

УДК 616.24-006.6-076

ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ АЛЬФА-МЕТИЛАЦИЛ-КОЭНЗИМ А РАЦЕМАЗЫ В КАРЦИНОИДАХ ЛЕГКОГО КАК НЕЗАВИСИМЫЙ ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ФАКТОР

¹Сайнога Т.В., ²Славинский А.А.

¹ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства
здравоохранения Краснодарского края, Краснодар, e-mail: luu-tangri@mail.ru;

²ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет», Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Краснодар, e-mail: slavinsky@hotmail.ru

Диагностическое и прогностическое значение α -methylacyl-CoA рацемазы (AMACR) было исследовано во многих опухолях. Экспрессия этого маркера в карциноидах легких мало изучена, и его влияние на прогрессирование опухоли до сих пор не установлено. Иммуногистохимическое исследование с AMACR было выполнено для 73 случаев типичного карциноида и 31 случая атипичного. Мы проанализировали характер экспрессии AMACR в этих опухолях в зависимости от их клинических и морфологических характеристик. Наличие экспрессии AMACR было связано с повышением степени злокачественности и стадии процесса, более высоким пролиферативным индексом ($p < 0,05$). В типичных карциноидах мы выявили корреляцию между экспрессией AMACR, размером опухоли и наличием метастазов. Важно отметить, что гиперэкспрессия AMACR предполагает наличие метастазов ($p < 0,05$) как в типичных, так и атипичных карциноидах. Гиперэкспрессия AMACR – важный независимый прогностический фактор для карциноидов легочной локализации.

Ключевые слова: карциноид, AMACR, метастазирование

ALPHA-METHYLACYL COENZYME A RACEMASE OVEREXPRESSION IN LUNG CARCINOIDS AS AN INDEPENDENT PROGNOSTIC FACTOR

¹Saynoga T.V., ²Slavinsky A.A.

¹Krasnodar regional clinical hospital № 1 of prof. S.V. Ochapovskiy, Krasnodar,
e-mail: luu-tangri@mail.ru;

²Kuban State Medical University, Krasnodar, e-mail: slavinsky@hotmail.ru

Diagnostic and prognostic significance of α -methylacyl-CoA racemase (AMACR) has been established in many human cancers. Its correlation with clinical and pathologic data in lung carcinoid has not been fully elucidated and its impact on tumor progression has not been studied thus far. AMACR immunostaining was assessable in 73 cases of typical carcinoid and 31 cases of atypical carcinoid. We analyzed consecutive lung carcinoids cases in terms of AMACR expression and clinical and morphologic characteristics. AMACR expression was significantly associated with stage, an increased histological grade and higher proliferative index ($p < 0,05$). In typical carcinoid find correlation between AMACR expression and tumor size and metastasis. Importantly, AMACR overexpression predicted development of metastases ($p < 0,05$) both for typical and atypical carcinoid. In lung carcinoid, AMACR overexpression was correlated with important prognosticators and independently portended metastasis, highlighting the potential prognostic utility of AMACR in this type of malignances.

Keywords: carcinoid, AMACR, metastasis

AMACR (P504S, альфа-метилацил-коэнзим А рацемазы) – кислый цитоплазматических белок с молекулярной массой 45kDa, впервые был выделен из ткани печени крысы [8]. Внутри клетки локализуется в митохондриях и пероксисомах. Установлено, что фермент, катализирующий первую реакцию в цикле β -окисления, стереоспецифичен, Ацил-СоА метаболизируется данным ферментом, только если наиболее удаленный от ω -углеродного атома хиральный центр имеет S-конфигурацию. Фермент AMACR катализирует обращение конфигурации R \rightarrow S наиболее удаленного от ω -углеродного атома хирального центра жирных кислот и их метаболитов в процессе β -окисления.

В нормальных тканях экспрессия AMACR выявляется в печени (гепатоциты), почках (тубулярный эпителий), легких (эпителий бронхов), желчном пузыре

(мукоэпителиальные клетки). Учитывая участие AMACR в метаболизме липидов, было предположено, что избыточное накопление этого фермента может привести к изменениям в балансе клеточных оксидантов, что в свою очередь приводит к продукции активных форм кислорода, вызывающих повреждение ДНК [6]. При неоплазиях AMACR чаще всего выявляется в опухолях, ассоциированных с высоким употреблением жиров, таких как аденокарцинома толстой кишки, аденокарцинома предстательной железы [3]. Также экспрессия P504 выявлена в папиллярном почечно-клеточном раке, гепатоцеллюлярном раке, раке желудка и мочевого пузыря [3, 4, 10]. В исследованиях уротелиального рака отмечается положительная корреляция между экспрессией AMACR, высокой гистопатологической градацией опухоли и опухоле-

вой прогрессией [2, 5]. Гиперэкспрессия АМАСР в опухолевой ткани делает этот энзим мишенью для противоопухолевой терапии [11].

Отдельные исследования отмечают, что небольшом проценте случаев P504S выявляется в аденокарциномах и плоскоклеточном раке легкого [7]. Экспрессия в нейроэндокринных опухолях (НЭО) легких мало изучена, в одном из исследований описана положительная экспрессия в 72% типичных и 52% атипичных карциноидов 71% крупноклеточного и 50% мелкоклеточного рака легкого [9]. При исследовании НЭО желудочно-кишечного было выявлено, что экспрессия АМАСР более характерна для нейроэндокринных раков (90%), нежели для умеренно- (67%) и высокодифференцированных (0%) опухолей [1].

Цель настоящего исследования – выявить роль фермента АМАСР в опухолевой прогрессии при карциноидах легкого.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на биопсийном и операционном материале патологоанатомического отделения Краевой клинической больницы № 1 им. проф. Очаповского г. Краснодара, полученном от 104 больных карциноидными опухолями легких, находившихся на лечении в Центре грудной хирургии.

Всем пациентам была выполнена лобэктомия с лимфодиссекцией. Диагноз был морфологически верифицирован, опухоли были поделены на типичный и атипичный карциноиды согласно рекомендациям ВОЗ (73 типичных карциноида и 31 атипичный). Все случаи были стадированы по классификации TNM.

В зависимости от признаков прогрессирования заболевания (наличие метастазов, размер опухоли более 3 см) данная группа больных была разделена на подгруппы (табл. 1).

Таблица 1

Распределение больных с карциноидами по группам в зависимости от характера опухоли

Характер опухоли	Количество пациентов, n			
	ТК	АК	всего	
Размер опухоли, см	≤3	54	13	67
	> 3	19	18	37
Метастазы	нет	67	21	88
	есть	6	10	16

Иммуногистохимическое исследование осуществлялось на срезах с парафиновых блоков толщиной 3–4 мкм иммунопероксидазным методом по стандартной методике с использованием моноклональных мышиных антител к АМАСР (P504S) клон 13Н4 и Ki67 клон М1В-1 фирмы ДАКО, демаскировка осуществлялась нагреванием.

Характер экспрессии ИГХ маркеров оценивался по специально разработанной балльной системе,

учитывающей как количество позитивных клеток, так и интенсивность их окрашивания. Для каждого случая баллы суммировались, экспрессия маркеров оценивалась от 0 до 5 баллов (где 0 – отсутствие экспрессии, 5 – интенсивная экспрессия в более 70% клеток опухоли).

Результаты исследования и их обсуждение

Маркер АМАСР локализуется в цитоплазме и экспрессируется в виде гранул. В НЭО легкого мы выявляли как слабую, так и интенсивную экспрессию этого антитела.

В типичных карциноидах интенсивная экспрессия АМАСР всеми клетками опухоли была выявлена в 5% (4 из 73). В 11% случаев (8 из 73) мы наблюдали положительную реакцию различной интенсивности в части опухолевых клеток, в 12%(9 из 73) – в отдельных клетках. 68% (50 из 73) всех опухолей были АМАСР-негативными.

Атипичные карциноиды не экспрессировали АМАСР в 32% случаев (10 из 31). В 13% (4 из 31) мы наблюдали интенсивную положительную реакцию в большинстве клеток опухоли. В 16% (5 из 31) этот маркер экспрессировался в части клеток, в 39% (12 из 31) – в отдельных клетках.

Таким образом, при увеличении злокачественности карциноидных опухолей количество клеток с высоким содержанием рацемазы увеличивается (табл. 2).

Таблица 2

Экспрессия АМАСР в карциноидах легких различной степени злокачественности

Экспрессия АМАСР в баллах, M ± m	
Типичный карциноид, n = 73	Атипичный карциноид, n = 31
0,87 ± 0,17	2,00 ± 0,31

Степень злокачественности карциноидных опухолей легкого во многом зависит от их пролиферативной активности. Мы выявили зависимость характера экспрессии АМАСР от уровня пролиферации клеток опухоли (табл. 3). По мере его увеличения мы наблюдали рост уровня экспрессии фермента (p < 0,05).

Что касается различных клинических стадий, то в карциноидах отмечается стойкое повышение уровня экспрессии АМАСР при прогрессировании опухолевого процесса (табл. 4).

Для типичных карциноидов выявлено статистически значимое различие в характере иммунореактивности опухолевых клеток с P504S в зависимости от наличия метастазов и размера первичного очага (табл. 5). В атипичных карциноидах такая тенденция не про-

слеживается. Однако, если учитывать опухоли с интенсивной экспрессией на 4–5 баллов (гиперэкспрессия), что такая иммунореактив-

ность была выявлена нами только в опухолях с метастазами как в случая типичного, так и атипичного карциноида ($p < 0,05$).

Таблица 3

Экспрессия AMACR в зависимости от пролиферативной активности опухолевых клеток

Индекс Ki67, %	0	< 1	1–2	> 2–3	> 3–5	> 5–10	> 10
<i>n</i>	7	50	21	7	11	5	3
Экспрессия AMACR в баллах, $M \pm m$	0	$0,90 \pm 0,22$	$1,09 \pm 0,27$	$1,28 \pm 0,64$	$2,00 \pm 0,52$	$2,40 \pm 0,81$	$4,00 \pm 0,58$

Таблица 4

Экспрессия AMACR в карциноидах легкого на разных клинических стадиях

TNM	<i>n</i>	Экспрессия в баллах, <i>n</i> (%)						Стадия
		0	1	2	3	4	5	
T ₁ N ₀ M ₀	54	42(78)	–	8(15)	3(5)	1(2)	–	1A
T _{1(m)} N ₀ M ₀	7	7(100)	–	–	–	–	–	
T _{2a} N ₀ M ₀	16	7(44)	–	6(37,5)	2(12,5)	1(6)	–	1B
T _{2b} N ₀ M ₀	11	4(36)	–	5(46)		1(9)	1(9)	2A
T _{1-2a} N ₁ M ₀	14	2(14)	–	3(21)	1(7)	2(14)	6(44)	
T _{1-2a} N ₂ M ₀	2	–	–		2(100)	–	–	3A

Таблица 5

Экспрессия AMACR в карциноидах в зависимости от размера опухоли и наличия метастазов

Характер опухоли		Экспрессия P504S, <i>n</i>					
		TK, 1-5 баллов	TK, 0 баллов	<i>p</i>	AK, 1-5 баллов	AK, 0 баллов	<i>p</i>
Размер опухоли, см	≤3	11	43	< 0,05	7	6	> 0,05
	> 3	10	9		14	4	
Метастазы	нет	16	51	< 0,01	12	9	> 0,05
	есть	5	1		9	1	

Заключение

Полученные нами данные в совокупности с исследованиями других авторов позволяют предположить, что AMACR играет важную роль в опухолевом генезе. Экспрессии AMACR в карциноидах лёгкого увеличивается в более злокачественных опухолях. Также мы выявили повышение уровня содержания этого фермента в клетках при прогрессировании опухолевого процесса. Гиперэкспрессия AMACR была выявлена нами только в опухолях с метастазами, а при типичных карциноидах любая, даже слабая иммунореактивность связана с большей величиной первичной опухоли и наличием метастазов. Таким образом, иммуногистохимическое исследование позволяет выявить изменения, происходящие с опухолевыми клетками на молекулярном уровне, и тем самым определить биологический

потенциал опухоли. Мы предполагаем, что выявление уровня экспрессии фермента AMACR в клетках карциноидов легкого является важным независимым прогностическим фактором для этого типа опухолей.

Список литературы

1. Annenkov A., Nishikura K., Domori K. Alpha-methylacyl-coenzyme A racemase expression in neuroendocrine neoplasms of the stomach // *Virchows Arch.* – 2012. – Vol.461, № 2. – P. 169–175.
2. Gunia S., May M., Scholmann K. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase correlates with histopathologic grading in noninvasive bladder cancer // *Virchows Arch.* – 2008. – Vol. 453, № 2. – P. 165–70.
3. Jiang Z., Fanger G. R., Woda B. A., Banner B. F. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase (P504s) in various malignant neoplasms and normal tissues: astudy of 761 cases // *Hum Pathol.* – 2003. – Vol. 34, № 8. – P. 792–6.
4. Kourda N., Mlika M., Derouiche A. The utility of alpha-methyl CoA racemase (P504S) expression as a marker of renal cell carcinomas // *Tunis Med.* – 2010. – № 9. – P. 651–4.

5. Langner C., Rupar G., Leibl S. Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR/P504S) protein expression in urothelial carcinoma of the upper urinary tract correlates with tumour progression // *Virchows Arch.* – 2006. – Vol. 448, № 3. – P. 325–30.

6. Lloyd M. D., Darley D. J., Wierzbicki A. S. Alpha-methylacyl-CoA racemase – an ‘obscure’ metabolic enzyme takes centre stage // *FEBS J.* – 2008. – № 275. – P. 1089–1102.

7. Nassar A., Amin M., Sexton D. Utility of alpha-methylacyl coenzyme A racemase (p504s antibody) as a diagnostic immunohistochemical marker for cancer. *Appl Immunohistochem // Mol Morphol.* – 2005. – Vol.3, № 3. – P. 252–5.

8. Schmitz W., Fingerhut R., Conzelmann E. Purification and properties of an alpha-methylacyl-CoA racemase from rat liver // *Eur J Biochem.* – 1994. – № 222. – P. 313–323.

9. Shilo K., Dracheva T., Mani H. Alpha-methylacyl CoA racemase in pulmonary adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, and neuroendocrine tumors: expression and survival analysis // *Arch Pathol Lab Med.* – 2007. – Vol. 131, № 10. – P. 1555–60.

10. Truong C.D., Li W., Feng W. Alpha-methylacyl-CoA racemase expression is upregulated in gastric adenocarcinoma: a study of 249 cases // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2008. – Vol.1, № 6. – P. 518–23.

11. Wilson B.A., Wang H., Nacev B.A. High-throughput screen identifies novel inhibitors of cancer biomarker α -methylacyl coenzyme A racemase (AMACR/P504S) // *Mol Cancer* – 2011. – Vol. 10, № 5. – P. 825–38.

References

1. Annenkov A., Nishikura K., Domori K. Alpha-methylacyl-coenzyme A racemase expression in neuroendocrine neoplasms of the stomach. *Virchows Arch*, 2012, Vol.461, no. 2, pp. 169–175.

2. Gunia S., May M., Scholmann K. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase correlates with histopathologic grading in noninvasive bladder cancer // *Virchows Arch*, 2008, Vol.453 no.2, pp. 165–70.

3. Jiang Z., Fanger G. R., Woda B. A., Banner B. F. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase (P504s) in various malignant neoplasms and normal tissues: a study of 761 cases. *Hum Pathol*, 2003, Vol. 34, no.8, pp. 792–6.

4. Kourda N., Mlika M., Derouiche A. The utility of alpha-methyl CoA racemase (P504S) expression as a marker of renal cell carcinomas. *Tunis Med*, 2010, no. 9, pp. 651–4.

5. Langner C., Rupar G., Leibl S. Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR/P504S) protein expression in urothelial carcinoma of the upper urinary tract correlates with tumour progression. *Virchows Arch*, 2006, Vol.448, no. 3, pp. 325–30.

6. Lloyd M.D., Darley D.J., Wierzbicki A.S. Alpha-methylacyl-CoA racemase – an ‘obscure’ metabolic enzyme takes centre stage. *FEBS J*, 2008, no. 275, pp. 1089–1102.

7. Nassar A., Amin M., Sexton D. Utility of alpha-methylacyl coenzyme A racemase (p504s antibody) as a diagnostic immunohistochemical marker for cancer. *Appl Immunohistochem. Mol Morphol*, 2005, Vol.3, no.3, pp. 252–5.

8. Schmitz W., Fingerhut R., Conzelmann E. Purification and properties of an alpha-methylacyl-CoA racemase from rat liver. *Eur J Biochem*, 1994, no.222, pp. 313–323.

9. Shilo K., Dracheva T., Mani H. Alpha-methylacyl CoA racemase in pulmonary adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, and neuroendocrine tumors: expression and survival analysis. *Arch Pathol Lab Med*, 2007, Vol. 131, no.10, pp. 1555–60.

10. Truong C.D., Li W., Feng W. Alpha-methylacyl-CoA racemase expression is upregulated in gastric adenocarcinoma: a study of 249 cases. *Int J Clin Exp Pathol*, 2008, Vol.1, no.6, pp. 518–23.

11. Wilson B. A., Wang H., Nacev B. A High-throughput screen identifies novel inhibitors of cancer biomarker α -methylacyl coenzyme A racemase (AMACR/P504S). *Mol Cancer*, 2011, Vol. 10, no.5, pp. 825–38.

Рецензенты:

Савченко Ю.П., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей хирургии, ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар;

Каде А.Х., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии, ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар.

Работа поступила в редакцию 03.06.2013.