

О. М. Бакурова¹, Р. В. Бузіна¹, Р. Б. Кондратюк¹, Ю. К. Гульков^{1,2}, І. В. Василенко¹, Б. Г. Борзенко¹

Тимідинфосфорилаза та можливий зв'язок із формуванням особливостей фенотипу раку легенів

¹Донецький національний медичний університет ім. М. Горького,

²Донецьке обласне клінічне територіальне медичне об'єднання

Ключові слова: тимідинфосфорилаза, неоваскуляризація патологічна, легень новоутворення.

Для таргетної терапії необхідним є визначення особливостей ангиогенезу раку легенів, а отже перспективне застосування його біохімічних маркерів. Тимідинфосфорилазу вважають одним із них. З метою вивчення кореляції між її активністю та індивідуальними особливостями ангиогенезу в 25 пухлинах імуногістохімічним методом визначили судинний маркер ендотелію CD34, спектрофотометричним методом дослідили особливості ферментативної активності. Виявили її підвищення від 30 до 150 нмоль/хв·мг (у 20 пухлинах із 25 у порівнянні з контрольною активністю країв резекції). Встановили прямий кореляційний зв'язок (показник кореляції Спірмена $\rho = 0,668$; $p < 0,05$) між змінами активності та рівнями експресії CD 34, кількістю судин. Це свідчить про можливість застосування тимідинфосфорилази як біохімічного показника ангиогенезу, а також про її взаємозв'язок з індивідуальними особливостями фенотипу раку легенів.

Тимидинфосфорилаза и возможная связь с формированием особенностей фенотипа рака легких

Е. М. Бакурова, Р. В. Бузина, Р. Б. Кондратиук, Ю. К. Гульков, И. В. Василенко, Б. Г. Борзенко

Для таргетной терапии необходимо определение особенностей ангиогенеза рака легких, а значит, перспективно использование его биохимических маркеров, один из которых – тимидинфосфорилаза. С целью изучения корреляции ферментативной активности с индивидуальными особенностями ангиогенеза в 25 опухолях иммуногистохимическим методом определили сосудистый маркер эндотелия CD34, спектрофотометрическим методом изучили особенности ферментативной активности. Отмечено ее повышение от 30 до 150 нмоль/мин·мг (в 20 опухолях из 25 по сравнению с контрольной активностью краев резекции). Установлена прямая корреляционная связь (показатель корреляции Спирмена $\rho = 0,668$; $p < 0,05$) между изменениями активности и уровнями экспрессии CD 34, количеством сосудов. Это свидетельствует о возможности использования тимидинфосфорилазы в качестве биохимического маркера ангиогенеза, а также о ее взаимосвязи с индивидуальными особенностями фенотипа рака легких.

Ключевые слова: тимидинфосфорилаза, ангиогенез, неоваскуляризация патологическая, легких новообразования.

Патология. – 2015. – №1 (33). – С. 53–55

Thymidine phosphorylase and its possible correlation with the lung cancer phenotype features

Е. М. Бакурова, Р. В. Бузина, Р. Б. Кондратиук, Ю. К. Гульков, И. В. Василенко, Б. Г. Борзенко

The tumor phenotype investigation is necessary for lung cancer drug therapy optimization. For this purpose is perspective to use the biochemical markers of angiogenesis. Thymidine phosphorylase may be one of them.

Aim. The aim of study was to evaluate the correlation between the enzyme activity in tumors and the levels of expression of the vascular endothelial marker CD34.

Methods and results. They were examined spectrophotometrically and by the immunohistochemical method, respectively, in 25 samples of lung cancer tissues. It was shown that its activity in tumors is higher as compared to non-neoplastic adjacent tissues (from 30 to 150 nmol/min·mg; in 20 cases from total number). The enzyme activity changes were dependent of the levels of the CD 34, a positive correlation between them was shown (the index of Spearman's rank correlation, i.e. $\rho = 0,668$; $p < 0,05$).

Conclusion. These findings suggest the possibility of using thymidine phosphorylase as a biochemical marker of angiogenesis, its relationship with the lung cancer phenotype features.

Key words: Thymidine Phosphorylase, Lung Neoplasms, Neovascularization Pathologic.

Pathologia. 2015; №1 (33): 53–55

Пухлинний поліморфізм є ознакою злоякісної трансформації, котра суттєво впливає на прогноз, індивідуальну ефективність лікування. Багато в чому фенотипові зміни пухлинної клітини залежать від сигналів мікрооточення, яке безпосередньо має вплив на її геном. Так, деякі білкові молекули є індукторами транскрипції, діють як фактори росту. Поліфункціональний білок тимідинфосфорилаза (ТФ) бере участь у канцерогенезі солідних раків різної локалізації. Це водночас фермент і тромбоцитарний чинник росту ендотеліоцитів (PD-ECGF). Вважають, що йому притаманні ангиогенні, пропроліферативні, антиапоптозні властивості, він пов'язаний із пухлинною прогресією, є одним із критеріїв виживання [1]. Імовірно, ТФ може безпосередньо брати участь у морфогенезі пухлин. У

дослідженні, що здійснили, вивчили особливості активності ТФ і визначили морфологічні індивідуальні особливості ангиогенезу.

Мета роботи

Дослідити наявність кореляції між активністю ТФ та індивідуальними особливостями ангиогенезу пухлин легенів.

Матеріали і методи дослідження

Морфологічні та біохімічні дослідження виконали у 25 пухлинах раку легенів T₃₋₄N_xM₀ стадій (23 випадки – аденокарциноми, 2 – плоскоклітинний рак легенів). Контроль – віддалені від пухлини нетрансформовані тканини країв резекції. Імуногістохімічно визначили специфічний маркер ендотелію судин – CD34. У гістологічних препаратах кількісно визначили кінці зрізів

судин з експресією CD34 у полях зору мікроскопа при збільшенні $\times 200$ за Г.Г. Автанділовим [2], що є аналогом щільності мікросудин і довжини судинного русла. Малою вважали довжину судинного русла, коли кількість судинних кінців у полі зору була не більше ніж 20, помірно – 21–45, великою – 46–90, дуже великою – понад 90 кінців зрізів судин. Активність ферменту в гомогенатах тканин визначали спектрофотометрично на СФ-46 (Ломо, Російська Федерація) при довжині хвилі 300 нм за змінами оптичної щільності тиміну в 0,01 нNaOH [3]. Вміст білка оцінювали за методом Лоурі [3].

Статистично результати дослідження опрацювали шляхом комп'ютерного аналізу з використанням ліцензійних програм «MedStat» (Альфа) та «Statistica 5.5» (StatSoft). Для перевірки розподілу на нормальність використовували критерій W Шапіро – Уїлка, що дає змогу коректно виконувати перевірку при невеликих обсягах вибірки. При аналізі даних для оцінювання генеральної сукупності використовували стандартні характеристики (обсяг вибірки, середнє значення, стандартна помилка). Порівняли середні значення незалежних вибірок, що підпорядковувались нормальному закону розподілу. Застосовували критерій Стьюдента. Для виявлення статистичного лінійного зв'язку між ознаками використовували методи кореляційного аналізу, розраховували показник рангової кореляції Спірмена. Для встановлення значущості виявленого зв'язку порівняли розрахункове значення з відповідним критичним значенням на рівні значущості $p=0,05$.

Результати та їх обговорення

Зворотна фосфорилазна реакція, що у класичному напрямі є реакцією катаболізму дезокситимідилату, постачає клітинам тимін і дезоксифосфопентозу – 2-дезоксид-рибозу. Ці продукти водночас є стимуляторами ангіогенезу. Протягом індивідуального зіставлення значень активності ТФ у тканинах встановили: активність ТФ у 20 пухлинах із 25 (80%) була вищою, ніж активність у контролі. При цьому індивідуальні значення пухлинної активності у вибірці значно змінювались (від 30 до 150 нмоль/хв·мг).

Під час імуногістохімічного дослідження рівнів експресії судинного маркера ендотелію CD34 у цих пухлинах виявили їх варіативність. При зіставленні цих індивідуальних особливостей із ферментативною активністю встановили пряму кореляцію. Наприклад, низьким рівням експресії CD34 відповідають рівні пухлинної активності ТФ у межах $35,16 \pm 8,62$ нмоль/хв·мг, $n=7$; помірним – $77,17 \pm 20,22$ нмоль/хв·мг, $n=8$ ($p < 0,01$); високим рівням – $136,24 \pm 25,43$ нмоль/хв·мг, $n=7$ ($p < 0,001$) відповідно. Підвищення активності ТФ у підгрупах вірогідне. Отже, між змінами активності ТФ і показником ангіогенезу CD34 встановили прямий кореляційний зв'язок (показник кореляції Спірмена $r = 0,668$; $p < 0,05$). Це відповідає результатам інших дослідників: зниження рівня тимідину призводить до промоції проліферації ендотеліоцитів, а 2-дезоксид-рибоза індукує міграцію ендотеліальних клітин при

хемотаксичній відповіді та формування ендотеліальних тяжів у колагеновому гелі [4].

У препаратах підраховували кількість судин, які експресують CD34, що показує індивідуальні особливості ангіогенезу. За значеннями показника вибірку препаратів пухлин поділили на дві підгрупи: перша – з помірно довжиною судинного русла ($n=9$) (рис. 1, кольор. вкладка 4), друга – з великою довжиною судинного русла ($n=13$) (рис. 2, кольор. вкладка 4). Зіставляючи особливості активності ТФ у підгрупах 1 та 2, одержали дані, що узгоджуються з кореляцією між активністю й CD34 (рис. 3).

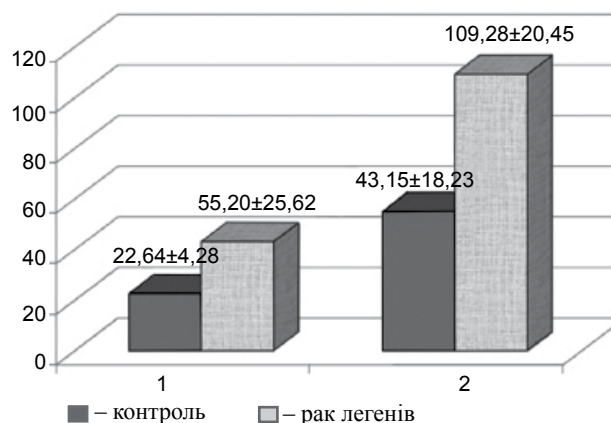


Рис. 3. Зміни активності ТФ залежно від довжини судинного русла пухлин у підгрупах 1 та 2, нмоль/хв·мг.

Так, у підгрупі 2 встановили вірогідне ($p < 0,01$) підвищення пухлинної активності ензиму вдвічі в порівнянні з пухлинами 1 підгрупи (рис. 3), таку саму тенденцію виявили для контролю. Отже, не тільки пухлинна, але й активність ТФ у контролі в підгрупі 2 були вищими. Імовірно, це вказує на універсальність дії сигнальних стимулів у тканинах легень, які здатні сприймати як нормальні, так і трансформовані тканини.

Опубліковано результати досліджень інших авторів про зв'язок між експресією ТФ і щільністю судин у пухлинах різної локалізації. Важливими є відомості М. Ikeguchi і співавт., які досліджували рак шлунка: максимальну щільність судин мали пухлини, в яких експресування TP відбувалось і в пухлинних клітинах, і в її стромі [5]. Отже, автори виявили активуючий вплив на ангіогенез раку загальної кількості як пухлинних, так і стромальних клітин, що експресують ТФ. Ці дані, а також наші результати роблять припустимим визначення активності ТФ у гомогенатах пухлин, оскільки це може впливати на процеси ангіогенезу, а також надати сумарну інформацію про загальну спрямованість метаболізму тканини.

Висновки

1. Зміни активності ТФ у гомогенатах пухлин прямо корелюють з індивідуальними показниками ангіогенезу раку легень (із рівнями експресії судинного маркера ендотелію CD34 і кількістю мікросудин).
2. Активність ензиму можна застосовувати як біохімічний показник, що показує індивідуальні особливості ангіогенезу, а тому має вплив на формування фенотипу раку легень.

Список літератури

1. Low Thymidylate Synthase, Thymidine Phosphorylase, and Dihydropyrimidine Dehydrogenase mRNA Expression Correlate With Prolonged Survival in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer / P.P. Grimminger, P.M. Schneider, R. Metzger et al. // *Clinical Lung Cancer*. – 2010. – Vol. 11. – №5. – P. 328–334.
2. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию / Г.Г. Автандилов. – М. : Медицина, 1980. – 216 с.
3. Activity of thymidilate «salvage pathway» enzymes in human gastric cancer and blood serum: correlation with treatment modalities / B.G. Borzenko, E.M. Bakurova, Yu.A. Popovich, E.A. Sidyuk et al. // *Experimental Oncology* – 2013. – Vol. 35. – №1. – P. 37–40.
4. Suppression of thymidine phosphorylase-mediated angiogenesis and tumor growth by 2-deoxy-L-ribose / H. Uchimiya, T. Furukawa, M. Okamoto et al. // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62. – №10. – P. 2834–2839.
5. The expression of thymidine phosphorylase and its correlation with angiogenesis in gastric adenocarcinoma / M. Ikeguchi, S. Oka, H. Saito et al. // *Anticancer Res.* – 1999. – Vol. 19. – №5B. – P. 4001–4005.

References

1. Grimminger, P., Schneider, P., Metzger, R., & Halsor, E. (2010). Low thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression correlate with prolonged survival in resected non-small-cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer*, 11(5), 328–334.
2. Avtandilov, G. G. (1980). Vvedenie v kolichestvennyuyu patologicheskuyu morfologiyu [*The introduction into the measuring pathological morphology*]. Moscow: Medicina. [in Russian].
3. Borzenko, B. G., Bakurova, E. M., Popovich, Yu. A., Sidyuk, E. A., & Popovich, A. Y. (2013). Activity of thymidilate “salvage pathway” enzymes in human gastric cancer and blood serum: correlation with treatment modalities. *Experimental Oncology*, 35(1), 37–40.
4. Uchimiya, H., Furukawa, T., Okamoto, M., & Tsuchida, A. (2002). Suppression of thymidine phosphorylase-mediated angiogenesis and tumor growth by 2-deoxy-L-ribose. *Cancer Research*, 62(10), 2834–2839.
5. Ikeguchi, M., Oka, S., Saito, H., Yamamoto, S., & Kitadai, Y. (1999). The expression of thymidine phosphorylase and its correlation with angiogenesis in gastric adenocarcinoma. *Cancer Research*, 19(5), 4001–4005.

Відомості про авторів:

Бакурова О.М. к. мед. н., доцент каф. хімії, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького, E-mail: 32023@mail.ru.

Бузина Р.В., асистент каф. патоморфології, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького.

Кондратюк Р.Б., к. мед. н., доцент каф. патоморфології, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького.

Гульков Ю.К., к. мед. н., доцент каф. патоморфології, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького,

зав. бюро патоморфології, Донецьке обласне клінічне територіальне медичне об'єднання.

Василенко І.В., д. мед. н., професор, зав. каф. патоморфології, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького.

Борзенко Б.Г., д. біол. н., професор каф. хімії, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького.

Сведения об авторах:

Бакурова Е.М., к. мед. н., доцент каф. химии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, E-mail: 32023@mail.ru.

Бузина Р.В., ассистент каф. патоморфологии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького.

Кондратиук Р.Б., к. мед. н., доц. каф. патоморфологии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького.

Гульков Ю.К., к. мед. н., доцент каф. патоморфологии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького,

зав. бюро патоморфологии, Донецкое областное клиническое территориальное медицинское объединение.

Василенко И.В., д. мед. н., профессор, зав. каф. патоморфологии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького.

Борзенко Б.Г., д. биол. н., профессор каф. химии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького.

Information about authors:

Bakurova E.M., as. of professor of chemistry department, M. Gorky Donetsk National Medical University, E-mail: 32023@mail.ru.

Buzina R.V., as. of professor of pathomorphology department, DonNMU; M. Gorky Donetsk National Medical University.

Kondratiyuk R.B., as. of professor of pathomorphology department, M. Gorky Donetsk National Medical University.

Gulkov Yu.K., as. of professor of pathomorphology department, M. Gorky Donetsk National Medical University.

Vasilenko I.V., prof., chief of pathomorphology department, M. Gorky Donetsk National Medical University.

Borzenko B.G., prof., prof. of chemistry department, M. Gorky Donetsk National Medical University.

Надійшла в редакцію 15.01.2015 р.

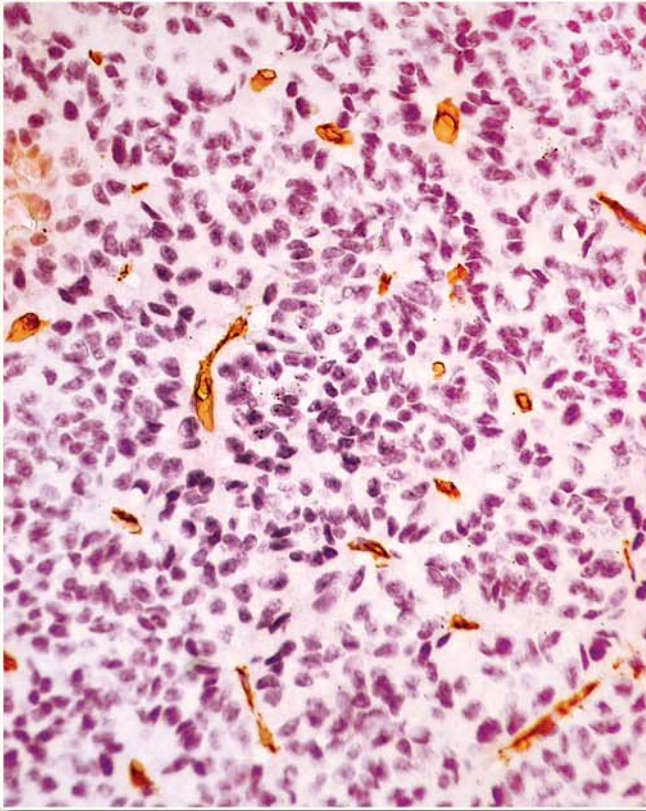


Рис. 1. Помірна довжина судинного русла. Тонкостінні судини капілярного типу з експресією маркера CD 34. ІГХ метод (×400).

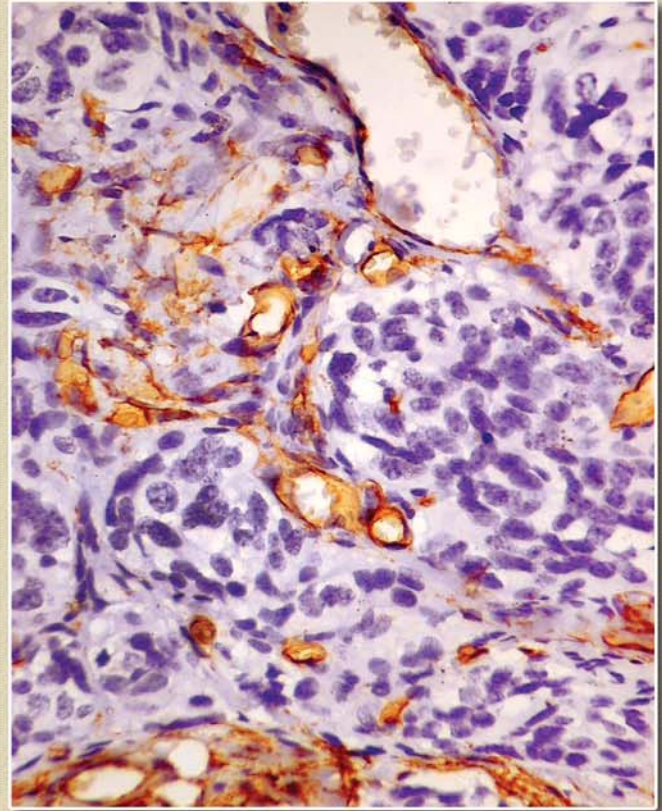


Рис. 2. Велика довжина судинного русла в раку легенів. Експресія в ендотелії маркера CD 34. ІГХ метод (×400).

(Рис. 1,2 до статті О. М. Бакурової, Р. В. Бузіної, Р. Б. Кондратюка, Ю. К. Гулькова, І. В. Василенко, Б. Г. Борзенко «Тимідинфосфорилаза та можливий зв'язок із формуванням особливостей фенотипу раку легенів», с. 53–55)

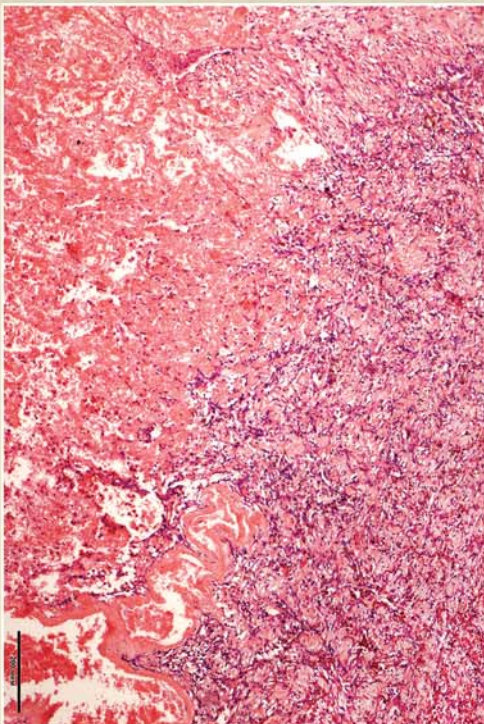


Рис. 1. Фрагмент інфаркта легкого – зона на границі коагуляційного некроза і разрастання неспецифічної грануляційної тканини. Окраска гематоксилином і еозином. Ув. х40.

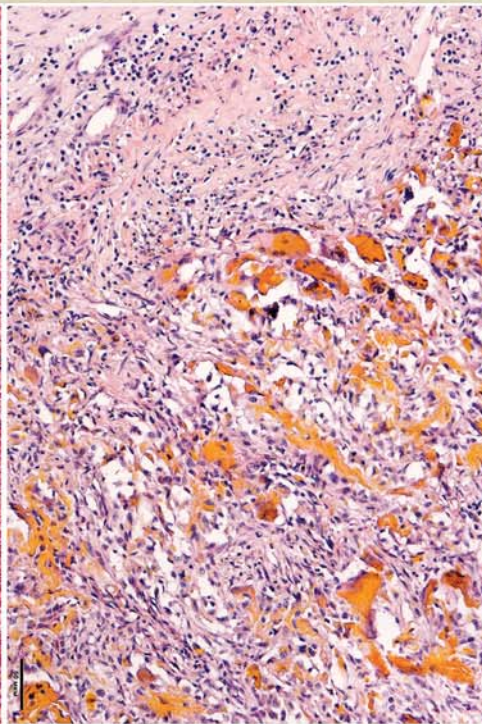


Рис. 2. Грануляційна тканина по периферії зони некроза. Очагові масивні скоплення гематоїдину і нечисленні багатоядерні гігантські макрофаги по типу «іногородного тіла». Окраска гематоксилином і еозином. Ув. х100.

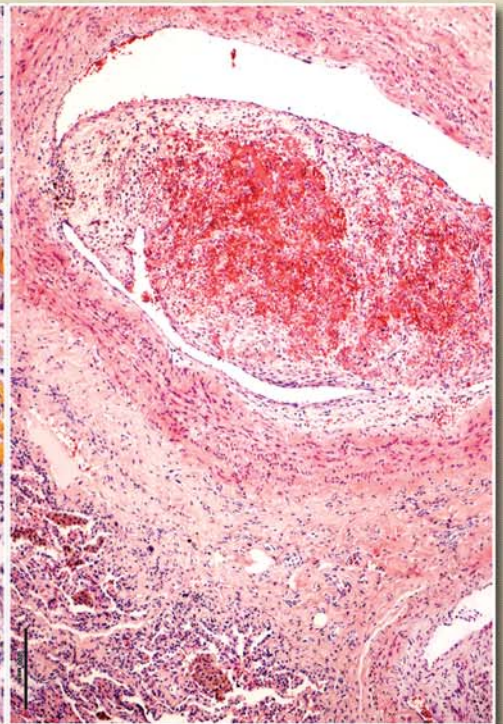


Рис. 3. Артерія м'язового типу со «старим» тромбом в її просвіті, розположена безпосередньо вздовж інфаркта. Скоплення сидерофагов в збережених альвеолах (лівий нижній кут). Окраска гематоксилином і еозином. Ув. х40.

(Рис. 1–3 к статті І. В. Лискиної, Л. М. Загабы, С. І. Дорофеевой «Інфаркт легкого як хірургічна патологія: морфологія і диференціальна діагностика», с. 102–107)