

УДК 616-006

**ПРОТЕИНКИНАЗА С ИОТА: НОВЫЙ ПЕРСПЕКТИВНЫЙ  
ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР У ПАЦИЕНТОВ  
С ПИЛОИДНЫМИ АСТРОЦИТОМАМИ**

**<sup>1</sup>Никитин П.В., <sup>1</sup>Рыжова М.В., <sup>2</sup>Мурадян М.А., <sup>1</sup>Дациева А.А.,  
<sup>1</sup>Галстян С.А., <sup>1</sup>Зубова И.В.**

<sup>1</sup>ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии имени акад. Н.Н. Бурденко» Москва, e-mail: redseadog@gmail.com;

<sup>2</sup>ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов», медицинский институт, Москва

Атипические изоформы протеинкиназы С являются классом протеинкиназ с уникальными биохимическими свойствами – низким порогом и относительной легкостью активации. Одним из важнейших представителей данного класса является протеинкиназа С иота (ПКСи). Ранее проводились исследования по изучению роли данной протеинкиназы в патогенезе ряда опухолевых заболеваний. Настоящее исследование поставило своей целью определить значимость ПКСи в канцерогенезе пилоидных астроцитом (ПА), а также установить возможную взаимосвязь активности её экспрессии с прогнозом пациентов в отношении безрецидивной выживаемости. Для решения данной задачи были сформированы две группы пациентов – с наличием рецидива заболевания в течение 5 лет (ГСР) и без возникновения рецидива за этот же период (ГБР), в каждую группу были включены по 30 пациентов. В образцах каждого пациента подсчитывался показатель histoscore ПКСи. Было выявлено, что среднее значение histoscore ПКСи в ГСР составило  $137,89 \pm 2,01\%$ , в то время как в ГБР данный показатель был меньше и составил  $119,54 \pm 2,46$ , при этом выявленные различия были статистически достоверными. Также при проведении регрессионного анализа было выявлено, что значения histoscore ПКСи значимо влияют на прогноз безрецидивной выживаемости у пациентов с ПА. Таким образом, ПКСи может выступать в качестве эффективного инструмента оценки риска возникновения рецидива.

**Ключевые слова:** протеинкиназа С иота, пилоидная астроцитома, рецидив

**PROTEIN KINASE C IOTA: A NEW PROMISING DIAGNOSTIC  
MARKER IN PATIENTS WITH PILOID ASTROCYTOMAS**

**<sup>1</sup>Nikitin P.V., <sup>1</sup>Ryzhova M.V., <sup>2</sup>Muradyan M.A., <sup>1</sup>Datsieva A.A.,  
<sup>1</sup>Galstyan S.A., <sup>1</sup>Zubova I.V.**

<sup>1</sup>N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow, e-mail: redseadog@gmail.com;

<sup>2</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Medical Institute, Moscow

Atypical isoforms of protein kinase C are a class of proteinkinases with unique biochemical properties – low threshold and relative ease of activation. One of the most important representatives of this class is protein kinase C iota (PKCi). Earlier researches studied the role of this protein kinase in the pathogenesis of a number of tumor diseases. The present study aimed to determine the significance of PKCi in piloid astrocytomas (PA) carcinogenesis, as well as to establish the possible relationship between its expression activity and the patient's disease-free survival prognosis. To solve this problem, two groups of patients were formed – with the presence of a relapse within 5 years (RG) and without occurrence of a relapse during the same period (RFG), 30 patients were included in each group. In each patient's samples, PKCi histoscore was calculated. It was revealed that the average PKCi histoscore in the RG was  $137.89 \pm 2.01\%$ , while in the RFG this index was less and amounted to  $119.54 \pm 2.46$ , the differences were statistically significant. Also regression analysis showed that histoscore PKCi values significantly affect the prognosis of relapse-free survival in patients with PA. Thus, PKCi can act as an effective tool for assessing the risk of relapse.

**Keywords:** protein kinase C iota, piloid astrocytoma, relapse

Атипические изоформы протеинкиназы С (АИПКС) представляют собой крайне интересный класс белков, причём любопытен он не только с позиций физиологических процессов, но и с точки зрения патогенетических механизмов, в том числе механизмов канцерогенеза. Одним из важнейших представителей данного класса белков является протеинкиназа С иота (ПКСи). Данная протеинкиназа, как и другие представители семейства АИПКС, не требует для своей активации ни  $Ca^{2+}$ , ни диацилглицерола, что сказывается на их более высокой ферментативной активности [1].

В последнее время достаточно интенсивно изучается роль ПКСи в развитии онкологических заболеваний. В частности, высокая активность ПКСи наблюдается в аденокарциномах пищевода, стимулируя процесс пролиферации опухолевых клеток и подавляя процессы апоптоза в них [2]. При раке поджелудочной железы разработаны несколько перспективных препаратов, ингибирующих данную разновидность протеинкиназ. В некоторых исследованиях было показано, что ПКСи играет существенную роль в развитии рака яичников [3]. Данный подход позволил создать способ лечения таких больных

с применением ингибитора ПКСи препарата ауринофина, показавшего свою эффективность. Было выявлено, что ПКСи принимает участие в развитии рака желудка [4]. В исследованиях некоторых форм рака молочной железы определена значительная роль ПКСи в её патогенезе [5]. Также была показана роль ПКСи в развитии немелкоклеточного рака легкого и его прогрессии [6].

В некоторых исследованиях была выявлена роль ПКСи в развитии глиобластомы [7]. Это привело к тому, что при данном виде опухолей именно ПКСи стала наиболее перспективным объектом терапевтических воздействий. Так, применение такого препарата, как ауриотиомалат, снижающего продуктивность каскадного пути ПКСи, позволило уменьшить инвазивность опухоли и вызвать её регресс [8]. Использование специального ингибитора данной формы протеинкиназы ICA-1 приводит к значительному уменьшению объема опухоли [9].

Несмотря на очевидную перспективность потенциального использования ПКСи в качестве диагностического маркера и возможной мишени для таргетной терапии, исследований, выявляющих участие ПКСи в патогенезе большинства опухолей головного мозга, не проводилось. Между тем существует ряд опухолей, которые в силу своей сложной локализации и наличия рецидивирующего течения нуждаются в поиске дополнительных диагностических и лечебных подходов. Одной из таких опухолей является пилоидная астроцитомы (ПА). ПА является самой частой опухолью головного мозга у детей [10]. При этом нередко наблюдаются рецидивы онкологического процесса, в том числе связанные с невозможностью или повышенной трудностью в осуществлении радикального хирургического лечения вследствие сложной локализации опухоли в хиазмально-селлярной области и стволе головного мозга [11, 12].

Поэтому целью данного исследования явилось изучение роли ПКСи в канцерогенезе ПА и оценке влияния активности её экспрессии на прогноз безрецидивной выживаемости пациентов.

### **Материалы и методы исследования**

#### *Модель исследования*

Проводилось ретроспективное, слепое исследование с включением 60 образцов опухолей пациентов с диагнозом ПА (ВОЗ Grade I), получавших хирургическое лечение в ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко в 2010–2014 гг. Проводилось наблюдение пациентов в течение минимум пяти лет, выполнялись регулярные (два раза в год) контрольные магнитно-резонансные томографии головного мозга на предмет наличия рецидивов онкологического процес-

са. Были сформированы две равные группы пациентов (по 30 человек в каждой): группа с наличием рецидива (ГСР) и отсутствием рецидива (ГБР) на протяжении пяти лет. Критериями рецидива выступали появление характерной клинической картины и МР-признаки рецидива онкологического процесса в том же месте, что и локализация первичной опухоли. Время до появления рецидива рассчитывалось как период времени в днях от проведенной операции по поводу первичной опухоли до возникновения признаков рецидива.

#### *Иммуногистохимическое исследование*

В ходе исследования использовались парафиновые блоки с образцами опухолей (в ГСР использовались образцы опухолей от первой операции). Из них изготавливали срезы с толщиной слоя 3 микрометра, выполняли депарафинирование срезов с использованием ксилола, после чего срезы гидратировались с помощью различных концентраций растворов этанола. Затем проводили инкубацию препаратов с кроличьими моноклональными антителами против антигена ПКСи человека (Cell Marque, «Sigma-Aldrich», США) и с антикроличьими мышиными IgG антителами против пероксидазы хрена (Cell Marque, «Sigma-Aldrich», США). Сайты связывания проявляли с помощью тетрагидрохлорида 3,3'-диаминобензидина («Ventana Medical Systems», США).

#### *Обработка результатов исследования*

Препараты изучались с помощью светового микроскопа при увеличении  $\times 200$  тремя патологами. Для выявления активности экспрессии ПКСи проводилось оценка экспрессии полуколичественным методом *histoscore* с дальнейшим усреднением результатов.

При определении *histoscore* процент клеток, имеющих слабое окрашивание, умножался на один, процент клеток с умеренной интенсивностью окрашивания умножался на два, и, наконец, процент клеток с выраженным положительным окрашиванием умножался на три, после чего результат суммировался.

#### *Статистическая обработка результатов исследования*

Статистическая обработка выполнялась с помощью программного обеспечения Statistica 10 (StatSoft, США). Для определения уровня достоверности различий в активности экспрессии ПКСи для разных групп использовался U-критерий Манна – Уитни. Для определения взаимосвязи *histoscore* ПКСи с безрецидивной выживаемостью применялся регрессионный анализ по методу Кокса. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

### **Результаты исследования и их обсуждение**

#### *Характеристика групп исследования*

Средний возраст пациентов на момент операции составлял  $12,65 \pm 2,42$  года. 60% участников были лицами мужского пола, 40% женского пола. В ГСР средний возраст пациентов составил  $9,76 \pm 1,68$  года, в то время как в ГБР данный показатель был на уровне  $15,54 \pm 3,16$  года. ГСР характеризовалось средним временем до развития рецидива  $775,93 \pm 108,81$  дней.

*Сравнение активности экспрессии ПКСi в ГСР и ГБР*

В рамках исследования было выявлено, что уровень экспрессии *histoscore* ПКСi в ГСР составил  $137,89 \pm 2,01\%$ , в то время как в ГБР данный показатель был ниже и составил  $119,54 \pm 2,46\%$  (рис. 1). Выявленные различия носили статистически достоверный характер ( $p = 0,000002$ ;  $z = 4,72$ ).

*Взаимосвязь активности экспрессии ПКСi с временем возникновения рецидива*

Кроме того, в нашем исследовании мы оценили взаимосвязь активности экспрессии ПКСi с временем до возникновения рецидива и степень вклада данного показателя в риск возникновения рецидива. Для решения этой задачи мы провели регрессионный анализ Кокса, в результате было выявлено, что *histoscore* ПКСi значимо влиял на прогноз пациентов, причём повышение его значений на 1% приводило к увеличению возникновения риска рецидива ПА на 5,57% ( $p = 0,00003$ ;  $\exp\beta = 1,0557$ ) (рис. 2).

Безусловно, с точки зрения выживаемости ПА не представляются такой же острой стоящей проблемой, как злокачественные опухоли глиального и неглиального происхождения. Однако в аспекте лечебных подходов ПА все равно являют собой достаточно важную проблему, поскольку их локализация, не позволяющая зачастую провести радикальное удаление опухоли,

и вытекающий из этого повышенный риск развития рецидивов приводят к необходимости поиска более тонких методов терапии, способных высокоэффективно подавлять рост опухолевой ткани и индуцировать состояние ремиссии. Вопросы подобного рода в современной онкологии все чаще находят свое решение благодаря поиску важнейших драйверных молекулярных изменений в опухолевых клетках, становящихся мишенью для разработки средств таргетной терапии. Иногда этот процесс относительно прост – достаточно выявить наиболее распространенную среди данного вида опухолей молекулярно-генетическую модификацию, после чего направленный на нейтрализацию эффектов этой модификации терапевтический агент успешно подавляет рост и развитие опухолевых клеток, выводя пациента в клиническую ремиссию. К сожалению, далеко не все опухоли оказались чувствительны к такому подходу.

ПА в этом аспекте выглядят очень перспективно: есть доминирующее мутационное событие – слияние генов *KIAA1549-BRAF* – приводящее к гиперактивации белка BRAF и запуску сигнального каскада RAS/MAPK, играющего драйверную роль в реализации пролиферативных эффектов опухоли [13]. Тем не менее, несмотря на многообещающие предпосылки, ингибиторы BRAF не смогли показать своей эффективности в лечении ПА [14].

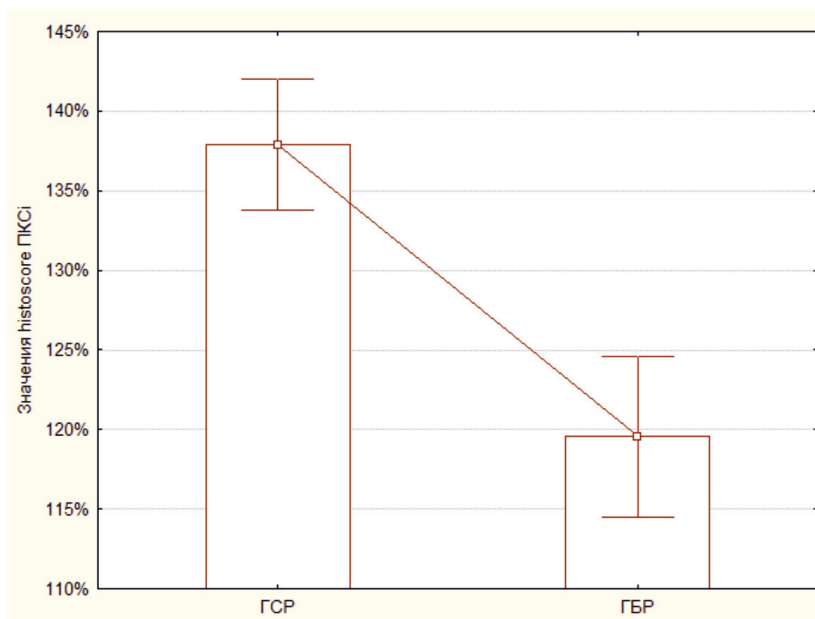


Рис. 1. Значения *histoscore* ПКСi в ГСР и ГБР. По оси ординат приведены средние групповые значения *histoscore* ПКСi в процентах. Данный показатель был статистически достоверно выше в ГСР, нежели в ГБР ( $p = 0,000002$ ;  $z = 4,72$ )

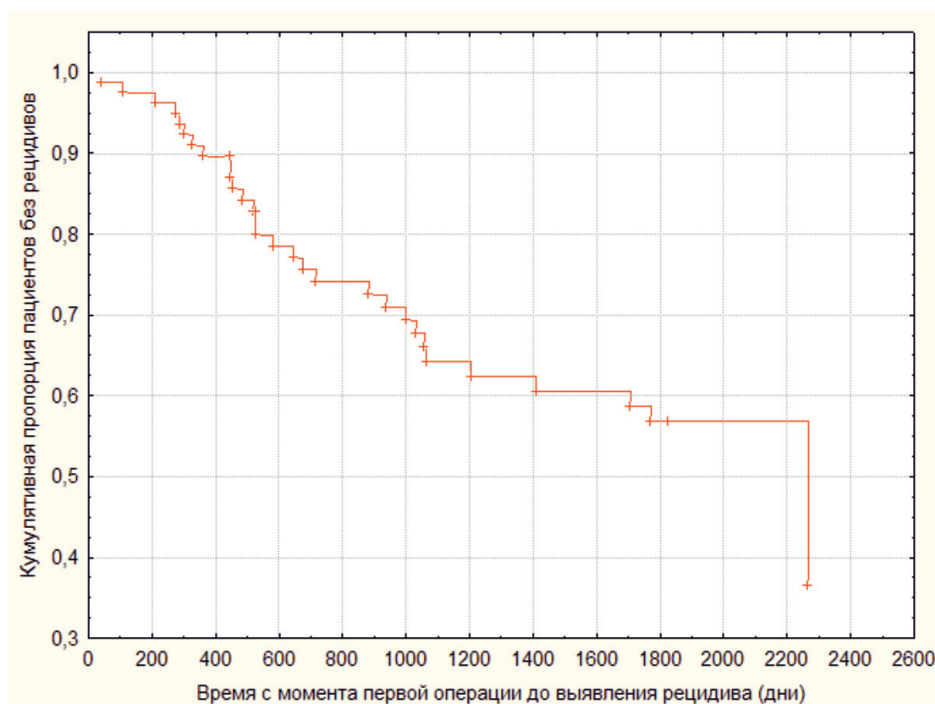


Рис. 2. Кумулятивная пропорция пациентов без наличия рецидивов (по оси ординат) в зависимости от времени до возникновения рецидива (по оси абсцисс)

Чем могут быть объяснены такие результаты? Существует вероятность, что одной из причин выступает сложность организации всей системы сигнальных каскадов внутри клеток, в том числе молекулярных путей, обеспечивающих ростовые и пролиферативные процессы в норме и патологии. Одним из важнейших звеньев, на котором конвергируют различные сигнальные пути и которое также может активировать элементы различных каскадов, являются эффекторные механизмы. Очевидно, что в данном случае подобные эффекторные механизмы в ключевых патогенетических точках должны обладать достаточно специфическими свойствами. АИПКС идеально подходят на эту роль. Их биохимические особенности – более низкий в сравнении с другими протеинкиназами порог активации и возможность длительного самоподдержания активности – дают им возможность реализовывать сложные молекулярные программы, лежащие в основе прогрессирования опухолевых заболеваний.

Руководствуясь этими предположениями, ранее мы уже продемонстрировали возможность применения одного из представителей АИПКС – ПК М $\zeta$  – в патогенезе ПА [15]. В нынешнем исследовании мы продолжили развивать данную тематику и выявили роль другого представителя

АИПКС – ПКС $i$  – не только в фундаментальном плане, ведь мы впервые охарактеризовали экспрессию рассматриваемого маркера в ПА, но и в клиническом: ПКС $i$  оказалась взаимосвязана с прогнозом.

### Заключение

В данном исследовании нам удалось выявить более высокую активность экспрессии ПКС $i$  у пациентов с наличием рецидива опухолевого процесса в течение пяти лет после первичной операции по сравнению с безрецидивными больными. Более того, уровень экспрессии ПКС $i$  оказался статистически достоверно связан с прогнозом заболевания в отношении рецидивирования. Таким образом, ПКС $i$  может быть не только многообещающей мишенью для разработки средств таргетной терапии, но и существенно расширить диагностический пул, используемый в клинической практике, в качестве эффективного инструмента оценки риска возникновения рецидива.

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

### Список литературы

1. Qian Y., Yao W., Yang T., Yang Y., Liu Y., Shen Q., Zhang J., Qi W., Wang J. aPKC- $\nu$ /P-Sp1/Snail signaling induces

- epithelial-mesenchymal transition and immunosuppression in cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2017. V. 66 (4). P. 1165–1182.
2. Ni S., Chen L., Li M., Zhao W., Shan X., Wu M., Cheng J., Liang L., Wang Y., Jiang W., Zhang J., Ni R. PKC  $\iota$  promotes cellular proliferation by accelerated G1/S transition via interaction with CDK7 in esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2016. V. 37(10). P. 13799–13809.
  3. Jatoi A., Radecki Breitkopf C., Foster N.R., Block M.S., Grudem M., Wahner Hendrickson A., Carlson R.E., Barrette B., Karlin N., Fields A.P. A mixed-methods feasibility trial of protein kinase C  $\iota$  inhibition with auranofin in asymptomatic ovarian cancer patients. *Oncology*. 2015. V. 88(4). P. 208–213.
  4. Kashiwara H., Shimada M., Kurita N., Iwata T., Sato H., Yoshikawa K., Miyatani T., Takasu C., Matsumoto N. Protein kinase C  $\iota$  is a new prognostic factor in gastric cancer. *Surg Today*. 2015. V. 45(6). P. 759–764.
  5. Rosse C., Lodillinsky C., Fuhrmann L., Nourieh M., Monteiro P., Irondele M., Lagoutte E., Vacher S., Waharte F., Paul-Gilloteaux P. et al. Control of MT1-MMP transport by atypical PKC during breast-cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111(18). P. E1872-E1879.
  6. Luo Q., Tang L., Lin H., Huang J., Zhang T., Liu Y., Wang J., Zhan P., Yin X., Su X. et al. The oncogenic role of PKC $\iota$  gene amplification and overexpression in Chinese non-small cell lung cancer. *Lung. Cancer*. 2014. V. 84(2). P. 190–195.
  7. Baldwin R.M., Barrett G.M., Parolin D.A., Gillies J.K., Paget J.A., Lavictoire S.J., Gray D.A., Lorimer I.A. Coordination of glioblastoma cell motility by PKC $\iota$ . *Mol Cancer*. 2010; 9:233.
  8. Phillips E., Lang V., Bohlen J., Bethke F., Puccio L., Tichy D., Herold-Mende C., Hielscher T., Lichter P., Goidts V. Targeting atypical protein kinase C  $\iota$  reduces viability in glioblastoma stem-like cells via a notch signaling mechanism. *Int. J. Cancer*. 2016. V. 139(8). P. 1776–1787.
  9. McCray A.N., Desai S., Acevedo-Duncan M. The interruption of PKC- $\iota$  signaling and TRAIL combination therapy against glioblastoma cells. *Neurochem Res*. 2014. V. 39(9) P. 1691–1701.
  10. 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.
  11. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H., Westler 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.
  12. Matyja E., Grajkowska W., Stępień K., Naganska E. Heterogeneity of histopathological presentation of pilocytic astrocytoma – diagnostic pitfalls. A review. *Folia Neuropathol*. 2016. V. 54(3). P. 197–211. DOI: 10.5114/fn.2016.62530.
  13. Forshew T., Tatevossian R.G., Lawson A.R., Ma J., Neale G., Ogunkolade B.W., Jones T.A., Aarum J., Dalton J., Bailey S., Chaplin T., Carter R.L., Gajjar A., Broniscer A., Young B.D., Ellison D.W., Sheer D. Activation of the ERK/MAPK pathway: a signature genetic defect in posterior fossa pilocytic astrocytomas. *J. Pathol*. 2009. V. 218(2). P. 172–181. DOI: 10.1002/path.2558.
  14. Sievert A.J., Lang S.S., Boucher K.L., Madsen P.J., Slaunwhite E., Choudhari N., Kellet M., Storm P.B., Resnick A.C. Paradoxical activation and RAF inhibitor resistance of BRAF protein kinase fusions characterizing pediatric astrocytomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110(15). P. 5957–5962. DOI: 10.1073/pnas.1219232110.
  15. Никитин П.В., Рыжова М.В., Зубова И.В., Шугай С.В. Экспрессия протенинкиназы М $\zeta$  в диффузных и отграниченных глиальных опухолях // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2019. № 2. С. 43–47.