

*В.В. Делекторская, А.В. Комельков, И.Б. Зборовская, А.Д. Еникеев,
В.М. Сафронова, Е.М. Чевкина*

Ядерная локализация белка, связывающего ретиноевую кислоту (CRABP1), ассоциирована со степенью злокачественности нейроэндокринных опухолей легкого

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» МЗ РФ, Москва

Бронхолегочные нейроэндокринные опухоли (НЭО) относятся к злокачественным эпителиальным новообразованиям нейроэндокринного происхождения, которые образуют крайне разнородную группу в отношении биологического поведения и клинических проявлений. При диагностике НЭО легких выделяют три основных категории различной степени злокачественности: типичные карциноиды (ТК), атипичные карциноиды (АК) и наиболее агрессивные низкодифференцированные опухоли, включающие мелкоклеточный и крупноклеточный нейроэндокринный рак легкого. Эти группы различаются в отношении прогноза и подходов к терапии заболевания, однако используемые в настоящее время критерии не всегда позволяют провести четкие границы между отдельными гистологическими вариантами. Для оптимальной классификации и градации основных категорий НЭО необходим поиск дополнительных диагностических параметров и маркеров для оценки индивидуального прогноза. В работе впервые проведено исследование белка, связывающего ретиноевую кислоту, CRABP1, в различных вариантах НЭО легкого. ИГХ анализ 43 образцов НЭО легкого различной степени дифференцировки выявил достоверную корреляцию ядерной локализации данного белка с пролиферативным индексом Ki-67 и степенью злокачественности. Полученные результаты указывают на участие CRABP1 в патогенезе бронхолегочных НЭО и свидетельствуют о необходимости дальнейшего исследования связи ядерной формы CRABP1 с клиническими показателями и выживаемостью пациентов для определения возможности использования данного белка в качестве маркера дифференциальной диагностики и/или прогноза течения заболевания.

Ключевые слова: бронхолегочные нейроэндокринные опухоли, типичный карциноид, атипичный карциноид, мелкоклеточный рак легкого, ретиноевая кислота, CRABP1, степень злокачественности

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) легких развиваются из клеток диффузной нейроэндокринной системы и представляют собой отдельную категорию злокачественных эпителиальных новообразований [4, 31, 36, 40], составляющую 20–25% от общего числа злокачественных опухолей легкого [15, 29].

Несмотря на наличие общих признаков нейроэндокринной морфологии и определенных биологических характеристик, НЭО легкого образуют крайне разнородную группу в отношении биологического поведения и клинических проявлений [35, 37]. В соответствии с классификацией ВОЗ 2015 года, одобренной ведущей организацией — Европейским обществом по изучению нейроэндокринных опухолей (the European Neuroendocrine Tumor Society, ENETS [8] к основным гистологическим вариантам НЭО легкого относятся типичный карциноид (ТК), атипичный карциноид (АК), крупноклеточный нейроэндокринный рак (КНЭР) и мелкоклеточный рак легкого (МРЛ) [34], которые отличаются по уровню дифференцировки и степени злокачественности. КНЭР и МРЛ составляют группу низкодифференцированных НЭО высокой степени злокачественности, в то время как карциноиды являются менее агрессивным высокодифференцированными опухолями, которые, в свою очередь, делятся на ТК (низкая степень злокачественности) и АК (промежуточная степень злокачественности). Основными критериями для градации степени злокачественности НЭО, которая является прогностически значимым параметром, являются гистологические данные, включающие морфологические характеристики, количество митозов на 2 мм² а также наличие и размер участков некрозов.

Индекс пролиферативной активности опухолевых клеток Ki-67 хотя и не является основным диагностическим критерием НЭО, однако коррелирует с агрессивностью опухолевого процесса и прогнозом заболевания и служит в качестве важного параметра для уточнения степени злокачественности НЭО [5, 18, 19, 26, 41]. Иммуногистохимическое (ИГХ) определение индекса Ki-67 рекомендовано для разграничения катего-

рии карциноидных опухолей, где он, как правило, составляет менее 20%, и НЭО высокой степени злокачественности, где данный показатель обычно превышает 50% положительно окрашенных ядер опухолевых клеток. Также индекс Ki-67 рекомендован в качестве дополнительного критерия для диагностики карциноидов: ТК — ≤ 5% и АК — ≤ 20%.[34].

CRABP1 (Cellular Retinoic Acid Binding Protein-1), а также высокомолекулярный белок CRABP2 относятся к семейству iLBPs (intracellular Lipid Binding Proteins), представленному небольшими белками, обладающими очень сходной структурой, но селективно связывающими лиганды (ретиновая кислота (РК). Несмотря на то, что белки CRABP очевидно играют большую роль в реализации эффекта РК (подробнее — в обзоре автора «Белки CRABP — родственники или однофамильцы?» [3]), а также, согласно последним данным, обладают и другими важнейшими активностями, не связанными с ретиновым сигналингом [27, 28, 39], роль этих белков в опухолевой прогрессии исследована недостаточно, а имеющиеся немногочисленные наблюдения расходятся в своих заключениях.

Ранее нами впервые была показана про-туморогенная функция CRABP1 на различных моделях мезенхимальных опухолей, а также при исследовании синовиальных сарком [17]. Кроме того, нами была обнаружена ассоциация CRABP1 с прогрессией НЭО поджелудочной железы (НЭО ПЖ) [1]. Участие данного белка в опухолевой прогрессии позднее было показано и другими авторами [7, 21]. Тем не менее, до сих пор нет единого мнения о том, насколько этот эффект является опухоль или ткане-специфичным, поскольку имеются и данные, указывающие на опухоль-супрессорную роль этого белка [13, 16, 23, 33]. Большая противоречивость данных об опухоль-супрессорной или опухоль-промоторной роли CRABP1 отчасти объясняется практически полным отсутствием до последнего времени исследований значения внутриклеточной локализации данного белка, хотя значение этого фактора неоднократно показано для CRABP2 [12, 22, 38].

Нами впервые проведено исследование экспрессии и внутриклеточной локализации CRABP1 в НЭО легких, которое показало наличие корреляции ядерной локализации данного белка со степенью злокачественности данной группы опухолей.

Материалы и методы

Образцы клинического материала

Послеоперационные образцы опухолевой ткани были получены от пациентов, проходивших хирургическое лечение в НИИ КО ФГБУ «НМИЦО им.Н.Н.Блохина» МЗ РФ с диагнозом НЭО легкого. В исследование включено

43 пациента с НЭО легкого различной степени дифференцировки, диагнозы МРЛ, ТК и АК легкого были верифицированы двумя независимыми морфологами в отделе патологической анатомии ФГБУ «НМИЦО им.Н.Н.Блохина» МЗ РФ в соответствии с клинико-морфологическими и иммуногистохимическими критериями ВОЗ 2015 для НЭО бронхолегочной локализации.

Иммуногистохимический анализ

Иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание выполнено на парафиновых срезах ткани НЭО легких с использованием антител к CRABP I и Ki67(MIB-1), а также маркерам НЭО (хромогранину А (CgA) и синаптофизину (Syn) (фирма «Dako»)) и системы детекции Super Sensitive™ Polymer-HRP («BioGenex») по стандартной методике. Вкратце, образцы опухолевой ткани фиксировали в формалине в течение 24 часов. Образцы заливали в парафиновые блоки, с которых были получены срезы толщиной 3-5 мкм. Эндogenous пероксидазную активность подавляли с помощью обработки 3% перекисью водорода в течение 10 мин. Депарафинизированные срезы обрабатывали 10 mM цитратным буфером (pH 6.0) на водяной бане при 95°C в течение 40 мин, после чего инкубировали с первичными антителами anti-CRABP1 (Sigma-Aldrich, HPA017203) и anti-Ki-67 (Dako, Clone MIB-1, No. M724001) 30 мин. при комнатной температуре. Ядра докрасивали гематоксилином Майера.

Результаты анализа общей экспрессии CRABP I независимо оценивали два морфолога и выражали как сумму баллов от «0» до «9» с учетом количества антиген-позитивных клеток (1(+) — <20%; 2(+) 25-50%; 3(+) >50-%) и интенсивности окраски (0 — 3(+)). Аналогичным образом оценивали интенсивность ядерной экспрессии CRABP1.

Иммуноблотинг

Концентрацию белков в лизатах определяли спектрофотометрически с использованием реактива Бредфорд согласно протоколу производителя (Bio-Rad Laboratories GmbH). 30 мкг тотального белка разделяли в 15%-SDS-полиакриламидном геле (SDS-ПААГ) и переносили на PVDF мембрану (Millipore) в буфере для переноса (100 В и 250 мА, 1 час). Мембрану инкубировали в блокирующем растворе (5% обезжиренное молоко (BioRad) в течение 1 часа при комнатной температуре, затем в течение 10 часов — с первичными антителами (anti-CRABP1 (Sigma-Aldrich, HPA017203)) при +4 °С, после чего отмывали в буфере TBS, содержащем 0,1% TWEEN, и инкубировали 1,5 часа со вторичными антителами, конъюгированными пероксидазой хрена (Cell Signalling, #2367), при комнатной температуре. После стандартной отмывки мембрану проявляли с помощью реагента для хемилюминесцентной реакции ECL (Milipore). Хемилюминесцентную реакцию регистрировали на приборе Kodak GelLogic 2200 Imaging system с последующей обработкой с помощью программы Kodak Molecular Imaging Software SE ver. 5.0.1.27.

Методы статистического анализа

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ GraphPad Prizm v. 5.1 и Microsoft® Office Excel 2010. Достоверность различий наблюдаемых частот признаков в изучаемых группах определяли с использованием точного критерия Фишера (различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

В исследование включено 43 пациента с НЭО легких различной степени дифференцировки и степени злокачественности: в 9 случаях был

поставлен диагноз — мелкоклеточный рак легкого (низкодифференцированные НЭО легкого), 34 образца соответствовали высокодифференцированным НЭО легкого. Из них в соответствии с критериями классификации ВОЗ 2015 года (морфологические характеристики, количество митозов и участков некрозов) 13 случаев были отнесены к атипичным карциноидам (промежуточная степень злокачественности) и 21 — к типичным карциноидам легкого (низкая степень злокачественности).

Во всех образцах был проведен ИГХ анализ экспрессии CRABP1. Также во всех случаях проводили анализ маркера Ki-67, на основании которого оценивали индекс пролиферации.

Проведенный анализ выявил присутствие экспрессии CRABP1 в 41-ом образце. Отсутствие реакции наблюдалось в двух случаях, относящихся к группе ТК.

Для проверки специфичности реакции в части образцов карциноидов, для которых был получен в достаточном количестве и заморожен послеоперационный материал (образцы опухолевой ткани) был параллельно проведен анализ экспрессии белка CRABP1 методом иммуноблоттинга с использованием тех же антител. Среди них были образцы типичных карциноидов с интенсивной ИГХ реакцией и CRABP1-негативный образец. В качестве контролей использовали лизаты клеток линии крупноклеточного рака легкого H460, в которой отсутствует эндогенная экспрессия данного белка (отрицательный контроль), а также производной линии H460-CRABP1, в которой данный белок был гиперэкспрессирован с помощью трансдукции кодирующей последовательности CRABP1 в составе ретровирусного вектора pLXSN (рис. 1).

Интенсивность ИГХ реакции варьировала от слабой до сильной, также различалось количество CRABP1-позитивных клеток в образцах. Различался и характер экспрессии: имелись случаи цитоплазматической, парануклеарной и ядерной реакции, а также их комбинации. Типичные примеры различных видов окрашивания

при исследовании НЭО различной степени злокачественности приведены на рис. 2. При сравнительном анализе уровня экспрессии CRABP1 (по критериям — интенсивность реакции, и количество CRABP1-позитивных клеток, а также по суммарному показателю (сумма баллов)) нам не удалось выявить статистически значимых различий между образцами опухолей различной степени злокачественности, хотя имеется тенденция к увеличению экспрессии в менее дифференцированных образцах. Очевидно, что для однозначного ответа на данный вопрос необходимо увеличить выборку образцов, относящихся к группам МРЛ и ТК.

В то же время нами обнаружены различия в характере экспрессии CRABP1 (внутриклеточной локализации) в зависимости от уровня дифференцировки опухолей и степени злокачественности. Так, ядерная реакция наблюдалась лишь в 3-х из 21 CRABP1-позитивных образцов ТК (14,2%). В то же время, в образцах АК ядерная реакция обнаружена в 69,2% (9 из 13 образцов), а среди образцов МРЛ ядерная реакция была характерна для всех случаев (100%). Также с увеличением степени злокачественности опухолей увеличивался и процент клеток с CRABP1-позитивными ядрами.

Сравнение групп образцов низкодифференцированных НЭО (МРЛ) и высокодифференцированных НЭО (карциноиды) по критерию наличия или отсутствия ядерной реакции (табл. 1) выявило статистически значимые различия ($p < 0,01$). Также статистически значимые различия наблюдались при аналогичном сравнении внутри группы карциноидов — между группой образцов ТК и группой АК ($p < 0,01$).

Поскольку наиболее выраженные различия наблюдались при сравнении МРЛ с группой карциноидов, нам представлялось интересным провести сравнение в группе карциноидов по дополнительному параметру, учитывая, что система градации НЭО легкого в целом и в особенности дифференциальная диагностика ТК и АК представляют на сегодняшний день опреде-

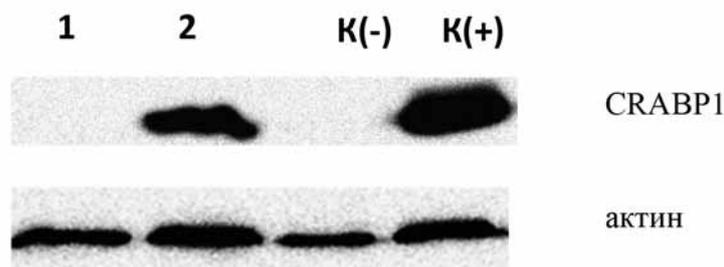


Рис. 1. Примеры анализа (присутствие и отсутствие) эндогенной экспрессии CRABP1 в образцах карциноидов методом иммуноблоттинга. 1 — CRABP1-негативный образец карциноида, 2 — CRABP1-позитивный образец карциноида, K(-)-лизат линии клеток H460, K(+)-лизат линии H460pLXSNCRABP1

Таблица 1. Анализ ядерной ИГХ реакции на CRABP1 в зависимости от степени дифференцировки (ТК/АК/МРЛ) и индекса пролиферации Ki-67

Группа сравнения (гистологический вариант НЭО легкого)	Количество образцов	Ядерная реакция	Отсутствие ядерной реакции	Значение p
МРЛ	9	9	0	0,0005
Карциноиды	36	12	22	
Типичный	21	3	18	0,0024
Атипичный	15	9	4	
Образцы карциноидов с «Ki-67» ≤ 5%	20	4	16	0,0356
Образцы карциноидов с «Ki-67» > 5%	14	8	6	

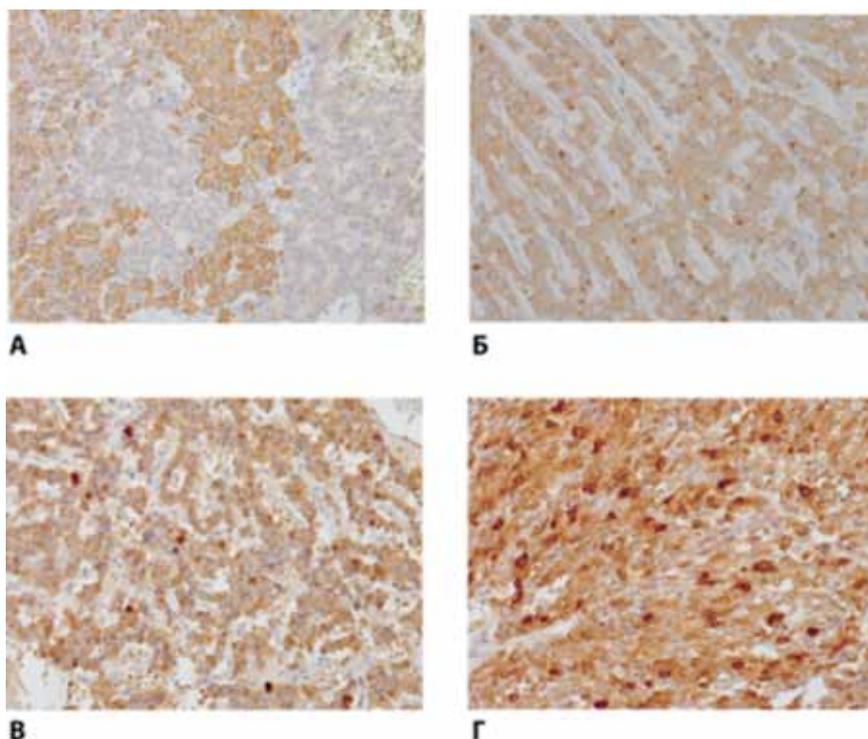


Рис. 2. Примеры ИГХ анализа CRABP1 в образцах НЭО легкого различной степени злокачественности. Ядра клеток докрашены гематоксилином Майера

- А — образец ТК, гетерогенная цитоплазматическая реакция в клетках опухоли (x200);
- Б — образец ТК, слабая цитоплазматическая реакция в большинстве опухолевых клеток. Ядерная реакция — в 10% опухолевых клеток (x200);
- В — образец АК, цитоплазматическое окрашивание умеренной интенсивности. Ядерная реакция различной интенсивности — в 30% опухолевых клеток (x200);
- Г — образец МРЛ, интенсивная ядерно-цитоплазматическая реакция в большинстве опухолевых клеток. Ядерная реакция различной интенсивности — в более чем 50% опухолевых клеток (x400)

ленные сложности и нуждаются в добавочных критериях и маркерах.

Индекс пролиферативной активности опухолевых клеток Ki-67 впервые включен в действующую классификацию НЭО в 2015 году (WHO 2015), но пока рассматривается как дополнительный критерий межвариантной диагностики, наиболее важный для разграничения опухолей низкой/промежуточной и высокой степени злокачественности, особенно при исследовании малого диагностического материала. В соответствии с классификацией WHO 2015, показатель индекса Ki-67 для разграничения ТК и АК условно составляет менее 5% (варьирует между 2,5% и 5,8%), однако считается окончательно не установленным [12].

В нашей работе проведен анализ ядерной экспрессии CRABP1 в зависимости от индекса пролиферативной активности в группе карциноидов. Для этого образцы были разделены на группы с индексом Ki67≤5% и Ki67>5% (табл. 1), в которых пороговое значение 5 % было выбрано в соответствии с рекомендациями WHO 2015. Сравнение показало, что в группе образцов с Ki67>5% ядерная реакция на CRABP1 выявлялась значительно чаще (p<0,05) (табл. 1). Таким образом, присутствие CRABP1 в ядре ассоциировано и с пролиферативным статусом клеток.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о корреляции ядерной локализации CRABP1 с агрессивностью НЭО легкого (диф-

ференцировкой, степенью злокачественности и пролиферативной активностью). Это означает, что по мере увеличения степени злокачественности белок CRABP1 все чаще встречается в ядре. Полученные результаты свидетельствуют о значимости ядерной локализации CRABP1 для опухолевой прогрессии НЭО и согласуются с последними литературными данными о различных функциях белков CRABP в ядре и цитоплазме, а также о функциональном значении компартиментализации этих белков применительно к процессу канцерогенеза.

Согласно современным представлениям, НЭО характеризуются большой гетерогенностью по строению и клиническим характеристикам, и хотя все нейроэндокринные новообразования обладают потенциалом злокачественности, их клиническое течение может варьировать от индолентного до высокоагрессивного, сопровождающегося быстрым развитием метастазов и рецидивов заболевания [24, 29, 36]. Схема действующей классификации WHO 2015 для бронхолегочных НЭО имеет четкую направленность на предсказание прогноза заболевания, однако она основана на нескольких морфологических параметрах (митозы и некрозы), которые часто трудно воспроизводимы и не всегда могут быть оценены достоверно (особенно на малом диагностическом материале), что влияет на согласованность диагнозов между различными исследователями. Кроме того, остается пограничная, или «серая», зона, когда субъективная оценка данных критериев вызывает сложности при анализе сходных вариантов, например, ТК vs. АК, АК vs. КНЭР и КНЭР vs. МРЛ. Уточняющие критерии для диагностики данных пограничных категорий НЭО легких пока отсутствуют (подробнее можно прочитать в обзоре [2]).

Ранее экспрессия белков CRABP в НЭО не исследовалась, за исключением работы авторов (Делекторская и др.), в которой была показана связь белка CRABP1 с прогрессией НЭО поджелудочной железы (НЭО ПЖ). В частности, была продемонстрирована корреляция между уровнем экспрессии CRABP1 и степенью злокачественности НЭО ПЖ, индексом Ki-67, снижением дифференцировки опухолей а также наличием регионарного метастазирования [1].

Также до сих пор мало что известно о значении компартиментализации данного белка. Помимо «классической» локализации в цитоплазме, CRABP1 также обнаруживается в митохондриях [30] и в перинуклеарном пространстве [20]. При этом CRABP1 (также, как и CRABP2, который функционирует как ядерно-цитоплазматический «шаттл») имеет в своем составе сигнал ядерной локализации и

обнаруживается в ядрах [11, 21] there are two low molecular weight (15 kD. Тем не менее, функциональное значение CRABP1 в ядре остается мало понятным.

В этой связи нужно отметить, что механизм передачи ПК от белков CRABP к рецепторам RAR принципиально отличается. Так, CRABP2 транспортирует ПК из цитоплазмы в ядро к ядерным рецепторам ПК, транскрипционным факторам RAR или RXR, что вызывает активацию экспрессии RAR-зависимых (ретиноид-респонсивных) генов, большая часть которых участвует в антипролиферативных и/или проапоптотических процессах в клетке. Соответственно, CRABP2 не только облегчает связывание ПК с соответствующими рецепторами, но и усиливает их транскрипционную активность [3]. Несмотря на то, что CRABP1 связывает ПК наиболее активно (по сравнению с другими ПК-связывающими белками), CRABP1 не способен напрямую взаимодействовать с RAR, и для передачи ПК от белка CRABP1 к рецепторам требуется диссоциация комплекса CRABP1-ПК с последующей ассоциацией ПК с RAR [6, 9]. Соответственно, если CRABP1 и способен усиливать передачу сигнала от ПК, то осуществляет это менее эффективно. Таким образом, несмотря на то, что все больше работ указывают на присутствие CRABP1 в ядре, ядерные функции этого белка остаются не совсем понятными.

В данной работе впервые было проведено сравнение экспрессии белка CRABP1 в НЭО легких различной степени злокачественности — типичных карциноидах, атипичных карциноидах и МРЛ. Полученные в нашей работе данные указывают на присутствие данного белка в ядрах клеток нейроэндокринных опухолей (НЭО) легкого. Более того, мы наблюдали увеличение представленности CRABP1 в ядре по мере прогрессии степени злокачественности НЭО легких (МРЛ>АК>ТК). Также обнаружена достоверная ассоциация ядерной локализации CRABP1 с увеличением индекса Ki-67. Анализ полученных данных показал, что уровень статистической значимости выше при сравнении групп НЭО легкого, выделенных по совокупности критериев (ТК vs АК), чем при сравнении карциноидов, разделенных по группам в соответствии с критерием Ki-67. Этот результат объясняется, по-видимому, как условностью порогового значения Ki-67, который окончательно не установлен и значительно варьирует для карциноидов различной степени злокачественности [25, 32] < 2 mitoses per 2 mm, так и, возможно, недостаточно представительной выборкой исследованных образцов.

В последнее время появляется все больше данных литературы, указывающих на принци-

пиальное значение внутриклеточной локализации белков CRABP с точки зрения канцерогенеза и прогрессии опухолей. Так, еще в работе 2004 года авторы показали мембранное окрашивание этого белка при ИГХ анализе серозного папиллярного рака яичников и цитоплазматическое окрашивание в образцах метастазов в сальник, что указывало на связь цитоплазматической локализации CRABP1 с прогрессией данного заболевания [14]. Вместе с тем, в более поздней работе по исследованию CRABP1 в том же типе рака яичников (серозный РЯ), а также в светлоклеточном РЯ, авторы показали, что снижение цитоплазматической реакции имеет место в 50% случаев, и это снижение коррелирует со снижением общей выживаемости пациентов. Таким образом, авторы данной работы считают присутствие цитоплазматического CRABP1 фактором хорошего прогноза [23]. В то же время в работе 2015 года, в которой исследовались не только продукция белка CRABP1, но и различные аспекты его функциональной активности, а также сравнивалось значение ядерной и цитоплазматической локализации, авторы показали, что увеличение уровня CRABP1 в цитоплазме ассоциировано с высоким индексом Ki-67, степенью злокачественности опухоли и плохим прогнозом для больных раком молочной железы [21]. Таким образом, как наши собственные результаты, так и последние данные опубликованных исследований свидетельствуют о значимости внутриклеточной локализации белков CRABP в аспекте опухолевой прогрессии. И хотя эти данные противоречивы, по-видимому, это является следствием очень малого количества таких исследований. Необходимо также отметить, что, по мнению авторов, белки CRABP необходимо исследовать совместно в одних и тех же образцах, поскольку согласно нашим данным и данным других авторов, все более очевидно наличие их взаимосвязи [10, 21].

Вопрос о функциональной роли CRABP1 в ядре также остается открытым. В работах последних лет появляются данные о его дополнительных (не связанных с транспортом РК) функциях в цитоплазме, где он может активировать такие важные регуляторы опухолевой прогрессии, как митоген-активируемая киназа Erk1/2 [27]. Интересно, что, как минимум в некоторых случаях, CRABP1-зависимая активация Erk1/2 продлевает G1 фазу клеточного цикла и стимулирует апоптоз [28]. Важно, что этот эффект напрямую зависит от РК, но не зависит от ее ядерных рецепторов, то есть реализуется в цитоплазме и не связан с RAR-зависимой регуляцией транскрипции. Авторы предполагают, что CRABP1 осуществляет

опухоль-супрессорную функцию в цитоплазме посредством подавления пролиферации и усиления апоптоза. Поэтому одним из возможных объяснений обнаруженного в данной работе накопления CRABP1 в ядре может быть изменение баланса между клетками с «ядерным» и «цитоплазматическим» CRABP1 в сторону увеличения выживаемости и/или пролиферации клеток в более агрессивных типах НЭО легких. Очевидно, что для ответа на этот вопрос необходимы дальнейшие исследования функциональной роли ядерной локализации CRABP1, а также ее значения в патогенезе злокачественных новообразований.

Данная работа была выполнена при поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований, грант 16-04-01559А, «Значение белков CRABP1 и CRABP2 в прогрессии злокачественных опухолей нейроэндокринного и эпителиального происхождения».

ЛИТЕРАТУРА

1. Делекторская В., Чемерис Г., Каинов Я. и др. Экспрессия белка, связывающего ретиноевую кислоту, и пролиферативная активность клеток в нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы // Молекулярная медицина. — 2013. — № 1. — С. 38-44.
2. Делекторская В.В. Нейроэндокринные опухоли легкого: современная классификация и алгоритм морфологической диагностики // Успехи молекулярной онкологии. — 2017. — Т. 4. — № 2. — С. 46-58.
3. Чевкина Е.М., Фаворская И.А. Белки CRABP — родственники или однофамильцы? // Успехи молекулярной онкологии. — 2015. — № 2 (2). — С. 6-16.
4. Asamura H., Kameya T., Matsuno Y. et al. Neuroendocrine neoplasms of the lung: a prognostic spectrum. // Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. — 2006. — Vol. 24. — № 1. — С. 70-76.
5. Aslan D.L., Gulbahce H.E., Pambuccian S.E. et al. Ki-67 immunoreactivity in the differential diagnosis of pulmonary neuroendocrine neoplasms in specimens with extensive crush artifact. // American journal of clinical pathology. — 2005. — Vol. 123. — № 6. — С. 874-878.
6. Budhu A., Gillilan R., Noy N. Localization of the RAR interaction domain of cellular retinoic acid binding protein-II // Journal of molecular biology. — 2001. — Vol. 305. — № 4. — С. 939-949.
7. Campos B., Centner F.-S., Bermejo J.L. et al. Aberrant expression of retinoic acid signaling molecules influences patient survival in astrocytic gliomas // The American journal of pathology. — 2011. — Vol. 178. — № 5. — С. 1953-1964.
8. Caplin M.E., Baudin E., Ferolla P. et al. Pulmonary neuroendocrine (carcinoid) tumors: European Neuroendocrine Tumor Society expert consensus and recommendations for best practice for typical and atypical pulmonary carcinoids. // Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. — 2015. — Vol. 26. — № 8. — С. 1604-1620.

9. Dong D., Ruuska S.E., Levinthal D.J. et al. Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid // *The Journal of biological chemistry*. — 1999. — Vol. 274. — № 34. — С. 23695–23698.
10. Favorskaya I., Kainov Y., Chemeris G. et al. Expression and clinical significance of CRABP1 and CRABP2 in non-small cell lung cancer. // *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. — 2014. — Vol. 35. — № 10. — С. 10295–10300.
11. Gaub M.P., Lutz Y., Ghyselinck N.B. et al. Nuclear detection of cellular retinoic acid binding proteins I and II with new antibodies // *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. — 1998. — Vol. 46. — № 10. — С. 1103–1111.
12. Gupta A., Williams B.R.G., Hanash S.M. et al. Cellular retinoic acid-binding protein II is a direct transcriptional target of MycN in neuroblastoma // *Cancer research*. — 2006. — Vol. 66. — № 16. — С. 8100–8108.
13. Hawthorn L., Stein L., Varma R. et al. TIMP1 and SERPIN-A overexpression and TFF3 and CRABP1 underexpression as biomarkers for papillary thyroid carcinoma // *Head & neck*. — 2004. — Vol. 26. — № 12. — С. 1069–1083.
14. Hibbs K., Skubitz K.M., Pambuccian S.E. et al. Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers // *The American journal of pathology*. — 2004. — Vol. 165. — № 2. — С. 397–414.
15. Huang Q., Muzitansky A., Mark E.J. Pulmonary neuroendocrine carcinomas. A review of 234 cases and a statistical analysis of 50 cases treated at one institution using a simple clinicopathologic classification // *Archives of pathology & laboratory medicine*. — 2002. — Vol. 126. — № 5. — С. 545–553.
16. Huang Y., la Chapelle A. de, Pellegata N.S. Hypermethylation, but not LOH, is associated with the low expression of MT1G and CRABP1 in papillary thyroid carcinoma // *International journal of cancer*. — 2003. — Vol. 104. — № 6. — С. 735–744.
17. Kainov Y., Favorskaya I., Delektorskaya V. et al. CRABP1 provides high malignancy of transformed mesenchymal cells and contributes to the pathogenesis of mesenchymal and neuroendocrine tumors // *Cell Cycle*. — 2014. — Vol. 13. — № 10. — С. 1530–1539.
18. Klimstra D.S., Modlin I.R., Adsay N.V. et al. Pathology reporting of neuroendocrine tumors: application of the Delphic consensus process to the development of a minimum pathology data set // *The American journal of surgical pathology*. — 2010. — Vol. 34. — № 3. — С. 300–313.
19. Klimstra D.S., Modlin I.R., Coppola D. et al. The Pathologic Classification of Neuroendocrine Tumors // *Pancreas*. — 2010. — Vol. 39. — № 6. — С. 707–712.
20. Levadoux-Martin M., Li Y., Blackburn A. et al. Perinuclear localisation of cellular retinoic acid binding protein I mRNA // *Biochemical and biophysical research communications*. — 2006. — Vol. 340. — № 1. — С. 326–331.
21. Liu R.-Z., Garcia E., Glubrecht D.D. et al. CRABP1 is associated with a poor prognosis in breast cancer: adding to the complexity of breast cancer cell response to retinoic acid // *Molecular cancer*. — 2015. — Vol. 14. — № 1. — С. 129.
22. Liu R.-Z., Li S., Garcia E. et al. Association between cytoplasmic CRABP2, altered retinoic acid signaling, and poor prognosis in glioblastoma // *Glia*. — 2016. — Vol. 64. — № 6. — С. 963–976.
23. Miyake T., Ueda Y., Matsuzaki S. et al. CRABP1-reduced expression is associated with poorer prognosis in serous and clear cell ovarian adenocarcinoma // *Journal of cancer research and clinical oncology*. — 2011. — Vol. 137. — № 4. — С. 715–722.
24. Moran C.A., Suster S. Neuroendocrine Carcinomas (Carcinoid, Atypical Carcinoid, Small Cell Carcinoma, and Large Cell Neuroendocrine Carcinoma): Current Concepts // *Hematology/Oncology Clinics of North America*. — 2007. — Vol. 21. — № 3. — С. 395–407.
25. Pelosi G., Rindi G., Travis W.D. et al. Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: unraveling a role in clinical practice. // *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. — 2014. — Vol. 9. — № 3. — С. 273–284.
26. Pelosi G., Rodriguez J., Viale G. et al. Typical and atypical pulmonary carcinoid tumor overdiagnosed as small-cell carcinoma on biopsy specimens: a major pitfall in the management of lung cancer patients // *The American journal of surgical pathology*. — 2005. — Vol. 29. — № 2. — С. 179–187.
27. Persaud S.D., Lin Y.-W., Wu C.-Y. et al. Cellular retinoic acid binding protein I mediates rapid non-canonical activation of ERK1/2 by all-trans retinoic acid // *Cellular signalling*. — 2013. — Vol. 25. — № 1. — С. 19–25.
28. Persaud S.D., Park S.W., Ishigami-Yuasa M. et al. All trans-retinoic acid analogs promote cancer cell apoptosis through non-genomic Crabp1 mediating ERK1/2 phosphorylation // *Scientific Reports*. — 2016. — Vol. 6. — № 1. — С. 22396.
29. Rekhman N. Neuroendocrine tumors of the lung: an update // *Archives of pathology & laboratory medicine*. — 2010. — Vol. 134. — № 11. — С. 1628–1638.
30. Ruff S.J., Ong D.E. Cellular retinoic acid binding protein is associated with mitochondria // *FEBS letters*. — 2000. — Vol. 487. — № 2. — С. 282–286.
31. Swarts D.R.A., Ramaekers F.C.S., Speel E.-J.M. Molecular and cellular biology of neuroendocrine lung tumors: evidence for separate biological entities // *Biochimica et biophysica acta*. — 2012. — Vol. 1826. — № 2. — С. 255–271.
32. Swarts D.R.A., Suylen R.-J. van, Bakker M.A. den et al. Interobserver variability for the WHO classification of pulmonary carcinoids. // *The American journal of surgical pathology*. — 2014. — Vol. 38. — № 10. — С. 1429–1436.
33. Tanaka K., Imoto I., Inoue J. et al. Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-cell carcinoma // *Oncogene*. — 2007. — № 44 (26). — С. 6456–6468.
34. Travis W., Brambilla E., Burke A. et al. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart / W. Travis, E. Brambilla, A. Burke, A. Marx et al., 4th ed.-e изд. — Lyon: IARC Press, 2015.
35. Travis W.D. Advances in neuroendocrine lung tumors. // *Annals of oncology : official journal of the European So-*

- ciety for Medical Oncology. — 2010. — № Supplement 7 (21 Suppl 7). — С. vii65-71.
36. Travis W.D. Pathology and diagnosis of neuroendocrine tumors: lung neuroendocrine // *Thoracic surgery clinics*. — 2014. — Vol. 24. — № 3. — С. 257–266.
37. Travis W.D., Brambilla E., Nicholson A.G. et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification // *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. — 2015. — Vol. 10. — № 9. — С. 1243–1260.
38. Vreeland A.C., Levi L., Zhang W. et al. Cellular retinoic acid-binding protein 2 inhibits tumor growth by two distinct mechanisms // *The Journal of biological chemistry*. — 2014. — Vol. 289. — № 49. — С. 34065–34073.
39. Vreeland A.C., Yu S., Levi L. et al. Transcript Stabilization by the RNA-Binding Protein HuR Is Regulated by Cellular Retinoic Acid-Binding Protein 2 // *Molecular and Cellular Biology*. -2014. — Vol. 34. — № 12. — С. 2135–2146.
40. Wick M.R. Neuroendocrine neoplasia. Current concepts. // *American journal of clinical pathology*. — 2000. — Vol. 113. — № 3. — С. 331–335.
41. Yang Z., Tang L.H., Klimstra D.S. Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: historical context and current issues // *Seminars in diagnostic pathology*. — 2013. — Vol. 30. — № 3. — С. 186–196.

Поступила в редакцию 07.08.2017 г.

V.V. Delektorskaya, A.V. Komelkov, I.B. Zborovskaya, A.D. Enikeev, V.M. Safronova, E.M. Chevkina

Nuclear localization of CRABP1 in neuroendocrine lung tumors is associated with the degree of tumor malignancy

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology
Moscow

Bronchopulmonary neuroendocrine tumors (NETs) refer to malignant epithelial neoplasms of neuroendocrine origin, which form highly heterogeneous group with respect to biological behavior and clinical manifestations. Three main categories of different grades of malignancy are distinguished in the diagnosis of lung NETs: typical carcinoids (TK), atypical carcinoids (AK) and the most aggressive low-differentiated tumors including small-cell and large-cell neuroendocrine lung carcinomas. These groups differ in terms of disease prognosis and therapeutic approaches, but the criteria currently used do not always allow clear boundaries between different histological variants. The search for additional diagnostic parameters and individual prognosis markers is currently actual for the grading and optimal classification of NETs. For the first time we studied the expression of Retinoic Acid Binding Protein-1 (CRABP1) in different variants of lung NETs. IHC analysis of 43 samples of lung NETs with various degrees of differentiation and grades revealed the statistically significant correlation between nuclear localization of CRABP1 and proliferation index «Ki-67» and tumor grade. The results pointed on the involvement of CRABP1 in the pathogenesis of lung NETs and indicated the need for further investigation of the relationship of the nuclear CRABP1 with clinical parameters and patient survival to determine whether this protein can be used as a marker for differential diagnosis and/or disease prognosis.

Key words: bronchopulmonary neuroendocrine tumors, typical carcinoid, atypical carcinoid, small-cell lung carcinoma, retinoic acid, CRABP1, degree of tumor grade