

УДК: 591.8

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.3.216

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКА NPM1 ПРИ ТУБУЛЯРНОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КОШЕК

Митенко В.В.* – канд. биол. наук, асс. каф. паразитологии и ветсанэкспертизы, анатомии и патанатомии им. профессора С.Н. Никольского (ORCID 0000-0003-1594-8630); **Дилекова О.В.** – д-р биол. наук, зав. каф. паразитологии и ветсанэкспертизы, анатомии и патанатомии им. профессора С.Н. Никольского (ORCID 0000-0003-0247-8633).

ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»

*mitenko.vas@yandex.ru

Ключевые слова: кошка, молочная железа, опухоль, тубулярная карцинома, иммуногистохимия (ИГХ), нуклеофозмин (NPM1).

Keywords: cat, mammary gland, tumor, tubular carcinoma, immunohistochemistry (IHC), nucleophosmin (NPM1).

Поступила: 18.07.2024

Принята к публикации: 20.09.2024

Опубликована онлайн: 01.10.2024

РЕФЕРАТ



Канцерогенез опухолей молочных желез кошек отличается своей однородностью в отношении клеточных структур, за счет этого можно хорошо проанализировать влияние отдельных сигнатурных паттернов на механизм возникновения рака. Для этого необходимо определить функциональное состояние отдельных белков, которые начинают экспрессировать как внутри, так и на поверхности ядерной структуры. Некоторые мультифункциональные белки в области ядрышковых организаторов формируют активность ядра, что тесно связано с регуляцией клеточного цикла. Белок нуклеофозмин является важнейшим клеточным белком, который участвует в ряде путей, включая транспорт мРНК, ремоделирование хроматина, апоптоз и стабильность генома. Он слабо экспрессируется покоящимися клетками, но его гиперэкспрессия приводит клетку к стимуляции деления и увеличению метастатического потенциала. Поэтому целью нашего исследования являлось изучение экспрессии белка нуклеофозмина (NPM1) при разных гистологических градациях тубулярной карциномы в молочных железах у кошек (n=13). В обзоре представлены результаты гистологического строения тубулярной карциномы от высокодифференцированного до низкодифференцированного типа. При изучении материала было выявлено, что в 5 образцах опухолей G3 в лимфатических сосудах, которые располагались трансгранично, регистрировали опухолевые эмболы, также в одном образце лимфатического узла был зарегистрирован макрометастаз, занимающий около 70 % паренхимы коркового вещества. При выполнении иммуногистохимического исследования (ИГХ) определили, что иммунопозитивные участки отмечали в ядрышковой локализации, при этом регистрировали оценку окрашивания, которая соответствовала умеренной (++) для

высокодифференцированных опухолей и сильной (+++) для низкодифференцированных. Таким образом, при гиперэкспрессии данного маркера происходила дезорганизация хроматина в ядрышке с увеличением субкомпарментов в ядре, что в последующем приводило к увеличению метастатического потенциала характерного для опухолей G3.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Опухоли молочных желёз у кошек характеризуются меньшей гетерогенностью и преобладанием простых злокачественных новообразований. Это является одной из основных причин смертности, особенно среди самок среднего и пожилого возраста [2,8].

Гистологические исследования показали, что наиболее распространёнными опухолями молочной железы у кошек являются карциномы, развивающиеся из эпителия протоков и альвеол. Менее часто встречаются опухоли со смешанным происхождением [3,7,12].

Гистологические паттерны карцином молочной железы у кошек разнообразны и могут сочетаться в одной опухоли. Большинство исследований не обнаружили связи между гистологическим типом и прогнозом, однако в некоторых случаях специфическая гистология может указывать на более или менее агрессивное поведение [1,4].

Особенность тубулярной карциномы заключается в преобладании открытых канальцев, состоящих из одного слоя эпителиальных клеток, окружающих просвет. Их доля в большинстве случаев превышает 90% от общей массы опухоли. Канальцы обычно имеют смешанную форму овальных, округлых и угловатых структур и располагаются хаотично. Люминальный эпителий может иметь различные параметры в размерах, а также наблюдаются митотические фигуры. Миоэпителиальные клетки отсутствуют вокруг канальцев, хотя у некоторых из них может отсутствовать прилегающий слой базальной мембраны. Вторичным, но важным признаком является клеточная десмопластическая строма, обычно связанная с канальцевыми структурами [10, 5].

Кроме описания гистологического строения опухолей молочных желёз у

кошек в последнее время применяют молекулярную диагностику. Анализируя отечественные и зарубежные источники данные по оценке экспрессии генов, в частности ядрышковых организаторов мало изучены [11].

Нуклеофозмин (NPM1) — это преимущественно ядрышковый белок, который играет важную роль в клеточном росте и гомеостазе, контролируя биогенез рибосом и реакцию на стресс. Его многофункциональность определяется способностью взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами и множеством других белков, что напрямую связано с процессом созревания рибосом в ядре и последующим переносом их субъединиц в цитоплазму [6].

Целью данной работы являлось исследование агрессивных паттернов тубулярной карциномы в опухолях молочных желёз у кошек и определение морфофункциональной активности NPM1 в ядрышках злокачественных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследование проводилось с 2022-2024 гг. в г. Ставрополе на базе Научно-диагностического и лечебно-ветеринарного центра и кафедре паразитологии и ветсанэкспертизы, анатомии и патанатомии им. профессора С.Н. Никольского ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет».

В качестве материала для этого исследования использовались отобранные образцы биопсии опухолей молочных желёз у кошек ($n = 13$), полученные путём унилатеральной или билатеральной мастэктомии не позднее чем за 20 минут до фиксации. Для анализа были выбраны фрагменты изменённых участков молочных желёз размером 1 см³ с захватом здоровой ткани и кожи. Образцы фиксировались в течение 48 часов в 10%-забуференном растворе формалина

(БиоВитрум, Россия).

После проведения фиксации образцы были обработаны спиртами с возрастающей концентрацией (50, 60, 70, 80 и 96 градусов) и ксилолом, после чего их поместили в гистологическую среду «Гистомикс Экстра» (БиоВитрум, Россия). Для этого использовали гистологический процессор Tissue-Tek VIP™ 5 Jr закрытого типа и станцию Tissue-Tek® TEC™ 5 для парафиновой заливки (Sakura, Япония).

Из полученных блоков с помощью ротационного микротомы Accu-Cut® SRM™ 200 (Япония) и стола для подготовки гистологических срезов Bio-Optica (Италия) были изготовлены срезы толщиной 3–4 микрометра. Их окрасили красителями гематоксилином и эозином (БиоВитрум, Россия) на автоматическом мультистейнере Prisma™ (Sakura, Япония).

Для проведения иммуногистологического исследования изготавливались парафиновые срезы образцов опухолевой ткани молочных желёз толщиной 3–4 мкм, которые монтировались на стёкла, обработанные поли-L-лизин (Menzel, Австралия).

Далее применяли антитела NPM1 кроличьи моноклональные Anti-Nucleophosmin antibody (SP236) 1:25 – 1:50 (Abcam plc, Великобритания). Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали в течение 20 мин в 3% растворе перекиси водорода. Постановку ИГХ реакций проводили с помощью пероксидазы-полимерной системы визуализации по стандартному протоколу фирмы-производителя (Dako, США). Антитела демаскировали кипячением срезов при 100 °C в цитратном буфере (pH=6,0) в течение 10 мин. На заключительном этапе реакции срезы докрашивали гематоксилином Майера. Негативным контролем служили реакции с заменой первых антител раствором для разведения (SpringBioScience, США).

Гистологические препараты исследовали с использованием микроскопа Olympus BX53 со встроенным фотоаппаратом

С 300 (Япония). С каждого препарата делали по 10 цифровых снимков при увеличении $\times 200$, $\times 400$, $\times 600$, $\times 800$.

Интенсивность экспрессии иммунореактивного материала оценивали визуально, принимая во внимание процент активных клеток и общую площадь иммунопозитивных структур согласно рекомендациям Американского общества клинической онкологии и Колледжа американских патологов (ASCO/CAP) от 2013 года. С каждого препарата выполняли по 10 цифровых снимков в иммунопозитивных участках при увеличении $\times 400$, $\times 1000$.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В ходе исследования были отобраны образцы кошек (n=13) с диагнозом трубчатая карцинома молочных желёз. Средний возраст таких животных составлял 12,6 лет. Среди них присутствовали породы: британская короткошёрстная (n=3), персидская (n=2), бенгальская (n=1), сфинкс (n=1). Среди всех животных 30,7 % составляли стерилизованные самки.

Количественный показатель гистологической оценки степени злокачественности опухолей составлял: высокодифференцированный тип (G1) – 1, умереннодифференцированный тип (G2) – 4 и низкодифференцированный тип (G3) – 8.

Высокодифференцированный тип данной опухоли был представлен слегка атипичными эпителиальными клетками, формирующими множественные структуры в виде трубочек, которые занимали более 50 % всей опухолевой ткани. В ядрах отмечалось одно ядрышко, вокруг которого регистрировали мелкие песчинки хроматина.

При иммуногистохимическом исследовании было обнаружено, что образец ткани с типом G1 формировал иммунопозитивные участки, представленные 10 % от общей площади среза. Оценка окрашивания раковых клеток составляла как умеренная (++) . Паттерн экспрессии NPM1 регистрировали в ядрышковом аппарате в виде умеренного окрашивания светлокоричневого цвета в количестве 1-ой структуры.

Умеренно-дифференцированный тип характеризовался другой патологической картиной, в нем отмечали уже мало сформированных тубулярных строений. Эпителиальные клетки формировали выраженный плеоморфизм, ядра были гипохромными, присутствовало 1-2 ядрышка.

В ходе иммуногистологического исследования образцов ткани с типом G2 было выявлено, что иммунопозитивные участки формировали более 40 % от общей площади среза. В атипичных клетках регистрировали сильное окрашивание (+++). Паттерн экспрессии NPM1 отмечали в ядрышковом аппарате в виде интенсивного гомогенного окрашивания темно-коричневого цвета, в данных клетках отчетливо просматривался анизонуклеоз. Количество видоизмененных позитивных ядрышек насчитывали от 1-го до 3-х.

При низкодифференцированном типе отмечали единичные тубулярные цепочки, эпителиальные клетки формировали высокий атипический потенциал, при этом хроматин распределялся неравно по структуре ядра в виде грубых частиц. Наблюдалось множественное количество митозов с атипичными признаками (n=20), а также на некоторых участках отмечали клетки с двумя ядрами и обильной цитоплазмой (n=5). Формировались

большие участки некрозов в центре самой опухолевой ткани. В пяти образцах в лимфатических сосудах регистрировали опухолевые эмболы, состоящие из 5-10 клеток, которые четко формировали эпителиальный каркас, напоминающий тубулярную структуру. В одном образце ткани лимфатического узла был обнаружен макрометастаз, опухолевые клетки занимали около 70 % паренхимы коркового вещества.

Иммуногистологическое исследование 8 образцов ткани с типом G3 показало, что иммунопозитивные участки занимали более 70 % площади среза. Экспрессия NPM1 в раковых клетках оценивалась как сильное окрашивание (+++). Паттерн экспрессии белка в клетках наблюдался в ядрышковом организаторе, при этом отчетливо просматривался анизонуклеоз с формированием макроядрышка. Окрашивание внутриядерного субкомпартамента визуализировали в виде плотного, гомогенного темно-коричневого цвета, в некоторых клетках вокруг макроядрышка были отмечены мелкие хаотично разрозненные светло-коричневые частицы. Количественный показатель ядрышек насчитывали от 1-го до 5-ти структур. При исследовании образца лимфатического узла с метастазом выявили, что иммунопозитив-

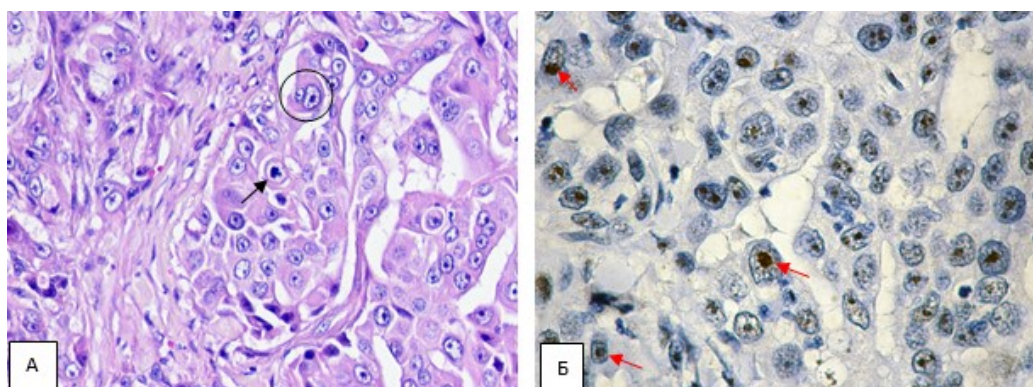


Рисунок 1 – А. Тубулярная карцинома (G3), атипичная форма митоза (↑), двухъядерная клетка (○), (абиссинская кошка, 12 лет).

Окраска гематоксилином и эозином, ув. ×400.

Б. NPM1 + маркер, макроядрышки (↑) в ядрах опухолевых клеток. Тубулярная карцинома (G3) (персидская кошка, 9 лет). ИГХ реакция на NPM1.

Продукт реакции коричневого цвета. Ув. ×600.

ные участки занимали около 60 % поврежденной ткани. Паттерн экспрессии маркера NPM1 отмечали в ядрышках, при этом гиперэкспрессия была выражена в клетках с анизонуклеозом.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Таким образом, полученные данные по изучению нуклеолярного маркера NPM1 показали, что происходил рост ядрышек и их гиперэкспрессия в опухолях, имеющих низкую дифференцировку и инвазию в лимфатические сосуды по сравнению с локализованными новообразованиями. Чем больше опухолевая клетка содержала нуклеолонемных ядрышек, в которых находился белок нуклеофозмин, тем выше проявлялась злокачественность рака. При метастазировании опухолевых клеток данный белок способствовал к приобретению ими более выраженных злокачественных свойств. Поэтому дальнейшее изучение морфофункциональной активности ядрышек и экспрессии маркера нуклеофозмина в опухолевых клетках поможет определить вероятность развития метастазов и спрогнозировать течение рака молочных желёз.

MORPHOFUNCTIONAL ACTIVITY OF NPM1 PROTEIN IN TUBULAR-BREAST CANCER IN CATS

Mitenko V.V.* – Candidate of Biological Sciences, ass. of the Department of Parasitology and Veterinary Medicine, Anatomy and Pathanatomy named after Professor S.N. Nikolsky (ORCID 0000-0003-1594-8630)

Dilekova O.V. – Doctor of Biological Sciences, Head of the Department of Parasitology and Veterinary Medicine, Anatomy and Pathanatomy named after Professor S.N. Nikolsky (ORCID 0000-0003-0247-8633).

Stavropol State Agricultural University

*mitenko.vas@yandex.ru

ABSTRACT

The carcinogenesis of mammary gland tumors in cats is characterized by its uniformity with respect to cellular structures, due to this, it is possible to analyze the effect of individual signature patterns on the mech-

anism of cancer occurrence well. To do this, it is necessary to determine the functional state of individual proteins that begin to express both inside and on the surface of the nuclear structure. Some multifunctional proteins in the region of nucleolar organizers form the activity of the nucleus, which is closely related to the regulation of the cell cycle. The nucleophosmin protein is an essential cellular protein that is involved in a number of pathways, including mRNA transport, chromatin remodeling, apoptosis, and genome stability. It is poorly expressed by resting cells, but its overexpression leads the cell to stimulate division and increase metastatic potential. Therefore, the aim of our study was to study the expression of the nucleophosmin protein (NPM1) at different histological gradations of tubular carcinoma in mammary glands in cats (n=13). The review presents the results of the histological structure of tubular carcinoma from the highly differentiated to the low-differentiated type. When studying the material, it was revealed that tumor emboli were recorded in 5 samples of G3 tumors in lymphatic vessels that were located cross-border, and macro-metastasis, occupying about 70% of the parenchyma of the cortical substance, was also recorded in one sample of the lymph node. When performing an immunohistochemical study (IHC), it was determined that immunopositive sites were noted in the nucleolar localization, while a staining score was recorded, which corresponded to moderate (++) for highly differentiated tumors and strong (+++) for low-grade ones. Thus, when this marker was overexpressed, chromatin disorganization occurred in the nucleolus with an increase in subcomputments in the nucleus, which subsequently led to an increase in the metastatic potential characteristic of G3 tumors.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Cancer driver genes IDH1/2, JARID1C/KDM5C and UTX/KDM6A: crosstalk between histone demethylation and hypoxic reprogramming in cancer metabolism / Chang S., Yim S., Park H. // Exp Mol Med. 2019. – T. 51. – №6. – С. 1-17.

2. Extensive analysis of tumor array confirms overwhelming role of nucleophosmin in breast cancer / Karhemo Piia-Riitta, Rivinoja Antti, Lundin Johan, Joensuu Heikki Bono, Petri, Laakkonen // Regular article oncogenesis and tumor progression. – 2011. – Т. 179. – № 2. – С. 1004-1014.
3. Histone deacetylase inhibitor eliminates multidrug resistance by reducing nucleophosmin levels via the PI3K/Akt pathway in breast cancer / Chen Xi, Zheng Hu, Cai J.H., Zhang WP, Yu HS, Xing J.F., Dong Y.L. // Int J Oncol. 2016. – Т. 49. – №1. – С. 294-304.
4. Invasive micropapillary breast carcinoma in cats: clinical and pathological features and nuclear DNA content / Seixas F., Palmeira S., Pires M.A., Lopez S. // Veterinary pathology. – 2007. – Т. 44. – №6. – С. 842-848.
5. Limaïem F, Mlika M. Tubular Breast Carcinoma. 2023 Jan 1. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 31194380.
6. Nucleophosmin, a multifunctional nucleolar organizer with a role in DNA repair / David J. López, José A. Rodríguez, Sonia Bañuelos // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 2020. – Т.1868. – №12. – с. 21-32.
7. Nucleophosmin: from structure and function to disease development / Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O'Byrne KJ, Richard DJ. // BMC Mol Biol. 2016. – Т.17.– № 1. – С. 19-34.
8. Proposed Classification of the Feline “Complex” Mammary Tumors as Ductal and Intraductal Papillary Mammary Tumors / Zappulli V, Calìari D, Rasotto R, Ferro S, Castagnaro M, Goldschmidt M. // Veterinary Pathology. – 2013. –Т. 50. – №6. – С.1070-1077.
9. The contribution of overexpression of nucleophosmin to multidrug resistance in breast cancer / Chen S., Meng T., Zheng X, Cai J., Zhang V, Yu Ch, Xing J., Dong Yu. // J is a drug target. 2018. – Т. 26. – № 1. – С. 27-35.
10. Аргирофильные белки областей ядрышковых организаторов – маркеры скорости клеточной пролиферации: Обзор / Айхлин Н.Т., Букаева И.А., Пробатова Н.А. // Арх. Патол. – 2006. – Т.68. – № 3. – С. 47–51.
11. Нуклеофозмин и нуклеолин: кодирующие гены и экспрессия в различных тканях животных и человека / Зенит-Журавлева Е.Г., Полковниченко Е.М., Лушников А.А., Трещалина Е.М., Букаева И.А., Райхлин Н.Т. // Молекулярная медицина – 2012. – №4. – С. 19-25.
12. Опухоли молочной железы кошек и собак: морфологические особенности / Е.П. Шапиро, Н.А. Краснослободцев, Н.С. Кухаренко [и др.] // Актуальные вопросы и инновационные технологии в ветеринарной медицине, животноводстве и природоохранном комплексе: матер. междунар. науч.-практич. конф., посвящ. 40-летию юбилею со дня образования ветеринарного факультета. Уссурийск, – 2019. – С. 138–144.

REFERENCES

1. Cancer driver genes IDH1/2, JARID1C/KDM5C and UTX/KDM6A: crosstalk between histone demethylation and hypoxic reprogramming in cancer metabolism / Chang S., Yim S., Park H. // Exp Mol Med. 2019. – Т. 51. – №6. – С. 1-17.
2. Extensive analysis of tumor array confirms overwhelming role of nucleophosmin in breast cancer / Karhemo Piia-Riitta, Rivinoja Antti, Lundin Johan, Joensuu Heikki Bono, Petri, Laakkonen // Regular article oncogenesis and tumor progression. – 2011. – Т. 179. – № 2. – С. 1004-1014.
3. Histone deacetylase inhibitor eliminates multidrug resistance by reducing nucleophosmin levels via the PI3K/Akt pathway in breast cancer / Chen Xi, Zheng Hu, Cai J.H., Zhang WP, Yu HS, Xing J.F., Dong Y.L. // Int J Oncol. 2016. – Т. 49. – №1. – С. 294-304.
4. Invasive micropapillary breast carcinoma in cats: clinical and pathological features and nuclear DNA content / Seixas F., Palmeira S., Pires M.A., Lopez S. // Veterinary pathology. – 2007. – Т. 44. – №6. – С. 842-848.
5. Limaïem F, Mlika M. Tubular Breast Carcinoma. 2023 Jan 1. In: StatPearls [Internet].

- Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 31194380.
6. Nucleophosmin, a multifunctional nucleolar organizer with a role in DNA repair / David J. López, José A. Rodríguez, Sonia Bañuelos // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2020. – T.1868. – №12. – с. 21-32.
7. Nucleophosmin: from structure and function to disease development / Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O'Byrne KJ, Richard DJ. // *BMC Mol Biol*. 2016. – T.17. – № 1. – C. 19-34.
8. Proposed Classification of the Feline “Complex” Mammary Tumors as Ductal and Intraductal Papillary Mammary Tumors / Zappulli V, Caliri D, Rasotto R, Ferro S, Castagnaro M, Goldschmidt M. // *Veterinary Pathology*. – 2013. –T. 50. – №6. – S.1070-1077.
9. The contribution of overexpression of nucleophosmin to multidrug resistance in breast cancer / Chen S., Meng T., Zheng X, Cai J., Zhang V, Yu Ch, Xing J., Dong Yu. // *J is a drug target*. 2018. – T. 26. – № 1. – C. 27-35.
10. Argyrophilic proteins of the regions of nucleolar organizers – markers of the rate of cell proliferation: A review / Aikhlin N.T., Bukaeva I.A., Probatova N.A. // *Arch. Pathol.* – 2006. – Vol.68. – No. 3. – pp. 47-51. (In Russ.)
11. Nucleophosmin and nucleolin: coding genes and expression in various tissues of animals and humans / Zenit-Zhuravleva E.G., Polkovnichenko E.M., Lushnikova A.A., Treshchalina E.M., Bukaeva I.A., Raikhlin N.T.. // *Molecular medicine* – 2012. – No. 4. – pp. 19-25. (In Russ.)
12. Mammary gland tumors of cats and dogs: morphological features / E.P. Shapiro, N.A. Krasnoslobodtsev, N.S. Kukharenko [et al.] // *Topical issues and innovative technologies in veterinary medicine, animal husbandry and nature conservation complex: mater. international scientific and practical conference, dedicated. the 40th anniversary of the establishment of the veterinary Faculty. Ussuriysk, -2019.* – pp. 138-144. (In Russ.)