



МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА С ПРИМЕНЕНИЕМ НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В БИОПТАТАХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫХ КАРЦИНОМ*

Белкин А.Н., Фрейнд Г.Г.

ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера Минздрава России (614990, Пермь, Россия)

MORPHOLOGICAL EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF ELECTOCHEMICAL METHOD WITH NANOTECHNOLOGICAL BIOSENSORS USING FOR ALKALINE PHOSPHOTASE DETECTION IN COLORECTAL CARCINOMA BIOPSIES*

Belkin A.N., Freynd G.G.

E.A. Vagner Perm State Medical University (614990, Perm, Russia)

Для цитирования: Белкин А.Н., Фрейнд Г.Г. Морфологическая оценка эффективности электрохимического метода с применением нанотехнологических биосенсоров для выявления щелочной фосфатазы в биоптатах колоректальных карцином. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018;156(8): 64–67. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-156-8-64-67

For citation: Belkin A. N., Freynd G. G. Morphological evaluation of effectiveness of electrochemical method with nanotechnological biosensors using for alkaline phosphotase detection in colorectal carcinoma biopsies. Experimental and Clinical Gastroenterology. 2018;156(8): 64–67.

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-156-8-64-67

Белкин А.Н.

Belkin A. N.

belkinanton87@gmail.com

Белкин А.Н. — кафедра патологической анатомии с секционным курсом, старший преподаватель

Фрейнд Г.Г. — заведующая кафедрой патологической анатомии с секционным курсом, д.м.н., профессор

Резюме

* Рис. 5 – на цветной вклейке в журнал.

* Illustration 5 to the article are on the colored inset of the Journal.

Цель исследования: оценить эффективность электрохимического метода с применением биосенсоров для изучения содержания ЩФ в биоптатах опухолей и неизменной слизистой толстой кишки с помощью морфологического исследования.

Материалы и методы: с помощью электрохимического метода с применением нанотехнологических биосенсоров исследовали содержание щелочной фосфатазы в биоптатах колоректальных карцином и неизменной слизистой оболочки толстой кишки, полученных в ходе эндоскопического исследования от 24 пациентов. На основании результатов последующего гистологического и иммуногистохимического исследования биоптатов оценивали эффективность электрохимического метода.

Результаты: средняя величина силы тока, полученная при исследовании свежих биоптатов опухолей, составила $0,0492 \pm 0,0007$ мкА, биоптатов неизменной слизистой оболочки толстой кишки — $0,1197 \pm 0,019$ мкА. Аналогичные результаты были получены при исследовании биоптатов, фиксированных в формалине: опухоль — $0,033 \pm 0,0005$ мкА, неизменная слизистая оболочка — $0,0596 \pm 0,0008$ мкА. Гистологическая картина опухолей соответствовала аденокарциноме различной степени дифференцировки. Положительная корреляция результатов электрохимического и гистологического / иммуногистохимического исследований наблюдалась у всех пациентов. При иммуногистохимическом исследовании биоптатов с антителами к неспецифической щелочной фосфатазе была выявлена высокая экспрессия фермента в клеточных мембранах эпителия железистых крипт толстой кишки и слабое «фоновое» окрашивание цитоплазмы и клеточных мембран опухолевых клеток.

Заключение: Электрохимическое исследование с использованием биосенсоров может быть использовано для оценки содержания щелочной фосфатазы в биоптатах опухолей и неизменной слизистой оболочки толстой кишки. Различия в содержании щелочной фосфатазы в ткани аденокарциномы толстой кишки и неизменной слизистой оболочки статистически достоверны. Имеющиеся различия в исследовании свежих и фиксированных в формалине биоптатов свидетельствуют о целесообразности использования нефиксированного материала.

Ключевые слова: колоректальный рак, щелочная фосфатаза, электрохимический метод, биопсии

Summary

Objective: To evaluate (morphologically) the effectiveness of the electrochemical method with biosensors applying to study the content of ALP in biopsies of tumors and intact colon mucosa.

Materials and methods: Using the electrochemical method with nanotechnological biosensors, the concentration of alkaline phosphatase in biopsy specimens of colorectal carcinomas and intact colon mucosa, obtained from endoscopy from 24 patients were examined. Based on the results of a subsequent histological and immunohistochemical study of biopsy specimens, the effectiveness of the electrochemical method was evaluated.

Results: The average value of the current, obtained in the study of fresh tumor biopsies was $0.0492 \pm 0.0007 \mu\text{A}$, in case of biopsy specimens of the intact colon mucosa was $0.1197 \pm 0.019 \mu\text{A}$. Similar results were obtained in the study of biopsies, fixed in formalin: tumor tissue — $0.033 \pm 0.0005 \mu\text{A}$, intact mucosa — $0.0596 \pm 0.0008 \mu\text{A}$. The histological structure of tumors corresponded to adenocarcinoma of various degrees of differentiation. A positive correlation of the results of electrochemical and histological / immunohistochemical studies was observed in all patients. Immunohistochemical study of biopsy specimens with antibodies to non-specific alkaline phosphatase revealed high expression of enzyme in the cell membranes of the glandular crypt's colon epithelium and a weak "background" staining of the cytoplasm and cell membranes of tumor cells.

Conclusion: An electrochemical study with biosensors can be used to assess the alkaline phosphatase content in tumor biopsies and intact colon mucosa. Differences in the content of alkaline phosphatase in the tissue of colon adenocarcinoma and the unmodified mucosa are statistically significant. The existing differences in the study of fresh and fixed in formalin biopsy samples indicate the advisability of non-fixed material using.

Keywords: colorectal cancer, alkaline phosphatase, electrochemical method, biochips

Введение

Колоректальный рак (КРР) – одно из самых распространенных онкологических заболеваний. По данным Американского онкологического общества (2017), он занимает третье место в структуре онкологической патологии в мире, уступая раку легких, раку простаты у мужчин и раку молочной железы у женщин [1]. В 2015 году в России выявлено 30685 новых случаев КРР, заболеваемость составила 26 человек / 100 тыс. населения, а среднегодовой темп прироста составил 2,28%, что является одним из самых высоких среди злокачественных новообразований [2].

Эндоскопическое исследование толстой кишки с биопсией опухоли является «золотым стандартом» диагностики КРР. В последние десятилетия активно изучается роль биосенсоров в диагностике онкопатологии. Биосенсоры (БС) – устройства, которые используют специфические биохимические реакции с участием ферментов, антигенов и антител, органелл, целых клеток или тканей для обнаружения химических соединений как правило с помощью электрических, термических или оптических сигналов. Высокая чувствительность и избирательность БС по отношению к исследуемому веществу, миниатюризация, портативность и невысокая стоимость позволяют успешно использовать как инвазивные, так и неинвазивные БС в рутинной клинической практике [3]. Представляет интерес исследование маркеров функционального атипизма опухолевой ткани с помощью БС, среди которых заслуживает внимания щелочная фосфатаза (ЩФ).

ЩФ – фермент из класса гидролаз, широко распространенный в тканях и органах человека. Известно 4 изоформы ЩФ: кишечная, плацентарная, плацентарно-подобная и неспецифическая,

представленная в костях, печени и почках. Кишечная ЩФ продуцируется в большом количестве в эпителии тонкой и толстой кишки. Литературные данные о содержании кишечной ЩФ в нормальном и малигнизированном эпителии толстой кишки неоднозначны. В исследованиях [4] было показано, что в толстой кишке ЩФ в наибольшем количестве секретируется в верхних отделах кишечных ворсин и ееечных отделах крипт. В настоящее время кишечная ЩФ рассматривается как маркер дифференцировки кишечного эпителия. Было показано, что максимальная концентрация фермента наблюдается лишь в полностью дифференцированных эпителиальных клетках. Известно, что во многих слабодифференцированных колоректальных клеточных линиях уровень экспрессии ЩФ очень низок, почти отсутствует, а ее активность составляет всего лишь $<0,0001 \text{ ед./мг белка}$, тогда как в здоровой дифференцированной клетке кишечного эпителия активность может достигать $>0,7 \text{ ед./мг белка}$ [5]. Предпосылкой для электрохимического определения концентрации ЩФ в биоптатах стал тот факт, что продукты химической реакции между ЩФ и специфическим субстратом – 1-нафтил фосфатом (1-нафтол и 1,4 – дигидрокси-нафталин) обладают электрохимической активностью, т.е. при постоянном напряжении генерируют электрический ток. Таким образом, по величине силы тока можно судить о количестве выделяемых продуктов химической реакции, и, следовательно, об активности ЩФ.

Целью нашего исследования было оценить эффективность электрохимического метода с применением БС для оценки содержания ЩФ в биоптатах опухолей и неизменной слизистой толстой кишки.

Материал и методы исследования

В ходе работы были исследованы биоптаты злокачественных эпителиальных опухолей и неизменной слизистой оболочки толстой кишки у 24 пациентов с помощью электрохимического метода с применением нанотехнологических БС. Биоптаты были получены при проведении эндоскопического исследования толстой кишки на базе Пермского краевого онкологического диспансера. От каждого пациента было исследовано 4 биоптата опухоли и 4 биоптата неизменной слизистой оболочки толстой кишки на расстоянии не менее 10 см от опухолевого узла. Размер каждого биоптата составлял 2 мм³. Одинаковый размер биоптатов был достигнут применением шипцов для биопсии фирмы «Olympus» (пр-во США, арт. номер 026633). До исследования биоптаты хранили отдельно в фосфатном буфере (10 пациентов) и 10% забуференном нейтральном формалине (14 пациентов) при температуре 4°C. Непосредственно перед исследованием фиксированные фрагменты промывали в фосфатном буфере, все фрагменты помещали в термостат при температуре 36°C. Для электрохимического исследования был применен программно-аппаратный комплекс, состоящий из восьмиканального высокочувствительного портативного потенциостата «Palm Sens» (фирма «Palm Instruments BV», Нидерланды) с программой «PSTrace 2.0», мультиплексора, перемешивающего устройства, устройства автономного питания «РИП-24», и набора БС. Мультиплексор и перемешивающее устройство были разработаны на базе кафедры физической электроники и электротехнических систем Тель-Авивского Университета. Все БС были изготовлены методом трафаретной печати в «чистой комнате» лаборатории микросистем Тель-Авивского Университета, обеспечивающей условия контролируемой чистоты атмосферы «класса 100». Биоптаты опухолей и неизменной слизистой оболочки кишки

раздельно помещали в лунки БС, содержащих 270 мкл фосфатного буфера с 1-нафтил фосфатом каждая (концентрация 1-нафтил фосфата в каждой лунке 0,1 мг / мл). После этого БС устанавливали в отсеки перемешивающего устройства. Все электроды соединялись мультиплексором, и работали в непрерывном режиме в условиях перемешивания благодаря подаче воздуха через пипетки перемешивающего устройства. Мультиплексор соединяли с перемешивающим устройством и потенциостатом. Общее время одного измерения составляло 2000 секунд. Реакция между ЩФ и специфическим субстратом 1-нафтил-фосфатом приводила к образованию продуктов (1-нафтола и др), обладающих электрохимической активностью, т.е. при постоянном напряжении генерирующих электрический ток. Результаты электрохимического исследования оценивали по хроноамперограмме. По силе тока, получаемой в ходе эксперимента, судили о количестве выделяемых продуктов реакции, а, следовательно, о содержании исследуемой ЩФ в биоптатах. После окончания эксперимента исследованные биоптаты раздельно помещали в пробирки Эппендорфа с 4 мл 10% забуференного формалина, хранили при комнатной температуре не более 24 часов, затем подвергали гистологическому исследованию с окраской гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону, альциановым синим и иммуногистохимическому исследованию с моноклональными кроличьими антителами к неспецифической ЩФ. Сравнивали результаты электрохимического, гистологического и иммуногистохимического исследований. При оценке статистической достоверности различий (р) сравнивали средние (М) с помощью параметрического критерия – двухвыборочного t-критерия. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования

Вследствие высокого содержания ЩФ в биоптатах эндоскопически неизменной слизистой оболочки толстой кишки регистрировался сигнал тока, который был выше силы тока, наблюдаемого при исследовании биоптатов опухолей. Средняя величина силы тока, полученная при исследовании «свежих» биоптатов опухолей, составила $0,0492 \pm 0,0007$ мкА, биоптатов неизменной слизистой оболочки толстой кишки – $0,1197 \pm 0,019$ мкА. Аналогичные результаты были получены при исследовании биоптатов, фиксированных в формалине: опухоль – $0,033 \pm 0,0005$ мкА, неизменная слизистая оболочка – $0,0596 \pm 0,0008$ мкА. Гистологическая картина опухолей соответствовала аденокарциноме различной степени дифференцировки. Положительная корреляция результатов электрохимического и гистологического исследований наблюдалась у всех пациентов. При

иммуногистохимическом исследовании биоптатов была выявлена высокая экспрессия ЩФ в клеточных мембранах эпителия железистых крипт толстой кишки и слабое «фоновое» окрашивание цитоплазмы и клеточных мембран опухолевых клеток. Были получены различия в результатах электрохимического исследования «свежих» и фиксированных в 10% нейтральном забуференном формалине биоптатов: сила тока при исследовании «свежих» биоптатов была выше силы тока, полученной при исследовании биоптатов, фиксированных в формалине. 10% нейтральный забуференный формалин частично разрушает ЩФ как белковый фермент, что приводит к снижению концентрации кишечной ЩФ, активно реагирующей с субстратом, и, как следствие, более низкой силе тока, получаемой при исследовании биоптатов, фиксированных в формалине.

Обсуждение полученных результатов

Электрохимическое исследование с использованием нанотехнологических БС оказалось эффективным в оценке содержания ЩФ в биоптатах опухолей и неизменной слизистой оболочки толстой кишки. При нарушении дифференцировки эпителия в злокачественных опухолях, т.е. с нарастанием морфологической и функциональной атипии, секреторная активность клеток снижается. Низкий сигнал тока, полученный при электрохимическом выявлении ЩФ в биоптатах опухолей, отражает низкую концентрацию фермента в опухолевых клетках, и, следовательно, нарушение клеточной дифференцировки. Эти изменения являются одним из проявлений функциональной атипии, свойственной злокачественным новообразованиям. В кишечном эпителии ЩФ – это один из маркеров дифференцировки клеток, экспрессирующийся только в зрелых дифференцированных энтероцитах [6]. Аналогичные различия были получены в ходе гистологического и иммуногистохимического исследований опухолей и неизменной слизистой оболочки толстой кишки [7]. Ранее также было показано, что низкая экспрессия ЩФ в опухолях человека различной локализации связана с мутацией в определенных группах генов [8].

Обработка биоптатов нейтральным забуференным формалином влияет на химическую фиксацию тканей, что выражается в длительном сохранении клеточной структуры образца, но большинство ферментов, тем не менее, инактивируются. В разведенных водных растворах (4% или менее) свободного формальдегида нет или он представлен в небольшом количестве, но есть метиленгликоль $\text{CH}_2(\text{OH})_2$ или, в больших концентрациях, полиоксиметилены

$\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$. При экспозиции формальдегид реагирует с несвязанными, но не с протонированными $\text{N2} (-\text{NH}_3^+)$ группами. Первоначально образуются высоко реактивные метиловольные соединения. Такие метиловольные группы конденсируются в метиленовые мостики с соответствующими амидными или пептидными связями, боковыми цепями аргинина и ароматических аминокислот, формируя перекрестные связи между полипептидными цепями в пропорции 1:1 в отношении связей формальдегида и аминогрупп. Получившиеся метиленовые $(-\text{CH}_2-)$ мостики устойчивы и обеспечивают неразрывность и стойкость протеин-содержащих тканей, фиксированных формальдегидом. Именно эти поперечные межмолекулярные связи отвечают за денатурацию связанных белков и неминуемое снижение ферментной активности ферментов, в том числе ЩФ.

По результатам проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Электрохимическое исследование с использованием биосенсоров может быть использовано для оценки содержания щелочной фосфатазы в биоптатах опухолей и неизменной слизистой оболочки толстой кишки. Различия в содержании щелочной фосфатазы в ткани аденокарциномы толстой кишки и неизменной слизистой оболочки статистически достоверны.
2. 10% забуференный формалин частично разрушает щелочную фосфатазу в биоптатах в ходе фиксации, поэтому при электрохимическом исследовании с использованием биосенсоров целесообразно использовать нефиксированный материал.

Литература | Reference

1. Cancer facts and figures: estimated cases of new cancer cases in 2017 year (newsletter) / American Cancer Society. New York. 2017. P. 10.
2. Каприн А. Д. Злокачественные новообразования в России 2015 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова // 2017. – С. 14. *Kaprin A. D., Starinsky V. V., Petrova G. V. Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii 2015 godu (zabolevayemost' i smertnost')* [Malignant neoplasms in Russia in 2015 (morbidity and mortality)] P. A. Gertsen – branch of the Federal State Budgetary Institution "NMIRTS" of the Ministry of Health of Russia Publ., Moscow, 2017, 14 p.
3. Wang J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics / J. Wang // Biosensors and Bioelectronics. – 2006. – no. 21(10). – P. 1887–1892.
4. Kabbat E. A. A histochemical study of distribution of alkaline phosphatase in various normal and neoplastic tissues / E. A. Kabbat, J. Furth // American journal of pathology. – 1940. – № 27. – P. 40–61.
5. Barnard J. A. Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells / J. A. Barnard, G. Warwick // Cell Growth and Differentiation. – 1993. – № 4. – P. 495–501.
6. Hinnebusch B. F. Enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is a target gene of the gut-enriched Kruppel-like factor / B. F. Hinnebusch // American Journal of Physiology. – № 286 (1). – P. 23–30.
7. Giatromanolaki A. Downregulation of intestinal-type alkaline phosphatase in the tumor vasculature and stroma provides a strong basis for explaining amifostine selectivity / A. Giatromanolaki, E. Sivridis, E. Maltezos, M. Koukourakis // Seminars in Oncology. – 2002. – № 29. – P. 14.
8. Mendonka M. S. Characterization of intestinal alkaline phosphatase expression and the tumorigenic potential of gamma-irradiated HeLa X fibroblast cell hybrids / M. S. Mendonka // Cancer research. – 1991. – № 51(16). – P. 4455–62.