Экспрессия мРНК кальпаинов и их активность в злокачественном и дисплазически измененном эпителии верхних дыхательных путей
Сиденко Е.А., Какурина Г.В., Черемисина О.В., Спирина Л.В., Шашова Е.Е., Коршунов Д.А., Кондакова И.В.
Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Кальпаиновая протеолитическая система играет важную роль в развитии злокачественных опухолей. В настоящее время диагностика рака верхних дыхательных путей на ранних стадиях проводится редко, заболевание часто характеризуется запущенностью опухолевого процесса.

С целью поиска кандидатных маркеров перехода предопухолевых заболеваний в злокачественные изучали уровень экспрессии мРНК CAPN1, CAPN2 и общей активности кальпаинов в опухолевой ткани пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи (ПРГШ) и в дисплазически измененном эпителии верхних дыхательных путей.

Материалы и методы. В исследование были включены 32 пациента с ПРГШ (T1-3N0-1M0), группу больных с предопухолевой патологией составили 12 пациентов с хроническими заболеваниями верхних отделов дыхательной системы, ассоциированными с дисплазическими изменениями эпителия различной степени. Уровень экспрессии мРНК CAPN1 и CAPN2 оценивался с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Активность кальпаинов определяли по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC.

Результаты. Показано увеличение уровня экспрессии мРНК CAPN1 и CAPN2 (в 3 и 4 раза соответственно) в опухолевой ткани у пациентов с ПРГШ в сравнении с дисплазически измененным эпителием верхних дыхательных путей. Также отмечен высокий уровень активности кальпаинов у больных ПРГШ, который в 4,4 раза превышал показатели, полученные для пациентов с дисплазическими изменениями эпителия различной степени.

Заключение. Вероятно, увеличение уровня мРНК CAPN1 и CAPN2 и общей активности кальпаинов в опухолевых тканях пациентов с ПРГШ в сравнении с пациентами с хроническими заболеваниями, ассоциированными с дисплазическими изменениями различной степени, может играть важную роль в процессе перехода предрака в рак. Для полного установления роли кальпаинов в канцерогенезе ПРГШ необходимо дальнейшее проведение подобных исследований в интактной ткани, что возможно только на экспериментальных моделях.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак головы и шеи, дисплазия эпителия, активность кальпаинов, экспрессия мРНК CAPN1 и CAPN2.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания на 2020 г. в НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено локальным комитетом по биомедицинской этике НИИ онкологии, Томский НИМЦ.
The mRNA expression levels of calpains and their activity in malignant and dysplastic epithelium of the upper respiratory tract

Sidenko E.A., Kakurina G.V., Cheremisina O.V., Spirina L.V., Shashova E.E., Korshunov D.A., Kondakova I.V.

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC) Russian Academy of Sciences 5, Kooperativny Str., 634050, Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

Background. The calpain proteolytic system plays an important role in the development of cancer. Detection of early cancer in the upper respiratory tract is often challenging, as symptoms are largely non-specific, and most cases are diagnosed at an advanced stage.

Aim. To identify candidate markers of transition from premalignant lesions to invasive carcinoma, we studied mRNA expression levels of CAPN1 and CAPN2 and the total activity of calpains in the tumor tissues of patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and in the epithelial dysplasia-affected tissues of patients with chronic diseases of the upper respiratory tract.

Materials and methods. The study included 32 patients with HNSCC (T1-3N0-1M0) and 12 patients with chronic diseases of the upper respiratory system associated with epithelial dysplasia. The expression levels of CAPN1 and CAPN2 were assessed using real-time polymerase chain reaction (PCR). The calpain activity was determined by hydrolysis of the fluorogenic Suc-LLVY-AMC oligopeptide.

Results. The mRNA expression levels of CAPN1 and CAPN2 were respectively 3 and 4 times higher in the tumor tissue of patients with HNSCC than in the tissue of patients with endothelial dysplasia in the upper respiratory tract. The level of calpain activity was 4.4 times higher in patients with HNSCC than in patients with epithelial dysplasia of different severity.

Conclusion. The elevated mRNA expression levels of CAPN1 and CAPN2 and their activity in the tumor tissues of patients with HNSCC compared to patients with chronic respiratory diseases associated with epithelial dysplasia are likely to characterize a high potential for transition from precancerous lesion to cancer. To clarify the role of calpains in the carcinogenesis of HNSCC, further studies of intact tissues using animal models are required.

Key words: head and neck squamous cell carcinoma, epithelial dysplasia, calpain activity, mRNA expression of CAPN1 and CAPN2.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out within the State Assignment for Cancer Research Institute, TNRMC RAS for 2020.

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the local Biomedical Ethics Committee at Cancer Research Institute, Tomsk NRMC.

For citation: Sidenko E.A., Kakurina G.V., Cheremisina O.V., Spirina L.V., Shashova E.E., Korshunov D.A., Kondakova I.V. The mRNA expression levels of calpains and their activity in malignant and dysplastic epithelium of the upper respiratory tract. Bulletin of Siberian Medicine. 2021; 20 (2): 88–94. https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-2-88-94.
ВВЕДЕНИЕ

Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) занимает 6-е место по распространенности злокачественных новообразований во всем мире, ежегодно регистрируется более 500 тыс. новых случаев [1, 2]. Одними из основных его локализаций являются горло и гортаноглотка [3]. Несмотря на доступность визуальных и инструментальных исследований, диагностика рака верхних дыхательных путей на ранних стадиях проводится редко, заболевание часто характеризуется запущенностью опухолевого процесса [4]. Механизм опухолевой трансформации от диспластических изменений эпителия до рака остается мало изученным. Считается, что он представляет собой ступенчатый процесс, в котором за генетическими повреждениями следуют морфологические изменения в плоском эпителии [5]. Наличие диспластии в слизистой оболочке горла, гортаноглотки, ротоглотки позволяет отнести пациента в группу онкологического риска [6].

Большое влияние на опухолевую трансформацию оказывают протеолитические системы, которые способны регулировать множество молекулярных и клеточных процессов. Значимой системой специфического внутриклеточного протеолиза является кальпапиновая система, которая вовлечена в развитие и прогрессирование опухолей различных локализаций [7]. Кальпапины — это цитоплазматические цистеиновые протеазы, для активности которых требуются ионы кальция. Протеолиз, осуществляемый кальпапинами, является частичным, не деградирующим белок, а лишь изменяющим его структуру, таким образом, это протеазы-«модуляторы» [8].

В семействе кальпапинов существуют повсеместно экспрессируемые изоформы (μ-кальпапин (кальпапин 1) и μ-кальпапин (кальпапин 2)) и тканеспецифичные изоформы (кальпапин 9, обнаруженный в органах пищеварительного тракта) [9]. Хотя многие функции кальпапинов и механизмов, контролирующих протеолитическую активность, еще предстоит выяснить, экспериментальные исследования продемонстрировали четкую роль кальпапинов в ряде важных клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку, репарацию ДНК и апоптоз [10, 11]. Кальпапины играют важную роль в прогрессировании злокачественных опухолей [12–14].

Несмотря на активное изучение кальпапиновой системы, в настоящее время нет достаточного количества данных, свидетельствующих об изменениях уровня экспрессии и активности кальпапинов у пациентов с ПРГШ и хроническими заболеваниями, ассоциированными с диспластическими изменениями различной степени. Таким образом, целью данного исследования явилась оценка уровня экспрессии mРНК CAPN1 и CAPN2 и активности кальпапинов в опухолевой ткани пациентов с ПРГШ (Т1-3N0-1М0) и диспластически измененными эпителиями верхних дыхательных путей (DI-II).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 32 пациента с ПРГШ (Т1-3N0-1М0) и 12 больных с предопухолевой патологией — хроническими заболеваниями верхних отделов дыхательной системы, ассоциированными с диспластическими изменениями эпителия различной степени (DI-II), поступивших на лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ. Все пациенты были с гистологически подтвержденным диагнозом и до настоящего исследования не получали специфического лечения. Средний возраст обследованных пациентов составил (56,3 ± 7,2) лет.

Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288), получено разрешение этического комитета института.

Материалом для исследования явилась опухолевая и неизмененная, условно-нормальная ткань, полученная при видеоларингоскопии с помощью биопсии по утвержденному протоколу. Анализ экспрессии генов кальпапинов (CAPN1, CAPN2) проводился методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с интеркалирующим красителем SYBR Green I (БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×); Биолабмикс, Новосибирск). Выделение суммарного пула РНК из образцов тканей проводили с помощью реакции обратной транскрипции с использованием реакционной смеси ОТ M-MuLV-RH (Биолабмикс, Новосибирск). Праймеры для ПЦР-РВ были подобраны с использованием специализированных программ Vector NTI Advance 11,5 и базы данных NCBI (табл. 1).

Уровень экспрессии целевых генов рассчитывали по формуле 2ΔΔСt [15] и выражали в условных единицах. В качестве гена-рефери использовали ген «домашнего хозяйства» фермента GAPDH, и уровень экспрессии каждого целевого гена был нормализован по отношению к экспрессии GAPDH.
Активность кальпаинов определяли в осветленных гомогенатах тканей по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC (Sigma, США). Образовавшийся продукт регистрировали на флуориметре Hitachi-850 (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Активность кальпаинов выражали в единицах активности на 1 мг белка. Соответствие статистичности различных групп было рассчитано с помощью критерия Манна – Уитни с поправкой Бонферрони. Различия считались значимыми при р < 0,05.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Анализ уровня экспрессии мРНК CAPN1 и CAPN2 в диспластически измененном эпителии (DI-II) и опухолевой ткани (T2N0-Mx) показал наличие статистически значимых различий в представленных группах (табл. 2). Так, уровень экспрессии CAPN1 и CAPN2 в опухолевой ткани ПРГШ (T1-3N0-1М0) увеличивался почти в 3 и 4 раза, соответственно, по сравнению с дисплязией различной степени. Самый высокий показатель экспрессии как для CAPN1, так и для CAPN2 наблюдался у больных стадии T3N0-1М0. Для CAPN1 характерна тенденция к увеличению в зависимости от размера опухоли. Также можно отметить, что для CAPN2 в злокачественных эпителиях верхних дыхательных путей экспрессия наиболее выражена в сравнении с экспрессией CAPN1, что может свидетельствовать об определенной специфичности изучаемого гена.

Полученные данные демонстрируют вовлеченность компонентов кальпаиновой системы в патогенез опухолей верхних дыхательных путей. Кроме того, идет процесс деградации белка, участвующего в этих процессах, свойственных злокачественным тканям. По мнению многих авторов, это связано с процессами, свойственными злокачественным опухолям, что согласуется с данными литературы [10, 16, 17]. Это позволяет сделать вывод о преимущественном участии кальпаинов в процессах, свойственных злокачественным тканям.

**Таблица 1**

| Последовательность праймеров исследованных генов | Ген | Праймеры |
|-------------------------------------------------|-----|----------|
| CAPN1 | NM_001198868.2 | F 5′- AGAGCCTGGGTTACAAG-3′ |
|       |                 | R 5′- TGTCGGTGGATGTTGAGG-3′ |
| CAPN2 | NM_001146068.1 | F 5′- AGTCTAGATCGGAGGGGAGG-3′ |
|       |                 | R 5′- TGGAGTTGACAGGGCATCTT-3′ |
| GAPDH | NM_001256799.3 | F 5′- GGAAAGTCAGGTGGAGCGA-3′ |
|       |                 | R 5′- GCAAACATCCCTATTACAGA-3′ |

Примечание. NM – номер последовательности РНК в NCBI; F – прямой праймер; R – обратный праймер.

**Таблица 2**

| Экспрессия мРНК CAPN1 и CAPN2 в тканях пациентов в злокачественном и диспластически измененном эпителиях верхних дыхательных путей, Me (Q1–Q3) | Группа | Уровень экспрессии, усл. ед. |
|-------------------------------------------------|-----|----------|
|                                                | CAPN1 | CAPN2 |
| Дисплазия эпителия (DI-II), n = 12              | 0,5 (0,08–0,86) | 0,5 (0,06–0,95) |
| ПРГШ (T1-3N0-1М0), n = 32                       | 1,58 (0,25–10,9) p = 0,021 | 1,94 (0,25–4,12) p = 0,045 |
| T1N0,Mx, n = 10                                  | 0,59 (0,25–5,0) | 2,09 (0,51–5,68) p = 0,043 |
| T2N0,1М0, n = 11                                 | 1,0 (0,25–11,8) p = 0,041 | 0,52 (0,19–2,27) |
| T3N0,1М0, n = 11                                 | 1,92 (0,53–10,9) p = 0,021 | 2,14 (0,28–5,13) p = 0,046 |

Примечание. Уровень значимости различий показателей в сравнении с группой «Дисплазия эпителия (DI-II)» – р.

Анализ общих статистических подходов к исследованию кальпаинов в биопсийных материалах показал значимые различия между ПРГШ (T1-3N0-1М0) и дисплазией эпителия (DI-II) (рис.). На диаграмме a показано изменение активности кальпаинов в зависимости от распространенности опухолевого процесса в сравнении с диспластически измененным эпителием. У пациентов...
со стадией T3N0-1M0 наблюдался самый высокий показатель активности кальпаинов. Также на этой диаграмме прослеживалась тенденция к увеличению активности кальпаинов в зависимости от размера опухоли. Диаграмма b отражает общий показатель активности кальпаинов у пациентов с ПРГШ, который составлял 125,7 × 10³ Ед/мг белка, что в 4,4 раза больше в сравнении с пациентами с диспластическими изменениями эпителия. Диаграмма a отражает общий показатель активности кальпаинов у пациентов с ПРГШ, который составлял 125,7 × 10³ Ед/мг белка, что в 4,4 раза больше в сравнении с пациентами с диспластическими изменениями эпителия.

Полученные результаты согласуются с литературными данными. В исследованиях В.Д. Коваль и соавт. выявлено, что активность кальпаинов у пациентов с гиперплазическими процессами эндометрия почти в 12 раз больше в сравнении с пациентами, у которых был диагностирован рак эндометрия [18]. Повышение активности компонентов кальпаиновой системы было также продемонстрировано в различных типах опухолей, таких как менингиома, почечно-клеточный рак, колоректальные аденокарциномы, рак эндометрия, рак желудка, рак молочной железы по сравнению с условно-нормальной тканью [10, 12, 13, 19]. Участие кальпаинов в развитии злокачественных опухолей обусловлено их важной ролью в различных клеточных физиологических процессах. Кальпаины потенциально распознают более 200 субстратов, что подтверждено исследованиями in vitro [11].

Среди белков, идентифицированных как субстраты кальпаинов, находятся транскрипционные факторы, трансмембранные рецепторы, компоненты сигнальных путей и белки цитоскелета. Кальпаины функционируют взаимосвязанно с другими внутриклеточными протеазами, в частности с протеасомами. При этом в злокачественной ткани образуется комплекс, представленный ферментами различных каталитических типов, получивший название «раковый деградом» [7]. Компоненты «ракового деградома» обеспечивают эффективный протеолиз в течение опухолевой прогрессии, включая процессы инвазии и метастазирования.

Рисунок. Активность кальпаинов в биопсийном материале у пациентов с дисплазически измененным эпителием верхних дыхательных путей (DI-II) и плоскоклеточным раком головы и шеи (T1N0M0); – значимость различий в сравнении с группой «Дисплазия эпителия DI-II», p < 0,05

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в этом исследовании, свидетельствуют о значительном различии уровня экспрессии и активности компонентов кальпаиновой системы между злокачественными и диспластическими измененными тканями верхних дыхательных путей. Вероятно, увеличение уровня мРНК CAPN1 и CAPN2 и общей активности кальпаинов в опухолевых тканях пациентов с ПРГШ в сравнении с пациентами с хроническими заболеваниями, ассоциированными с диспластическими изменениями различной степени, может играть важную роль в процессе перехода предрака в рак. Однако для полного установления роли кальпаинов в канцерогенезе ПРГШ необходимо проведение подобных исследований в интактной ткани, что возможно только на экспериментальных моделях. Представленные данные указывают на непосредственное участие кальпаиновой системы в развитии опухолевых заболеваний области головы и шеи. В дальнейшем на основе данных показателей перспективна разработка
критериев риска злокачественной трансформации у пациентов с предопухолевыми заболеваниями верхних дыхательных путей.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Leemans C.R., Braakhuis B.J.M., Brakenhoff R.H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2011; 11 (1): 9–22. DOI: 10.1038/nrc2982.

2. Alsahafi E., Begg K., Amelio I., Raufl N., Lucarelli P., Saufter T., Tavassoli M. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis*. 2019; 10 (8): 540. DOI: 10.1038/s41419-019-1769-9.

3. Каприц А.Д., Стариковский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2019: 250.

4. Философова И.Г., Чойнзонов Е.Л., Гольдберг В.Е., Чижевский Л.А., Шпилева О.В. Активность протеасом и кальпайн в опухолях при новообразованиях эндометрия. Челябинский онкологический журнал. 2012; (4):45–48.

5. Trivedi S., Rosen C.A., Ferris R.L. Current understanding of the tumor microenvironment of laryngeal dysplasia and progression to invasive cancer. *Curr Opin Otolaryngol. Head Neck Surg*. 2016; 24 (2): 121–127. DOI: 10.1097/MOO.0000000000000245.

6. Черемисина Е.М., Коганова Е.С., Панкова О.В., Меньшиков К.Ю. Хронический гиперпластический ларингит как критерий формирования группы риска по раку гортани. Российский онкологический журнал. 2013; 63 (2): 84–89.

7. Кукис А.А., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. Компоненты системы детримина гиустимы в прогрессии плоскоклеточного карцинома головы и шеи. Вестник РАМН. 2015; 70 (6): 684–693. DOI: 10.15690/vramn563.

8. Sorimachi H., Hata S., Kawabata Y., Sorimachi H. Structure, activation, and Biology of Calpain. *Diabetes*. 2004; 53 (Sl. 1): S12–S18. DOI: 10.2337/diabetes.53.2007.S12.

9. Shashova E.E., Kolegova E.S., Zav’yalov A.A., Slonimskaya E.M., Konadakova I.V. Changes in the activity of proteasomes and calpains in metastases of human lung cancer and breast cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014; 157 (6): 781–784. DOI: 10.1007/s10517-014-2666-y.

10. Shashova E.E., Kolegova E.S., Zav’yalov A.A., Slonimskaya E.M., Konadakova I.V. Changes in the activity of proteasomes and calpains in metastases of human lung cancer and breast cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017; 163 (4): 486–489. DOI: 10.1007/s10517-017-3834-7.

11. Zhang S., Deen S., Storr S.J., Chondrou P.S., Nicholls H., Yao A., Rungsakaolert P., Martin S.G. Calpain system protein expression and activity in ovarian cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2019; 145 (2): 345–361. DOI: 10.1007/s00432-018-2794-2.

12. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. *Methods*. 2001; 25 (4): 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

13. Ma D., Fang J., Liu Y., Song J-J., Wang Y-Q., Xia J., Cheng B., Wang Z. High level of calpain1 promotes cancer cell invasion and migration in oral squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*. 2017; 13 (6): 4017–4026. DOI: 10.3892/ol.2017.5970.

14. Слетов А.А., Можейко Р.А. Особенности дифференциальной диагностики рака слизистой оболочки полости рта с использованием специфических маркеров опухолевой прогрессии. Научный альманах. 2017; 28 (2–3): 389–397. DOI: 10.17117/na.2017.02.03.389.

15. Ковалев В.Д., Спирина Л.В., Кондакова И.В., Козломец Л.А., Шпилева О.В. Активность протеасом и кальпайн при новообразованиях эндометрия. *Молекулярная медицина*. 2012; (4):45–48.

Вклад авторов

Сиденко Е.А. – проведение лабораторных исследований, определение экспрессии генов кальпайн, написание рукописи. Ка-курина Г.В. – определение экспрессии генов кальпайн, анализ и интерпретация данных. Черемисина О.В. – набор биопсийного материала больных раком гортани и гортаноглотки и предопухолевыми заболеваниями верхних дыхательных путей. Спирина Л.В. – проведение лабораторных исследований, определение активности кальпайн. Шашова Е.Е. – статистическая обработка данных."
Сведения об авторах

Сиденко Евгения Александровна, аспирант, лаборатория биохимии опухолей, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0001-5838-9459.

Какурина Гелена Валерьевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория биохимии опухолей, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-4506-9429.

Черемисина Ольга Владимировна, д-р мед. наук, профессор, зав. эндоскопическим отделением, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0001-7234-4708.

Спирина Людмила Викторовна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория биохимии опухолей, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-5269-736X.

Шашова Елена Евгеньевна, д-р мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория биохимии опухолей, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-7752-9346.

Коршунов Дмитрий Афанасьевич, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория биохимии опухолей, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-1058-3882.

Кондакова Ирина Викторовна, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией биохимии опухолей, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-0947-8778.

(✉) Сиденко Евгения Александровна, e-mail: sidenkoevgenyaaleksandrovna@gmail.com

Поступила в редакцию 06.07.2020
Подписана в печать 28.12.2020