

УДК 616.37.-006.6-033.2:576.385.5

Ya. N. Shoihet, A. F. Lazarev, M. Tsoller, I. V. Berezovsky, S. D. Fokeev

ROLE OF ALFA-6/BETA-4 INTEGRIN AND D6.1 TETRASPANIN INTERACTION IN EARLY PROGRESSION OF PANCREAS CANCER

*Altay State Medical University,
The Altai branch of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Barnaul
German Center of Cancer Research, Heidelberg, Germany*

ABSTRACT

Alfa-6/beta-4 integrin (B-5.5) has an absolute ability to stimulate adhesion and migration of pancreatic tumor cells. Aggressive tumor growth was revealed in pancreas cancer with high expression of alfa-6/beta-4 integrin.

The experimental data show double function of alfa-6/beta-4 integrin as a molecule that mediates not only tumor cell migration, but also their stable fixation on peritoneum.

Therefore, its role in tumor cell fixation on peritoneum and vascular wall during tumor cell migration along peritoneum and trough vascular walls is important for progression of pancreas cancer.

Cell mechanisms that lead to metastases of pancreas cancer in other organs differ from mechanisms that work during invasion. This complicated process includes various mechanisms such as angiogenesis, tumor cell interaction with endotelium and survival in a foreign environment. All these processes can work due to interaction between alfa-6/beta-4 integrins and other molecules – D6.1 tetraspanin.

Experimental studies showed that tumors expressing D6.1 tetraspanins developed marked angiogenesis. Arteries cover over 25% of tumor tissue surface that is very important for stimulation and tumor development. In control group arteries cover less than 5% tumor surface only.

Key words: pancreas cancer, metastatic process, tumor cells.

Я. Н. Шойхет, А. Ф. Лазарев, М. Цоллер, И. В. Березовский, С. Д. Фокеев

ЗНАЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АЛЬФА-6/БЕТА-4 ИНТЕГРИНА И D6.1 ТЕТРАСПАНИНА ДЛЯ РАННЕГО ПРОГРЕССИРОВАНИЯ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*ГОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет»,
Алтайский филиал ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул
Немецкий центр по исследованию рака, Гайдельберг, Германия*

РЕЗЮМЕ

Альфа-6/бета-4 интегрин (B-5.5) обладает абсолютной способностью к стимуляции адгезии и миграции опухолевых клеток рака поджелудочной железы. Выявлено агрессивное поведение опухоли поджелудочной железы с высокой экспрессией альфа-6/бета-4 интегрина.

Данные экспериментальной работы показывают двойственную природу альфа-6/бета-4 интегрина как молекулы, которая опосредует не только миграцию опухолевых клеток, но и стабильную фиксацию на брюшине.

Таким образом, их роль в стабильном закреплении опухолевых клеток на брюшине и сосудистой стенке в миграции опухолевых клеток по брюшине и через сосудистую стенку, циркуляции по сосудистому руслу придает им важное значение в прогрессии рака поджелудочной железы.

Механизмы, посредством которых клетки рака поджелудочной железы образуют метастазы в инородных тканях, отличаются от механизмов, работающих при инвазии. Этот сложный процесс включает также разные механизмы, такие, как ангиогенез, взаимодействие клеток опухоли с эндотелием и выживание в инородной среде. Все эти процессы становятся возможными при взаимодействии альфа-6/бета-4 интегринов с другими молекулами – D6.1 тетраспанинами.

В отношении D6.1 тетраспанинов экспериментальная работа показала, что в опухоли поджелудочной железы, экспрессирующей D6.1 тетраспанины, происходит выраженный ангиогенез. Артериальные сосуды покрывают более 25 % площади опухолевой ткани, что очень важно для дальнейшей стимуляции и развития опухолевого процесса. В контрольной группе артериальные сосуды покрывают всего менее 5 % площади опухоли.

Ключевые слова: рак поджелудочной железы, метастатический процесс, опухолевые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Рак поджелудочной железы на сегодняшний день в плане диагностики и лечения остается очень большой проблемой. У больных, прошедших обследование по поводу рака поджелудочной железы, в 20–50 % случаев в брюшной полости имеются отдельные опухолевые клетки [3; 4; 7], которые через так называемые перитонеальные поры проникают в лимфатические и кровеносные сосуды [7] с последующим поражением, в первую очередь, печени [2]. Предполагается, что на миграцию клеток рака поджелудочной железы влияют определенные адгезионные молекулы, а именно, альфа-6/бета-4 интегрины, часто в ассоциации с D6.1 тетраспанинами [1; 5; 6].

Цель исследования – изучить влияние альфа-6/бета-4 интегринов и D6.1 тетраспанинов на миграцию клеток рака поджелудочной железы при метастазировании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проведены с использованием BDX крыс. BDX крысы – специальный крысиний штамм с моделью рака поджелудочной железы, которые были разведены в питомниках при Германском центре по исследованию рака, содержались в специфических условиях, без патогенных факторов, ели стерильную еду, пили стерильную воду и были задействованы в экспериментах в возрасте от 6 до 10 нед. По половой принадлежности – все крысы были мужского рода. Опыты проведены на 48 животных.

Исследовались 4 линии опухолевых клеток у 4 групп крыс (табл. 1).

1-я группа (сравнения) – 12 животных. Этой группе крыс вводили внутрибрюшинно AS-клетки (ряд не метастатической панкреатической аденокарциномы у BDX крыс).

2 группа (основная) – 36 животных. В этой группе крысам вводили внутрибрюшинно клетки AS – B5.5; AS – D6.1; AS – B5.5–D6.1, в связи с чем основная группа была разделена на 3 подгруппы:

1-я подгруппа: крысы, которым вводились AS – B5.5 клетки (12 животных). AS – B5.5 – ряд панкреатической аденокарциномы у BDX крыс с альфа-6/бета-4 интегринными.

2-я подгруппа: крысы, которым вводились AS – D6.1 клетки (12 животных). AS – D6.1 – ряд панкреатической аденокарциномы у BDX крыс с D6.1 тетраспанинами.

3-я подгруппа: крысы, которым вводились AS – B5.5–D6.1 клетки (12 животных). AS – B5.5–D6.1 – ряд панкреатической аденокарциномы у BDX крыс с альфа-6/бета-4 интегринными и D6.1 тетраспанинами.

Все опухолевые клетки вводились внутрибрюшинно, предварительно метились специальным флюоресцирующим веществом GFP (green fluorescence protein). Через 3 и 6 дней после инъекции проводилась интравитальная микровидеосъемка при помощи флюоресцирующего микроскопа с 40-кратным увеличением. Интравитальная микровидеосъемка осуществлялась следующим образом. BDX крысам

Таблица 1

Количество интравитальных исследований миграции опухолевых клеток и ангиогенеза в опухоли

Группы животных	Количество животных в зависимости от сроков внутрибрюшинного введения опухолевых клеток		n
	3 дня	6 дней	
Сравнения AS	6	6	12
Основная AS – B5.5	6	6	2
Основная AS – D6.1	6	6	2
Основная AS–B5.5–D6.1	6	6	2
Общее количество	24	24	48

Таблица 2

Наличие конгломератов и отдельных опухолевых клеток в группах эксперимента

Линия опухолевых клеток	Конгломераты	Отдельные опухолевые клетки		Фиксированные	
		Фиксированные	Плавающие	Адгерентные	Неадгерентные
AS	++	–	–	–	–
AS – B5.5	+	+	–	+	+
AS – D6.1	++	+	+	–	+
AS – B5.5–D6.1	+	+	–	+	+

делали анестезию (интраперитонеально вводили Ketanest 50 mg/kg + Rompun 15 mg/kg веса), затем катетеризировалась подключичная вена и в дальнейшем наркоз поддерживался путем введения лекарств через нее. Крысам вскрывалась брюшина (срединная лапаротомия), они фиксировались на специальной чашке, которая автоматически поддерживала температуру 37 °С. Брыжейка (участок) тонкой кишки с новообразованиями (опухолями) фиксировалась в 50 мл раствора Рингера при температуре 37 °С. Изображения просматривались с помощью флуоресцирующего микроскопа с 40-кратным увеличением. Изображения транслировались, записывались на видеокамеру для дальнейшего анализа на компьютере. У каждой крысы просматривались 20 участков с опухолями на различных участках брыжейки. Наиболее интересные области брыжейки просматривались и записывались более 2 ч. После экспериментов животные при помощи максимальной дозы CO₂ по отработанной методике усыплялись. Эксперименты в естественных условиях были одобрены и разрешены местным комитетом по защите животных.

Для анализа брались следующие параметры: образование из отдельных опухолевых клеток конгломератов; наличие отдельных опухолевых клеток в брюшной полости, которые подразделялись на прикрепленные к брюшине и свободно плавающие. Фиксированные к брюшине опухолевые клетки делились на адгерентные и неадгерентные в отношении к существующим и ранее возникшим сосудам брыжейки (артерий); изменения формы опухолевых клеток; миграция опухолевых клеток с учетом подвижности опухолевых клеток по брюшине тонкой кишки, прикрепления к стенке артериального сосуда, проникновение внутрь просвета сосуда; наличие сосудов в опухоли; ангиогенез в опухолевых узелках.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сопоставление результатов экспериментов в группе сравнения и подгруппах основных групп показало, что во всех 4 группах (AS; AS – B5.5; AS – D6.1; AS – B5.5 – D6.1) из опухолевых клеток на брюшине

образуются конгломераты (табл. 2). Более выражены по размерам и плотности конгломераты, состоящие из AS (группа сравнения) и AS – D6.1 (с D6.1 тетраспанинами) клеток (рис. 1 и 2). Менее выражены конгломераты, состоящие из AS – B5.5 (с альфа-6/бета-4 интегринными) и AS – B5.5 – D6.1 (с альфа-6/бета-4 интегринными и D6.1 тетраспанинами) клеток (рис. 3 и 4). Все конгломераты были плотно фиксированы к брюшине, за исключением группы с AS – D6.1 (с D6.1 тетраспанинами) клетками, где встречались плохо фиксированные к брюшине конгломераты, а также свободно плавающие конгломераты клеток.

Чтобы выявить значение альфа-6/бета-4 интегрин и D6.1 тетраспанина в процессе прогрессирования и метастазирования рака поджелудочной железы, важно доказать их влияние на адгезивные свойства опухолевых клеток.

При поиске адгерентных и неадгерентных клеток к ранее существующим сосудам брыжейки тонкой кишки обнаружено, что в группе опухолевых клеток, которые экспрессируют альфа-6/бета-4 интегрин (AS – B5.5; AS – B5.5–D6.1), имеются как адгерентные (рис. 5) к ранее существующим артериям брыжейки, так и неадгерентные опухолевые клетки (табл. 2). В группе же, где опухолевые клетки не экспрессируют альфа-6/бета-4 интегрин (AS – D6.1), адгерентные клетки обнаружены не были, были найдены только неадгерентные клетки. Как уже отмечалось, в группе сравнения (AS) вообще в эти сроки отсутствовали отдельные опухолевые клетки. Наличие D6.1 тетраспанина не придавало опухолевым клеткам адгезивных свойств. Ими обладают те опухолевые клетки рака поджелудочной железы, в структуре которых экспрессируют (присутствуют) альфа-6/бета-4 интегрин, причем в группе клеток, где помимо альфа-6/бета-4 интегринных имеются D6.1 тетраспанины (AS – B5.5–D6.1), адгезивные свойства опухолевых клеток выражены в меньшей степени. Наибольший процент адгерентных был в группе с AS – B5.5 (с альфа-6/бета-4 интегринными) клетками, что составляло 70 %, неадгерентных 30 % (табл. 3). В группе с AS – D6.1 (с D6.1 тетраспанинами) клетками 100% клеток

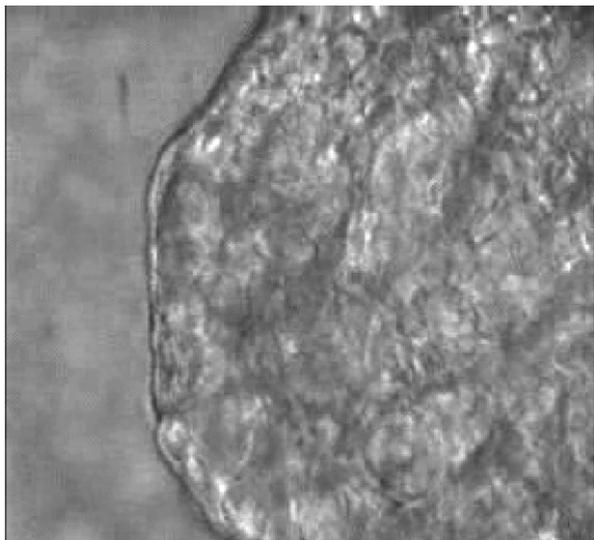


Рис. 1. Конгломерат, состоящий из AS-клеток

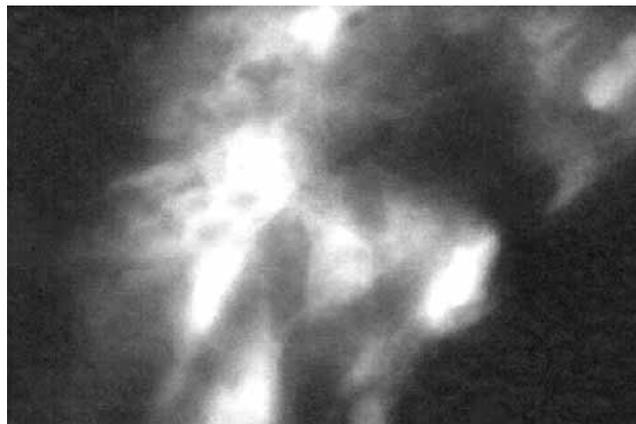


Рис. 2. Опухолевая ткань из AS – D6.1 клеток при флюоресценции. Сосуды покрывают более 25 % ткани опухоли

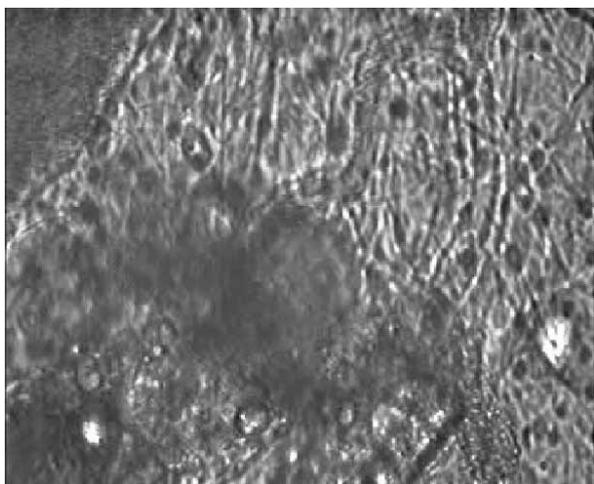


Рис. 3. Конгломерат, состоящий из AS – B5.5 клеток



Рис. 4. Клетки AS – B5.5–D6.1, находящиеся в конгломерате, при флюоресценции

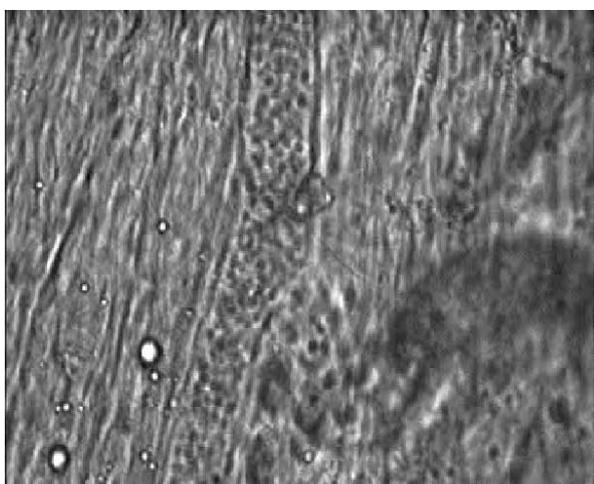


Рис. 5. Отдельная опухолевая AS – B5.5 клетка, фиксированная к стенке сосуда



Рис. 6. Флюоресцирующие AS опухолевые клетки

Таблица 3

Процентное соотношение адгерентных и неадгерентных клеток в группах эксперимента

Линия опухолевых клеток	Количество клеток		Фиксированные к брюшине клетки			
			Адгерентные		Неадгерентные	
	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%
AS	0	0	0	0	0	0
AS – B5.5	200	100	140	70	60	30
AS – D6.1	200	100	0	0	200	100
AS – B5.5–D6.1	200	100	79	39,5	121	60,5

были неадгерентными. В группе с AS – B5.5–D6.1 (с альфа-6/бета-4 интегринами и D6.1 тетраспанинами) клетками было 39,5 % клеток адгерентных, неадгерентных – 60,5 %.

В группе сравнения (AS) клетки были круглые, с ровными краями (рис. 6), очертания конгломератов правильные (см. рис. 1). Изменений формы клеток в этой группе не наблюдалось. Опухолевые клетки как отдельные, так и находящиеся в конгломератах, экспрессирующие альфа-6/бета-4 интегрин (AS – B5.5; AS – B5.5–D6.1), по сравнению с группой сравнения (AS) наиболее подвержены изменению формы.

Под воздействием интегринов (B5.5) изменялась форма клеток, они становились овальными, появлялись как бы выросты (псевдоподии) (рис. 7), особенно это было заметно в отношении адгерентных клеток (см. рис. 5). В то же время форма группы клеток, которые не экспрессируют интегрин (AS; AS – D6.1), оставалась стабильной (табл. 4).

Альфа-6/бета-4 интегрин отвечает за миграцию клеток рака поджелудочной железы. Подтверждением этому является то, что миграционными способностями обладают те опухолевые клетки, в структуре которых имеются данные молекулы (AS – B5.5; AS – B5.5–D6.1) (см. рис. 5). У клеток, не имеющих в своей структуре

альфа-6/бета-4 интегрин (AS; AS – D6.1), миграционных способностей выявлено не было (табл. 5).

Миграция клеток происходила по брюшине тонкой кишки, клетки также фиксировались к уже существующим артериям брыжейки и проникали внутрь сосуда (рис. 5 и 8). Эти отдельные области, места прикрепления и проникновения внутрь сосуда были исследованы при помощи флуоресцирующего микроскопа и записаны на видеопленку в течение 2 ч, чтобы убедиться в проникновении опухолевой клетки. Опухолевые клетки AS – B5.5 (с альфа-6/бета-4 интегрин) и AS – B5.5–D6.1 (с альфа-6/бета-4 интегрин) и D6.1 тетраспанинами) прикреплялись к сосудистой стенке и проникали внутрь.

На возникновение ангиогенеза в опухоли поджелудочной железы оказывало влияние наличие D6.1 тетраспанина (табл. 5).

Уже через 3 дня после инъекции опухолевых клеток образование капилляров было замечено в маленьких AS – D6.1 (с D6.1 тетраспанинами) опухолевых узелках. В остальных группах через 3 дня после инъекции (AS; AS – B5.5; AS – B5.5–D6.1) образования капилляров замечено не было. Через 6 дней после инъекции опухолевых клеток ангиогенез в опухолевых узелках, экспрессирующих только D6.1 тетраспа-

Таблица 4

Наличие изменений формы в группах эксперимента

Линия опухолевых клеток	Изменения формы
AS	–
AS – D5.5	+
AS – D6.1	–
AS – B5.5 – D6.1	+

Таблица 5

Отображение миграции клеток и ангиогенеза в группах эксперимента

Линия опухолевых клеток	Миграция клеток в сосуд	Ангиогенез в опухоли
AS	–	+
AS – B5.5	+	–
AS – D6.1	–	++
AS – B5.5–D6.1	+	+

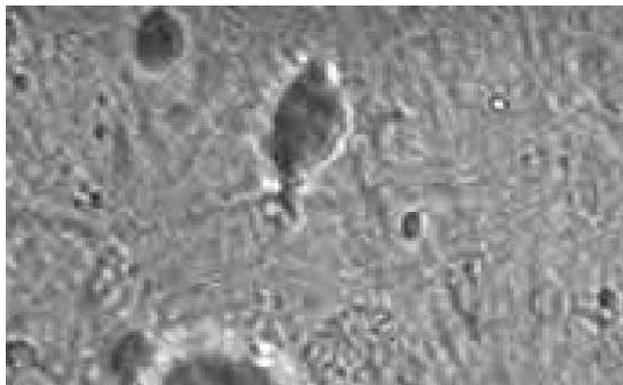


Рис. 7. Отдельная AS – B5.5 опухолевая клетка меняет свою форму



Рис. 9. Конгломерат, состоящий из AS – D6.1 клеток с ангиогенезом

нины (AS – D6.1), увеличился в 5 раз (рис. 9). У клеток группы сравнения (AS) через 6 дней после инъекции только начали образовываться капилляры. Рассматривались ширина и плотность сосудов. Относительная ширина сосудов была определена как соотношение между площадью сосуда и длиной соприкосновения опухоли с сосудом.

Через 3 дня после инъекции опухолевых клеток образование сосудов было замечено в опухоли с AS – D6.1 (с D6.1 тетраспанинами) клетками. В группе с AS; AS – B5.5; AS – B5.5–D6.1 клетками образования сосудов в опухолевых узелках в эти сроки обнаружено не было. Через 6 дней после инъекции опухолевых клеток ангиогенез был замечен в группах с AS; AS – B5.5–D6.1 клетками и наиболее выражен в группе с AS – D6.1 клетками. В опухолевых узелках, экспрессирующих только альфа-6/бета-4 интегрин (AS – B5.5), ангиогенеза в эти сроки выявлено не было.

В результате оказалось, что в опухолевых узелках, экспрессирующих D6.1 тетраспанины (AS – D6.1), происходит выраженный ангиогенез, опухолевые сосуды покрывают более 25 % площади опухоли (см. рис. 2) по сравнению с менее 5 % в группе сравнения (AS). В группе AS – B5.5–D6.1 (с альфа-6/бета-4 интегринами и D6.1 тетраспанинами) опухолевые сосуды покрывают 10–20 % площади опухоли, ангиогенез выражен в мень-

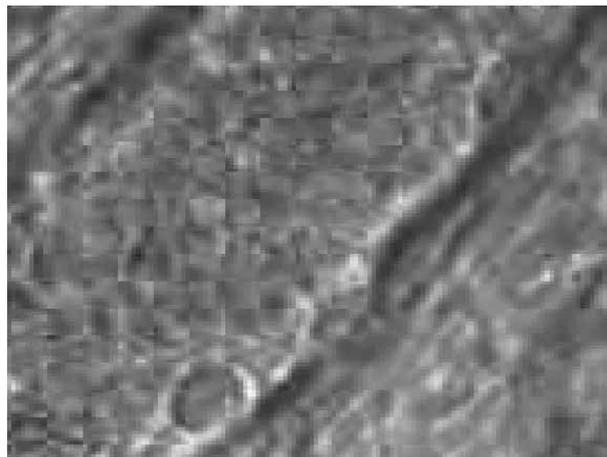


Рис. 8. Проникновение адгезивной опухолевой клетки AS – B5.5 в просвет сосуда

шей степени, чем в группе с опухолью, экспрессирующей D6.1 тетраспанины (AS – D6.1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из всего вышеизложенного следует, что экспрессия клетками рака поджелудочной железы альфа-6/бета-4 интегрин и D6.1 тетраспанинов в эксперименте способствует ангиогенезу в раковых конгломератах в брюшной полости, миграции раковых клеток в сосуд и метастазированию.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Daemi N., Thomasset N., Lissitzky J. C. et al.* Anti-beta 4 integrin antibodies enhance migratory and invasive abilities of human colon adenocarcinoma cells and their MMP-2 expression // *Int. J.Cancer.* – 2000. – Vol. 85. – P. 850–6.
2. *Friess H., Kleeff J., Kors M., Buechler M. W.* Molecular aspects of pancreatic cancer and future perspectives // *Dig. Surg.* – 1999. – Vol. 16. – P. 281–90.
3. *Friess H., Kleeff J., Sadowski C. et al.* The role of diagnostic laparoscopy in pancreatic and periampullary malignancies // *J. Am Coll.* – 1998. – Vol.186. – P. 675–82.
4. *Hermanek P., Huterr R. V., Sobin L. H., Wittekind C.* International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis // *Cancer.* – 1999. – Vol. 86. – P. 2668–73.
5. *Khare L., Sabourin C. L., Young B. R. et al.* Alterations in the expression of alpha6beta4 integrin and p2/WAF/Cip 1 in N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis // *Mol. Carcinog.* – 1998. – Vol. 21. – P. 185–93.
6. *Mukhopadhyay R., Theriault R. L., Price J. E.* Increased levels of alpha6 integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells // *Clin. Exp. Metastasis.* – 1999. – Vol. 17. – P. 325–32.
7. *Z'graggen K., Centino B. A., Fernandez – del Castillo C. et al.* Biological implications of tumor cells in blood and bone marrow of pancreatic cancer patients // *Surgery.* – 2001. – Vol. 129. – P. 537–46.

Поступила 29.05.2006.