

УДК 616-006

**ЭКСПРЕССИЯ ПРОТЕИНКИНАЗЫ М $\zeta$  В ДИФFUЗНЫХ И ОТГРАНИЧЕННЫХ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ****Никитин П.В., Рыжова М.В., Zubova И.В., Шугай С.В.**ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии имени акад. Н.Н. Бурденко», Москва, e-mail: [nikitinpaulv@yandex.ru](mailto:nikitinpaulv@yandex.ru)

Глиальные опухоли представляют собой важную проблему в современной нейроонкологии. Существует множество нерешенных фундаментальных проблем их канцерогенеза, транслируемых в практическую плоскость, в частности недостатки в понимании механизмов канцерогенеза служат одной из причин трудностей в разработке средств таргетной терапии. В данной работе мы решили изучить роль мозгоспецифичной атипичной изоформы протеинкиназы C – протеинкиназы М $\zeta$  (ПК М $\zeta$ ) – в развитии двух видов глиальных опухолей – диффузных астроцитомах с мутацией в гене *IDH1* (ДА) и пилоидных астроцитомах (ПА) с помощью иммуногистохимического исследования с подсчетом процента клеток, экспрессирующего ПК М $\zeta$  (ПКЭ М $\zeta$ ), и *histoscore* ПК М $\zeta$ . Мы показали наличие статистически достоверных отличий в значениях ПКЭ М $\zeta$ , в ДА данный показатель составил  $40,84 \pm 0,64\%$ , в ПА –  $29,35 \pm 0,76\%$ . Аналогичная картина наблюдалась также при подсчете *histoscore* ПК М $\zeta$ , в ДА данный показатель составил  $167,12 \pm 3,4\%$ , в то время как в ПА  $105,7 \pm 4,19\%$ , выявленные различия были также статистически достоверными. Таким образом, мы впервые описали экспрессию ПК М $\zeta$  в ДА и ПА. Более того, мы выявили более активную экспрессию ПК М $\zeta$  в ДА по сравнению с ПА.

**Ключевые слова:** диффузная астроцитома, пилоидная астроцитома, протеинкиназа М $\zeta$ **EXPRESSION OF PROTEIN KINASE M $\zeta$  IN DIFFUSE AND DELIMITED GLIAL TUMORS****Nikitin P.V., Ryzhova M.V., Zubova I.V., Shugay S.V.***N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow,**e-mail: [nikitinpaulv@yandex.ru](mailto:nikitinpaulv@yandex.ru)*

Glial tumors are an important problem in modern neuro-oncology. There are many unsolved fundamental issues on their carcinogenesis that are translated into practical terms, in particular, shortcomings in understanding the mechanisms of carcinogenesis are one of the reasons for the difficulties in developing targeted therapies. In this article, we decided to study the role of the brain-specific atypical isoform of protein kinase C – proteinkinase M $\zeta$  (PKM $\zeta$ ) – in the development of two glial tumors types – diffuse astrocytomas with a mutation in the *IDH1* gene (DA) and piloid astrocytomas (PA) using immunohistochemical studies with counting the percentage of cells expressing PK M $\zeta$  (PKE M $\zeta$ ) and PK M $\zeta$  *histoscore*. We showed statistically significant differences in the PKE M $\zeta$  values, in DA this indicator was  $40.84 \pm 0.64\%$ , in PA –  $29.35 \pm 0.76\%$ . A similar picture was also observed in case of PK M $\zeta$  *histoscore*, in DA this indicator was  $167.12 \pm 3.4\%$ , while in PA  $105.7 \pm 4.19\%$ , the identified differences were also statistically significant. Thus, we first described the expression of PK M $\zeta$  in DA and PA. Moreover, we found a more active expression of PK M $\zeta$  in DA compared to PA.

**Keywords:** diffuse astrocytoma, pilocytic astrocytoma, proteinkinase M $\zeta$ 

Глиальные опухоли представляют собой важную проблему в современной нейроонкологии. Данный вопрос актуален не только в практической плоскости – эффективных средств таргетной терапии как для диффузных, так и для отграниченных глиальных опухолей не разработано, но и в фундаментальной – вопросы патогенеза различных видов глиом остаются не до конца изученными. Конечно, логично предположить, что между двумя этими посылами существует непосредственная взаимосвязь – пробелы в понимании фундаментальных механизмов канцерогенеза определяют неполноценность теоретической базы для создания эффективных, высокотехнологичных средств терапии. Именно поэтому дальнейшее, более глубокое изучение ключевых принципов канцерогенеза является важнейшей задачей, имеющей как фундаментальное, так и прикладное значение.

Большую часть глиом согласно классификации опухолей центральной нервной системы (ЦНС) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2016 г. можно разделить на две условные группы, одна из них включает в себя диффузные глиальные опухоли, другая составлена из опухолей с относительно отграниченным ростом [1]. Среди диффузных глиом наименьшим злокачественным потенциалом обладают диффузные астроцитомы, Grade II по классификации ВОЗ, несущие в себе мутацию генов *IDH1* или *IDH2*. Данные мутации являются важнейшим генетическим событием в патогенезе глиом, определяющим ряд молекулярно-биологических изменений в диффузных астроцитомах и имеющих непосредственное влияние на прогноз: пациенты с диффузными астроцитомами с мутацией в генах *IDH1* или *IDH2* отличаются лучшим прогнозом по сравнению с паци-

ентами с диффузными астроцитомами без мутаций данных генов [2–4]. При этом мутация в гене *IDH1* встречается в подавляющем большинстве случаев [2, 3].

Самыми распространенными среди отграниченных глиальных опухолей ЦНС являются пилоидные астроцитомы. Данные опухоли возникают преимущественно у детей и молодых взрослых [5]. Гистологически они характеризуются преимущественно отграниченным от окружающей мозговой ткани ростом. При этом основным драйверным событием в канцерогенезе данных опухолей является активация сигнального каскада рецепторов тирозинкиназы, мишенью мутационных изменений при этом наиболее часто является белок *BRAF* [6]. Данные опухоли относительно доброкачественные, им присвоен Grade I по ВОЗ, тем не менее они могут рецидивировать и подвергаться малигнизации [6].

Целый ряд вопросов, связанных с патогенезом как диффузных, так и отграниченных глиальных опухолей остается неизученным. В частности, важным представляется характеристика не только драйверных событий канцерогенеза, но и других звеньев патогенеза, обеспечивающих рост и прогрессирование опухоли. Большую роль в этом вопросе играют эффекторные белки, такие как протеинкиназы. Среди всех представителей данного класса белков серьезный интерес представляют особые формы протеинкиназ – так называемые атипичные изоформы протеинкиназы С.

Протеинкиназы класса С (ПК С) играют важнейшую роль в реализации целого ряда клеточных функций, связанных с пластическим обменом, энергетическим метаболизмом, пролиферацией клеток и регуляцией клеточного цикла. Все ферменты класса протеинкиназ С делятся на несколько семейств, отличающихся своими биохимическими и молекулярно-биологическими свойствами. Это традиционные или классические протеинкиназы, новые или нестандартные протеинкиназы и атипичные изоформы протеинкиназы С. Традиционные протеинкиназы С взаимодействуют с  $Ca^{2+}$ , диацилглицеролом или фосфатидилхолином для своей активации. Новые протеинкиназы С активируются молекулами диацилглицерола и не требуют  $Ca^{2+}$ . Атипичные изоформы протеинкиназы С не требуют для своей активации ни  $Ca^{2+}$ , ни диацилглицерола. К членам данного семейства относятся такие протеинкиназы, как протеинкиназа С  $\zeta$  (ПКС  $\zeta$ ), протеинкиназа М $\zeta$  (ПК М $\zeta$ ) и протеинкиназы С *iota* (ПК Ci) и протеинкиназа С  $\lambda$  [7].

Данные ферменты обладают необычными свойствами, в частности более высокой,

чем у других представителей их класса, каталитической активностью [7]. Поскольку атипичные изоформы протеинкиназы С не требуют для своей активации никаких дополнительных кофакторов, они, в отличие от большинства других протеинкиназ, могут выступать не только в качестве вторичных посредников в реализации различных функций, но и в роли независимых и самостоятельных регуляторов этих функций, в том числе метаболических и пролиферативных процессов [7].

Наиболее уникальными свойствами среди всех представителей данного класса белков обладает ПК М $\zeta$ , которая является автономно активирующимся фрагментом ПКС  $\zeta$ , имеющим самостоятельное значение. ПК М $\zeta$  не содержит регулирующего аутоингибиторного домена [8], поэтому после своего синтеза она остается активной до тех пор, пока не подвергнется процессу деградации. Активация клетки, требующая её длительных пластических перестроек, приводит к освобождению мРНК ПК М $\zeta$  от трансляционного блока посредством активации вторичных посредников. Последующее фосфорилирование ПК М $\zeta$  PDK1 ферментом затем превращает её в конформацию с высокой конститутивной активностью [9]. Таким образом, трансляция мРНК ПК М $\zeta$  приводит к синтезу белка, идентичного каталитической части молекулы ПКС  $\zeta$ , но с отсутствием каких-либо регуляторных доменов. Поэтому, будучи синтезированной, ПК М $\zeta$  является конститутивно активной, не требуя повторного связывания с какими-либо посредниками. Считается, что эта постоянная активность позволяет ПК М $\zeta$  играть ключевую роль в поддержании длительно существующих пластических перестроек в клетках головного мозга [10, 11].

Целью данного исследования явилось проведение сравнительного анализа наличия и активности экспрессии ПК М $\zeta$  в наиболее близких с гистогенетической точки зрения видах глиальных опухолей, представляющих разные опухолевые классы: диффузных астроцитомах с мутацией в гене *IDH1*, имеющих диффузный характер роста, и пилоидных астроцитомах, растущих преимущественно отграниченно в окружающей мозговой ткани.

#### Материалы и методы исследования

##### *Группы исследования и их характеристика*

В ретроспективном, слепом, рандомизированном исследовании были изучены 30 образцов опухолей от пациентов с установленным диагнозом диффузной астроцитомы с мутацией в гене *IDH1* (Grade II по ВОЗ)

(ДА), а также 30 образцов опухолей пациентов с установленным диагнозом пилоидной астроцитомы (Grade I по ВОЗ) (ПА), проходивших хирургическое лечение в ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко в 2018 г. Определение мутационного статуса гена *IDH1* проводилось с помощью прямого секвенирования по методу Сенгера.

*Проведение иммуногистохимического исследования*

Из парафиновых блоков с фиксированными в них образцами опухолей изготавливали срезы толщиной 3 мкм, депарафинировали с использованием ксилола и повторно гидратировали с помощью различных концентраций этанола, срезы высушивали в термостате при 45 °С. Затем срезы последовательно инкубировали с кроличьими моноклональными антителами против антигена ПК МЗ человека (Abcam, Великобритания) и после этого конъюгировали с антикроличьими мышиными IgG антителом против пероксидазы хрена (Cell Marque, «Sigma-Aldrich», США). Сайты связывания антител визуализировали с использованием тетрагидрохлорида 3,3'-диаминобензидина («Ventana Medical Systems», США), ядра клеток окрашивали гематоксилином.

*Обработка результатов иммуногистохимического исследования*

Образцы изучались под световым микроскопом на увеличении  $\times 400$  тремя опытными патологами, не знакомыми с исходными данными пациентов. Активность экспрессии ПК МЗ подсчитывали количественным методом, определяя процент клеток, экспрессирующих данный маркер (ПКЭ МЗ), а также полуколичественным методом *histoscore*. При подсчете ПКЭ МЗ три опытных патолога высчитывали соотношение клеток с наличием экспрессии ПК МЗ и общего числа клеток, выраженное в процентах. Результаты подсчета усредняли.

Для определения *histoscore* ПК МЗ процент клеток со слабopоложительным окрашиванием (низкая интенсивность экспрессии) умножался на один, процент клеток с умеренно положительным окрашиванием (средняя интенсивность экспрессии) умножался на два и, наконец, процент клеток с сильно положительным окрашиванием (высокая интенсивность экспрессии) умножался на три, после чего результат суммировался [12]. При этом для оценки степени выраженности экспрессии маркеров применялось колориметрическое исследование с помощью эталонной модели CIE XYZ. Для этого с помощью микроскопа Carl Zeiss Scope.A1, камеры AxioCam 105 color (Zeiss

AG, Германия) и программ для формирования и анализа изображений ZEN 2 (Zeiss AG, Германия), ImageJ (NIH, США) и Adobe Photoshop (Adobe Systems, США) определялись суммарные средние значения по красной кривой (X), зеленой кривой (Y) и синей кривой (Z). После этого, программным способом вычислялись средние колориметрические показатели (СКП) для каждой метки в отдельности. В случае, если СКП составлял 170 и более, интенсивность экспрессии считалась низкой, при значении СКП 85 и более средней и при показателе СКП менее 85 активность экспрессии считалась высокой. Данные, полученные при подсчете тремя патологами, усреднялись.

*Статистическая обработка результатов исследования*

Статистическая обработка проводилась с помощью программного обеспечения Statistica 10 (StatSoft, США). Для определения достоверности различий показателей активности экспрессии ПК МЗ в двух группах применялся U-критерий Манна – Уитни. Различия считали достоверными при значении  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение**

*Характеристика групп исследования*

Средний возраст пациентов в ДА группе на момент операции составлял  $38,15 \pm 3,12$  года, при этом мужчины составили 60% исследуемых ( $n = 18$ ), женщины 40% ( $n = 12$ ). Также в группе ПА средний возраст на момент операции составлял  $16,87 \pm 2,14$  года. Мужчины в данной группе составляли 53,33% ( $n = 16$ ), женщины 46,67% ( $n = 14$ ).

*Определение процента клеток с положительной экспрессией ПК МЗ*

При определении процента клеток с положительной экспрессией ПК МЗ было выявлено, что ПКЭ МЗ в ДА группе составляет в среднем  $40,84 \pm 0,64\%$ . В то же время в группе ПА средний показатель ПКЭ МЗ был меньше и составил  $29,35 \pm 0,76\%$  (рис. 1). При этом выявленные различия носили статистически достоверный характер ( $p < 0,0001$ ,  $z = 6,43$ ).

*Выявление различий в *histoscore* ПК МЗ в диффузных и пилоидных астроцитомах*

В группе ДА среднее значение *histoscore* ПК МЗ составило  $167,12 \pm 3,4\%$ . Средний показатель *histoscore* ПК МЗ в группе ПА был меньше и составил  $105,7 \pm 4,19\%$  (рис. 2). Указанные различия носили статистически достоверный характер ( $p < 0,0001$ ,  $z = 6,56$ ).

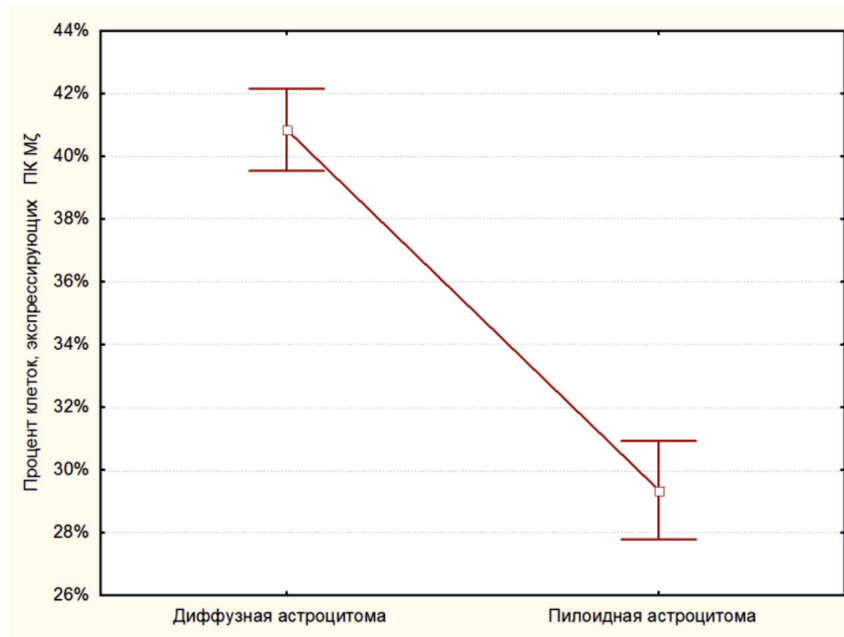


Рис. 1. Значения процента клеток, экспрессирующих ПК Мζ в диффузных и пилоидных астроцитозах. Уровень экспрессии данного маркера статистически достоверно выше в диффузных астроцитозах ( $p < 0,0001$ ,  $z = 6,43$ )

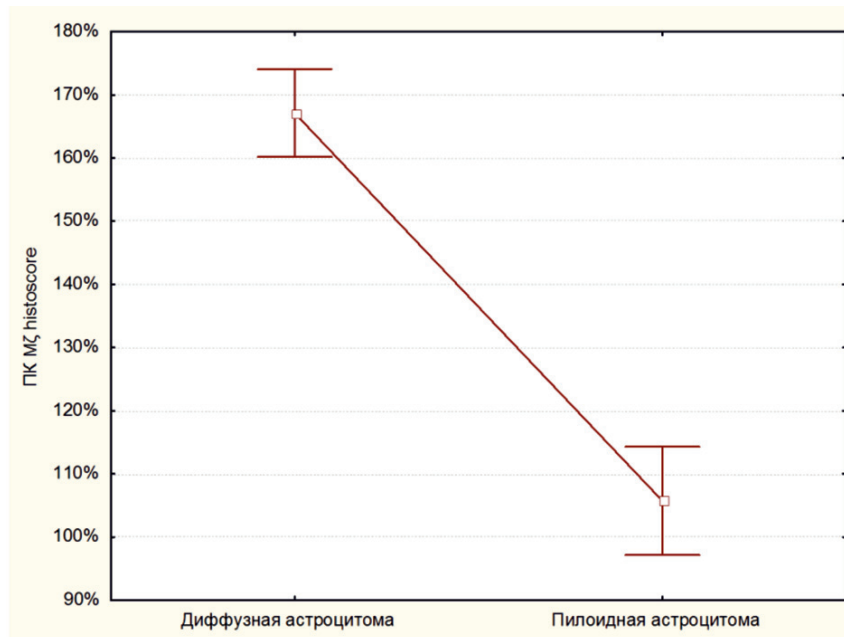


Рис. 2. Значения histoscore ПК Мζ в диффузных и пилоидных астроцитозах. Степень активности экспрессии ПК Мζ в диффузных астроцитозах выше, чем в пилоидных астроцитозах ( $p < 0,0001$ ,  $z = 6,56$ )

Роль ПК Мζ в развитии опухолевых заболеваний изучена крайне мало. В одном из немногих исследований было выявлено участие ПК Мζ-подобной формы в разви-

тии острого лимфобластного лейкоза [11]. Необходимо отметить, что в данном случае ПК Мζ синтезируется как результат редкой мутации и встречается крайне нечасто



и только в патологических условиях, несколько отличаясь своим молекулярным строением и свойствами.

Что касается опухолей головного мозга, то исследований роли ПК М $\zeta$  в развитии опухолей данной локализации не проводилось. Тем не менее было обнаружено, что ПК М $\zeta$  вовлекается в процессы пролиферации нейронов при нейрогенезе и может быть вовлечен в пролиферативные каскады в клетках астроцитарной глиии. Это подчеркивает возможную ключевую эффекторную роль ПК М $\zeta$  в поддержании стволовых свойств клеток, что немаловажно в вопросах канцерогенеза.

В рамках данного исследования нам впервые удалось показать наличие экспрессии ПК М $\zeta$  как в астроцитах с ограниченным характером роста на примере пилоидных астроцитом, так и в астроцитах с диффузным ростом на примере диффузных астроцитом с наличием мутации в гене *IDH1*. При этом сравнительный анализ позволил выявить статистически значимые различия в активности экспрессии между ДА и ПА: экспрессия ПК М $\zeta$  была более активной в ДА, нежели в ПА. Интересно заметить, что данные различия наблюдались не только в количественном аспекте – обнаружено различие процента клеток, экспрессирующего ПК М $\zeta$ , но и в полуколичественном – в исследуемых группах различались также показатели *histoscore*.

В целом можно отметить, что ПК М $\zeta$  экспрессируется достаточно активно и в ПА, и в ДА, поэтому данный молекулярный фактор может играть существенную роль в развитии обоих онкологических процессов. Тем не менее, по-видимому, именно в патогенезе диффузных глиом в целом и ДА в частности ПК М $\zeta$  играет наибольшую роль. Однако участие ПК М $\zeta$  в канцерогенезе как диффузных, так и ограниченных глиальных опухолей требует дополнительного изучения.

Полученные результаты свидетельствуют о существенной роли факторов, играющих роль эффекторов, но в данном случае важно отметить, что ПК М $\zeta$  является специфическим эффектором, характерным исключительно для мозговой ткани. Именно поэтому фактически ПК М $\zeta$  представляет собой специфический фактор канцерогенеза глиальных опухолей. То есть роль данной протеинкиназы сходна с ролью мутаций в генах *IDH1* и *IDH2*, только проявление этой роли происходит не на генетическом, а непосредственно на протеомическом, функциональном уровне. В этом аспекте ПК М $\zeta$  представляет огромный интерес не

только с точки зрения понимания фундаментальных механизмов канцерогенеза глиальных опухолей, но и в отношении практического применения как диагностического маркера и потенциальной мишени для таргетной терапии.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-01034 мк.*

### Список литературы

1. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H., Wiestler O.D., Kleihues P., Ellison D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016. V. 131 (6). P. 803–820. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
2. Balss J., Meyer J., Mueller W., Korshunov A., Hartmann C., von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008. V 116 (6). P. 597–602. DOI: 10.1007/s00401-008-0455-2.
3. Yan H., Parsons D.W., Jin G., McLendon R., Rasheed B.A., Yuan W., Kos I., Batinic-Haberle I., Jones S., Riggins G.J., Friedman H., Friedman A., Reardon D., Henson J., Kinzler K.W., Velculescu V.E., Vogelstein B., Bigner D.D. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* 2009. V. 360 (8). P. 765–773. DOI: 10.1056/NEJMoa0808710.
4. Hartmann C., Hentschel B., Tatagiba M., Schramm J., Schnell O., Seidel C., Stein R., Reifenberger G., Pietsch T., von Deimling A., Loeffler M., Weller M; German Glioma Network. Molecular markers in low-grade gliomas: predictive or prognostic? *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17 (13). P. 4588–4599. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3194.
5. Ostrom Q.T., Gittleman H., Liao P., Rouse C., Chen Y., Dowling J., Wolinsky Y., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol.* 2014. V. 16. Suppl 4. P. iv1-iv63. DOI: 10.1093/neuonc/nou223.
6. Jones D.T., Hutter B., Jäger N., Korshunov A., Kool M., Warnatz H.J., Zichner T., Lambert S.R., Ryzhova M., Quang D.A. et al. Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet.* 2013. V. 45 (8). P. 927–932. DOI: 10.1038/ng.2682.
7. Zeng L., Webster S.V., Newton P.M. The biology of protein kinase C. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012. V. 740. P. 639–661. DOI: 10.1007/978-94-007-2888-2\_28.
8. Hernandez A.I., Blace N., Cray J.F., Serrano P.A., Leitges M., Libien J.M., Weinstein G., Tcherapanov A., Sacktor T.C. Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory. *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278 (41). P. 40305–40316.
9. Pastalkova E., Serrano P., Pinkhasova D., Wallace E., Fenton A.A., Sacktor T.C. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science.* 2006. V. 313 (5790). P. 1141–1144.
10. Sacktor T.C. PKMzeta, LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage. *Prog Brain Res.* 2008. V. 169. P. 27–40. DOI: 10.1016/S0079-6123(07)00002-7. Review.
11. Hartsink-Segers S.A., Beaudoin J.J., Luijendijk M.W., Exalto C., Pieters R., Den Boer M.L. PKC $\zeta$  and PKM $\zeta$  are overexpressed in TCF3-rearranged paediatric acute lymphoblastic leukaemia and are associated with increased thiopurine sensitivity. *Leukemia.* 2015. V. 29 (2). P. 304–311. DOI: 10.1038/leu.2014.210.
12. Wang Y.X., Zhang X.R., Zhang Z.J., Li L., Xi G.J., Wu D., Wang Y.J. Protein kinase M $\zeta$  is involved in the modulatory effect of fluoxetine on hippocampal neurogenesis in vitro. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014. V. 17 (9). P. 1429–1441. DOI: 10.1017/S1461145714000364.