в зависимости от вида сочетания скорректированной экспрессии циклинов B1 и D1

Сходная картина была получена при анализе зависимости площади, занимаемой актином от вида сочетания скорректированной экспрессии циклинов B1 и D1 (рисунок 2). В образцах 4-й и 5-й групп площадь актина была существенно выше, чем в 1-й группе ($p_{1-4}=0,02, p_{1-5}=0,04$). В то же время наибольшая внутренняя площадь сечения сосудов определялась в образцах 1-й группы (по сравнению с группами 4 и 5 $p=0,04$ в обоих случаях) (рис. 3).

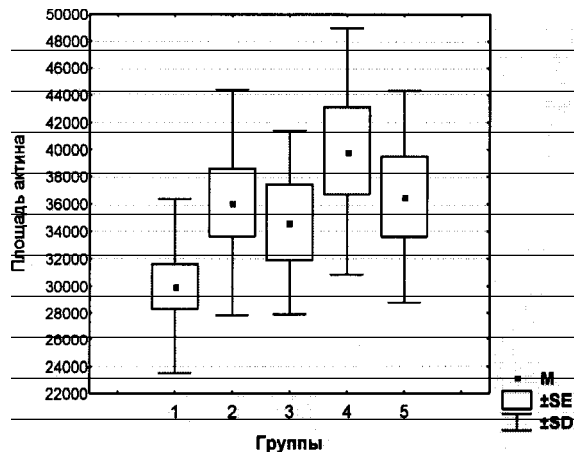


Рисунок 2 - Площадь, занимаемая актином в зависимости от вида сочетания скорректированной экспрессии циклинов B1 и D1

Анализ зависимости величины средней продолжительности жизни (зависимая переменная) от всей совокупности изученных морфометрических показателей проведен с помощью уравнения множественной регрессии. Статистические данные и знаки коэффициентов регрессии показывают, что достоверно положительно с продолжительностью жизни больных связано соотношение экспрессии циклинов B1 и D1 в эндотелии сосудов и в опухолевых клетках, скорректированной с учетом стромальной

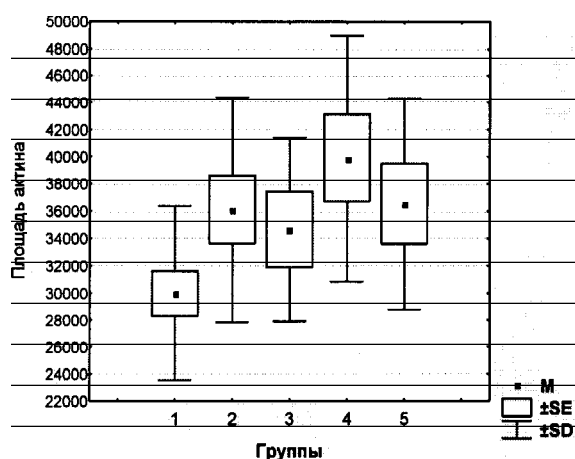


Рисунок 3 - Внутренняя площадь сечения сосудов в зависимости от вида сочетания скорректированной экспрессии циклинов B1 и D1

экспрессии, а также вид сочетания (номер группы) скорректированной экспрессии этих циклинов (табл. 3). Достоверно отрицательно выживаемость связана с показателем фракции площади сосудов, внутренней площадью сечения, площадью актина и соотношением экспрессии циклинов B1 и D1 в опухолевых клетках.

Таблица 3 – Коэффициенты уравнения регрессии и их статистические характеристики

Показатели (регрессоры)	B	Ошибка B	t	p
Свободный член	192.360	53.810	3.57	0.001
Номер группы	11.121	2.706	4.10	0.0002
Фракция площади	-412.288	132.595	-3.10	0.004
Внутренняя площадь сечения	-0.462	0.104	-4.40	0.0001
Площадь экспрессии актина	-0.002	0.001	-2.85	0.007
B1 _{коррект} / D1 _{коррект}	51.896	17.534	2.95	0.005
B1 / D1 (в опухолевых клетках)	-41.420	16.489	-2.51	0.02
B1 / D1 (в эндотелии)	13.748	5.997	2.29	0.03
Количество актиновых волокон	0.078	0.070	1.11	0.2

Множественный коэффициент корреляции (Multiple R) между зависимой и независимыми переменными составил 0,812, соответственно Multiple R²=0,660. Это значит, что предложенное уравнение описывает 66% общей дисперсии, F=8,98, p<10⁻⁶. Стандартная ошибка оценки составляет ±20,5 месяцев.

Характерно распределение остатков уравнения регрессии относительно предсказанных значений (рисунок 4) и график остатков на нормальной вероятностной бумаге (рисунок 5), а низкие значения коэффициента автокорреляции первого порядка (r=-0,270, p=0,09) свидетельствуют об отсутствии гетероскидности и достаточной надежности поученной модели.

Таким образом, можно предположить, что выявленная зависимость продолжительности жизни от соотношения экспрессии циклинов обусловлена связью между интенсивностью синтеза и метаболизма последних и степенью злокачественности опухоли. Так, повышенный уровень циклина D в цитоплазме может свидетельствовать как об интенсивном его синтезе, связанном с воздействием ростовых факторов, так и о нарушении его транс-

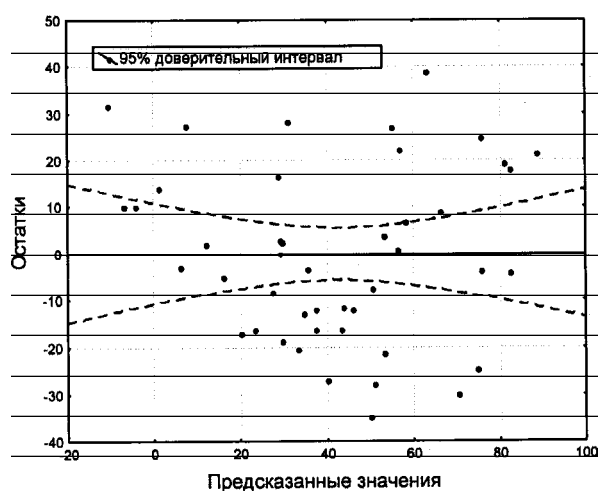


Рисунок 4 - Распределение остатков уравнения регрессии относительно предсказанных значений

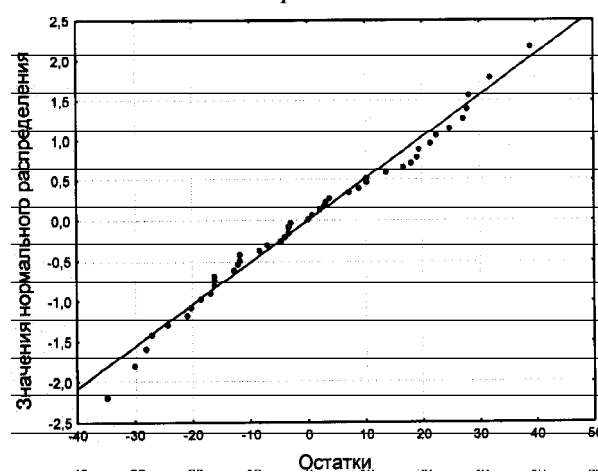


Рисунок 5 - Распределение остатков на нормальной вероятностной бумаге

порта в ядро. Применительно к опухолевой клетке первый вариант свидетельствует о более высокой злокачественности, второй – о сохраненной функции антионкогенов, продукты которых препятствуют попаданию циклина D в ядро, что приведет к остановке клеточного цикла в G1.

Аналогично повышение циклина B в цитоплазме опухолевых клеток может быть отражением высокой пролиферативной активности и, соответственно, злокачественности. С другой стороны, секвестрирование комплекса циклин B-Cdc2 в цитоплазме может происходить под влиянием продукта гена 14-3-3-s, транскрипцию которого стимулирует продукт одного из основных антионкогенов – белок p53. Связывание белком 14-3-3-s комплекса циклин B-Cdc2 препятствует попаданию последнего в ядро и вызывает остановку клеточного цикла в G2. Очевидно, что сохраненная функция антионкогенов в опухолевой клетке – признак меньшей злокачественности.

Рассмотрим варианты сочетаний различных уровней циклинов. Высокая экспрессия обоих исследованных циклинов (1-я группа), очевидно, свидетельствует о высокой пролиферативной и недостаточной антионкогенной активности. Высокий

цитоплазматический уровень циклина В на фоне высокого D не может быть следствием эффектов p53, так как последний стимулирует синтез белка p21^{Waf1}, функцией которого является транспорт циклина D из цитоплазмы в ядро. Таким образом, данное сочетание свидетельствует о высокой злокачественности опухолевых клеток и плохом прогнозе в плане продолжительности жизни.

Одновременно низкая экспрессия циклинов В и D опухолевыми клетками (2-я группа), вероятно, является результатом нарушения функции антионкогенных белков, вследствие чего не происходит остановки клеточного цикла в контрольных точках (check points) и блокируется запуск апоптоза. Этот вариант также сопровождается низкой продолжительностью жизни.

Средняя и высокая цитоплазматическая экспрессия циклина В на фоне низкой экспрессии циклина D (соответственно 4 и 5 группы) с большой вероятностью является свидетельством остановки клеточного цикла в контрольной точке G2. В этом случае циклин В не поступает в ядро клетки и скапливается в цитоплазме. Чем эффективнее работает p53, тем выше цитоплазматическая экспрессия циклина В и тем самым ниже злокачественность опухоли и выше выживаемость. Уровень циклина D при этом не высокий, так как пролиферативная активность умеренная, а, кроме того, контрольную точку G1 клетка проходит беспрепятственно.

Высокая экспрессия циклина D в сочетании с низкой экспрессией циклина В (3-я группа) может быть обусловлена 2 причинами: 1-я – высокая пролиферативная активность опухоли как следствие высокой ее злокачественности, 2-я – остановка клеточного цикла в G1, что свидетельствует о наличии антионкогенной активности и, таким образом, более низкой злокачественности. Вероятно, в 3-ю группу вошли оба указанных варианта, поэтому продолжительность жизни представителей этой группы имела самую большую, по сравнению с остальными группами, вариабельность (M=44,00 месяцев, SD=±39,73) и колебалась от 7 до 102 месяцев.

Связь вида сочетания экспрессии циклинов В1 и D1 с площадью, занимаемой актином и степенью васкуляризации можно объяснить ролью, которую играют антионкогены в контроле ангиогенеза. Известно, что ключевое значение в неоангиогенезе играет VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), фактор, стимулирующий размножение и миграцию эндотелиоцитов, его синтез существенно увеличивается при активации некоторых онкогенов. Белок p53, напротив, репрессирует транскрипцию гена VEGF [7, 8] и активирует гены тромбоспондинов, белков, которые ингибируют ангиогенез, вызывая апоптоз эндотелиоцитов [5, 6]. Таким образом, клетки с активированным p53 перестают секретировать VEGF и начинают секретировать ингибиторы ангиогенеза, что препятствует образованию новых сосудов. Кроме того, p53 ак-

тивирует гены гладкомышечного актина. Таким образом, существенные различия в площади сечения сосудов и распространенности актина между образцами 1 и 4-5 групп косвенно подтверждают наши предположения о роли белка p53 в повышении уровня цитоплазматического циклина В на фоне низкой экспрессии циклина D.

Выводы

На основании анализа связей между продолжительностью жизни больных раком предстательной железы и уровнем экспрессии гладкомышечного актина в строме и сосудах, циклинов В1 и D1 в опухолевых, стромальных и эндотелиальных клетках, а также морфометрическими параметрами сосудистого компонента была построена регрессионная модель для прогнозирования выживаемости. Высоко достоверные статистические характеристики коэффициентов регрессии и уравнения в целом (Multiple R=0,812, Multiple R²=0,660, F=8,98, p<10⁻⁶) свидетельствуют о достаточной надежности полученной модели. Обсуждена неслучайность выявленных связей: проанализированы возможные причины различных вариантов экспрессии циклинов В1 и D1 и связь этих вариантов со степенью злокачественности опухоли и прогнозом. Предположено следующее.

- Высокая экспрессия обоих исследованных циклинов в сочетании с повышенной площадью сечения сосудов и низкой распространенностью актина свидетельствует о высокой пролиферативной и недостаточной антионкогенной активности, является плохим прогностическим фактором.

- Средняя и высокая цитоплазматическая экспрессия циклина В на фоне низкой экспрессии циклина D, невыраженной васкуляризации и повышенного количества актина является свидетельством умеренной пролиферативной и сохраненной антионкогенной активности. При раке простаты этому варианту сопутствует наиболее высокая выживаемость.

- Сочетание высокой экспрессии циклина D и низкой экспрессии циклина В выявляется у гетерогенной в плане продолжительности жизни группы больных.

Литература

1. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. 2000. Биохимия, 65(1):5-33.
2. Bashir T, Horlein R, Rommeleare J, Willwand K. Cyclin A activates the DNA polymerase γ -dependent elongation machinery in vitro: a parvovirus DNA replication model. 2000. Proc Natl Acad Sci USA, 97(10):5522-5527.
3. Furuno N, den Elzen N, Pines J. Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. 1999. J Cell Biol, 147(2):295-306.
4. Pines J and Rieder CL. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. 2000. Nature Cell Biology, 3: E3-E6.
5. Dameron, K.M., Volpert, O.V., Tainsky, M.A., and Bouck, N. (1994) Science, 265, 1582-1584.
6. Adolf, K.W., Liska, D.J., and Bornstein, P. (1997) Gene, 193, 5-11.
7. Sugihara, T., Kaul, S.C., Mitsui, Y., and Wadhwa, R. (1994) Biochim. Biophys. Acta, 1224, 365-370.
8. Mukhopadhyay, D., Tsiokas, L., and Sukhatme, V.P. (1995) Cancer Res., 55, 6161-6165.

Поступила 28.08.07