
ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ КЛАУДИНА-1 И Ki-67 ПРИ ЛЕЙКОПЛАКИИ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА*

**А.А. Катушкина, В.А. Ковязин,
И.И. Бабиченко**

Кафедра патологической анатомии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

А.С. Григорьян

Лаборатория патологической анатомии
ФГУ «ЦНИИС и ЧЛХ Росмедтехнологий»
ул. Тимура Фрунзе, 16, Москва, Россия, 119021

В статье изучены процессы взаимосвязи между уровнем пролиферации клеток и выраженностью экспрессии белка клаудина-1 при лейкоплакии СОР с различной степенью неопластической трансформации клеток в соответствии с классификацией ВОЗ 2005 года — SIN (Squamous Intraepithelial Neoplasia) и при плоскоклеточном раке. С помощью иммуногистохимического метода была оценена экспрессия клаудина-1 и пролиферация клеток в различных слоях эпителия СОР. Установлена обратная взаимосвязь между уровнем пролиферации клеток и выраженностью экспрессии клаудина-1 при лейкоплакии и плоскоклеточном раке СОР.

Ключевые слова: лейкоплакия, плоскоклеточный рак, слизистая оболочка полости рта, Ki-67, клаудин-1.

Своевременная диагностика злокачественных опухолей различной локализации, в том числе плоскоклеточного рака слизистой оболочки рта (СОР), является актуальной задачей современной медицины. В настоящее время для ее решения изучаются механизмы прогрессии опухолей, а также гены и белковые продукты, участвующие в этом процессе.

Отличительной особенностью многослойного плоского эпителия является тот факт, что он образует слои, в которых отдельные клетки прочно связаны между собой и с подлежащей базальной мембраной. В основе механизма подобных связей лежат кадгерин-катениновая система клеток и их плотные контакты (ПК).

ПК формируются из мембранных, цитоплазматических белков и белков цитоскелета. Клаудины относятся к группе мембранных белков, состоящей из 24 видов, с молекулярной массой от 20 до 27 кДа. Их основной функцией является формирование волокон, структурных и функциональных центров ПК в плазматической мембране клеток [4, 5, 7, 9]. Изменения экспрессии клаудинов часто ассоциируются с раковыми опухолями различной локализации, что свидетельствует об их потенциальном участии в онкогенезе [9].

Целью данного иммуногистохимического исследования являлось изучение особенностей экспрессии белка клаудина-1 (Cl-1) в зависимости от уровня пролиферативной активности клеток при лейкоплакии с различной выраженностью неопластических изменений клеток (SIN1, SIN2, SIN3) и плоскоклеточном раке СОР.

* Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009—2013 гг.

Материалы и методы исследования. В работе использовали операционный и архивный материал лаборатории патологической анатомии ФГУ «ЦНИИС и ЧЛХ Росмедтехнологий» за период с января 2007 года по декабрь 2009 года. Были исследованы биоптаты слизистой оболочки рта 67 пациентов (18 мужчин, 49 женщин). Средний возраст составил 41,7 год. У 12 больных (17,9%) диагностирован плоскоклеточный рак, у 45 пациентов (67,2%) — лейкоплакия и у 10 (14,9%) — патологических изменений выявлено не было. В 18 случаях (40%) лейкоплакия соответствовала SIN1, в 17 случаях (37,78%) — SIN2 и в 10 случаях (22,22%) — SIN3.

Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине. Для гистологического и иммуногистохимического исследования (ИГХ) серийные срезы толщиной 5 мкм монтировали на стекла, покрытые поли-L-лизинном. Выявление тканевых антигенов осуществляли с помощью моноклональных антител к Ki-67 (MM1, Diagnostic Biosystems) и очищенных антител кроличьей антисыворотки к клаудину-1 (LabVision). Выявление иммунных комплексов проводили при помощи безбиотиновой системы детекции на основе пероксидазы хрена (BioGenex, США), срезы докрашивали гематоксилином Майера. Индекс пролиферации по Ki-67 (ИП Ki-67) определяли отношением количества иммунореактивных ядер клеток к общему числу ядер в %. Экспрессию клаудина-1 (Cl-1) выявляли на наружной мембране эпителиальных клеток по критерию H-score. При этом: 0 — экспрессии не отмечалось; 1 — экспрессия отмечалась менее $\frac{1}{3}$ поверхности мембраны; 2 — от $\frac{1}{3}$ до $\frac{2}{3}$ поверхности мембраны; 3 — более $\frac{2}{3}$ поверхности мембраны. В связи с тем, что пролиферация клеток при лейкоплакии наблюдается только в нижних слоях эпителия, данные маркеры определяли в ста клетках четырех рядов: первый ряд (базальный) — клетки, непосредственно прилегающие к базальной мембране и три последующих ряда клеток. Оценку показателей проводили в соответствующих участках тканей. Подсчет клеток производили при увеличении $\times 400$.

Статистическая обработка данных проводилась в программном пакете SPSS 17.0 (SPSS Inc., 2007) стандартными методами с определением средней арифметической (M) и среднего квадратического отклонения (σ). При сравнении средних использован H-критерий Краскела-Уоллеса различия считались значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Пролиферативная активность в исследуемом материале выявлялась с помощью маркера Ki-67, который определялся в ядрах пролиферирующих клеток. В неизменном эпителии СОР иммунопозитивные клетки локализовались в базальном слое; при лейкоплакии (SIN1) — в первом и во втором рядах; при лейкоплакии (SIN2) — в первых трех рядах клеток; при лейкоплакии (SIN3) — в клетках четырех рядов; при плоскоклеточном раке СОР отмечалось диффузное распределение пролиферирующих клеток во всех слоях эпителия. Средние значения количественных показателей представлены в таблице (табл.).

Имуногистохимически белок клеточной адгезии Cl-1 выявлялся на поверхности плазматической мембраны эпителиальных клеток. При ИГХ исследовании неизменного многослойного плоского эпителия СОР выраженная экспрессия отмечалась в клетках всех исследованных слоев. Изучение лейкоплакии выявило

следующие закономерности: при SIN1 максимальная экспрессия Cl-1 наблюдалась в 3-м и 4-м клеточных рядах, во 2-м ряду — экспрессия Cl-1 была менее выражена и занимала от $1/3$ до $2/3$ поверхности мембраны всех клеток, в базальном слое — в 3 случаях экспрессии Cl-1 не наблюдалось; во всех лейкоплакиях с SIN2 и SIN3 в 1-м и 2-м рядах Cl-1 не выявлен, а в 3-м и 4-м рядах клеток интенсивность экспрессии этого белка увеличивалась по мере снижения картины неопластической трансформации клеток. Экспрессия клаудина-1 при SIN1, SIN2 и SIN3 во всех клеточных рядах достоверно отличалась от нормы. Выявлены также достоверные различия его экспрессии между различными видами плоскоклеточной внутриэпителиальной неоплазии. При плоскоклеточном раке Cl-1 обнаружен только на поверхности нескольких клеток 4-го ряда, в 2 случаях высокодифференцированного рака СОР. Экспрессия клаудина-1 на поверхности эпителиальных клеток при плоскоклеточном раке достоверно отличалась от экспрессии при различных видах SIN.

Таблица

Особенности экспрессии белков клаудина-1 и Ki-67 в эпителиальных клетках СОР

Диагноз (кол-во)	Клаудин-1 (H-score)				Ki-67, %			
	1-й ряд	2-й ряд	3-й ряд	4-й ряд	1-й ряд	2-й ряд	3-й ряд	4-й ряд
Норма (10)	292 ± 13	300 ± 0	300 ± 0	300 ± 0	24 ± 3	5 ± 2	0 ± 0	0 ± 0
Sin1 (18)	84 ± 42*	201 ± 55*	300 ± 0	300 ± 0	23 ± 3	7 ± 1	4 ± 2*	0 ± 0
Sin2 (17)	0 ± 0#	0 ± 0#	122 ± 18#	272 ± 24#	26 ± 3	17 ± 2#	14 ± 2#	0 ± 0
Sin3 (10)	0 ± 0	0 ± 0	31 ± 41&	116 ± 31&	13 ± 2&	26 ± 3&	25 ± 3&	10 ± 3&
Рак (12)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0^	5 ± 12^	75 ± 13^	64 ± 10^	70 ± 13^	50 ± 14 ^

Примечание: * значимо по сравнению с нормой ($P < 0,05$); # значимо по сравнению с SIN1; & значимо по сравнению с SIN2; ^ значимо по сравнению с SIN3.

Основным звеном патогенеза опухолей является повышение пролиферативной активности клеток. Универсальным маркером пролиферации при иммуногистохимических исследованиях (ИГХ) является белок Ki-67, поскольку он выявляется в клетке во всех фазах митотического цикла, кроме G0 [1]. Проведенные исследования показали, что повышение пролиферативной активности клеток многослойного плотного эпителия при лейкоплакии и раке СОР сопровождается уменьшением экспрессии клаудина-1 на поверхности плазматической мембраны, что ведет к снижению межклеточной адгезии, приводит к снижению обмена сигнальными субстанциями, которые могли бы тормозить деление и миграцию клеток [2, 3, 8, 9]. В свою очередь, приобретение злокачественными клетками свойства отделяться от исходной клеточной массы за счет ослабления межклеточных контактов ведет к опухолевой прогрессии.

Заключение

Проведенные исследования выявили наличие обратной взаимосвязи между выраженностью пролиферации клеток и экспрессией в них клаудина-1. Высокий уровень клеточной пролиферации при лейкоплакии и плоскоклеточном раке СОР характеризовался снижением уровня экспрессии клаудина-1, а выраженная клеточная неоплазия — полным отсутствием данного белка на клеточной поверхности. Таким образом, белок клеточной адгезии клаудин-1 может служить критерием для ранней диагностики неопластической трансформации клеток при лейкоплакии и плоскоклеточном раке СОР.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Бабиченко И.И., Ковязин В.А.* Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста. — М.: Изд-во РУДН, 2008. — 109 с.
- [2] *Георгиев Г.П.* Молекулярно-генетические механизмы прогрессии опухолей // Соросовский Образовательный Журнал. — 2000. — № 11. — С. 2—7.
- [3] *Пальцев М.А., Иванов А.А.* Межклеточные взаимодействия. — М.: Медицина, 1995. — 224 с.
- [4] *Alan S. Fanning, Laura L. Mitic, James Melvin Anderson.* Transmembrane Protein in the Tight Junction Barrier // *J Am Soc Nephrol.* — 1999. — V. 10. — P. 1337—1345.
- [5] *Andrea Hartsock, W. James Nelson.* Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton // *Biochim Biophys Acta.* — 2008. — V. 3 — P. 660—669.
- [6] *Leon Barnes, John W. Eveson, Peter Reichart et al.* Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. — IARC, 2005. — P. 430.
- [7] *Mikio Furuse.* Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junction // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* — 2010. — V. 2.
- [8] *Naohisa Oku, Eri Sasabe, Eisaku Ueta et al.* Tight Junction Protein Claudin-1 Enhances the Invasive Activity of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells by Promoting Cleavage of Laminin-5 γ 2 Chain via Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and Membrane-Type MMP-1 // *Cancer Res.* — 2006. — V. 66. — P. 5251—5257.
- [9] *Susanne Angelow, Robert Ahlstorm, Alan S.L. Yu.* Biology of claudins // *Am J Physiol Renal Physiol.* — 2008. — V. 295. — P. 867—874.

CLAUDIN-1 AND KI-67 EXPRESSION IN ORAL LEUKOPLAKIA AND ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

**A.A. Katushkina, V.A. Koviazin,
I.I. Babichenko**

Department of Pathological Anatomy
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

A.S. Grigorian

Laboratory of Pathologic Anatomy
Central Research Institute for Stomatology
Timur Frunze str., 16, Moscow, Russia, 119021

The correlation was investigated between the level of cell proliferation and the intensity of claudin-1 expression in oral Leukoplakia with different grade of cell neoplastic transformation (according to WHO classification 2005, — SIN — Squamous Intraepithelial Neoplasia) and in oral Squamous cell carcinoma. Claudin-1 expression and cell proliferation were assessed using immunohistochemistry in different epithelial layers of oral mucosa. The inverse correlation was revealed between the level of cell proliferation and the intensity of claudin-1 expression in oral Leukoplakia and oral Squamous cell carcinoma.

Key words: leukoplakia, squamous cell carcinoma, oral mucosa, Ki-67, claudin-1.