

ДЕРМАТООНКОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018
УДК 616-006.81.04-033.2-092

Сергеева О.Н., Палкина Н.В., Аксененко М.Б., Комина А.В., Сергеева Е.Ю., Рукша Т.Г.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ Ki-67 И NFE2L2 В ОРГАНАХ МИШЕНЯХ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ МЕЛАНОМЫ В ПРЕМЕТАСТАТИЧЕСКУЮ ФАЗУ

ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, 660022, г. Красноярск,
Российская Федерация

Известно, что опухолевое микроокружение является активным участником в развитии злокачественных новообразований. Микроокружение опухоли – это функциональная клеточная среда, взаимодействующая с опухолевыми клетками, способствующая росту, пролиферации, инвазии метастазированию опухолевых клеток. В представленной работе рассматриваются особенности уровней экспрессии транскрипционного фактора NFE2L2 и маркера пролиферации Ki-67 в органах мишенях метастазирования меланомы в преметастатическую фазу. Повышение экспрессии Ki-67 в ткани легких, печени и почек и снижение экспрессии NFE2L2 в печени и почках может свидетельствовать о реорганизации структуры и функционирования органов-мишеней метастазирования меланомы на преметастатическом этапе развития опухоли.

Ключевые слова: меланома; опухолевое микроокружение; преметастатическая фаза; пролиферация; антиоксидантная защита; органы-мишени метастазирования; NFE2L2; Ki-67; Pmel.

Для цитирования: Сергеева О.Н., Палкина Н.В., Аксененко М.Б., Комина А.В., Сергеева Е.Ю., Рукша Т.Г. Особенности экспрессии Ki-67 и NFE2L2 в органах мишенях метастазирования меланомы в преметастатическую фазу. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2018; 21(2): 68-71. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9588-2018-21-2-68-71>

Sergeeva O.N., Palkina N.V., Aksenenko M.B., Komina A.V., Sergeeva E.Yu., Ruksha T.G.

FEATURES OF EXPRESSION OF KI-67 AND NFE2L2 IN TARGET ORGANS OF MELANOMA METASTASIS IN PREMETASTATIC PHASE

Krasnoyarsk State Medical University n.a. prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

Tumor microenvironment is known to be an active participant of tumor development. Tumor microenvironment is functional cell community interacting with cancer cells and promoting proliferation, invasion and metastasis of tumor cells. In the article features of Ki-67 and NFE2L2 expression levels in target organs of melanoma metastasis in premetastatic phase are investigated. Increased Ki-67 expression levels in lung tissue, liver and kidneys and decreased NFE2L2 levels in liver and kidneys can be the markers of structural and functional reorganization of melanoma metastasis target organs in premetastatic phase of melanoma development.

Key words: melanoma, tumor microenvironment; pre-metastatic phase; proliferation; antioxidant defense; target organs of metastasis; NFE2L2; Ki-67; Pmel.

For citation: Sergeeva O.N., Palkina N.V., Aksenenko M.B., Komina A.V., Sergeeva E.Yu., Ruksha T.G. Features of expression of Ki-67 and NFE2L2 in target organs of metastasis of melanoma in premetastatic phase. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases (Rossiyskii Zhurnal Kozhnykh i Venericheskikh Boleznei)*. 2018; 21(2): 68-71. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9588-2018-21-2-68-71>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study was supported by Grant of the Russian Science Foundation (project No. 14-15-00074-P).

Received 28 Febr 2018
Accepted 21 March 2018

Для корреспонденции:

Рукша Татьяна Геннадьевна, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой патологической физиологии им. проф. В.В. Иванова ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. E-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

For correspondence:

Ruksha Tatiana G., MD, PhD, DSc., Head of Department of pathophysiology, KrasSMU n.a. prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation. E-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Information about authors:

Sergeeva O.N., <https://orcid.org/0000-0003-0819-1967>; Palkina N.V., <https://orcid.org/0000-0002-6801-3452>;
Aksenenko M.B., <http://orcid.org/0000-0001-7660-700X>; Komina A.V., <http://orcid.org/0000-0002-2269-0298>;
Sergeeva E.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-2089-6022>; Ruksha T.G., <http://orcid.org/0000-0001-8142-4283>.

Ежегодный темп прироста заболеваемости меланомой в мире и составляет 3–8% [1], что представляет собой глобальную проблему не только в связи с ростом заболеваемости, но и с высокой резистентностью меланомы к терапии [2].

Важную роль в развитии и прогрессии опухоли играет опухолевое микроокружение, состоящее из нескольких важных компонентов, включая опухолевые, стромальные и мезенхимальные клетки, кровеносные и лимфатические сосуды, а также инфильтрирующие опухоль иммунные клетки [3]. Компоненты опухолевого микроокружения взаимодействуют с раковыми клетками, изменяя их молекулярный профиль, тем самым способствуя опухолевой прогрессии, инвазии и метастазированию. Кроме того, опухолевое микроокружение участвует в формировании опухолевой резистентности [4]. В клетках микроокружения изменяется уровень пролиферации, дифференцировки, экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора [5]. Несколько видов стромальных клеток, включая эндотелиальные, клетки иммунной системы и фибробласты, выделяющие факторы роста, способствующих росту и пролиферации злокачественных клеток в микроокружении опухоли, признаны возможными объектами для снижения резистентности к противоопухолевой терапии и рецидива опухоли. Экспериментально выявлено, что воздействие на стромальные фибробласты вызывает подавление пролиферации клеток меланомы [6]. Таким образом, микроокружение опухоли играет важную роль в механизмах метастатического процесса [7]. Опухоль секретирует тканеспецифичные ангиогенные молекулы, под действием которых происходят существенные изменения в паренхиматозных органах, подтвержденных метастазированию, с формированием преме­тастатических ниш. Стромальные клетки трансформируются в так называемые опухоль-ассоциированные клетки, т.е. приобретают активированный, преимущественно, проопухолевый фенотип. Опухоль-ассоциированные фибробласты, в свою очередь, индуцируют ремоделирование стромы, необходимое для развития метастазов в органах-мишенях метастазирования меланомы. Пролiferация звездчатых клеток, фибробластов, секреция хемотаксических факторов, индукция ангиогенных факторов роста запускают в последующем процесс метастазирования посредством создания благоприятной среды в паренхиматозных органах [8].

Прогрессирование меланомы зависит от уровня клеточной пролиферации, одним из наиболее широко используемых маркеров пролиферативной активности является ядерный антиген Ki-67 [9], который является диагностическим маркером меланоцитарных новообразований и меланомы, так как выявлено, что индекс пролиферации данного антигена в меланоме выше, чем в меланоцитарных новообразованиях [10]. Также известно, что высокий индекс пролиферации Ki-67 является неблагоприятным прогностическим фактором при злокачественных опухолях молочной железы, мочевого пузыря, простаты [11].

В механизмах пролиферации, метастазирования и роста клеток меланомы принимает участие белок NFE2L2 [12], который отвечает за транскрипцию генов антиоксидантных белков, таких, как ферменты антиоксидантной защиты; интерлейкинов, обладающих протективным эффектом от окислительного повреждения.

Уровень экспрессии NFE2L2 повышен при раке молочной железы, легких, печени [13]. Доказано, что белок NFE2L2 обладает протективным действием на клетки и ткани при воздействии токсинов и канцерогенов путем увеличения экспрессии цитопротекторных генов и снижения количества активных форм кислорода (ROS), а при повышенных уровнях экспрессии может также способствовать развитию резистентности к противоопухолевым препаратам [14].

Цель данного исследования – изучение уровня экспрессии NFE2L2 и маркера клеточной пролиферации Ki-67 в органах-мишенях метастазирования меланомы в преме­тастатическую фазу как компонентов формирующегося опухолевого микроокружения.

Материалы и методы

Использованы биоптаты опухолевого узла и органов мышей линии C57Bl6 (легкие, печень, почки), (мышы получены из вивария ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук») с перивитой меланомой B16 (культура была любезно предоставлена ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии»), в преме­тастатический период – 17-е сутки ($n = 13$), а также контрольной группы ($n = 13$). Органы фиксировали в 10% нейтральном формалине, заключали в парафин и изготавливали гистологические срезы толщиной до 4 мкм, на микротоме MC-2 («Точмедприбор», Украина), которые в дальнейшем подвергали иммуногистохимическому окрашиванию по стандартной методике [15] на маркер клеточной пролиферации Ki-67 («ThermoFisher», США). Уровень экспрессии Ki-67 определяли путем подсчета пролиферирующих клеток, имеющих положительно окрашенные ядра, при увеличении 400 с помощью микроскопа Olympus BX-41 («Olympus», Япония).

В последующем производилось определение уровня экспрессии NFE2L2 в легких, печени, почках и опухолевом узле методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Из биоптатов органов мышей экспериментальной и контрольной групп выделяли РНК с помощью наборов для выделения РНК «Рибо-золь-С» и «Рибо-сорб» («AmpliSens», Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя, после выделения РНК проводилась реакция обратной транскрипции с помощью комплекта реагентов «Реверта» («AmpliSens», Россия). Синтезированную в результате обратной транскрипции кДНК использовали для постановки ПЦР-РВ, применяя специфичные праймеры к NFE2L2 и β -актину в качестве эндогенного контроля («Applied Biosystems», США). Также с целью подтверждения отсутствия метастатических очагов в органах-мишенях на 17-и сутки, поставлена ПЦР-РВ с праймером к Pmel («Applied Biosystems», США).

Амплификацию и детекцию осуществляли методом ПЦР-РВ на приборе StepOne™ Real-Time PCR System («Applied Biosystems», Сингапур). Полученные результаты ПЦР были проанализированы по методу сравнения ΔC_t , который определяет амплификационный цикл, во время которого флюоресценция образца становится достоверно выше базального сигнала. При сравнении данных использовали непараметрический метод при помощи U-критерия Манна–Уитни для двух независимых групп. Различия между сравниваемыми показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

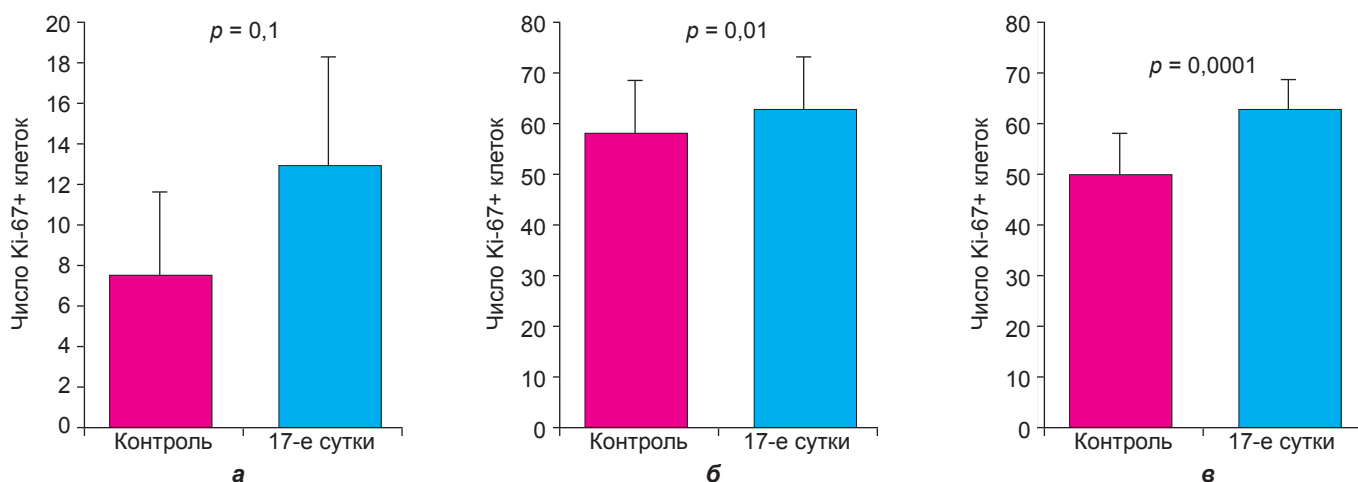


Рис. 1. Уровни экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67 в исследуемых группах: *а* – в ткани легких контрольной группы и на преметастатическом этапе меланомы экспериментальной группы; *б* – в ткани печени контрольной группы и на преметастатическом этапе меланомы экспериментальной группы; *в* – в ткани почек контрольной группы и на преметастатическом этапе при меланоме.

Результаты и обсуждение

Меланома кожи метастазирует в лимфатические узлы и внутренние органы. Доказано, что толщина опухоли по Бреслоу коррелирует с выраженностью прогрессии заболевания: опухоль толщиной менее 0,75 мм, как правило, не дает отдаленных метастазов, в то время как опухоль более 1,5 мм, имеет больший риск отдаленного метастазирования [16]. Первые метастазы меланомы чаще всего появляются в регионарных лимфатических узлах и распространяются в кожу, подкожный слой, отдаленные лимфатические узлы, описаны случаи гематогенного распространения опухолевых клеток в органы-мишени, без поражения лимфатических узлов [17]. Гематогенное метастазирование меланомы чаще всего приводит к появлению очагов вторичного роста опухоли в легких. Как правило, отдаленные метастазы обнаруживаются через несколько лет после иссечения первичной опухоли. Также метастазирование меланомы осуществляется в печень, головной мозг, кости, сердце, почки и селезенку [18].

Общепризнанной экспериментальной моделью меланомы является меланома B16, доступность которой позволяет исследовать особенности метастазирования и тестировать новые возможности лечения меланомы кожи. По данным литературы, мышьяная модель меланомы метастазирует двухступенчато: изначально в легкие, а затем вторично из легких в другие органы. Вторичные метастазы чаще всего имплантируются в почки, печень, головной мозг, яичники и поджелудочную железу [19].

Белок Ki-67 вырабатывается только в активно делящихся клетках и, поэтому, используется как маркер для определения пролиферирующих клеток в образцах ткани пациентов со злокачественными новообразованиями. Показано, что трансфекция в клетки олигонуклеотидов, блокирующих экспрессию Ki-67, тормозит пролиферацию клеток [19]. Для нормального роста различных клеточных линий необходим стабильный уровень экспрессии Ki-67 [20].

Выявлена взаимосвязь высоких уровней экспрессии Ki-67 с плохой выживаемостью при диссеминированной меланоме кожи [21]. Строма, ассоциированная с опухо-

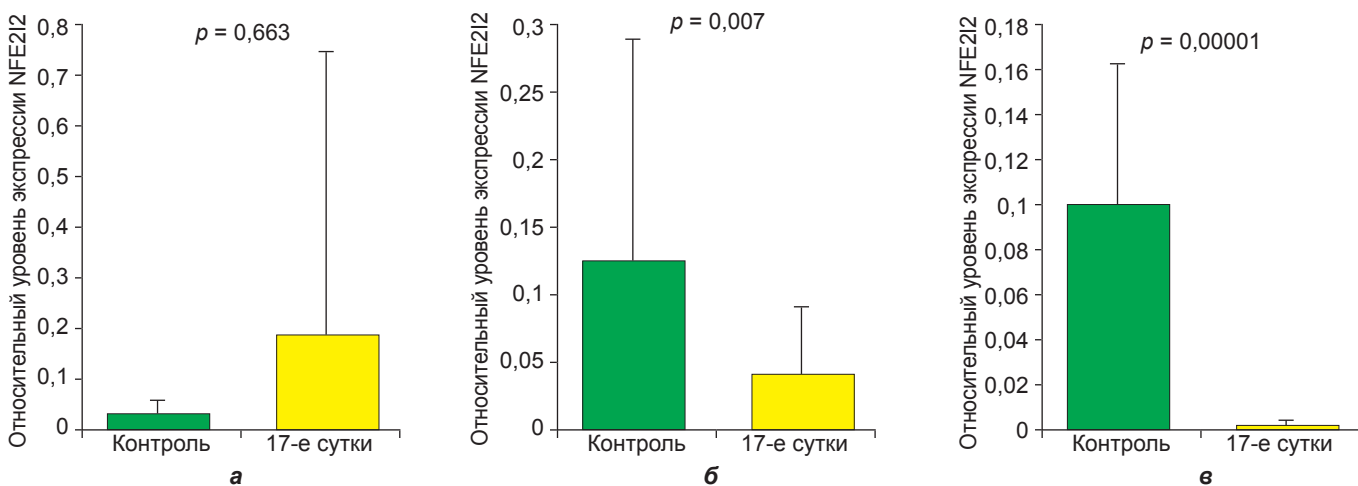


Рис. 2. Уровни экспрессии NFE2L2 в анализируемых группах: *а* – в ткани легких контрольной группы и на преметастатическом этапе меланомы экспериментальной группы; *б* – в ткани печени контрольной группы и на преметастатическом этапе меланомы экспериментальной группы; *в* – в ткани почек контрольной группы и на преметастатическом этапе меланомы экспериментальной группы.

REFERENCES

лью, является необходимым условием для инвазии и метастазирования опухолевых клеток и состоит из различных активно пролиферирующих клеток: фибробластов, перицитов, адипоцитов, макрофагов и иммунных клеток [22]. При оценке экспрессии Ki-67 в органах-мишенях метастазирования меланомы мышей контрольной и экспериментальной групп выявлено положительное иммунное окрашивание ядер в обеих группах. При этом уровень Ki-67, свидетельствующий о пролиферации клеток в тканях, возрастает в органах в преметастатическую фазу, в сравнении с группой контроля (рис. 1).

NFE2L2 участвует в регуляции пролиферации клеток, хотя его точная роль не установлена. С одной стороны, показано, что у мышей, дефицитных по NFE2L2, наблюдается удлинение сроков регенерации ткани печени после гепатэктомии из-за снижения уровня пролиферации гепатоцитов посредством подавления сигнального пути PI3K-AKT [23]. С другой стороны, определено, что генами-мишенями NFE2L2 являются ингибиторы клеточного цикла циклинзависимые киназы *Cdkn1a* (*p21*) и *Cdkn2b* (*p15*) [24]. Оценивая относительные уровни экспрессии NFE2L2 в органах-мишенях метастазов меланомы (легкие, печень, почки), выявлено, что NFE2L2 статистически значимо изменяется в ткани печени и почек. Уровень экспрессии NFE2L2 в преметастатическую фазу в ткани легких выше в экспериментальной группе, и ниже в ткани печени и почек по сравнению с контрольной группой (рис. 2).

Pmel-меланоцит ассоциированный антиген, присутствующий в нормальных меланоцитах и клетках меланомы, который используется в качестве меланома-специфических маркеров [25]. Pmel в легких, печени и почках не определялся, и был повышенным в опухолевом узле. Это свидетельствует об отсутствии клеток меланомы в органах-мишенях метастазирования новообразования и подтверждает, что исследование было выполнено на преметастатическом этапе развития процесса.

Таким образом, понижение уровня NFE2L2 в ткани почек и печени может быть связано с ослаблением регуляторного влияния на *Cdkn1a* (*p21*) и *Cdkn2b* (*p15*) и, возможно, приводит к росту показателей клеточной пролиферации. Механизмы снижения уровня NFE2L2 в органах-мишенях метастазирования меланомы в преметастатический период требуют дальнейшего исследования, так как важны для понимания процессов диссеминации опухолевого роста.

Конфликт интересов: Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00074П).

ЛИТЕРАТУРА

- Жуковец А.Г. Современные принципы и перспективы лечения меланомы кожи. *Онкологический журнал*. 2015; 36(4): 69–76.
- Шишкин М.А. Особенности иммуногистохимической экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67 в опухолевых и стромальных клетках колоректальной аденокарциномы. *Патология*. 2016; 37(2): 76–81.
- Аксененко М.Б., Шестакова Л.А., Рукша Т.Г. Особенности метастазирования перевиваемой меланомы B16 после ингибирования активности MMP-9. *Сибирский онкологический журнал*. 2012; 11(1): 31–5.
- Плешкан В.В., Зиновьева М.В., Сverdlov E.D. Меланома: Поверхностные маркеры как первый «порт» адресной доставки терапевтических генов при многоуровневой генной терапии. *Молекулярная биология*. 2011; 45(3): 416–33.

Остальные источники литературы пп. 1, 3–10, 12–18, 20–24 см. в References.

- Tas F. Metastatic behavior in melanoma: timing, pattern, survival, and influencing factors. *J. Oncol.* 2012; 2012: 647684. doi:10.1155/2012/647684.
- Zhukovets A.G. Current concepts and prospects for skin melanoma management. *Oncological Journal (Minsk)*. 2015; 4(36): 69–76. (in Russian)
- Chew V., Toh H.C., Abastado J.P. Immune microenvironment in tumor progression: characteristics and challenges for therapy. *J. Oncol.* 2012; 2012: 608406. doi: 10.1155/2012/608406.
- Son B., Lee S., Youn H., Kim E., Kim W., Youn B. The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance. *Oncotarget*. 2017; 8(3): 3933–45. doi: 10.18632/oncotarget.13907.
- Zhang L., Hu Y., Xi N., Song J., Huang W., Song S., et al. Partial oxygen pressure affects the expression of prognostic biomarkers HIF-1 alpha, Ki-67, and CK20 in the microenvironment of colorectal cancer tissue. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016; 2016: 1204715. doi: 10.1155/2016/1204715.
- Park S.A., Surh Y.J. Modulation of tumor microenvironment by chemopreventive natural products. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2017; 1401(1): 65–74. doi:10.1111/nyas.13395.
- Yang L., Lin P.C. Mechanisms that drive inflammatory tumor microenvironment, tumor heterogeneity, and metastatic progression. *Semin. Cancer Biol.* 2017; 47: 185–95. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.08.001.
- Psaila B., Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat. Rev. Cancer*. 2009; 9(4): 285–93. doi: 10.1038/nrc2621.
- Winking H., Gerdes J., Traut W. Expression of the proliferation marker Ki-67 during early mouse development. *Cytogenet. Genome Res.* 2004; 105(2–4): 251–6. doi: 10.1159/000078196.
- Uguen A., Talagas M., Costa S., Duigou S., Bouvier S., De Braekeleer M., Marcorelles P. A p16 Ki-67 HMB45 immunohistochemistry scoring system as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Diagn. Pathol.* 2015; 10: 195. doi: 10.1186/s13000-015-0431-9.
- Shishkin M.A. Immunohistochemical study of Ki-67 expression in the tumor cells and the stromal cells of colorectal adenocarcinoma. *Pathologia. Ukrainian Journal*. 2016; 37(2): 76–81. (in Russian)
- Hintsala H.R., Haapasari K.M., Soini Y., Karihtala P. An immunohistochemical study of NFE2L2, KEAP1 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and the EMT markers SNAI2, ZEB1 and TWIST1 in metastatic melanoma. *Histol. Histopathol.* 2017; 32(2): 129–36. doi:10.14670/HH-11-778.
- Hintsala H.R., Jokinen E., Haapasari K.M., Moza M., Ristimaki A., Soini Y., et al. Nrf2/Keap1 pathway and expression of oxidative stress lesions 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and nitrotyrosine in melanoma. *Anticancer Res.* 2016; 36(4): 1497–506.
- Jaramillo M.C., Zhang D.D. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev.* 2013; 27(20): 2179–91. doi: 10.1101/gad.225680.113.
- Ruksha T.G., Akseenko M.B., Papadopoulos V. Role of translocator protein in melanoma growth and progression. *Arch. Dermatol. Res.* 2012; 304(10): 839–45. doi: 10.1007/s00403-012-1294-5.
- Costache M., Stoica A., Contolenco A., Costache D., Cirstoiu C., Simionescu O., George S. Metastatic melanoma in the femur – case report with review of literature: a pathologists point of view. *Maedica (Buchar)*. 2014; 9(1): 62–7.
- Mervic L. Time course and pattern of metastasis of cutaneous melanoma differ between men and women. *PLoS One*. 2012; 7(3): e32955. doi: 10.1371/journal.pone.0032955
- Damsky W.E., Rosenbaum L.E., Bosenberg M. Decoding melanoma metastasis. *Cancers (Basel)*. 2011; 3(1): 126–63. doi:10.3390/cancers3010126.
- Aksenenko M.B., Shestakova L.A., Ruksha T.G. Features of metastasis transplanted B16 melanoma after inhibition MMP-9. *Siberian journal of oncology. Russian Journal (Sibirskii Onkologicheskii Zhurnal)*. 2012; 11(1): 31–5. (in Russian)
- Sobecki M., Mrouj K., Camasses A., Paris N., Nicolas E., Lleres D., et al. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife*. 2016; 5: e13722. doi: 10.7554/eLife.13722.
- Ilmonen S., Hernberg M., Pyrhonen S., Tarkkanen J., Asko-Seljavaara S. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in primary and metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 2005; 15(5): 375–81.
- Bussard K.M., Mutkus L., Stumpf K., Gomez-Manzano C., Marini F.C. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2016; 18(1): 84. doi: 10.1186/s13058-016-0740-2.
- Beyer T.A., Xu W., Teupser D., auf dem Keller U., Bugnon P., Hildt E., et al. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J.* 2008; 27(1): 212–23. doi: 10.1038/sj.emboj.7601950.
- Murakami S., Motohashi H. Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation. *Free Radic. Biol. Med.* 2015; 88(Pt B): 168–78. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.030.
- Pleshkan V.V., Zinovieva M.V., Sverdlov E.D. Melanoma: Surface markers as the first point of targeted delivery of therapeutic genes in multi-level gene therapy. *Russian Journal of Molecular Biology*. 2011; 45(3): 416–33. doi: 10.1134/S0026893311030149. (in Russian)

Поступила 28.02.18

Принята к печати 21.03.18