

УДК 616.61-006.6-037:577.2.088

Н.Н. Семенов, В.С. Домбровский, С.Л. Гуторов, Д.А. Филоненко,
И.Н. Соколова, М.Р. Личиницер, Е.В. Степанова
**ЭКСПРЕССИЯ ПАРАТИРОИД-ПОДОБНОГО ПРОТЕИНА
И ЕГО РЕЦЕПТОРА ПРИ РАКЕ ПОЧКИ**
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Контактная информация:

Семёнов Николай Николаевич, к.м.н., старший научный сотрудник отделения химиотерапии и комбинированного лечения злокачественных опухолей НИИ клинической онкологии

адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(495)324-92-54, факс +7(495)324-27-64

e-mail: niksemenov1969@yandex.ru

Статья поступила 30.09.2012, принята к печати 31.10.2012.

Резюме

Активно ведутся исследования по изучению молекулярных механизмов возникновения метастазов в кости. Нами было выполнено исследование экспрессии ПТГП и его рецептора (ПТГП-R1) при РП и изучена их ассоциация с появлением костных метастазов у больных. Показано, что в опухолевых клетках рака почки чаще экспрессируется ПТГП-R1, чем ПТГП. Не обнаружено значимых различий в экспрессии белков в группах больных с и без метастазов в кости. Экспрессия ПТГП-R1 была благоприятным фактором, предсказывающим увеличение безрецидивной выживаемости больных. Мы планируем продолжить изучение их прогностической значимости для больных РП. Использование биомаркеров, предсказывающих появление метастазов в кости, позволит персонализировать назначение адъювантной терапии, увеличить эффективность лечения и снизить смертность больных раком почки.

Ключевые слова: рак почки, прогноз, биомаркеры.

N.N. Semenov, V.S. Dombrovsky, S.L. Gutorov, I.N. Sokolova, D.A. Filonenko,
M.R. Lichinitser, E.V. Stepanova

**EXPRESSION OF PARATHYROID HORMONE-RELATED PROTEIN
AND ITS RECEPTOR IN RENAL CANCER**

FSBI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow

Abstract

Researches of molecular mechanisms of bone metastases development are actively conducted. We analyzed of PTHRP and its receptor (PTHRP-R1) expressions in renal cancer and their association with bone metastases development. It is shown PTHRP-R1 is expressed in renal cancer cells more often than PTHRP. There are not significant a differences between these proteins expression in patients with and without bone metastases. PTHRP-R1 expression was the favorable factor predicting increase of patient disease-free survival. Analysis of their prognostic significance will be extending. Usage of biomarkers predicting bone metastases development will allow personalizing of adjuvant therapy prescriptions, increasing of treatment efficiency and reducing mortality of renal cancer patients.

Key words: renal carcinoma, prognosis, biomarkers.

Введение

РП занимает 10 место по уровню заболеваемости среди злокачественных новообразований [4]. У большинства пациентов диагностируется местнораспространенный рак, основным методом лечения которого является полная или частичная нефрэктомия. Однако примерно у трети больных возникают метастазы после удаления первичной опухоли, что является основной причиной их смерти. Совершенствование подходов к назначению адъювантной терапии больным после удаления первичной опухоли рассматривается как актуальная задача. Персонализация лечения больных злокачественными новообразованиями может быть также связана с прогнозированием появления метастазов в определенные органы и назначением специфического профилактического лечения. Так, высокую эффективность для лечения метастазов в кости различных новообразований показали бисфосфонаты (Бондронат, Аредия, Зомета и другие).

В настоящее время активно ведутся исследования по изучению молекулярных механизмов воз-

никновения метастазов в кости [1; 18]. Интегрины, позволяющие опухолевым клеткам связываться с костным матриксом, костный сиалопротеин и остеоопонтин, являющиеся лигандами к интегрину, матриксная металлопротеиназа 2 играют важную роль в этом процессе. Также к факторам, способствующим развитию костных метастазов, относят и паратиреоид-подобный протеин и его рецепторы, активизирующие резорбцию костной ткани, стимулируя высвобождение трансформирующего фактора роста β [15].

Гиперкальциемия у больных злокачественными новообразованиями часто наблюдается при паранеопластическом синдроме [3]. Паратиреоид-подобный протеин, как было показано, является причиной гуморальной гиперкальциемии, ассоциированной с РП [15]. В недавних исследованиях описано, что ПТГП может стимулировать пролиферацию и дифференцировку клеток *in vitro*, проявляя, таким образом, свойства, характерные для различных факторов роста [15].

Он также может влиять на апоптотическую и ангиогенную активность различных злокачественных опухолей [8; 11].

Показано, что нейтрализующие поликлональные антитела к ПТПП ингибируют рост клеточных линий рака почки *in vitro* и *in vivo* [17], подтверждая гипотезу о том, что он является аутокринным фактором роста. Показано, что экспрессию белка в опухолевых клетках находят в 75–95 % случаев РП при ИГХ [6; 9]. Экспрессия ПТПП обратно коррелирует с вероятностью развития метастазов РП [9]. У больных с высокой интенсивностью окрашивания опухолевых клеток БРВ значительно ниже.

В целом показано, что экспрессия ПТПП первичной опухолью может быть связана с возможностью развития в дальнейшем костных метастазов, и напрямую определяет распространенность костных метастазов и их способность к литической деструкции. В то же время, повышенный уровень экспрессии ПТПП сочетался с хорошим прогнозом общей выживаемости больных. Однако на сегодняшний день мало известно о роли ПТПП-Р при раке почки и его прогностическом значении.

Нами было выполнено исследование экспрессии паратироид-подобного протеина и его рецептора при раке почки, изучена их ассоциация с появлением костных метастазов.

Материалы и методы

В исследование включены данные о 72 больных раком почки, лечившихся в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН в период с 1979 по 2007 годы. Средний возраст $54,5 \pm 11,5$ лет (от 17 до 78 лет). На момент постановки диагноза у 17 (24 %) больных были обнаружены метастазы в кости.

Всем больным было проведено хирургическое удаление первичной опухоли. У всех больных диагноз «рак почки» был подтвержден гистологическим исследованием опухоли. Оценивались также размеры опухоли, гистологический тип, степень злокачественности и другие параметры.

По классификации TNM большинство больных имели T₂₋₃ N₀M₀ опухоли. Так, стадия T₁ была поставлена 1 (1,4 %) больному, T₂ – 47 (65,3 %), T₃ – 14 (19,4 %), T₄ – 3 (7,2 %) больных, у 7 (9,7 %) размер опухоли был не определен. Метастазы в лимфоузлах отсутствовали у 45 (62,5 %) больных, N₁ поставили 3 (7,2 %), а N₂ – 4 (5,6 %) больным, у 20 (27,8 %) пациентов эта информация отсутствовала. 54 (75,0 %) больным была поставлена стадия M₀, а 18 (25,0 %) – M₁. Дополнительного адъювантного химиотерапевтического лечения больным не проводилось.

Иммуногистохимический анализ

Проведено иммуногистохимическое изучение экспрессии ПТПП и его рецептора 1 типа на срезах с парафиновых блоков, полученных после хирургического удаления первичной опухоли.

Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Для «демаскировки» антигенов проводили прогревание срезов на водяной бане в предварительно нагретом до 95–99 °C 10 мМ цитратном буфере в течение 40 минут. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 5 мин в темноте с 3%-ной перекисью водорода. Для блокирования неспецифического связывания антител срезы инкубировали 15 мин с 1 %-ным р-ром бычьего сывороточного альбумина. Инкубацию с первичными антителами про-

водили при +4 °C в течение 16–18 ч. В качестве первичных антител использовали МКА к ПТПП (клон 1D1, Santa Cruz Biotech, разведение 1 : 100) и его рецептору 1 типа (клон 3D1.1, Santa Cruz Biotech, разведение 1 : 400). Инкубацию со вторыми антителами, меченными пероксидазой, [ENVISION+ kit, DAKO] проводили при комнатной температуре в течение 20 минут. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали DAB+ систему [DAKO]. Реакцию проводили в темноте в течение 5–10 мин. Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в синтетическую основу.

Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа «NIKON 80i» (Германия) под увеличением $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$. Для всех маркеров оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана), интенсивность окрашивания (от 0 до 3+) и количество положительных клеток (от 0 до 100 %). Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество. Опухоль считали положительной по ПТПП или ПТПП-Р1, если более 25 % опухолевых клеток имели выраженное окрашивание антителами (1+ – 3+).

В качестве положительного контроля использовалось цитоплазматическое окрашивание клеточной линии рака молочной железы SK-BR-3.

Статистический анализ проводили на персональном компьютере с использованием программы «SPSS» (v 13.0. for Windows). Для проверки достоверности различий значений признаков в группах использовали точный критерий Фишера. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$ (95% точности). Кривые БРВ строили с использованием метода Каплана-Майер. Сравнение выживаемости различных групп проводили с помощью однофакторного логранкового метода.

Результаты и обсуждение

Специфическое окрашивание антителами к ПТПП и ПТПП-Р1 было обнаружено у 8 (11,1 %) и 43 (59,7 %) больных соответственно. Ко-экспрессия ПТПП и ПТПП-Р1 наблюдалась только в 7 (9,7 %) случаях. Окрашивание антителами локализовалось диффузно на мембране и в цитоплазме опухолевых клеток. Также наблюдалось окрашивание извилистых трубочек прилежащей нормальной ткани почки. Другие структуры почки (клубочки, проксимальные трубочки, фибробласты, гладкомышечные клетки, кровеносные сосуды) не окрашивались антителами.

Наблюдалась тенденция к корреляции экспрессией протеина и его рецептора в ткани РП ($p=0,132$). При отсутствии ПТПП в опухолевых клетках 36 (56,3 %) случаев были положительными по ПТПП-Р1, а при его экспрессии – в 7 (87,5 %).

Не обнаружено корреляции между экспрессией ПТПП и ПТПП-Р1 и клинико-морфологическими особенностями опухоли (размером, наличием метастазов в лимфоузлы и др.). По нашим данным экспрессия белков значимо не отличалась в группах пациентов, разнящихся по развитию метастазов в кости. Так, экспрессия ПТПП составила 11,9 % в группе больных, у которых не наблюдалось развития костных метастазов в период всего срока наблюдения; 47,1 % – при наличии синхронных костных метастазов на момент первичного диагноза и 53,8 % – при развитии метастазов в кости, а ПТПП-Р1 – 11,9; 11,8 и 0 % соответственно.

Статистический анализ корреляции экспрессии биомаркеров с БРВ проведен у 55 больных. У 34 (61,8 %) больных не наблюдалось появления метастазов более 5 лет. У 21 (38,2 %) больных метастазы после удаления первичной опухоли развились в сроки от 3 до 95 мес. Из них у 7 больных первой точкой метастазирования были кости, у 10 – висцеральные органы, у 4 наблюдались смешанные метастазы (кости и висцеральные органы).

Для общей группы высокая экспрессия ПТПП-Р1 коррелировала с высокой БРВ больных вне зависимости от типа возникших метастазов (см. рис., А). Медиана времени возникновения отдаленных метастазов составила $45,2 \pm 37,5$ мес. у больных без экспрессии ПТПП-Р1 в опухолевых клетках и не достигнута у больных с экспрессией этого маркера ($p=0,027$). При анализе выживаемости больных до появления метастазов в кости показано, что экспрессия ПТПП и ПТПП-Р1 имеют тенденцию к обратной корреляции с прогнозом течения болезни ($p=0,258$ и $p=0,098$ соответственно; см. рис., Б).

Таким образом, в нашем исследовании показано, что в опухолевых клетках рака почки чаще экспрессируется ПТПП-Р1, чем ПТПП. Нами не обнаружено значимых различий в экспрессии белков в группах больных с и без метастазов в кости. Экспрессия ПТПП-Р1 была благоприятным фактором, предсказывающим увеличение безрецидивной выживаемости больных.

Экспрессия ПТПП и его рецептора активно изучается при раке молочной железы [2; 10; 13; 14; 16]. Если экспрессия белка выявляется в первичных опухолях молочной железы в 60 % случаев, то в костных метастазах она повышена (до 92 %), а в висцеральных метастазах снижена (до 17 % случаев) [13]. В некоторых исследованиях было показано, что экспрессия ПТПП и ПТПП-Р1 ассоциирова-

на с ухудшение безрецидивной выживаемости больных [14], в других эти результаты не нашли подтверждения [16].

ПТПП исследуется как цитокин, регулирующий функцию почек. Предполагается, что он может быть аутокринным фактором, участвующим в регенерации почечной ткани после острого повреждения или ассоциированным с прогрессией хронических заболеваний почек [7; 12].

ПТПП рассматривается как фактор выживаемости опухолевых клеток РП, его экспрессия негативно регулируется геном фон Хиппель-Линдау (VHL) [5]. Однако клиническая информативность экспрессии этих белков для прогноза течения рака почки пока изучена недостаточно.

Заключение

Хотя в нашем исследовании не было обнаружено взаимосвязи между экспрессией ПТПП и его рецептора и развитием метастазов в кости, мы планируем продолжить изучение их прогностической значимости для больных РП, прежде всего – увеличив группу больных, имеющих метастазы.

Поиск маркеров, предсказывающих появление метастазов в кости, остается важной задачей. Ее решение позволит персонализировать назначение адъювантной терапии, увеличить эффективность лечения и снизить смертность больных раком почки.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение 8151 от 24 августа 2011 года) и благотворительным фондом «ПРОТЕК» (договор добровольного пожертвования №6 от 28.02.2012 г.).

Литература

- Семенов Н.Н., Степанова Е.В., Личницер М.Р. Значение экспрессии интегринов avb3 и avb5, паратириод-подобного гормона (ПТПГ), рецепторов к ПТПГ и остеопонтина в развитии метастазов в кости при раке молочной железы и почки // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 37–41.
- Bucht E., Rong H., Pernow Y. et al. Parathyroid hormone-related protein in patients with primary breast cancer and eucalcemia // Cancer Res. – 1998. – 58(18). – P. 4113–6.
- Burtis W.J., Brady T.G., Orloff J.J. et al. Immunochemical characterization of circulating parathyroid hormone-related protein in patients with humoral hypercalcemia of cancer // N Engl J Med. – 1990. – 322(16). – P. 1106–12.
- Cohen H.T. Renal cell carcinoma // N. Engl. J. Med. – 2005. – 353. – P. 2477–90.
- Danilin S., Sourbier C., Thomas L. et al. von Hippel-Lindau tumor suppressor gene-dependent mRNA stabilization of the survival factor parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma by the RNA-binding protein HuR // Carcinogenesis. – 2009. – 30(3). – P. 387–96.
- Gotoh A., Kitazawa S., Mizuno Y. et al. Common expression of parathyroid hormone-related protein and no correlation of calcium level in renal cell carcinomas // Cancer. – 1993. – 71. – P. 2803–6.
- Humes H.D., Lake E.W., Liu S. Renal tubule cell repair following acute injury // Miner Electrolyte Metab. – 1995. – 21. – P. 353–65.
- Isowa S., Shimo T., Ibaragi S. et al. PTHrP regulates angiogenesis and bone resorption via VEGF expression // Anticancer Res. – 2010. – 30(7). – P. 2755–67.
- Iwamura M., Wu W., Muramoto M. et al. Parathyroid hormone-related protein is an independent prognostic factor for renal cell carcinoma // Cancer. – 1999. – 86(6). – P. 1028–34.
- Kohno N., Kitazawa S., Fukase M. et al. The expression of parathyroid hormone-related protein in human breast cancer with skeletal metastases // Surg Today. – 1994. – 24(3). – P. 215–20.
- Mak I.W., Turcotte R.E., Ghert M. Transcriptomic and proteomic analyses in bone tumor cells: Deciphering parathyroid hormone-related protein regulation of the cell cycle and apoptosis // J Bone Miner Res. – 2012. – 27(9). – P. 1976–91.
- Myers B.D., Ross J.C., Newton L.D. et al. Cyclosporine-associated chronic nephropathy // N Engl J Med. – 1984. – 311. – P. 699–705.
- Powell G.J., Southby J., Danks J.A. et al. Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: Increased incidence in bone compared with other sites // Cancer Res. – 1991. – 51. – P. 3059–61.
- Richard L., Neil A., Richard H. et al. Coexpression of parathyroid hormone related protein and its receptor in early breast cancer predicts poor patient survival // Clin Cancer Res. – 2002. – 8. – P. 3172–7.
- Sourbier C., Massfelder T. Parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma // Cancer Lett. – 2006. – 240. – P. 170–82.
- Suzuki Y., Tokuda Y., Saito Y. et al. Clinicopathological correlation between expression of PTHrP receptor and various prognostic factors in breast cancer without axillary lymph node metastasis // Tokai J Exp Clin Med. – 2005. – 30(2). – P. 127–32.
- Talon I., Lindner V., Sourbier C. et al. Antitumor effect of parathyroid hormone-related protein neutralizing antibody in human renal cell carcinoma in vitro and in vivo // Carcinogenesis. – 2006. – 27. – P. 73–83.
- Yin J.J., Pollock C.B., Kelly K. Mechanisms of cancer metastasis to the bone // Cell Research. – 2005. – 15(1). – P. 57–62.