

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 616-006.66+616.34-002.191-092:611.018.1

ПОРТЯНКО
Анна Сергеевна

**РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ ЦИТОСКЕЛЕТА В ПАТОГЕНЕЗЕ
И ПРОГРЕССИИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ И ХРОНИЧЕСКИХ
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

по специальности 14.03.02 – патологическая анатомия

Минск 2016

Научная работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Научный консультант: Черствый Евгений Давыдович, доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки Республики Беларусь, профессор кафедры патологической анатомии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Официальные оппоненты: Крылов Юрий Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, начальник учреждения здравоохранения «Витебское областное клиническое патологоанатомическое бюро»

Доросевич Александр Евдокимович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет»

Воробей Александр Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, заведующий кафедрой хирургии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Оппонирующая организация: учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Защита состоится 10 февраля 2017 года в 13.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.02 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского 83, e-mail: uchsovet@bsmu.by, тел.: (017) 272 55 98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «_____» _____ 20__ года.

Ученый секретарь совета по защите диссертаций, канд. мед. наук, доц.



А.И. Герасимович

ВВЕДЕНИЕ

Разработка современных лекарственных препаратов основывается на успехах молекулярной биологии и трансляционных медицинских исследований по выявлению ключевых молекул патогенетического каскада и использованию их в качестве мишеней для медикаментозного воздействия. В фармацевтической промышленности нашли применение 324 такие молекулы [J.P. Overington et. al., 2006]. Очевидно, что в ближайшем будущем будет происходить не только резкое увеличение количества таких молекул-мишеней, но и значительное расширение их спектра [A.L. Hopkins et. al., 2002; Y. Landry et. al., 2008]. С этих позиций представляется важным установление новых закономерностей изменений молекулярного состава клеток при ряде патологических процессов человека, включая хроническое воспаление и опухолевый рост.

Недостаточно изученной остается область перестройки цитоскелета при различных состояниях клетки. К цитоскелету относятся микротрубочки, микрофиламенты и промежуточные филаменты. Микротрубочки – динамические структуры, обеспечивающие внутриклеточный транспорт в интерфазу, а также образующие веретено деления в фазу митоза. Микротрубочки состоят из тубулина – гетеродимера, содержащего α и β субъединицы, которые могут быть представлены различными изотипами. Также известны многочисленные посттрансляционные модификации тубулинов [R.F. Ludueña et. al., 2008]. Анализ опубликованных результатов свидетельствует о том, что они носят разрозненный точечный характер, не позволяющий сформировать целостную картину значения изменений состава микротрубочек в патогенезе различных патологических процессов и определить перспективы использования полученных данных для диагностики, прогнозирования и лечения заболеваний человека. Таким образом, научное значение данного исследования заключается в разработке нового направления в медицине – перестройка цитоскелета при патологии человека.

Несмотря на определенные успехи, смертность от злокачественных новообразований остается актуальной проблемой здравоохранения во всем мире. Для обеспечения значительного прорыва в данной области требуются новые подходы к созданию противоопухолевых препаратов. Одним из таких подходов может стать подавление миграционной активности опухолевых клеток, поскольку именно метастазирование, как следствие инвазивного роста, и составляет основную проблему лечения онкологических пациентов.

Движение клеток, частным вариантом которого является инвазия опухолевыми клетками окружающих тканей, тесно связано с динамикой структур цитоскелета. Установлено, что важную роль в обеспечении клеточной подвижности играют микротрубочки [T.K. Akhshi et. al., 2014].

Исследования *in vitro* показали, что динамика укорочения и удлинения микротрубочек зависит от того, из каких изотипов тубулина они построены [D. Panda et. al., 1994]. Чувствительность ряда опухолей к химиотерапевтическим препаратам и прогноз течения заболевания также определяются наличием в опухолевой клетке тех или иных изотипов тубулинов [N. Urano et. al., 2006; M. Kavallaris et. al., 2010; J.A. McCarroll et. al., 2014].

Таким образом, медицинская значимость настоящего исследования состоит в определении новых прогностических и предикторных маркеров, а также вероятных мишеней для создания новых лекарственных веществ.

Социальная значимость связана в первую очередь с влиянием исследуемых заболеваний на смертность, инвалидность и качество жизни населения. По данным Всемирной организации здравоохранения колоректальный рак (КРР) занимает четвертое место среди причин онкологической летальности в мире [J. Ferlay et. al., 2012]. В Республике Беларусь КРР – третья по частоте причина смерти онкологических больных [О.Г. Суконко, 2011]. 95% всех случаев КРР составляют аденокарциномы.

Хронические воспалительные заболевания кишечника (ХВЗК), к которым относятся язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК), являются одним из факторов риска возникновения КРР. При ХВЗК наблюдаются как альтеративные, так и репаративные изменения эпителия, что делает эти заболевания удобной моделью для изучения диапазона молекулярных изменений в клетках эпителия при хроническом воспалении. По данным официальной статистической отчетности Министерства здравоохранения Республики Беларусь распространенность ХВЗК в 2012 году составляла 20,8 случаев ЯК и 4,5 случая БК на 100 тыс. населения. У пациентов с ХВЗК риск злокачественного роста в толстой кишке в 2–4 раза превышает общепопуляционный [G. Rogler, 2014; S.I. Grivennikov, 2013]. Социальное значение исследований в этой области обусловлено значительным ухудшением качества жизни пациентов и развитием осложнений интенсивной терапии и хирургического лечения, с последующей инвалидизацией, а также вероятностью летального исхода.

Таким образом, актуальность данного исследования определяется вышеизложенными научным, медицинским и социальным значениями как на региональном уровне, так и в мировом масштабе.

Настоящее исследование направлено на получение новых данных об изменении состава цитоскелета с акцентом на роль таких изменений в хроническом воспалении и инвазивном росте злокачественных новообразований с целью определения новых прогностических маркеров этих заболеваний и новых молекулярных мишеней для разработки лекарственных препаратов. Подобных исследований ранее не проводилось ни в Республике Беларусь, ни в странах ближнего и дальнего зарубежья.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами и темами

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Министерства здравоохранения Республики Беларусь (Постановление Совета Министров Республики Беларусь «Об утверждении перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011–2015 годы» от 19.04.2010, № 585), раздел 4, пункты 4.1 «самоорганизация живых систем, закономерности течения патологических процессов, коррекция жизненно важных функций» и 4.2 «новые технологии профилактики, диагностики, лечения и реабилитации сердечно-сосудистых, онкологических и других социально значимых заболеваний».

Работа выполнялась в рамках следующих финансируемых крупных научных программ и тем:

– государственной научно-технической программы «Лечебные и диагностические технологии», подпрограмма «Терапия», задание «Разработать и внедрить в практику здравоохранения программу дифференциальной диагностики нарушений переваривания и всасывания питательных веществ», № госрегистрации 20081611 г., срок выполнения – 01.01.2007–31.12.2010 гг.;

– государственной научно-технической программы «Информационные технологии» № ит-06/5-05 «Разработать и внедрить специализированный программный комплекс автоматизированной системы управления в здравоохранении для экспертно-диагностической оценки хронических воспалительных заболеваний кишечника» № госрегистрации 20066803, срок выполнения – 2006–2009 гг.;

– научно-исследовательского проекта International Science and Technology Center № B-1636 «Cytoskeleton rearrangement in colon cancer and inflammatory bowel diseases» (Изменения цитоскелета при раке и воспалительных заболеваниях толстой кишки), срок выполнения – 01.11.2008–01.11.2011 гг.;

– научно-исследовательского проекта Фонда фундаментальных исследований № Б11М-080 «Экспрессия молекул плотных контактов в клетках инвазивного фронта рака толстой кишки», № госрегистрации 20113573, срок выполнения – 01.04.2011–31.03.2013 гг.;

– государственной программы научных исследований «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация» подпрограмма «Фундаментальная и прикладная медицина» № 1.2.42 «Установить причины и роль изменения состава клеточных тубулинов в прогрессии и химиорезистентности колоректального рака человека», № госрегистрации 20130560, срок выполнения – 01.01.2013–31.12.2015 гг.

Цель и задачи исследования

Цель исследования: установить характер изменений состава микротрубочек как динамических компонентов цитоскелета в аденокарциноме и слизистой оболочке толстой кишки при хронических воспалительных заболеваниях кишечника.

Задачи исследования:

1. Определить характер экспрессии основных изоформ β -тубулина и посттрансляционных модификаций α -тубулина в колоноцитах нормальной слизистой оболочки толстой кишки.

2. Установить спектр изменений экспрессии основных изоформ β -тубулина и посттрансляционных модификаций α -тубулина в колоноцитах при ХВЗК и их связь с морфологическими изменениями.

3. Выявить особенности экспрессии основных изоформ β -тубулина и посттрансляционных модификаций α -тубулина в клетках аденокарциномы толстой кишки.

4. Оценить наличие и характер связи между изменениями состава микротрубочек и морфологической характеристикой КРР.

5. Установить связь между изменениями состава микротрубочек и клиническим течением КРР и предложить новые прогностические маркеры КРР.

6. Выявить новые молекулы-мишени для химиотерапевтического воздействия и дать им экспериментальное обоснование.

Объект исследования: биоптаты, полученные при проведении колоноскопий пациентам с ХВЗК, с клиническим подозрением на ХВЗК, а также при обследовании с целью исключения органической патологии толстой кишки; материал резекций толстой кишки пациентов с КРР; регистр пациентов УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер» (МГКОД); культуры клеток КРР.

Предмет исследования: экспрессия основных изоформ β -тубулина и посттрансляционных модификаций α -тубулина в нормальной и воспаленной слизистой оболочке, аденокарциноме толстой кишки; адгезивные, ростовые и инвазивные свойства культур клеток.

Научная новизна

Дана характеристика составу микротрубочек в нормальной слизистой оболочке толстой кишки: микротрубочки нормальных колоноцитов содержат β -тубулин, ацетилированный, тирозинированный и детирозинированный

α -тубулины. При этом содержание β_1 -тубулина, а также ацетилированного и детирозинированного α -тубулинов выше в эпителии крипт, чем в поверхностном эпителии.

Установлен спектр изменений в составе микротрубочек при хронических воспалительных заболеваниях кишечника: при болезни Крона наблюдается повышение уровня β_1 -тубулина и тирозинированного α -тубулина, в то время как при язвенном колите, напротив, снижается экспрессия β_1 -тубулина. Уровень β_{III} -тубулина при язвенном колите и болезни Крона растет, в то время как уровень ацетилированного α -тубулина падает. Впервые выявлена связь этих изменений с морфологическими изменениями: дисплазия ассоциирована с более высоким уровнем β_1 -тубулина, атрофия крипт сочетается с ростом экспрессии β_{III} изоформа.

Дана характеристика перестройки микротрубочек в колоректальном раке: в центре опухоли по сравнению с неопухолевым слизистой оболочкой повышен уровень β_1 -, β_{II} -и β_{III} -тубулинов и тирозинированного α -тубулина, экспрессия ацетилированного α -тубулина снижена. В опухолевых почках инвазивного фронта по сравнению с раковыми клетками центра опухоли экспрессия β_1 -тубулина и посттрансляционных модификаций α -тубулина падает, экспрессия β_{III} -тубулина растет. Впервые установлено, что количество опухолевых почек в поле зрения связано с уровнем β_{III} -тубулина – чем выше экспрессия β_{III} -тубулина, тем больше опухолевых почек.

Выявлена связь морфологических параметров колоректального рака с экспрессией конкретных тубулинов: более дифференцированное строение опухоли ассоциировано с более высоким содержанием β_1 -тубулина, ацетилированного и детирозинированного α -тубулинов и более низким уровнем β_{III} -тубулина. Установлено, что увеличение категории pT происходит параллельно снижению уровня тирозинированного и детирозинированного α -тубулинов, в то время как увеличение категории pN происходит параллельно увеличению экспрессии β_{III} -тубулина.

Установлено влияние экспрессии различных тубулинов клетками аденокарциномы толстой кишки на выживаемость пациентов: падение уровня β_1 -тубулина, ацетилированного и детирозинированного α -тубулинов и рост экспрессии β_{III} изоформа ассоциированы с неблагоприятным прогнозом течения заболевания. Высокая экспрессия β_{III} -тубулина в инвазивном фронте связана с риском прогрессирования опухолевого процесса у пациентов, получающих химиотерапию препаратами 5-фторурацила.

Доказано влияние β_{III} -тубулина на инвазивную активность клеток колоректального рака. Установлено, что реализация этого влияния опосредована через адгезию клеток к молекулам внеклеточного матрикса.

Обосновано блокирование экспрессии β_{III} -тубулина для подавления инвазивной активности раковых клеток.

Положения, выносимые на защиту

1. Микротрубочки нормальных колоноцитов содержат β_I -тубулин, ацетилованный, тирозинированный и детирозинированный α -тубулины. Для β_I -, ацетилованного, и детирозинированного тубулинов существует градиент распределения: в эпителии крипт экспрессия данных молекул достоверно выше, чем в поверхностном эпителии. Экспрессия β_{II} -, β_{III} -тубулинов и δ^2 -тубулина отсутствует.

2. Молекулярный состав микротрубочек при хронических воспалительных заболеваниях кишки и при колоректальном раке претерпевает общие изменения: экспрессия β_{III} -тубулина увеличивается, экспрессия ацетилованного α -тубулина снижается. Кроме того, наблюдаются разнонаправленные изменения уровня β_I -тубулина и тирозинированного α -тубулина.

3. При болезни Крона наблюдается повышение уровня β_I -тубулина и тирозинированного α -тубулина; при язвенном колите экспрессия β_I -тубулина понижается. Наличие в биопсийном материале эрозий слизистой оболочки толстой кишки связано с более низким уровнем ацетилованного α -тубулина. Дисплазия эпителия ассоциирована с более высоким уровнем β_I -тубулина, атрофия крипт сочетается с ростом экспрессии β_{III} изотипа.

4. В клетках колоректального рака, расположенных в центре опухоли, уровень всех изученных изотипов β -тубулина (β_I -, β_{II} -и β_{III}) и тирозинированного α -тубулина выше, чем в неопухолевым слизистой оболочке, при этом экспрессия ацетилованного α -тубулина снижена. В строме центра опухоли происходит рост уровня β_I -тубулина и падение экспрессии ацетилованного α -тубулина.

Экспрессия практически всех изученных тубулинов (β_I -тубулина и посттрансляционных модификаций α -тубулина) снижается в опухолевых почках инвазивного фронта относительно раковых клеток центра опухоли при одновременном росте уровня β_{III} -тубулина. В строме инвазивного фронта также имеет место снижение экспрессии β_I изотипа и посттрансляционных модификаций α -тубулина. Рост количества опухолевых почек связан с увеличением уровня β_{III} -тубулина в раковых клетках инвазивного фронта.

5. Морфологические параметры колоректального рака связаны с изменением уровня определенных тубулинов. Более дифференцированное строение опухоли ассоциировано с более высоким содержанием β_I -тубулина, ацетилованного и детирозинированного α -тубулинов, и с более низким уровнем β_{III} -тубулина. Снижение экспрессии тирозинированного и ацетилованного α -тубулинов связано с утратой опухолевыми клетками базальной ориентации ядер.

Стадия опухоли по системе TNM ассоциирована с определенным спектром экспрессии тубулинов: увеличение категории pT происходит параллельно снижению уровня тирозинированного и детирозинированного α -тубулинов в раковых клетках центра опухоли, категории pN – параллельно увеличению экспрессии β _{III}-тубулина опухолевыми клетками как центра, так и инвазивного фронта колоректального рака.

6. Спектр экспрессии тубулинов раковыми клетками центра опухоли влияет на опухолеспецифическую и беспрогрессивную выживаемость пациентов с колоректальным раком: падение уровня β _I-, ацетилированного и детирозинированного тубулинов и рост экспрессии β _{III} изотипа ассоциированы с неблагоприятным прогнозом течения заболевания.

Высокая экспрессия β _{III}-тубулина в опухолевых почках и строме инвазивного фронта связана с риском прогрессирования опухолевого процесса у пациентов, получающих химиотерапию препаратами 5-фторурацила, и поэтому может рассматриваться как маркер химиорезистентности.

7. β _{III}-тубулин играет важную роль в инвазивной активности клеток колоректального рака, при этом реализация этого влияния полностью или частично опосредована воздействием на систему адгезии клеток к молекулам внеклеточного матрикса. Блокирование экспрессии данного изотипа снижает инвазивную активность раковых клеток.

Личный вклад соискателя ученой степени

Соискателем совместно с научным консультантом выбрана тема исследования, сформулированы цель и задачи, определены пути достижения поставленных задач. Соискателем проведено изучение литературы по теме работы, разработан дизайн исследования. Автором спланирован и организован отбор пациентов для включения в исследование, проведена работа по организации сбора и доставки к месту исследования необходимого биологического материала, обеспечена возможность изготовления гистологических препаратов, проведения иммуногистохимического и иммунофлуоресцентного окрашивания, конфокальной микроскопии, культуральных исследований.

Автор лично осуществляла процесс морфологической диагностики заболеваний толстой кишки у всех пациентов; проводила лично или участвовала в макроскопической диссекции резецированных фрагментов кишечника у пациентов с КРР; отработывала и контролировала процесс иммуногистохимической и иммунофлуоресцентной окраски гистологических препаратов, проводила цитологическую и иммунофлуоресцентную окраску культур клеток; осуществляла оценку гистологических и иммуногистохимических препаратов; проводила микросъемку

гистологических препаратов и морфометрический анализ, участвовала в проведении конфокальной микроскопии. Создана компьютерная база, включающая данные пациентов, данные морфологического исследования и изображения. Автором написаны программы на основе языка R для проведения морфометрии иммунофлуоресценции. Автором проводилась денситометрия Вестерн-блоттинга, а также оценка инвазивной активности культур клеток.

Вся статистическая обработка и написание текста диссертации выполнены автором лично.

В наборе гистологического материала и клинических данных автору оказывалась помощь сотрудниками кафедры гастроэнтерологии и нутрициологии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», отделений гастроэнтерологии и функциональной диагностики УЗ «1-я городская клиническая больница», кафедры патологической анатомии УО «Белорусский государственный медицинский университет», онкохирургического отделения № 2 УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер», отделения онкоморфологии УЗ «Минское городское клиническое патологоанатомическое бюро» [3, 7–9, 12, 14–17, 19–28, 30–37, 39–40, 44–45, 47–55]. Интерпретация клинических данных проводилась совместно с сотрудниками кафедры гастроэнтерологии и нутрициологии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» [1, 2, 4–6, 11, 53–55]. Эксперименты с культурами клеток осуществлялись в лаборатории биотехнологий антител и цитокинов ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий» [10, 13, 21, 29, 55, 56]. Конфокальная микроскопия была выполнена в ГНУ «Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси» [38]. Исследование инвазивного фронта методом двойного иммуногистохимического окрашивания проводилось совместно с сотрудниками Каролинского Института (Стокгольм, Швеция) [14, 18, 41–43, 46]. Суммарное доленое участие соискателя в публикациях составило 85%.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты исследований, включенных в диссертацию, докладывались на I съезде патологоанатомов Республики Беларусь (Минск, 2006), Falk Symposium № 160 «Pathogenesis and Clinical Practice in Gastroenterology» (Portoroz, Slovenia, 2007), Falk Symposium № 161 «Future Perspectives in Gastroenterology» (Dresden, Germany, 2007), 15th United European Gastroenterology Week (Paris, France, 2007), 16th United European Gastroenterology Week (Vienna, Austria, 2009), 22th European Congress of Pathology (Florence, Italy, 2009), European Bridging Meeting in Gastroenterology (Berlin, Germany, 2010), 23rd European Student's Conference

(Berlin, Germany, 2012), 20th United European Gastroenterology Week (Amsterdam, Netherlands, 2012), Республиканской научно-практической конференции «Болезни слизистой оболочки кишечника», посвященной Всемирному дню здоровья пищеварительной системы (Минск, 2012), IX Международной научной конференции «Лазерная физика и оптические технологии» (Гродно, 2012), ASCO Annual 13 Meeting (Chicago, USA, 2013), XII KICancer retreat (Djoronas, Sweden, 2013), Республиканском семинаре с интернет-трансляцией «Болезни кишечника для морфолога и клинициста: клинико-морфологические параллели как основа тактики ведения» в рамках 20-й Международной выставки «Здравоохранение Беларуси – 2013» (Минск, 2013), ASCO Annual 14 Meeting (Chicago, USA, 2014), 25th European Student's Conference (Berlin, Germany, 2014), Leiden International Medical Students' Conference – LIMSC (Leiden, Netherlands, 2015), 7th International Conference on Tumor Microenvironment (Tel Aviv, Israel, 2015), 11th Congress of European Crohn's and Colitis Organization (ECCO) (Amsterdam, Netherlands, 2016), IX съезде онкологов и радиологов стран СНГ (Минск, 2016), 12th International Congress of Cell Biology (Prague, Czech Republic, 2016), 27th European Students Conference (Berlin, Germany, 2016), XXXI International Congress of the International Academy of Pathology and 28th Congress of the European Society of Pathology (Cologne, Germany, 2016).

На международном симпозиуме «Патогенез и клиническая практика в гастроэнтерологии» (Порторож, Словения, 2006 г.) стендовый доклад, содержащий фрагмент диссертационного исследования, был удостоен II премии.

Разработаны и утверждены Министерством здравоохранения 3 инструкции по применению. Результаты исследования внедрены в работу учреждений здравоохранения Республики Беларусь (ГУЗ «Гомельское областное патологоанатомическое бюро», УЗ «Минский консультативный диагностический центр», УЗ «Минская областная клиническая больница», УЗ «Минское городское клиническое патологоанатомическое бюро», ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», УЗ «Витебская областная клиническая больница», УЗ «Минское областное патологоанатомическое бюро», УЗ «Витебское областное клиническое патологоанатомическое бюро»), а также учебный процесс УО «Гомельский государственный медицинский университет», УО «Белорусский государственный медицинский университет», ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» УО «Витебский государственный медицинский университет» (всего 20 актов внедрения).

Опубликование результатов диссертации

По теме диссертации опубликовано: 23 статьи в научных журналах, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий, включая 3 статьи в странах дальнего зарубежья и 2 – в странах ближнего зарубежья (14,99 авторских листов), 7 работ в рецензируемых сборниках научных трудов и материалах конференций, 22 тезиса докладов в сборниках конференций (из них 20 зарубежных). По теме диссертации Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждены 3 инструкции по применению. Подана заявка на патент (получено положительное решение экспертизы).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, 3 глав (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований), заключения, библиографического списка и приложений. Диссертация изложена на русском языке, иллюстрирована 64 таблицами (34 страницы), 57 рисунками (38 страниц) и приложениями (23 страницы). Список использованной литературы включает 276 источников, в том числе 275 работ иностранных авторов, список публикаций соискателя состоит из 56 работ (7 страниц). Полный объем диссертации составляет 212 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Исследование было проведено на фиксированном в формалине гистологическом операционном материале 125 первичных колоректальных аденокарцином 124 пациентов (69 женщин и 55 мужчин). Медиана возраста на момент операции составила 65,0 лет (q_1 – q_3 57,0–73,0 года). Все пациенты были прооперированы в МГКОД одним и тем же хирургом в период с ноября 2009 г. по апрель 2011 г.

Медиана срока динамического наблюдения за пациентами составила 3,56 года (q_1 – q_3 1,24–4,36 года), максимальное время наблюдения – 5,47 лет. Наблюдение проводилось в УЗ МГКОД в соответствии с национальными протоколами: повторные обследования планировались в первые два года после операции – 1 раз в 6 месяцев, в последующие – 1 раз в год, при отказе пациента явиться в установленные сроки обследование проводилось «по обращаемости».

Прогрессией считалось возникновение опухолевого роста после радикально проведенной операции. Наличие либо отсутствие прогрессии устанавливалось на момент последнего в ходе динамического наблюдения визита.

Анализ экспрессии различных тубулинов в слизистой оболочке толстой кишки при ХВЗК был проведен на основе изучения 156 биопсийных фрагментов из 75 сегментов толстой кишки 39 пациентов (21 мужчины и 18 женщин; медиана возраста – 33,0 лет (q_1 – q_3 27,0–44,5 лет)) с ХВЗК и 102 биоптатов из 53 сегментов толстой кишки 23 пациентов группы сравнения (9 мужчин и 14 женщин, медиана возраста 49,0 лет (q_1 – q_3 38,5–55,5 лет)), которым колоноскопия с биопсией проводилась в рамках диагностического алгоритма и у которых были исключены ХВЗК и другие морфологические изменения слизистой оболочки толстой и терминального отдела подвздошной кишки. Среди пациентов с ХВЗК было 13 случаев БК и 27 – ЯК.

Дизайн исследования

Научная работа состояла из проспективного поперечного (одномоментного) аналитического, продольного (динамического), сравнительного (случай – контроль), а также экспериментального исследований и включала следующие блоки.

1. Характеристика экспрессии различных тубулинов при КРР основана на проспективном одномоментном исследовании 125 опухолей от 124 пациентов, прооперированных в МГКОД в 2009-2011 гг.

2. Характеристика экспрессии различных тубулинов при ХВЗК дана на основе проспективного одномоментного сравнительного (случай – контроль) исследования 39 пациентов с ХВЗК и 23 – группы сравнения, проходивших обследование в УЗ «1-я городская клиническая больница» в период с октября 2009 г. по август 2011 г.

3. Прогностическое и предикторное значение различных тубулинов при КРР установлено при помощи проспективного продольного исследования 124 пациентов с КРР.

4. Влияние различных тубулинов на свойства клеток КРР исследовалось экспериментально на клеточных культурах.

Методы исследования

Двойная иммунофлуоресценция (ИФ) проводилась для количественной оценки экспрессии различных тубулинов в эпителиальном и стромальном компартментах изучаемых групп. Для исследования были выбраны блоки с участком наиболее глубокого инвазивного роста опухоли. Гистологические срезы толщиной 4 мкм монтировались на предметные стекла, обработанные 3-аминопропилтриэтоксисиланом, инкубировались в термостате в течение 18 часов при температуре 37°C, депарафинировались и регидратировались. Демаскировка антигенов проводилась 2,5 мин при температуре 125°C и давлении 25 psi в нагреваемой барокамере DAKO Pascal. Инкубация

с коктейлем из первичных антител к тубулинам (ацетилованный α - – Sigma-Aldrich (США), 6-11В-1, мышинные IgG_{2b}, 1:800; тирозинированный α - – Sigma-Aldrich (США), TUB-1A2, мышинные IgG₃, 1:800; детирозинированный α - – Merck Millipore (Германия), кроличьи поликлональные антитела, 1:200; β _I- – Sigma-Aldrich (США), SAP.4G5, мышинные IgG₁, 1:1200; β _{III}- – Promega (США), 5G8, мышинные IgG₁, 1:1000) и панцитокератину (ДАКО (Дания), клон AE1/3, мышинные IgG₁, 1:400; ДАКО (Дания), Wide Spectrum Screening, кроличьи поликлональные антитела, 1:1250) проводилась в холодильной камере при 4°C в течение 18 ч.

Для визуализации применялся коктейль вторичных гусиных антител, конъюгированных с флуорохромами AlexaFluor[®] (Life Technologies, США), в разведении 1:200. Ядра докрашивались DAPI (Sigma-Aldrich, США). Для проведения отрицательного контрольного окрашивания исключалось первичное антитело к тубулину. Срезы с интенсивным окрашиванием служили в качестве положительного контроля. Окрашенные срезы заключались в среду, содержащую антивыцветающий агент (ProLong Antifade Gold, Life Technologies (США) и Fluorescence Mounting Medium, ДАКО (Дания)).

Иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание с антителами к панцитокератину (ДАКО (Дания), клон AE1/AE3, мышинные IgG₁, 1:400) использовалось для более точной визуализации опухолевых почек (ОП). Также исследование ряда тубулинов (β _{II}- – BioGenex (США), JDR3B8, мышинные IgG_{2b}, 1:40 и δ ²-тубулин – Merck Millipore (Германия), кроличьи поликлональные антитела, 1:2000) проводилось при помощи ИГХ, так как на предварительном этапе была установлена низкая частота встречаемости позитивного окрашивания в исследуемых группах, в связи с чем проведение двойной ИФ было признано избыточным.

Съемка производилась на микроскопе с флуоресцентной осью Leica DM5000 цифровой камерой Leica DFC420c с использованием объектива $\times 20$: по 3 случайных непересекающихся поля зрения из центральной зоны и 3 непересекающихся последовательных поля зрения из инвазивного фронта каждой опухоли. В качестве контроля выступала неопухолевая слизистая оболочка 60 случаев. В контрольной ткани также было снято по 3 непересекающихся поля зрения. В гистологических препаратах биопсийного материала в каждом исследованном сегменте толстой кишки проводилась съемка до 4 неперекрывающихся полей зрения.

Детекция флуоресценции DAPI (ядра, синий канал) производилась при помощи куба флуоресцентных фильтров Leica A4, AlexaFluor[®] 488 (зеленый канал) – L5, AlexaFluor[®] 546 и 555 (красный) – Y3. Для исключения систематической ошибки выбора, связанной с влиянием видимой позитивной искомой реакции на решение исследователя, выбор поля зрения для съемки

проводился «вслепую» по каналу, на котором визуализировался цитокератин. Для обработки изображений использовался программный пакет eCognition Developer v.9 (Trimble, Германия).

Средняя интенсивность свечения региона ($I_{\text{рег}}$) определялась как отношение интенсивности свечения к площади региона. Измерялись также интенсивность свечения нервных стволиков, служивших внутренним позитивным контролем ($I_{\text{к+}}$), и свечение эпителия и стромы в отрицательном контрольном препарате ($I_{\text{эп.к-}}$ и $I_{\text{стр.к-}}$ соответственно).

Нормализованный уровень экспрессии (НУЭ) вычислялся по формуле:

$$\text{НУЭ} = \frac{I_{\text{рег}} - I_{\text{эп.к-}}}{I_{\text{к+}} - I_{\text{стр.к-}}} \times 100.$$

Идентификация эпителиальных кластеров, принадлежащих ОП, производилась по значениям их площади. При помощи ROC-кривой были определены минимальные и максимальные значения этих показателей, с наибольшей чувствительностью и специфичностью характеризовавшие ОП.

Анализ ИФ изображений нормальной слизистой оболочки вне опухоли, а также биопсийного материала из групп ХВЗК и сравнения проходил аналогичным образом с тем отличием, что эпителиальные клетки подразделялись на эпителий крипт и поверхностный эпителий.

Клеточный эксперимент был проведен на клеточных линиях КРР человека НТ-29 и НСТ 116. Для ИФ клетки культивировали на покровных стеклах, помещенных в чашки Петри. После достижения клетками около 70% монослоя стекла фиксировали в ацетоне-метаноле. Для ИФ культур клеток использовались те же антитела и в том же разведении, что и для окрашивания гистологических срезов.

Для проведения иммуноблоттинга белковые фракции после электрофореза переносили с помощью электроэлюции из геля на нитроцеллюлозные мембраны Hybond C (Pharmacia, США). Мембраны инкубировали с антителами в течение 18 ч, отмывали и инкубировали с полимерной системой визуализации EnVision (DAKO, Дания), проявляли с помощью хромогена диаминобензидин (BioGenex, США). Денситометрическое измерение результатов Вестерн-блоттинга проводилось с использованием программного пакета ImageJ 1.47v (НИН, США).

РНК-интерференция в клеточных линиях получена путем трансфекции в клетки малых интерферирующих РНК (миРНК), специфичных к разным участкам гена β_{III} -тубулина (siGENOME SMARTpool TUBB3, Dharmacon, Thermo Scientific, США). В качестве контроля использовалась нецелевая миРНК, не имеющая гомологии ни к одному известному гену в последовательности ДНК человека (ON-TARGETplus Non-targeting Pool, Dharmacon, Thermo Scientific, США). Трансфекция осуществлялась

с использованием реагента для трансфекции dharmaFECT siRNA (Dharmacon, Thermo Scientific, США) согласно рекомендациям производителя. Успешность проведения трансфекции контролировалась при помощи иммуоблоттинга.

Инвазивная активность клеток оценивалась в инвазивных камерах Costar (Corning, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Мембраны-вкладыши с 8,0 мкм порами покрывались Matrigel (BD Biosciences, США) или бычьим коллагеном I типа (Gibco, США). Подсчет инвазивировавших клеток на нижней поверхности мембраны производился в 5 независимых полях зрения светового микроскопа ($\times 200$).

Для оценки адгезивных свойств клетки рассеивались в лунки 24-луночного культурального планшета (Costar, США), предварительно покрытые коллагеном I типа (Gibco, США). После 2 ч культивирования при $+37^\circ\text{C}$ среда с неадгезированными клетками удалялась. Подсчет неадгезированных клеток проводился с использованием трипанового синего (Sigma-Aldrich, США). Уровень адгезии (УА) вычислялся по формуле:

$$\text{УА} = 1 - \frac{\text{число клеток в супернатанте (неадгезировавших)}}{\text{число клеток, посаженных в лунку}} \times 100\%.$$

Для анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла проводилась окраска пропидием иодидом предварительно фиксированных в 70% ледяном этаноле клеток. Процессы гибели клеток анализировались с использованием набора Annexin V-FITC / 7-AAD Kit (Beckman Coulter, США) в соответствии с инструкцией производителя. Результаты учитывались на проточном цитофлуориметре Becton Dickinson FACScan.

Оценка ростовых свойств клеток проводилась следующим образом: после трансфекции клетки выращивались 48 ч в 6-луночной культуральной плате, затем культура трипсинизировалась, число живых клеток подсчитывалось в камере Горяева. Ростковая активность выражалась в процентах относительно контрольной культуры.

Статистический анализ производился с использованием пакета RStudio, v. 0.98.1103 (RStudio, Inc., США). Данные описательной статистики указаны в виде медианы (Me) и квартилей (перцентиль 25% – q_1 , перцентиль 75% – q_3). Сравнение групп проводилось при помощи двустороннего теста Манна–Уитни с поправкой Бонферрони (p_{mu}). Для сравнения частот признаков в различных группах применялся критерий Пирсона χ^2 с поправкой Йэйтса (p_{χ^2}). Парные зависимые переменные сравнивались методом Вилкоксона (p_w). Определение связи между параметрами проводилось методом многофакторного линейного регрессионного анализа. Влияние на выживаемость в различных группах оценивалось при помощи построения кривых Каплана–Майера и их сравнения лог-ранг тестом (p_{lr}). Отсекающее значение при формировании групп для

анализа выживаемости определялось с помощью веб-сервиса Cutoff Finder <http://molpath.charite.de/cutoff/index.jsp>. Статистическая обработка результатов клеточного эксперимента проводилась с использованием Microsoft Office Excel 365, результаты представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего. Для анализа данных (не менее 3 независимых экспериментов) применялся однофакторный ANOVA тест (p_{AN}). Нулевая гипотеза о равенстве выборок отвергалась при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологическая характеристика групп

КРР в подавляющем числе случаев локализовался в левых отделах толстой кишки (74,4%). Категория pT распределилась следующим образом: 1 – 2,4%, 2 – 9,6%, 3 – 64,0%, 4 – 24,0%. Категория pN: 0 – 47,2%, 1 – 23,2%, 2 – 29,6%. Категория M1 была установлена в 16,8% случаев. В исследование были включены только первичные аденокарциномы. Кроме классического варианта (81,6%) было выявлено еще 5 форм аденокарцином: слизистая (12,0%), крибриформная комедо-карцинома (2,4%), микропапиллярная (1,6%), зубчатая (0,8%), перстневидноклеточный рак (0,8%) и медуллярный рак (0,8%). Степень злокачественности (категория G) была представлена: 1 – 11,2%, 2 – 62,4%, 3 – 26,4%. Полярность ядер сохранялась в 88,0% опухолей. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты присутствовали в 10,4% случаев. Зрелая строма [H. Ueno et al., 2004] была выявлена в 29,6% аденокарцином, промежуточная – в 26,4%, незрелая – в 44,0%. Келоидоподобный тип стромы [F. Prall et al., 2007] присутствовал в 53,0% опухолей. Инвазия лимфатических сосудов была выявлена в 27,2% случаев КРР, инвазия вен – в 28,8%.

ХВЗК определялись как хронические колиты с деструкцией крипт, которые характеризовались инфильтрацией всей толщи слизистой оболочки с появлением базального плазмацитоза, а также нарушением гистоархитектоники слизистой оболочки. Признаками гистоархитектонических нарушений являлись ветвление и изменение формы крипт, атрофия и неровность – «виллиформность» – поверхности слизистой оболочки. Инфильтрат состоял преимущественно из плазматических клеток, проникших в базальные отделы собственной пластинки слизистой оболочки. При активном процессе в lamina propria содержалось значительное количество нейтрофилов, инфильтрировавших эпителий крипт, а также поверхностный эпителий (76,0%) с эрозированием последнего (26,7%). ЯК, в дополнение к вышеуказанным признакам, характеризовался непрерывным диффузным воспалением, а БК – прерывистым диффузным или фокальным колитом с наличием или отсутствием эпителиоидноклеточных гранул, а также частым сочетанием с илеитом.

Уплотнение поверхностного эпителия присутствовало в 37,3% случаев ХВЗК, активность воспаления – в 78,7%, снижение содержания бокаловидных клеток – в 56,0%, атрофия крипт – в 52,0%, дисплазия – в 2,6%. Сравнительный анализ частот гистологических изменений не выявил различий между группами ЯК и БК.

Характеристика экспрессии изотипов β -тубулина

β_1 -тубулин. β_1 -тубулин присутствовал в составе микротрубочек интерфазной сети и митотических веретен всех клеток как эпителиального, так и мезенхимального компонентов.

В неопухолевого слизистой оболочке наименьший нормализованный уровень β_1 -тубулина наблюдался в поверхностном эпителии, а наиболее высокий – в эпителии крипт и строме ($p_{\text{mu}} < 0,001$) (таблица 1).

Таблица 1. – НУЭ β_1 -тубулина в операционном материале

Компартмент		Количество полей зрения	Медиана	q ₁	q ₃
Неопухолевая слизистая оболочка					
Поверхностный эпителий		77	20,5	11,2	28,3
Эпителий крипт		162	36,0	23,6	56,4
Строма		162	36,8	25,2	53,1
КРР					
Раковые клетки вне ОП	центр	375	78,8	45,2	109,3
	инвазивный фронт	372	73,1	45,8	97,7
ОП	центр	87	52,4	27,6	79,1
	инвазивный фронт	307	55,1	35,4	80,7
Строма	центр	375	58,2	37,7	80,7
	инвазивный фронт	375	48,5	33,2	66,6

Установлено, что уровень экспрессии β_1 -тубулина в клетках КРР выше, чем в нормальном эпителии толстой кишки ($p_{\text{mu}} < 0,001$): максимальный нормализованный уровень имел место в раковых клетках, не относящихся к ОП, причем экспрессия данного белка в инвазивном фронте не отличалась от экспрессии в центре. Для стромального компонента наибольший уровень β_1 -тубулина был установлен в центре опухоли. В инвазивном фронте экспрессия данного изотипа была ниже, чем в центре ($p_{\text{mu}} < 0,001$), но выше, чем в нормальной слизистой оболочке ($p_{\text{mu}} < 0,001$).

Методом многофакторного линейного регрессионного анализа установлено, что более высокая экспрессия β_1 -тубулина в ОП, располагавшихся в центре опухоли, сочетается с более продвинутой клинической стадией заболевания ($\beta=30,8$ (95% ДИ 2,5–59,1), $p=0,040$) и наличием инвазии лимфатических сосудов ($\beta=42,0$ (95% ДИ 2,2–81,9), $p=0,047$). Уровень этого тубулина в ОП инвазивного фронта изменяется параллельно с количеством ОП в поле зрения ($\beta=2,6$ (95% ДИ 0,4–4,8), $p=0,026$). Повышение уровня β_1 -тубулина в опухолевых клетках в центре КРР ассоциировано с наличием опухолю-

инфильтрирующих лимфоцитов ($\beta=147,6$ (95% ДИ 31,3–263,8), $p=0,015$) и с увеличением количества ОП в инвазивном фронте ($\beta=9,8$ (95% ДИ 3,9–15,7), $p=0,002$). Повышенная экспрессия данного изотипа в инвазивном фронте в раковых клетках вне ОП ассоциирована с более высоким показателем ОП в инвазивной части опухоли ($\beta=2,6$ (95% ДИ 0,4–4,8), $p=0,026$). Обычный тип стромы в зоне инвазии связан с понижением уровня данного белка ($\beta= -39,8$ (95% ДИ -77,8 – -1,7), $p=0,043$) в раковых клетках инвазивного фронта.

Уровень экспрессии β_1 -тубулина в стромальном компоненте как центра, так и инвазивной части КРР изменялся параллельно с количеством ОП ($\beta=5,2$ (95% ДИ 1,9–8,5), $p=0,003$ и $\beta=2,2$ (95% ДИ 0,8–3,7), $p=0,004$ соответственно). Более высокий НУЭ сочетался с наличием опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов ($\beta=88,4$ (95% ДИ 23,1–153,6), $p=0,010$ и $\beta=34,2$ (95% ДИ 5,2–63,2), $p=0,023$ соответственно). Более того, повышенная экспрессия данного белка в стромальном компоненте инвазивного края была ассоциирована с пиогенной перитуморозной реакцией ($\beta=17,5$ (95% ДИ 0,4–34,5), $p=0,048$) и, наоборот, низкий уровень экспрессии – с наличием метастаза в апикальном лимфоузле ($\beta= -26,8$ (95% ДИ -52,1 – -1,4), $p=0,041$).

Установлено, что уровень β_1 -тубулина в опухолевых клетках зависит от преобладающего гистоархитектонического строения. В частности, участки, не имевшие тубулярного строения или представленные иррегулярными железами, не различались по уровню экспрессии данного изотипа ($p_{\text{mu}}=1,0$), однако содержали меньше β_1 -тубулина, чем сложные ($p_{\text{mu}}<0,001$) или простые железы ($p_{\text{mu}}=0,011$ и $p_{\text{mu}}=0,008$ соответственно). Сложные и простые железы не отличались друг от друга по экспрессии данного белка ($p_{\text{mu}}=0,350$).

В биоптатах толстой кишки наблюдались разнонаправленные изменения: при БК по сравнению с нормальной слизистой оболочкой увеличивался уровень β_1 -тубулина в поверхностном эпителии ($p_{\text{mu}}<0,001$) и в строме ($p_{\text{mu}}<0,001$), при ЯК экспрессия данного изотипа в эпителии крипт уменьшалась ($p_{\text{mu}}<0,001$) (таблица 2).

Таблица 2. – НУЭ β_1 -тубулина в слизистой оболочке толстой кишки при ХВЗК и в группе сравнения

Компартмент	Группа	Количество полей зрения	Медиана	q ₁	q ₃
Поверхностный эпителий	группа сравнения	154	37,7	24,3	48,2
	ЯК	194	32,7	24,3	49,6
	БК	97	44,3	30,3	56,2
Эпителий крипт	группа сравнения	154	80,8	63,8	98,5
	ЯК	202	66,3	47,3	91,8
	БК	104	70,0	70,6	109,6
Строма	группа сравнения	154	39,0	24,1	53,7
	ЯК	207	44,3	32,4	62,6
	БК	104	50,2	37,8	68,8

Методом многофакторного линейного регрессионного анализа было установлено, что дисплазия сочетается с более высокой экспрессией β_1 -тубулина в поверхностном эпителии ($\beta=42,8$ (95% ДИ 16,3–69,2), $p=0,003$).

Снижение НУЭ β_1 -тубулина в раковых клетках центральных областей КРР ассоциировалось с более высоким риском прогрессирования ($p_{lr}=0,0078$) и высокой вероятностью смерти от КРР в течение 3,56 года (q_1-q_3 1,24–4,36 года) после операции ($p_{lr}=0,0148$). Понижение уровня β_1 -тубулина в клетках КРР в инвазивном фронте также было неблагоприятным фактором как для беспрогрессивной (НУЭ $\leq 141,6$) ($p_{lr}=0,0022$), так и для опухолеспецифической (НУЭ $\leq 73,5$) ($p_{lr}=0,0247$) выживаемости пациентов (рисунок 1).

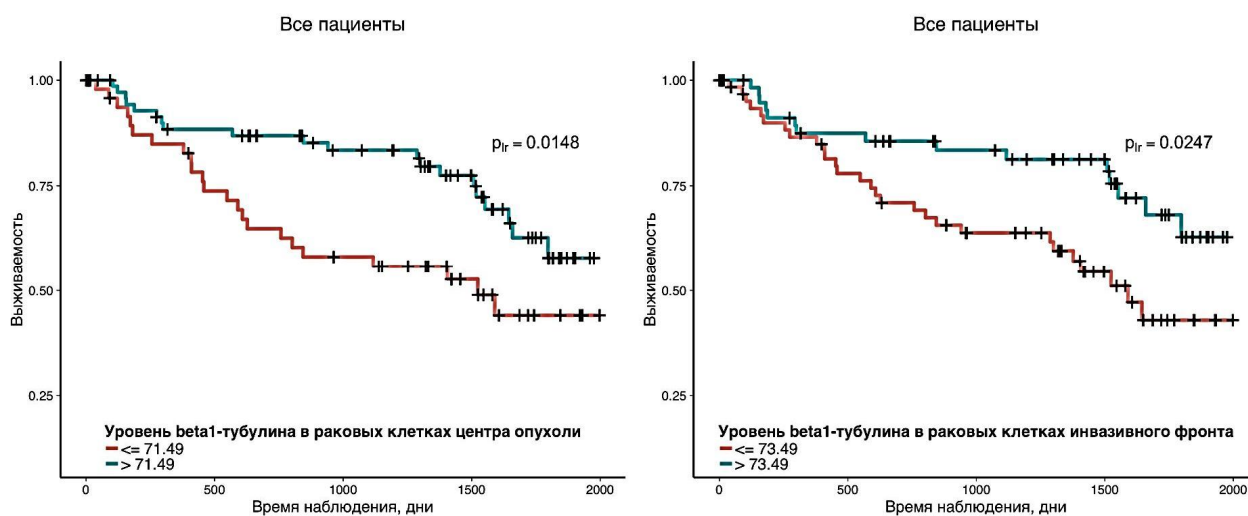


Рисунок 1. – Опухолеспецифическая выживаемость пациентов с КРР в зависимости от нормализованного уровня β_1 -тубулина

β_{II} -тубулин. В эпителии нормальной слизистой оболочки толстой кишки экспрессия β_{II} -тубулина отсутствовала. Позитивно окрашивались единичные клетки в строме, гладкие мышцы, а также нервные ганглии и стволики, служившие внутренним позитивным контролем. В КРР позитивное окрашивание выявлено в 35 случаях (28%). При этом окрашивались как цитоплазма (35 случаев – 28,0%), так и ядра (14 случаев – 11,2%). Как правило, экспрессия β_{II} -тубулина визуализировалась менее, чем в 5% клеток, и носила слабо или умеренно интенсивный характер. Положительно окрашивались как участки в центре опухоли (30 опухолей – 24%), так и в области инвазивного фронта (19 случаев – 15,2%). Окрашивание ОП имело место в отдельных случаях (2 наблюдения – 1,6%). При этом эксклюзивная экспрессия β_{II} -тубулина только в инвазивном фронте наблюдалась в 14,3% опухолей (5/35), только в центре КРР – в 48,6% (17/35).

В препаратах биопсий пациентов с ХВЗК и группы сравнения эпителиальная экспрессия β_{II} -тубулина отсутствовала.

Экспрессия β_{II} -тубулина в инвазивном фронте достоверно повышала вероятность прогрессии заболевания, причем данная закономерность выявлена как для цитоплазматического, так и для ядерного окрашивания ($p_{II}=0,0168$ и $p_{II}<0,001$ соответственно).

β_{III} -тубулин. Экспрессия β_{III} -тубулина практически отсутствовала в нормальной слизистой оболочке. В КРР β_{III} -тубулин присутствовал в той или иной степени практически во всех случаях, при этом в цитоплазме эпителиальных клеток отчетливо выявлялись микротрубочки в виде нитевидных структур. Визуализировались также веретена деления в раковых клетках, причем как нормальной, так и патологической конфигурации.

Установлено, что уровень экспрессии β_{III} -тубулина в клетках КРР выше, чем в нормальном эпителии толстой кишки: максимальный нормализованный уровень наблюдался в ОП инвазивного фронта, несколько ниже – в ОП центра опухоли и в раковых клетках инвазивного фронта вне ОП (таблица 3).

Таблица 3. – НУЭ β_{III} -тубулина в операционном материале

Компартмент		Количество полей зрения	Медиана	q_1	q_3
Неопухолевая слизистая оболочка					
Поверхностный эпителий		62	1,6	-1,4	5,1
Эпителий крипт		209	-1,1	-4,1	2,1
Строма		209	4,4	2,2	6,8
КРР					
Раковые клетки вне ОП	центр	375	0,8	-2,6	4,7
	инвазивный фронт	374	4,2	-0,5	11,7
ОП	центр	92	4,7	-0,1	12,3
	инвазивный фронт	330	12,0	3,5	25,1
Строма	центр	375	3,4	1,1	6,4
	инвазивный фронт	375	2,3	0,4	5,6

Методом многофакторного линейного регрессионного анализа установлено, что экспрессия β_{III} -тубулина в инвазивном фронте как в ОП, так и вне их, увеличивается параллельно с категорией pN ($\beta=4,0$ (95% ДИ 0,8–7,2), $p=0,015$ и $\beta=7,8$ (95% ДИ 2,6–13,0), $p=0,004$). Количество ОП в поле зрения также позитивно связано с экспрессией β_{III} изотипа клетками опухоли в инвазивном фронте, причем как в составе ОП, так и вне их ($\beta=1,1$ (95% ДИ 0,5–1,6), $p<0,001$ и $\beta=0,9$ (95% ДИ 0,5–1,3), $p<0,001$ соответственно). Крон-подобная реакция ассоциирована с более низким НУЭ β_{III} -тубулина как в строме центра, так и в строме инвазивного фронта опухоли ($p=0,014$ и $p=0,010$ соответственно).

Установлено, что уровень β_{III} -тубулина в опухолевых клетках зависит от преобладающего гистоархитектонического строения. В частности, максимальная экспрессия наблюдалась в участках, не имевших тубулярного строения, минимальная – в простых и сложных железах.

В биоптатах толстой кишки пациентов с ХВЗК и группы сравнения отмечалась схожая ситуация: минимальная экспрессия β_{III} -тубулина в эпителиальном компартменте наблюдалась в группе сравнения, максимальная – при ЯК (таблица 4).

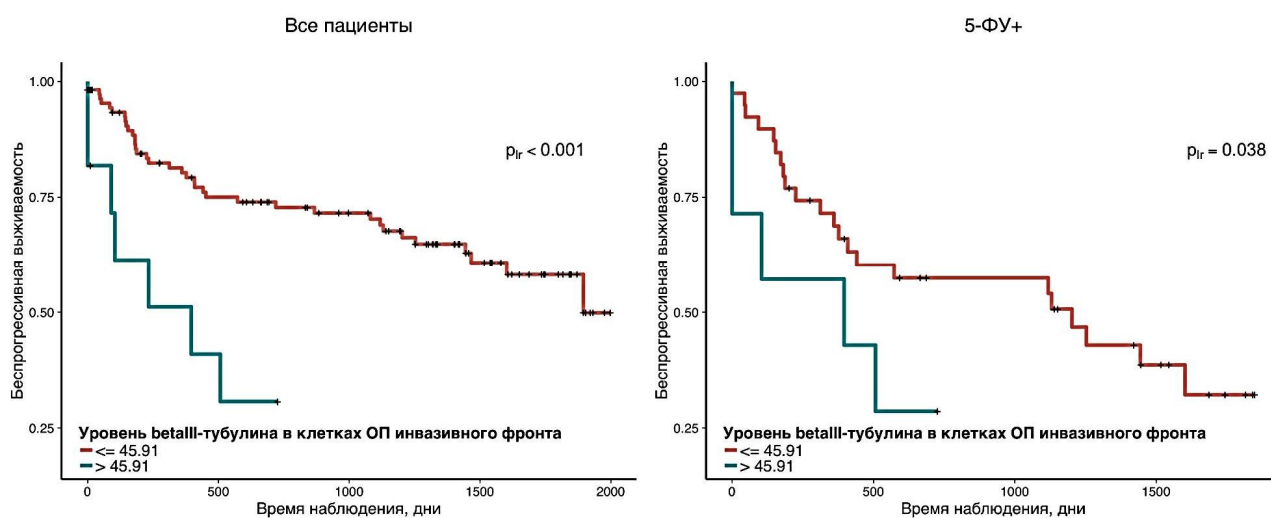
Таблица 4. – НУЭ β_{III} -тубулина в различных компартментах слизистой оболочки толстой кишки при ХВЗК и в группе сравнения

Компартмент	Группа	Количество полей зрения	Медиана	q ₁	q ₃
Поверхностный эпителий	группа сравнения	156	0,6	-2,0	2,8
	БК	83	1,8	-2,2	5,7
	ЯК	146	2,8	0,3	6,0
Эпителий крипт	группа сравнения	163	1,6	-0,5	4,4
	БК	92	1,7	-2,0	6,9
	ЯК	178	3,2	0,9	7,0
Строма	группа сравнения	163	4,7	0,7	8,5
	БК	92	2,7	-2,3	9,3
	ЯК	185	3,8	-5,0	8,5

Многофакторный линейный регрессионный анализ выявил, что повышенный уровень β_{III} изотипа как в поверхностном эпителии, так и в колоноцитах крипт ассоциирован с атрофией крипт ($\beta=5,4$ (95% ДИ 1,1–9,7), $p=0,018$ и $\beta=5,2$ (95% ДИ 1,2–9,1), $p=0,013$ соответственно).

Более высокий риск прогрессирования и смерти от КРР был связан с повышением НУЭ β_{III} -тубулина в раковых клетках центральных областей опухоли выше 12,7 ($p_{lr}=0,0015$) и 9,7 ($p_{lr}=0,0006$) соответственно. Аналогичная закономерность прослеживалась и для раковых клеток в инвазивном фронте: выше 26,7 ($p_{lr} < 0,0001$) и 20,1 ($p_{lr}=0,0053$) соответственно.

Высокая вероятность прогрессирования заболевания сочеталась с экспрессией β_{III} изотипа в ОП инвазивного фронта выше 45,9 ($p_{lr} < 0,0001$), причем в наибольшей степени у пациентов III–IV стадии ($p_{lr}=0,0106$) и пациентов, получавших химиотерапию ($p_{lr}=0,0380$) (рисунок 2).



Характеристика экспрессии посттрансляционных модификаций α -тубулина

Ацетилированный α -тубулин. Экспрессия ацетилированного (Ац-) тубулина присутствовала во всех случаях, при этом в цитоплазме эпителиальных клеток отчетливо окрашивались нитевидные структуры, являющиеся, вероятно, микротрубочками. Визуализировались также веретена деления в нормальных колоноцитах и раковых клетках, причем как нормальной, так и патологической конфигурации.

Установлено, что уровень экспрессии Ац-тубулина в клетках КРР ниже, чем в нормальном эпителии толстой кишки ($p_{mu} < 0,001$). Более того, экспрессия данного белка раковыми клетками в инвазивном фронте уменьшалась по сравнению с центральной зоной ($p_{mu} < 0,001$), при этом для ОП была характерна наименьшая экспрессия Ац-тубулина ($p_{mu} < 0,001$). Аналогичная закономерность прослеживалась и для стромального компонента: строма нормальной слизистой оболочки характеризовалась наибольшей экспрессией Ац-тубулина ($p_{mu} < 0,001$), в центре опухоли его уровень снижался ($p_{mu} < 0,001$), при этом наименьший показатель наблюдался в строме инвазивного фронта ($p_{mu} < 0,001$) (таблица 5).

Таблица 5. – НУЭ Ац-тубулина в операционном материале

Компартмент		Количество полей зрения	Медиана	q ₁	q ₃
Неопухолевая слизистая оболочка					
Поверхностный эпителий		70	13,0	8,4	24,6
Эпителий крипт		177	25,8	17,6	44,8
Строма		177	13,2	7,8	21,2
КРР					
Раковые клетки вне ОП	центр	375	12,8	8,6	20,5
	инвазивный фронт	373	9,5	6,8	14,4
ОП	центр	94	5,6	2,8	10,6
	инвазивный фронт	307	5,3	3,2	9,6
Строма	центр	375	4,8	2,3	8,5
	инвазивный фронт	373	2,2	1,0	3,8

Уровень Ац-тубулина в опухолевых клетках зависел от преобладающего гистоархитектонического строения. В частности, участки, не имевшие тубулярного строения, содержали меньше Ац-тубулина, чем иррегулярные железы ($p_{mu} = 0,001$). В иррегулярных железах уровень экспрессии Ац-тубулина был меньше, чем в сложных ($p_{mu} = 0,029$) или простых ($p_{mu} < 0,001$) железах.

Методом многофакторного линейного регрессионного анализа установлено, что более высокая экспрессия Ац-тубулина в раковых клетках центра КРР сочеталась с сохранением полярности ядер в опухолевых клетках ($\beta = -7,4$ (95% ДИ -13,6 – -1,3), $p = 0,020$).

В биоптатах толстой кишки максимальная экспрессия Ац-тубулина в эпителиальном компартменте наблюдалась в эпителии крипт группы сравнения, минимальная – в поверхностном эпителии биоптатов пациентов с ЯК (таблица 6).

Таблица 6. – НУЭ Ац-тубулина в различных компартментах слизистой оболочки толстой кишки при ХВЗК и в группе сравнения

Компартмент	Область	Количество полей зрения	Медиана	q ₁	q ₃
Поверхностный эпителий	группа сравнения	159	29,8	24,0	39,1
	ЯК	182	19,2	13,7	26,1
	БК	71	23,6	19,2	33,7
Эпителий крипт	группа сравнения	162	42,6	37,5	53,2
	ЯК	197	27,7	19,7	35,2
	БК	75	35,9	29,1	48,4
Строма	группа сравнения	162	16,1	13,3	19,9
	ЯК	201	10,5	8,4	13,7
	БК	77	13,0	9,8	19,8

Многофакторный линейный регрессионный анализ выявил, что снижение экспрессии Ац-тубулина как в эпителии, так и в строме у пациентов с ХВЗК сочеталось с наличием эрозий в биопсийном материале ($\beta = -5,5$ (95% ДИ $-10,2 - -0,8$), $p = 0,025$).

При анализе выживаемости было установлено, что прогрессирование процесса в послеоперационный период у пациентов с III и IV стадиями связано со значительным снижением уровня Ац-тубулина как в раковых клетках (НУЭ $\leq 6,1$, $p_{lr} = 0,0169$), так и в строме центральных областей опухоли (НУЭ $\leq 3,1$, $p_{lr} = 0,0388$) (рисунок 3).

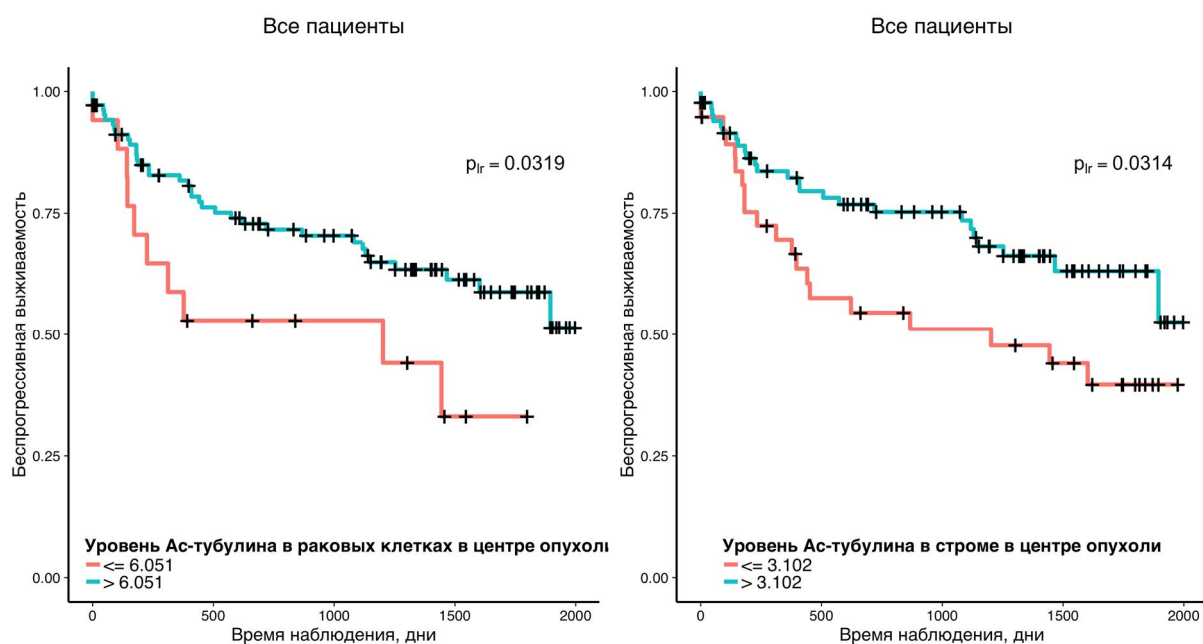


Рисунок 3. – Беспрогрессивная выживаемость пациентов с КРР в зависимости от нормализованного уровня Ац-тубулина

Тирозинированный α -тубулин. Тирозинированный (Тир-) тубулин экспрессировался во всех случаях в составе интерфазных и митотических микротрубочек. В нормальной слизистой оболочке наибольший нормализованный уровень Тир-тубулина наблюдался в эпителии крипт, а достоверно более низкий – в строма ($p_{mu}=0,003$). По содержанию этого белка поверхностный эпителий занимал промежуточное положение и не отличался от эпителия крипт ($p_{mu}=0,190$) и стромального компонента ($p_{mu}=1,0$).

Установлено (таблица 7), что уровень экспрессии Тир-тубулина в клетках КРР выше, чем в нормальной эпителии толстой кишки – максимальный нормализованный уровень наблюдался в раковых клетках, не относящихся к ОП. В ОП НУЭ данного тубулина был ниже, чем в остальных клетках КРР, причем как в центре, так и в инвазивном фронте ($p<0,001$ и $p<0,001$ соответственно) (таблица 7).

Таблица 7. – НУЭ Тир-тубулина в операционном материале

Компартмент	Количество полей зрения	Медиана	q ₁	q ₃	
Неопухолевая слизистая оболочка					
Поверхностный эпителий	60	12,0	6,3	25,0	
Эпителий крипт	180	22,6	9,6	49,3	
Строма	180	12,2	5,4	30,2	
КРР					
Раковые клетки вне ОП	центр	375	39,7	13,0	60,5
	инвазивный фронт	374	32,5	14,8	50,4
ОП	центр	123	20,4	7,8	39,5
	инвазивный фронт	290	22,0	10,0	40,5
Строма	центр	375	10,1	1,3	22,8
	инвазивный фронт	375	4,8	0,6	11,8

В стромальном компоненте наибольшая экспрессия Тир-тубулина наблюдалась в нормальной слизистой оболочке и в центре опухоли. В инвазивном фронте экспрессия данного изотипа была ниже ($p<0,001$).

Уровень Тир-тубулина практически не зависел от преобладающего гистоархитектонического строения.

У пациентов с БК наблюдалась более высокая экспрессия Тир-тубулина в эпителии крипт ($p=0,008$) и в стромальном компартменте ($p=0,001$), чем в группе сравнения (таблица 8).

В группе КРР методом многофакторного линейного регрессионного анализа было установлено, что более низкая экспрессия Тир-тубулина в раковых клетках вне ОП центра опухоли связана с более высокой категорией pT ($\beta= -10,0$ (95% ДИ $-17,9 - -2,1$), $p=0,015$), отсутствием полярности ядер ($\beta= -19,6$ (95% ДИ $-34,6 - -4,6$), $p=0,012$), экспансивным ростом ($\beta= -14,0$ (95% ДИ $-26,6 - -1,3$), $p=0,033$) и Крон-подобной перитуморозной реакцией ($\beta= -17,1$

(95% ДИ -28,7 – -5,5), $p=0,005$). Более высокий уровень экспрессии данного белка ассоциировался с обычным типом стромы ($\beta=13,7$ (95% ДИ 0,9 – 26,6), $p=0,039$).

Таблица 8. – НУЭ Тир-тубулина в различных компартментах слизистой оболочки толстой кишки при ХВЗК и в группе сравнения

Компартмент	Группа	Количество полей зрения	Медиана	q ₁	q ₃
Поверхностный эпителий	группа сравнения	140	47,1	36,1	68,0
	БК	55	58,4	43,0	71,8
	ЯК	137	53,7	39,6	73,5
Эпителий крипт	группа сравнения	149	64,5	47,7	90,3
	БК	66	85,0	60,2	116,0
	ЯК	149	75,8	55,3	99,5
Строма	группа сравнения	149	28,4	19,2	38,4
	БК	66	37,0	28,2	50,1
	ЯК	151	30,6	20,3	46,0

Прогрессия и высокая вероятность смерти от КРР ассоциировалась со снижением уровня Тир-тубулина в ОП центральных областей КРР (НУЭ $\leq 28,53$, $p_{lr}=0,0357$ и НУЭ $\leq 18,33$, $p_{lr}=0,0311$ соответственно). Данная закономерность в наибольшей степени характеризовала пациентов с III и IV стадиями заболевания ($p_{lr}=0,0484$) (рисунок 4).

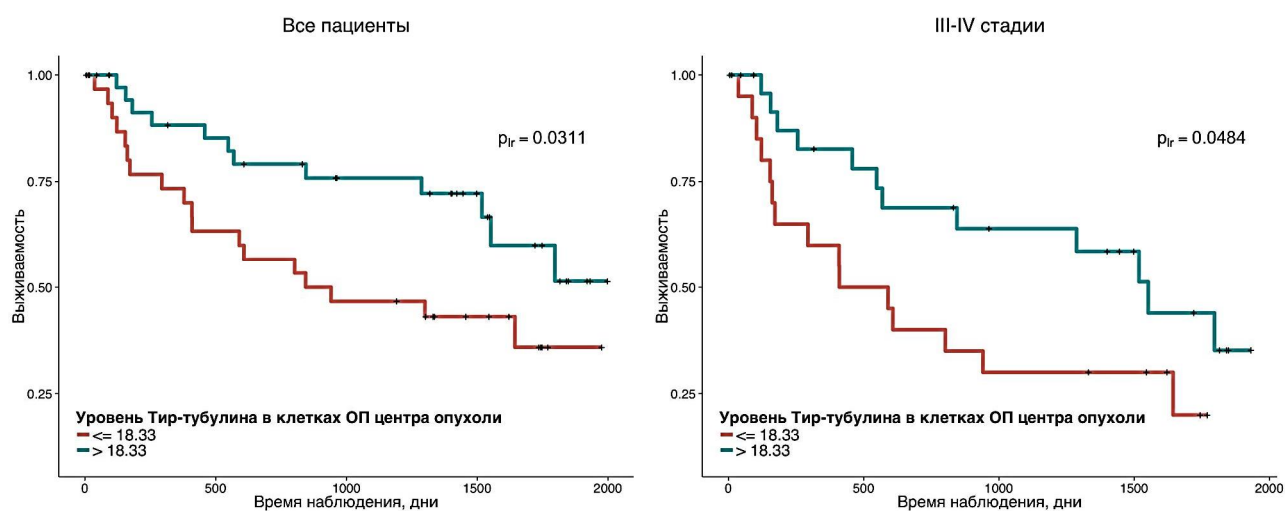


Рисунок 4. – Опухолеспецифическая выживаемость пациентов с КРР в зависимости от НУЭ Тир-тубулина

Детирозинированный α -тубулин. Экспрессия детирозинированного (Глу-) тубулина была обнаружена во всех случаях и носила гетерогенный характер. В нормальной слизистой оболочке наблюдалось мелкогранулярное окрашивание, гомогенно рассредоточенное по цитоплазме, при этом митозы не визуализировались. В раке выявлено два основных паттерна:

перинуклеарный и микротубулярный. В случае микротубулярного паттерна выявлялись также и позитивные митотические веретена.

В нормальной слизистой оболочке наименьший нормализованный уровень Глу-тубулина наблюдался в поверхностном эпителии ($p_{mu}=0,004$).

Экспрессия Глу-тубулина КРР практически не отличалась от нормальной слизистой оболочки. Однако в ОП инвазивного фронта отмечалось ее снижение по сравнению с раковыми клетками вне ОП центральных областей ($p_{mu}=0,005$). Аналогичная ситуация прослеживалась и в стромальном компоненте ($p_{mu}<0,001$) (таблица 9).

Таблица 9. – НУЭ Глу-тубулина в операционном материале

Компартмент	Количество полей зрения	Медиана	q ₁	q ₃	
Неопухолевая слизистая оболочка					
Поверхностный эпителий	248	16,9	12,5	33,4	
Эпителий крипт	327	25,0	15,8	35,8	
Строма	327	23,0	16,4	35,7	
КРР					
Раковые клетки	центр	375	28,2	17,6	42,3
вне ОП	инвазивный фронт	375	24,7	17,2	35,9
ОП	центр	92	24,2	17,0	41,9
	инвазивный фронт	309	23,0	15,3	33,1
Строма	центр	375	25,0	15,9	38,8
	инвазивный фронт	375	17,7	12,4	28,0

Установлено, что уровень Глу-тубулина в опухолевых клетках вне ОП зависит от преобладающего гистоархитектонического строения. В частности, максимальная интенсивность наблюдалась в железах, имевших простое или сложное строение, в то время как минимальная интенсивность имела место в иррегулярных железах и участках, не имевших тубулярного строения. Среди ОП наименьшая экспрессия была выявлена в участках, не имевших тубулярного строения, или с преобладанием иррегулярных желез. Экспрессия Глу-тубулина в стромальном компоненте имела аналогичную закономерность.

В биоптатах толстой кишки пациентов с ХВЗК и группы сравнения не наблюдалось достоверных различий (таблица 10). При этом снижение содержания муцина было ассоциировано с более низкой экспрессией Глу-тубулина во всех компартментах.

Мультифакторный регрессионный анализ показал, что высокая экспрессия Глу-тубулина в раковых клетках вне ОП в центре опухоли связана с наличием апикального метастаза ($\beta=11,9$ (95% ДИ 1,5–22,3), $p=0,027$) и более низкой категорией pT ($\beta= -6,6$ (95% ДИ -12,8 – -0,5), $p=0,036$). Более высокий НУЭ данного белка в раковых клетках инвазивного фронта сочетается с наличием отдаленных метастазов ($\beta=12,2$ (95% ДИ 4,9–19,4), $p=0,002$) и более

низкой категорией pN ($\beta = -4,8$ (95% ДИ $-8,4 - -1,2$), $p=0,010$); более низкий НУЭ Глу-тубулина ассоциирован с правосторонней локализацией опухоли ($\beta = -5,9$ (95% ДИ $-11,6 - -0,2$), $p=0,046$).

Таблица 10. – НУЭ Глу-тубулина в различных компартментах слизистой оболочки толстой кишки при ХВЗК и в группе сравнения

Компартмент	Область	Количество полей зрения	Медиана	q ₁	q ₃
Поверхностный эпителий	группа сравнения	153	48,6	32,8	78,8
	БК	77	50,5	32,6	72,0
	ЯК	172	43,0	25,0	76,4
Эпителий крипт	группа сравнения	157	42,9	28,4	80,1
	БК	86	52,0	30,3	65,7
	ЯК	187	40,5	26,6	75,3
Строма	группа сравнения	157	38,7	24,3	70,3
	БК	86	51,5	29,9	66,7
	ЯК	190	43,3	27,8	69,2

Снижение НУЭ Глу-тубулина в раковых клетках вне ОП центральных областей КРР связано с более высоким риском прогрессирования (НУЭ $\leq 21,2$, $p_{lr}=0,0432$) и более высокой вероятностью смерти от КРР (НУЭ $\leq 16,8$, $p_{lr}=0,0122$). Аналогичная закономерность прослеживалась и для ОП как центральных регионов, так и инвазивного фронта, а также стромы центра КРР (рисунок 5).

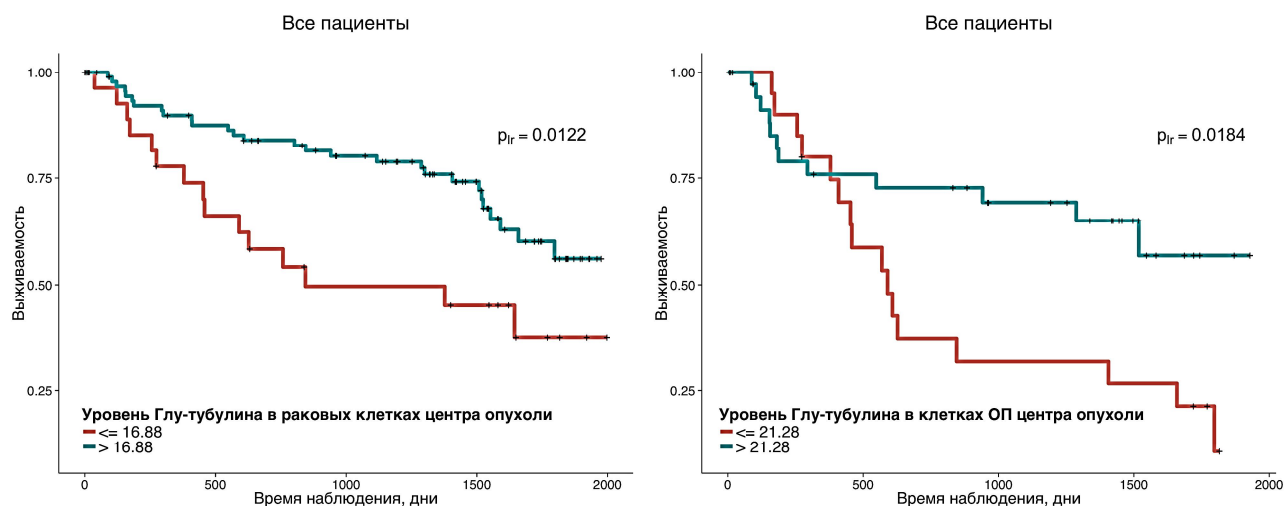


Рисунок 5. – Опухолеспецифическая выживаемость пациентов с КРР в зависимости от НУЭ Глу-тубулина

Деглутаминированный (δ^2 -) α -тубулин. В эпителии нормальной слизистой оболочки толстой кишки экспрессия δ^2 -тубулина отсутствовала. Позитивно окрашивались единичные клетки в строме, гладкие мышцы, а также нервные ганглии и стволы, служившие внутренним позитивным контролем. В КРР позитивное окрашивание наблюдалось в цитоплазме и было выявлено

в 5 случаях (4%). Как правило, экспрессия δ^2 -тубулина визуализировалась менее, чем в 5% клеток, и носила очаговый слабо интенсивный характер. Позитивные веретена деления не обнаружены.

В группе ХВЗК экспрессия δ^2 -тубулина присутствовала у 14/40 (35,0%) пациентов. В группе сравнения экспрессия δ^2 -тубулина наблюдалась в 5/23 (21,7%) случаях ($p_{\chi^2} > 0.05$). Связь между наличием данного белка и ХВЗК-ассоциированными гистологическими изменениями не установлена. Экспрессия δ^2 -тубулина статистически достоверного влияния на выживаемость не оказывала.

Определение роли β_{III} -тубулина в регуляции жизнедеятельности клеток КРР

Подавление экспрессии β_{III} -тубулина в клеточных линиях КРР.

В результате трансфекции экспрессия β_{III} -тубулина была подавлена в среднем в $3,1 \pm 0,6$ раза в клетках линии НТ-29 и в $4,2 \pm 1,2$ раза – в НСТ 116 ($p_{AN} = 0,0299$ и $p_{AN} = 0,0027$ соответственно по данным трех независимых экспериментов), при этом экспрессия β_I -тубулина не изменялась. Следовательно, подавление экспрессии β_{III} -тубулина было успешным и носило специфичный характер. В дальнейшем были проведены эксперименты для оценки влияния β_{III} -тубулина на ряд свойств клеток КРР.

Жизнеспособность. Исследование процессов гибели клеток при помощи двойного мечения аннексином V и 7-амино-актиномицином Д (7-ААД) позволяет определить как апоптотические, так и некротические клетки в культуре. Живые клетки не окрашиваются ни аннексином V, ни 7-ААД. Клетки в ранней фазе апоптоза или некроза маркируются аннексином V (+) или 7-ААД соответственно. Для мертвых клеток характерна двойная позитивность (аннексин V (+) и 7-ААД (+)) независимо от механизма их гибели. Кривые распределения клеток, меченых аннексином V, в клетках с подавленной экспрессией β_{III} -тубулина и в контрольной культуре не отличалась друг от друга. Результаты оценки окрашивания 7-ААД имели аналогичный характер. Таким образом, β_{III} -тубулин не влияет на жизнеспособность клеток.

Фазы клеточного цикла. Распределение клеток линии НСТ 116 с подавленной экспрессией β_{III} -тубулина по фазам клеточного цикла исследовалось методом проточной цитометрии. С этой целью клетки предварительно окрашивались пропидием иодидом. Клетки после трансфекции TUBV3 миРНК и нецелевой миРНК характеризовались одинаковым распределением по фазам клеточного цикла, сходным с таковым для интактного контроля. Следовательно, β_{III} -тубулин не оказывает влияние на пролиферативную активность клеток.

Ростовые свойства. Плотность культуры клеток НТ-29 через 72 ч после трансфекции составила $97,5 \pm 4,9\%$ для нецелевой миРНК и $57,1 \pm 9,4\%$ для TUBB3 миРНК (от плотности контрольной интактной культуры) ($p_{AN}=0,0188$). Аналогичные показатели для клеток линии НСТ 116 составили $88,2 \pm 5,9\%$ и $51,9 \pm 4,6\%$ ($p_{AN}=0,0004$). Таким образом, без β_{III} -тубулина культуры клеток растут хуже.

Адгезивные свойства. После трансфекции уровень адгезии снизился с $82,2 \pm 3,0\%$ до $67,2 \pm 5,6\%$ ($p_{AN}=0,0436$) для НСТ 116 и с $73,9 \pm 1,8\%$ до $36,1 \pm 7,8\%$ ($p_{AN}=0,0044$) для НТ-29. Таким образом, без β_{III} -тубулина клетки теряют адгезию к белкам внеклеточного матрикса.

Инвазивная активность. После трансфекции количество инвазивировавших в мембрану клеток уменьшилось в среднем с $10,9 \pm 1,8$ до $2,7 \pm 0,6$ ($p_{AN}=0,0001$) клеток в поле зрения для НСТ 116 и с $30,7 \pm 7,2$ до $7,0 \pm 1,1$ для НТ-29 ($p_{AN}=0,0033$). Таким образом, клетки без β_{III} -тубулина обладают меньшей инвазивной активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Микротрубочки колоноцитов нормальной слизистой оболочки содержат β_I -тубулин, ацетилированный, тирозинированный и детирозинированный α -тубулины. Экспрессия β_{II} -, β_{III} -тубулинов и δ^2 -тубулина отсутствует. При этом для β_I -тубулина, ацетилированного и детирозинированного α -тубулинов существует градиент распределения: в эпителии крипт экспрессия данных молекул выше, чем в поверхностном эпителии ($p<0,001$, $p<0,001$ и $p=0,004$ соответственно). Уровни тирозинированного α -тубулина в эпителии крипт и в поверхностных колоноцитах не различаются [15, 19, 20, 21].

2. Понижение экспрессии ацетилированного α -тубулина в эпителии слизистой оболочки толстой кишки происходит при хронических воспалительных процессах, независимо от нозологической принадлежности (при болезни Крона $p=0,046$ для эпителиа крипт и $p=0,032$ для поверхностного эпителиа, для язвенного колита – $p<0,001$ и $p=0,003$ соответственно). Эрозии слизистой оболочки толстой кишки сочетаются с понижением уровня данного тубулина в поверхностном эпителии ($\beta = -5,5$ (95% ДИ $-10,2 - -0,8$), $p=0,025$) [12, 16, 26, 30, 34, 44].

Повышение уровня β_I -тубулина в поверхностном эпителии ($p=0,029$) и тирозинированного α -тубулина в эпителии крипт ($p=0,008$) наблюдается при болезни Крона. При язвенном колите отмечается снижение экспрессии β_I -тубулина в эпителии крипт ($p<0,001$) и появление β_{III} изоформа как

в колоноцитах крипт ($p=0,001$), так и в поверхностных клетках эпителия ($p<0,001$) [17, 19, 22, 23, 30, 45, 47, 52].

Дисплазия эпителия сочетается с более высокой экспрессией β_1 -тубулина в поверхностном эпителии ($\beta=42,8$ (95% ДИ 16,3–69,2), $p = 0,003$); повышенный уровень β_{III} изотипа и в поверхностном эпителии, и в колоноцитах крипт ассоциирован с атрофией крипт ($\beta=5,4$ (95% ДИ 1,1–9,7), $p=0,018$ и $\beta=5,2$ (95% ДИ 1,2–9,1), $p=0,013$ соответственно) [22].

Уровень детирозинированного α -тубулина в колоноцитах при хронических воспалительных заболеваниях не изменяется [23].

3. В клетках колоректального рака, расположенных в центре опухоли, имеет место повышение уровня β_I -, β_{II} -, β_{III} - изотипов тубулина, тирозинированного α -тубулина и снижение уровня ацетилированного α -тубулина относительно неопухоловой слизистой оболочки ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$ и $p<0,001$ соответственно) [3, 7, 8, 9, 15, 16, 19, 20, 25, 27, 28, 32, 35, 36, 37, 38, 40, 55].

В строме центра опухоли отмечается увеличение содержания β_1 -тубулина ($p<0,001$) и уменьшение экспрессии ацетилированного α -тубулина ($p<0,001$) [15, 16, 19, 20].

Инвазивный фронт колоректального рака обладает отличными от центральных областей опухоли особенностями. В строме инвазивного фронта снижается экспрессия β_1 -тубулина, ацетилированного, тирозинированного и детирозинированного α -тубулинов ($p=0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$ и $p<0,001$ соответственно). В опухолевых почках инвазивного фронта наблюдается более низкая экспрессия β_1 -тубулина, тирозинированного, ацетилированного и детирозинированного α -тубулинов на фоне более высокого уровня β_{III} -тубулина ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p=0,005$ и $p<0,001$ соответственно) [3, 7, 8, 9, 14, 15, 18, 19, 20, 25, 27, 31, 32, 33, 35, 39, 40, 41, 42].

4. Дифференцированное строение опухоли (преобладание простых или сложных желез) ассоциировано с повышением уровня β_1 -тубулина, ацетилированного и детирозинированного α -тубулинов и снижением экспрессии β_{III} -тубулина. Исчезновение полярности ядер сочетается с более низкой экспрессией тирозинированного и ацетилированного α -тубулинов ($\beta= -19,6$ (95% ДИ -34,6 – -4,6), $p=0,012$ и $\beta= -7,4$ (95% ДИ -13,6 – -1,3), $p=0,020$ соответственно). Увеличение категории pN происходит параллельно росту уровня β_{III} -тубулина в раковых клетках как в центре опухоли, так и в инвазивном фронте ($\beta=4,0$ (95% ДИ 0,8–7,2), $p=0,015$ и $\beta=7,8$ (95% ДИ 2,6–13,0), $p=0,004$ соответственно), а также с падением уровня детирозинированного тубулина в злокачественных клетках инвазивного фронта ($\beta= -4,8$ (95% ДИ -8,4 – -1,2), $p=0,010$). Количество опухолевых почек позитивно связано с экспрессией β_{III} изотипа клетками опухоли в инвазивном

фронте, причем как в составе опухолевых почек, так и вне их ($\beta=1,1$ (95% ДИ 0,5–1,6), $p<0,001$ и $\beta=0,9$ (95% ДИ 0,5–1,3), $p<0,001$ соответственно). Рост категории pT ассоциирован с понижением уровня тирозинированного и детирозинированного α -тубулинов в раковых клетках центра опухоли ($\beta= -10,0$ (95% ДИ -17,9 – -2,1), $p=0,015$ и ($\beta= -6,6$ (95% ДИ -12,8 – -0,5), $p=0,036$) [3, 7, 8, 15, 20, 32, 35, 43, 46].

5. Неблагоприятный прогноз в отношении опухолеспецифической выживаемости и прогрессии колоректального рака ассоциирован с уменьшением экспрессии раковыми клетками центра опухоли β_1 -тубулина ($p=0,015$ и $p=0,008$ соответственно), ацетилированного ($p=0,032$ для беспрогрессивной выживаемости) и детирозинированного α -тубулинов ($p=0,012$ и $p=0,043$ соответственно) и с увеличением уровня β_{III} -тубулина ($p=0,022$ и $p=0,002$ соответственно). Высокая экспрессия β_{III} -тубулина в опухолевых почках и строме инвазивного фронта связана с высоким риском прогрессии опухолевого процесса у пациентов, получающих химиотерапию препаратами 5-фторурацила, и может рассматриваться как маркер химиорезистентности ($p=0,032$ и $p=0,030$ соответственно) [15, 16, 19, 20, 21, 48, 49, 50, 51, 55].

6. β_{III} -тубулин играет важную роль в инвазивной активности клеток колоректального рака, при этом реализация этого влияния полностью или частично опосредована воздействием на систему адгезии клеток к молекулам внеклеточного матрикса [10, 13, 29, 55, 56]. β_{III} -тубулин может быть использован в качестве мишени при создании антимиграционных противоопухолевых лекарственных препаратов [56].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Патологоанатомическим бюро и отделениям рекомендуется использовать разработанную систему гистологического описания и алгоритм дифференциальной диагностики заболеваний кишечника у пациентов с некровавой диареей, что позволит исключить гипердиагностику воспалительных заболеваний толстой кишки, значительно повысить информативность гистологического заключения и диагностическую эффективность биопсийного исследования толстой кишки [1, 2, 6, 11, 24, 53, 54].

2. Патологоанатомическим бюро и отделениям как общей, так и онкоморфологической направленности, рекомендуется применять разработанную систему гистологического описания и алгоритм дифференциальной диагностики опухолевых и опухолеподобных процессов. Применение указанных методов позволит увеличить вероятность ранней диагностики рака и снизить риск гипердиагностики как злокачественных

опухолей, так и процессов, требующих динамического инструментального наблюдения за пациентом (зубчатая аденома и дисплазия) [4, 5, 55].

3. Патологоанатомическим отделениям онкоморфологической направленности целесообразно использовать разработанную систему морфологической диссекции операционного материала рака толстой кишки, что позволит увеличить информативность гистологического заключения, диагностическую эффективность морфологического определения радикальности оперативного вмешательства и стадии процесса [55].

4. Спектр изменений состава цитоскелета в центре опухоли рекомендуется учитывать при определении режима наблюдения за пациентом, перенесшим хирургическое вмешательство по поводу колоректального рака. Неблагоприятным прогностическим фактором является уменьшение экспрессии раковыми клетками β_1 -тубулина, ацетилированного и детирозинированного α -тубулина, а также увеличение уровня β_{III} -тубулина [15, 16, 19, 20, 55].

5. Изменения в составе цитоскелета в инвазивном фронте опухоли рекомендуется учитывать при определении химиотерапевтической тактики у пациентов с раком толстой кишки. Высокая экспрессия β_{III} -тубулина в опухолевых почках и строме инвазивного фронта может рассматриваться как маркер химиорезистентности к препаратам 5-фторурацила [21, 55].

6. Целесообразно обратить внимание на блокирование β_{III} -тубулина, обладающего проинвазивной активностью, при создании новых противоопухолевых препаратов [13, 56].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Горгун, Ю.В. Особенности коррекции обмена железа при хронических воспалительных заболеваниях кишечника / Ю.В. Горгун, О.М. Каратыш, А.С. Портянко // Медицинские новости. – 2007. – № 11. – С. 82–84.
2. Горгун, Ю.В. Язвенный колит: диагностика и консервативная терапия / Ю.В. Горгун, А.С. Портянко // Лечебное дело. – 2008. – № 3. – С. 64–72.
3. Beta(III)-tubulin at the invasive margin of colorectal cancer: possible link to invasion / A. Portyanko, P. Kovalev, J. Gorgun, E. Cherstvoy // Virchows Arch. – 2009. – Vol. 454, № 5. – P. 541–548.
4. Портянко, А.С. Скрининг колоректального рака / А.С. Портянко, Ю.В. Горгун // Медицина. – 2009. – № 4. – С. 35–39.
5. Портянко, А.С. Колоректальный рак: факторы риска и скрининг / А.С. Портянко, Ю.В. Горгун // ARS MEDICA. – 2009. – № 6. – С. 114–125.
6. Эндоскопическая и гистологическая оценка интестинальной слизистой оболочки у взрослых пациентов с хронической некровавой диареей / Ю.В. Горгун, А.С. Портянко, Е.А. Денещук, О.М. Лях, К.Ю. Мараховский, С.В. Белявская, В.В. Ермак // ARS MEDICA. – 2010. – № 16. – С. 4–16.
7. Ремоделирование микротрубочек в инвазивном крае колоректального рака / А.С. Портянко, М.Ю. Дегтярева, Ю.В. Горгун, Г.Е. Тур, А.М. Неровня, Т.А. Бич, А.Б. Межеевский, Е.Д. Черствый // Лечебное дело. – 2012. – № 4. – С. 64–69.
8. Использование методов компьютерной обработки изображений на примере определения уровня экспрессии тирозинированного α -тубулина в клетках колоректального рака / А.С. Портянко, П.Г. Киселев, Г.Е. Тур, Ю.В. Горгун, А.Б. Межеевский, Н.В. Ивинская, А.М. Неровня, Т.А. Бич, Е.Д. Черствый // Медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 89–91.
9. Экспрессия β _{III}-тубулина в клетках колоректального рака / А.С. Портянко, П.А. Ковалев, А.Б. Межеевский, Ю.В. Горгун, Е.Д. Черствый // Медицинские новости. – 2014. – № 4. – С. 50–53.
10. Роль изоформ тубулина в адгезивных свойствах и инвазивной активности клеток колоректального рака / А.С. Портянко, А.Б. Межеевский, С.Т. Акалович, Т.М. Дорошенко // Новости медико-биологических наук. – 2014. – № 3. – С. 78–82.
11. Горгун, Ю.В. Медикаментозная терапия болезни Крона: рекомендации Европейской организации по изучению болезни Крона и язвенного колита / Ю.В. Горгун, А.С. Портянко, О.М. Жарская // Лечебное дело. – 2014. – № 5. – С. 22–28.

12. Изменения цитоскелета при хронических воспалительных заболеваниях толстой кишки / А.С. Портянко, П.А. Перовощиков, М.А. Станилевич, Ю.В. Горгун // Лечебное дело. – 2015. – № 2. – С. 31–36.

13. Портянко, А.С. β -тубулин – потенциальная мишень для подавления инвазивной активности злокачественных эпителиальных опухолей / А.С. Портянко, С.Т. Акалович, Т.М. Дорошенко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Том 78, № 7. – С 25–28.

14. Inter- and intra-tumoral relationships between vasculature characteristics, GLUT1 and budding in colorectal carcinoma / A. Mezheyeuski, A. Nerovnya, T. Bich, G. Tur, A. Ostman, A. Portyanko // *Histol Histopathol.* – 2015. – Vol. 30, № 10. – P.1203–1211.

15. Ацетилированный α -тубулин – потенциальный прогностический маркер течения колоректального рака / А.С. Портянко, К.Г. Рукша, А.Б. Межеевский, А.М. Неровня, Т.А. Бич, Г.Е. Тур, Е.Д. Черствый // *Здравоохранение.* – 2016. – № 2. – С. 10–16.

16. Экспрессия ацетилированного α -тубулина при хронических воспалительных заболеваниях и аденокарциноме толстой кишки / А.С. Портянко, П.А. Перовощиков, К.Г. Рукша, А.Б. Межеевский, А.М. Неровня, Т.А. Бич, Г.Е. Тур, Ю.В. Горгун // *Лечебное дело.* – 2016. – № 2 – С. 39–45.

17. Peravoshchukau, P. Expression of tyrosinated α -tubulin in Crohn's disease and ulcerative colitis. / P. Peravoshchukau, A. Portyanko, J. Gorgun // *Int. Stud. J. Med.* –2016. – Vol. 2, № 1. – P. 25–30.

18. Survival-associated heterogeneity of marker-defined perivascular cells in colorectal cancer / A. Mezheyeuski, M. Lindh, T. Guren, A. Dragomir, P. Pfeiffer, E. Kure, T. Ik Dahl, E. Skovlund, S. Corvigno, C. Strell, K. Pietras, F. Ponten, J. Mulder, C. Qvortrup, A. Portyanko, K. Tveit, B. Glimelius, H. Sorbye, A. Östman // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, № 27. – P. 41948–41958.

19. β I-изотип тубулина при хронических воспалительных заболеваниях и аденокарциноме толстой кишки / А.С. Портянко, П.А. Перовощиков, К.Г. Рукша, А.Б. Межеевский, А.М. Неровня, Т.А. Бич, Г.Е. Тур, Ю.В. Горгун // *Онкологический журнал.* – 2016 – Том 10, № 2. – С. 28–39.

20. Посттрансляционные модификации С-концевой последовательности α -тубулина в клетках колоректального рака: морфологическая характеристика и клиническое значение. / А.С. Портянко, К.Г. Рукша, М.Ю. Малько, А.Б. Межеевский, А.М. Неровня, Т.А. Бич, Г.Е. Тур, Е.Д. Черствый // *Здравоохранение.* – 2016. – № 8. – С. 10–19.

21. β III-изотип тубулина – потенциальный маркер химиорезистентности колоректального рака / А.С. Портянко, М.Ю. Малько, К.Г. Рукша, С.Т. Акалович, А.Н. Пундик, А.Б. Межеевский, А.М. Неровня, Т.А. Бич, Г.Е. Тур, Т.М. Дорошенко // *Онкологический журнал.* – 2016. – Том 10, № 3. – С. 53–62.

22. Изменение экспрессии изоформ β -тубулина в слизистой оболочке толстой кишки при хронических воспалительных заболеваниях / А.С. Портянко, П.А. Перевошиков, М.Ю. Малько, К.Г. Рукша, Ю.В. Горгун // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2016. – Том 5, № 3. – С. 309–318.

23. Экспрессия различных посттрансляционных модификаций С-концевой последовательности α -тубулина при хронических воспалительных заболеваниях. / А.С. Портянко, К.Г. Рукша, П.А. Перевошиков, С.Н. Русак, М.Ю. Малько, Ю.В. Горгун // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2016. – № 2. – С. 55–63.

Публикации в сборниках научных трудов и материалах конференций

24. Гистологическая характеристика слизистой оболочки толстой кишки у пациентов с хроническими кишечными симптомами / А.С. Портянко, Ю.В. Горгун, С.Н. Кондрашов, П.А. Ковалев // Высокие технологии в морфологии, их значение и перспективы внедрения в практическое здравоохранение: материалы I съезда патологоанатомов Республики Беларусь, Минск, 12–13 июня 2006 г. / РУМЦ ФВН ; ред.: М.К. Недзьведзь [и др.]. – Минск, 2006. – С. 131–133.

25. Ремоделирование цитоскелета в клетках колоректального рака / А.С. Портянко, А.М. Неровня, Т.А. Бич, Ю.В. Горгун, Г.Е. Тур // БГМУ: 90 лет в авангарде медицинской науки и практики: сб. науч. трудов. Т. II. – Минск, 2011. – С. 58.

26. Перевошиков, П.А. Экспрессия ацетилированного тубулина в эпителии толстой кишки при болезни Крона и язвенном колите / П.А. Перевошиков, М.А. Станилевич, А.С. Портянко // Инновации в медицине и фармации 2014: материалы дистанционной науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых / БГМУ ; ред.: А.В. Сикорский [и др.]. – Минск, 2014. – С. 415–420.

27. Expression of tubulin isoforms and posttranslational modifications in the invasive front of colorectal cancer / A. Portyanko, M. Degtyaryova, P. Kovalev, J. Gorgun, G. Tur, A. Nerovnya, T. Bich, A. Mezhejevsky, E. Cherstvoy // The collection of scientific works of professional teaching staff of State Medical University of Turkmenistan and Byelorussian State Medical University. – Ashgabat, 2014. – P. 132–136.

28. Экспрессия тирозинированного α -тубулина в клетках колоректального рака / Г.Е. Тур, А.С. Портянко, П.Г. Киселев, Ю.В. Горгун, А.Б. Межеевский, Н.В. Ивинская, А.М. Неровня, Т.А. Бич, Е.Д. Черствый // Актуальные вопросы диагностики и лечения злокачественных новообразований: сб. науч. работ Республ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию каф. онкологии / БГМУ ; под общ. ред. А.В. Прохорова. – Минск, 2014. – С. 102–103.

29. Влияние состава клеточных тубулинов на ростовые и адгезивные свойства клеток колоректального рака / А.С. Портянко, А.Б. Межеевский,

С.Т. Акалович, Н.В. Гончарова, Т.М. Дорошенко // 90 лет в авангарде медицинской науки и практики: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, БГМУ; редкол.: А.В. Сикорский, О.К. Кулага. – Минск, 2014. – Вып. 4. – С. 235–239.

30. Перевошиков, П.А. Особенности экспрессии ацетилированного и тирозинированного тубулина при хронических воспалительных заболеваниях кишечника / П.А. Перевошиков, М.А. Станилевич, А.С. Портянко // Сборник научных работ студентов Респ. Беларусь «НИРС 2014» / редк.: В.А. Богуш [и др.]. – Минск, 2015. – С. 230–231.

Тезисы докладов

31. Portyanko, A. Tissue transglutaminase could participate in ECM remodeling in invasive front in colorectal cancer / A. Portyanko, J. Gorgun, P. Kovalev // Future Perspectives in Gastroenterology: Falk Symposium No 161: Abstracts, Dresden, 11–12th October 2007. – Dresden, 2007. – P. 91.

32. Portyanko, A. Cancer cell budding at the invasive margin in colon carcinoma is associated with beta3-tubulin expression / A. Portyanko, J. Gorgun, P. Kovalev // Pathogenesis and Clinical Practice in Gastroenterology: Falk Symposium No 160: Abstracts, Portoroz, 15–16th June, 2007. – Portoroz, 2007. – P. 78.

33. Portyanko, A.S. Beta3 tubulin expression is upregulated in the invasive margin in colon carcinomas / A.S. Portyanko, J.V. Gorgun, P.A. Kovalev // Gut. – 2007. – Vol. 56, Suppl. III. – A313.

34. Gorgun, J.V. Expression of activated beta-1-integrin in normal and inflamed colonic mucosa / J.V. Gorgun, A.S. Portyanko // Gut. – 2008. – Vol. 57, Suppl. II. – A335.

35. High grade tumour budding in colorectal cancer is associated with up-regulation of β_{III} -tubulin expression at the invasive margin / A. Portyanko, J. Gorgun, P. Kovalev, A. Nerovnya, T. Bich, G. Tur, T. Letkovskaya, E. Cherstvoy // Virchows Arch. – 2009. – Vol. 455, Suppl. 1. – P. 46–47.

36. Portyanko, A. Role of microtubules in colorectal cancer / A. Portyanko, J. Gorgun, E. Cherstvoy // European Bridging Meeting in Gastroenterology. Abstracts, Berlin, Germany, November 18–20, 2010. – Berlin, 2010. – P. 10.

37. Rearrangement of microtubules in colorectal cancer / A. Portyanko J. Gorgun, G. Tur, A. Mezhejeusky, T. Bich, A. Nerovnya // Gut. – 2011. – Vol. 60, Suppl. 3 – A306.

38. Исследование распределения тубулинов в микротрубочках здоровых и раковых клеток методом лазерной сканирующей микроскопии / С.Б. Бушук, Ю.В. Кальвинковская, Б.А. Бушук, А.С. Портянко // Лазерная физика и оптические технологии: IX Междунар. науч. конф., Гродно, 30 мая – 2 июня 2012 г.: тез. докл. – Гродно, 2012. – С. 79.

39. Degtyarova, M. The deepest invasive margin in colorectal cancer shows alteration of the tubulins expression / M. Degtyarova, A. Portyanko // 23rd European Student's Conference: Abstract Book, Berlin, 17–20 Sept 2012. – Berlin, 2012. – P. 290.

40. Tumor buds in colorectal carcinoma show rearrangement of microtubules / A. Portyanko, J. Gorgun, M. Degtyarova, G. Tur, A. Nerovnya, T. Bich, A. Mezheyeuski, E. Cherstvoy // Gut. – 2012. – Vol. 61, Suppl. 3 – P. 1486.

41. Prognostic significance of tumor stromal and epithelial claudin 2 in metastatic colorectal cancer / A. Mezheyeuski, T. Guren, B. Glimelius, P. Pfeiffer, E. Kure, T. Ikdahl, E. Skovlund, H. Sorbye, K. Tveit, K. Pietras, P. Sandstrom, L. Bojmar, A. Portyanko, A. Ostman // J. Clin. Oncol. – 2013. – Vol. 31, № 15S. – P. 229s.

42. Characterization of tumor stromal and perivascular markers and vessel status in metastatic colorectal cancer / A. Mezhejeusky, M. Lindh, T. Guren, B. Glimelius, P. Pfeiffer, E. Kure, T. Ikdahl, E. Skovlund, H. Sorbye, K. Tveit, K. Pietras, P. Sandstrom, L. Bojmar, A. Portyanko, A. Ostman // KICancer retreat 2013: Abstract Book, Djuronaset (Sweden), Sept 30 – Oct 1 2013. – Djuronaset, 2013. – P. 65.

43. Digitalized multiparametric analyses of tumor stroma for identification of low perivascular PDGFBR expression and low vessel density as independent prognosis markers for stage IV CRC / A. Mezhejeusky, M. Lindh, B. Glimelius, P. Pfeiffer, E. Kure, T. Ikdahl, E. Skovlund, H. Sorbye, K. Tveit, K. Pietras, H. Birgisson, J. Mulder, T. Guren, A. Portyanko, A. Ostman // J. Clin. Oncol. – 2014. – Vol. 32, Suppl. – e14525.

44. Peravoshchikay, P. Inflammation in bowel mucosa during ulcerative colitis and Crohn's disease leads to decrease of acetylated tubulin expression in epithelial cells / P. Peravoshchikay, M. Stanilevich, A. Portyanko // 25th European Student's Conference: Abstract Book, Berlin, 17–20 Sept 2014. – Berlin, 2014. – P. 367.

45. Expression of tyrosinated alpha-tubulin in colonic epithelium change in inflammatory bowel diseases / P. Peravoshchikay, M. Stanilevich, A. Portyanko, J. Gorgun // 9th LIMSC: Abstract Book, Leiden, 11–15 March 2015. – Leiden, 2015. – P. 137.

46. Perivascular cell status is associated with survival in metastatic colorectal cancer / A. Mezheyeuski, T. Guren, I. Hrynchik, M. Lindh, D. Edler, A. Dragomir, P. Pfeiffer, E. Kure, T. Ikdahl, E. Skovlund, K. Pietras, F. Ponten, J. Mulder, M. Hallström, C. Qvortrup, K. Öhrling, A. Portyanko, K. Tveit, P. Ragnhammar, B. Glimelius, H. Sorbye, A. Östman // Cancer Microenviron. – 2015. – Vol. 8, Suppl. 1. – S104–105.

47. Inflammatory bowel disease is associated with cytoskeleton rearrangement in the epithelial cells / A. Portyanko, P. Perevoschikov, K. Ruksha, J. Gorgun // Journal of Crohn's and Colitis. – 2016. – Vol. 10, Suppl. 1. – S102.

48. BetaI-изотип тубулина – потенциальный маркер течения аденокарциномы толстой кишки / А.С. Портянко, К.Г. Рукша, А.Б. Межеевский,

А.М. Неровня, Т.А. Бич, Г.Е. Тур // Евразийский онкологический журнал. – 2016. – Том 4, № 2. – С. 237.

49. Cytoskeleton rearrangement is associated with prognosis and chemoresistance in colorectal cancer / A. Portyanko, K. Ruksha, M. Malko, A. Mezheyeuski, A. Nerovnya, T. Bich, G. Tur, J. Gorgun // 12th International Congress of Cell Biology: Abstract Book, Prague, 21–25 July 2016. – P. 155.

50. Ruksha, K. Posttranslational modifications of α -tubulin and their clinical significance in colorectal cancer / K. Ruksha, M. Malko, A. Portyanko // 27th European Students Conference: Abstract Book, Berlin, 28 September – 1 October 2016. – P. 249.

51. Changes in the expression of beta-tubulin isotypes are associated with different prognosis and chemosensitivity of colorectal cancer / A. Portyanko, K. Ruksha, M. Malko, A. Mezheyeuski, A. Nerovnya, T. Bich, G. Tur // 28th Congress of the European Society of Pathology: Abstract Book, Cologne, 25–29 September 2016. – S159.

52. Inflammatory bowel disease are associated with changes in beta1-tubulin expression epithelial cells / A. Portyanko, P. Peravoshchykay, K. Ruksha, J. Gorgun // 28th Congress of the European Society of Pathology: Abstract Book, Cologne, 25–29 September 2016. – S159.

Инструкции по применению

53. Программа дифференциальной диагностики хронической некровавой диареи у взрослых: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 29.10.2010, регистрационный номер 136-1110 / Ю.В. Горгун, А.С. Портянко, О.М. Каратыш, И.А. Дергачева, К.Ю. Мараховский, С.В. Белявская. – Минск: БелМАПО, БГМУ, 2010. – 21 с.

54. Гистологическая дифференциальная диагностика заболеваний, сопровождающихся хронической диареей или синдромом мальабсорбции: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 11.02.2011, регистрационный номер 137-1110 / А.С. Портянко, Ю.В. Горгун, Е.Д. Черствый. – Минск: БГМУ, БелМАПО, 2011. – 12 с.

55. Метод морфологической диагностики и прогнозирования течения колоректального рака: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 11.12.2015, регистрационный номер 147-1115 / А.С. Портянко, Ю.В. Горгун, А.М. Неровня, Т.А. Бич, А.Б. Межеевский, Т.М. Дорошенко, С.Т. Акалович – Минск: БГМУ, 2016. – 24 с.

Заявка на выдачу патента

56. Способ снижения инвазивной активности клеток колоректального рака : заявка ВУ а20150582: МПК А61В10/00 (2006.01) / А.С. Портянко, Т.М. Дорошенко, С.Т. Акалович. – Оpubл. 15.02.2016.

РЭЗІЮМЭ

Парцянка Ганна Сяргееўна

Рэмадэліраванне цыташкілета ў патагенезе і прагрэсіі адэнакарцыномы і хранічных запаленчых захворванняў тоўстай кішкі

Ключавыя словы: мікратрубачкі, тубулін, каларэктальны рак, язвы каліт, хвароба Крона, інвазіўны рост.

Мэта працы: устанавіць характар змянення складу мікратрубачак як дынамічных кампанентаў цыташкілета ў адэнакарцыноме і слізістай абалонке тоўстай кішкі пры хранічных запаленчых хваробах кішэчніка (ХЗХК).

Аб'ект і метады даследавання: вывучаны біяптаты, атрыманыя пры выкананні каланаскапій пацыентам з ХЗХК, клінічным падазрэннем на ХЗХК, а таксама пры абследаванні з мэтай выключэння арганічнай паталогіі тоўстай кішкі; матэрыял рэзекцый тоўстай кішкі пацыентаў з каларэктальным ракам (КРР); культуры клетак КРР. Выкарыстоўваўся метады двайной іммунафлюарэсцэнтнай афарбоўкі гісталагічных прэпаратаў антыцеламі да розных варыянтаў тубулінаў і цытакераціну з далейшай марфаметрычнай ацэнкай. Прааналізавана сувязь паміж экспрэсіяй розных ізатыпаў і посттрансляцыйных мадыфікацый (ПТМ) тубулінаў і асноўнымі клінічнымі, марфалагічнымі характарыстыкамі КРР і ХЗХК. Даследаванне ўплыву β_{III} -тубуліна на асноўныя функцыянальныя паказчыкі клетак выконвалася на клетачных лініях КРР.

Вынікі: упершыню ўстаноўлен спектр змянення экспрэсіі ізатыпаў β -тубуліна, а таксама ПТМ α -тубуліна пры ХЗХК і КРР. Неспрыяльны прагноз КРР асацыяваны з памяншэннем экспрэсіі ракавымі клеткамі цэнтры пухліны β_I -тубуліна, ацэтыліраванага і дэтыразіраванага α -тубулінаў, а таксама з павелічэннем узроўню β_{III} -тубуліна. Высокая экспрэсія β_{III} -тубуліна ў пухлінных почках і строме інвазіўнага фронту з'яўляецца маркерам хіміярэзістэнтнасці. Пры хранічных запаленчых працэсах адбываецца павышэнне экспрэсіі β_{III} -ізатыпу і зніжэнне – ацэтыліраванага α -тубуліна. Пры хваробе Крона таксама выяўляецца павелічэнне ўзроўню β_I -тубуліна і дэтыразіраванага α -тубуліна, у той час як пры язавым каліце – падзенне экспрэсіі β_I -ізатыпу. β_{III} -Тубулін адыгрывае важную ролю ў інвазіўнай актыўнасці клетак КРР.

Галіны прымянення: паталагічная анатомія, гастрэнтэралогія, анкалогія, фармакалогія.

РЕЗЮМЕ

Портянко Анна Сергеевна

Ремоделирование цитоскелета в патогенезе и прогрессии аденокарциномы и хронических воспалительных заболеваний толстой кишки

Ключевые слова: микротрубочки, тубулин, колоректальный рак, язвенный колит, болезнь Крона, инвазивный рост.

Цель работы: установить характер изменения состава микротрубочек как динамических компонентов цитоскелета в аденокарциноме и слизистой оболочке толстой кишки при хронических воспалительных заболеваниях кишечника (ХВЗК).

Объект и методы исследования: биоптаты, полученные при проведении колоноскопий пациентам с ХВЗК, с клиническим подозрением на ХВЗК, а также при обследовании с целью исключения органической патологии толстой кишки; материал резекций толстой кишки пациентов с колоректальным раком (КРР); культуры клеток КРР. Использован метод двойной иммунофлуоресцентной окраски гистологических препаратов антителами к различным вариантам тубулинов и цитокератину с последующей морфометрической оценкой. Выполнен анализ связи между экспрессией различных изоформ и посттрансляционных модификаций (ПТМ) тубулинов и основными клиническими, морфологическими характеристиками КРР и ХВЗК. Исследование влияния β_{III} -тубулина на основные функциональные показатели клеток выполнялось на клеточных линиях КРР.

Результаты: впервые установлен спектр изменения экспрессии изоформ β -тубулина, а также ПТМ α -тубулина при ХВЗК и КРР. Неблагоприятный прогноз КРР ассоциирован с уменьшением экспрессии раковыми клетками центра опухоли β_I -тубулина, ацетилированного и детирозинированного α -тубулинов, а также с увеличением уровня β_{III} -тубулина. Высокая экспрессия β_{III} -тубулина в опухолевых почках и строме инвазивного фронта является маркером химиорезистентности. При хронических воспалительных процессах происходит повышение экспрессии β_{III} -изоформа и понижение – ацетилированного α -тубулина. При болезни Крона также наблюдается увеличение уровня β_I -тубулина и детирозинированного α -тубулина, в то время как при язвенном колите – падение экспрессии β_I -изоформа. β_{III} -Тубулин играет важную роль в инвазивной активности клеток КРР.

Область применения: патологическая анатомия, гастроэнтерология, онкология, фармакология.

SUMMARY

Portyanko Anna Sergeevna

Cytoskeleton remodeling in the pathogenesis and progression of adenocarcinoma and chronic inflammatory diseases of the colon

Key words: microtubules, tubulin, colorectal cancer, ulcerative colitis, Crohn's disease, and invasive growth.

Aim: to establish the nature of changes in the composition of microtubules as dynamic components of the cytoskeleton in colorectal adenocarcinoma and colonic mucosa in chronic inflammatory bowel diseases (IBD).

Object and methods: biopsies obtained by colonoscopy of patients with IBD, clinical suspicion of IBD, as well as during the examination in order to exclude organic pathology of the colon; material of colon resection with colorectal cancer (CRC); CRC cell lines. A double-immunofluorescent stain of histological slides with antibodies to various types of tubulin and cytokeratin followed by morphometric evaluation. We analyzed the relationship between the expression of different isotypes and post-translational modifications (PTM) of tubulin and the main clinical, morphological characteristics of CRC and IBD. In the experiment colorectal cancer cell lines were used to study the effect β_{III} -tubulin on the basic functional cell performance.

Results: for the first time, the range of changes in the expression of tubulin isotypes of β - and α -tubulin PTM in IBD and CRC were established. Prognosis of CRC is associated with a decrease in the expression of β_I -tubulin, acetylated and detyrosinated α -tubulin, as well as an increase in the β_{III} -tubulin in the tumor center. High expression of β_{III} -tubulin in the tumor stroma and tumor buds at the invasive front is a marker of chemoresistance. In chronic inflammation an increase of β_{III} -isotype and decrease of acetylated α -tubulin were found. In Crohn's disease the β_I -tubulin and detyrosinated α -tubulin increase was revealed, while in ulcerative colitis the decrease of β_I -isotype was observed. β_{III} -tubulin plays an important role in the invasive activity of colorectal cancer cells.

Field of application: pathology, gastroenterology, oncology, and pharmacology.

Подписано в печать 14.12.16. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,45. Тираж 60 экз. Заказ 760.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.