

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ: ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

С.С. Коновалов¹, доктор медицинских наук, профессор,
О.М. Литвякова¹, кандидат медицинских наук, **Н.С. Линькова**¹, кандидат биологических наук,
Е.В. Седов¹, **Т.В. Кветная**¹, доктор биологических наук, профессор,
С.У. Мурсалов¹, кандидат медицинских наук, **А.О. Дурнова**², кандидат биологических наук,
Г.Х. Толибова², кандидат медицинских наук, **А.В. Костылев**¹, кандидат биологических наук

¹Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО, РАМН;

²НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО, РАМН

E-mail: miayu@yandex.ru

В буккальном эпителии у женщин, страдающих раком молочной железы, верифицировано снижение экспрессии сигнальных молекул RON, CD90, CD73, CD64, Pax6, Chx10, RTF1, Oct2, отражающих состояние локального и системного гомеостаза организма. Наиболее информативными маркерами, свидетельствующими о высокой степени вероятности развития этой онкологической патологии, являются факторы противоопухолевой защиты CD64 и RON, а также маркеры терминальной дифференцировки клеток – Oct2 и Chx10.

Ключевые слова: рак молочной железы, буккальный эпителий, сигнальные молекулы

IMMUNOCYTOCHEMISTRY OF THE BUCCAL EPITHELIUM: OPTIMISATION OF DIAGNOSTICS OF BREAST CANCER

S.S. Konovalov¹, **O.M. Litviakova**¹, **N.S. Linkova**¹, **E.V. Sedov**¹,
T.V. Kvetnaia¹, **S.U. Mursalov**¹, **A.O. Durnova**², **G.Kh. Tolibova**², **A.V. Kostylev**¹

¹Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology,

²Federal State Budgetary Institution «The Research Institute of Obstetrics and Gynecology named after D.O. Ott» of the North-West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences

The expression of signal molecules RON, CD90, CD73, CD64, Pax6, Chx10, RTF1, Oct2, which characterized the status of local and system homeostasis have been verified in the buccal epithelium from women with breast cancer. The most important markers, correlated with probability of oncology are the factors of anticancer protection CD64 and RON as well as molecules of terminal cells differentiation Oct2 and Chx10.

Key words: breast cancer, buccal epithelium, signal molecules

Рак молочной железы (РМЖ) относится к числу наиболее распространенных злокачественных заболеваний у женщин. В США риску развития данной патологии подвержена каждая 8-я женщина, в Европе – 1 из 12 женщины, а в Японии – 1 из 80. В России стандартизованный показатель заболеваемости в 1996 г. составил 35,9 на 100 тыс. при среднегодовом темпе роста 3,8% [3].

Таким образом, актуальной задачей молекулярной медицины является поиск неинвазивных высокоинформативных методов превентивной диагностики РМЖ.

Известно, что изменение функциональной активности клеток буккального эпителия во многом

отражает состояние локального и системного гомеостаза организма, в том числе при онкологических заболеваниях [2, 4]. Установлено, что иммуногистохимическое исследование экспрессии сигнальных молекул в буккальном эпителии может использоваться как диагностический маркер опухолей различных локализаций. Так, в буккальном эпителии изменяется соотношение синтеза E-кадгерина и катепсина-Д при возникновении опухолей в области шеи и головы [12], повышается синтез протеина S100A7 [11]; при карциноме молочной железы снижается экспрессия хемокина CXCL12, транскрипционного фактора WNT-5A, кластеров дифференцировки CD51, CD64, CD90 и CD73 [1].

В связи с этим целью данной работы была сравнительная оценка экспрессии сигнальных молекул в буккальном эпителии у здоровых женщин и больных РМЖ.

Методика. Для исследования были использованы образцы буккального эпителия, взятые у 50 пациенток в возрасте от 37 до 73 лет, с помощью цитощетки со слизистой оболочки щеки. Цитологические мазки готовили методом жидкостной цитологии с использованием автоматизированной системы Novoprep «NRS» (Франция).

Все женщины были разделены на 2 группы: 1-я (n=20) – без онкологической патологии, 2-я (n=30) – больные РМЖ во II–III стадиях.

Для иммуноцитохимического исследования использовали первичные моноклональные антитела к маркерам RON, CD90, CD73, CD64, Pax6, Chx10, RTF1, Oct2, Prox1, в разведении 1:50 и вторичные антитела – биотинилированные антимышьи иммуноглобулины (все реагенты от Novocastra). Пермеабиллизацию проводили с применением 0,1% тритона X100. Визуализацию реакции выполняли с применением пероксидазы хрена и диаминобензидина («EnVision Detection System», Peroxidase/DAB, Rabbit, Mouse). Результаты иммуноцитохимического окрашивания оценивали морфометрическим методом на микроскопе «Nikon Eclipse» E400 с применением цифровой камеры «Nikon» DXM1200 и программного обеспечения «Videotest Morphology 5.2». В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении $\times 200$. Площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в %.

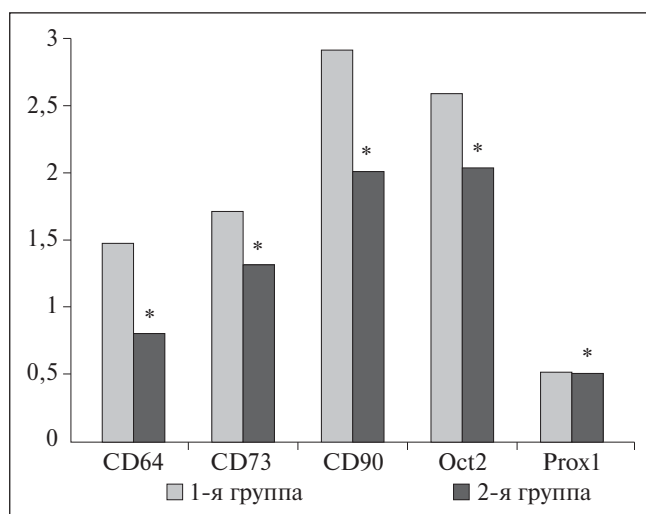


Рис. 1. Площадь экспрессии сигнальных молекул – маркеров функциональной активности и дифференцировки иммунных клеток у здоровых женщин (1-я группа) и больных РМЖ (2-я группа). * – $p < 0,05$ – по сравнению с соответствующим показателем у женщин без онкологической патологии (здесь и на рис. 2).

Выбор исследуемых сигнальных молекул был обусловлен их участием в иммунном ответе, дифференцировке клеток и развитии онкологических заболеваний. Так, маркер CD64 инициирует цитолиз опухолевых клеток моноцитами человека [6]. Гликопротеин CD73 активирует пролиферацию лимфоцитов и их адгезию к эндотелию сосудов, а снижение его экспрессии является причиной развития иммунодефицита, что может коррелировать с увеличением частоты развития опухолей [13]. Угнетение синтеза белка CD90 также наблюдается при развитии опухолей различного генеза [8]. Транскрипционные факторы Pax6, Chx10, Oct2, Prox1 регулируют дифференцировку клеток, а изменение уровня их экспрессии может приводить к неконтролируемой пролиферации клеток [7, 9]. Транскрипционный фактор RTF1 активирует экспрессию генов, кодирующих белки теплового шока, участвующие в адаптации организма к стрессорным воздействиям [10].

Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли в программе «Statistica 7.0». Для сравнения и оценки межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни, который является наиболее точным методом для сравнения выборок, включающих 10–15 элементов. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия сигнальных молекул RON, CD90, CD73, CD64, Pax6, Chx10, RTF1, Oct2 и Prox1 была верифицирована в буккальном эпителии у обследованных обеих групп, однако площадь экспрессии 8 из 9 изученных маркеров в группах достоверно различалась.

Так, среди молекул – кластеров дифференцировки CD90, CD73, CD64 экспрессия в буккальном эпителии у больных РМЖ снижалась для маркера CD90 – на 46%, для CD73 – на 30% и для CD64 – на 92% по сравнению с показателями у здоровых женщин (рис. 1). Таким образом, наиболее информативным маркером онкологической патологии при анализе буккального эпителия является гликопротеин CD64, отражающий снижение уровня цитолиза опухолевых клеток в организме.

Следует отметить, что в обеих исследуемых группах площадь экспрессии маркера дифференцировки иммунных клеток Prox1 была одинаковой, однако у женщин с онкологической патологией (2-я группа) отмечалось снижение синтеза транскрипционного фактора Oct2 – маркера дифференцировки лимфоцитов – на 28% (см. рис. 1). Следовательно, развитие РМЖ может коррелировать со снижением функциональной активности лимфоцитов, но не других типов иммунных клеток. Кроме того, во 2-й группе наблюдалось снижение экспрессии протеина RTF1

на 46% по сравнению с контролем (рис. 2), что указывает на снижение устойчивости организма женщин с онкологической патологией к стрессорным воздействиям. Площадь экспрессии маркеров RON, Pax6 и Chx10 в буккальном эпителии при РМЖ достоверно снижалась по сравнению с показателем у здоровых обследуемых соответственно на 44; 24 и 60% (см. рис. 2). Таким образом, на системном уровне признаками развития новообразований являются снижение способности клеток к терминальной дифференцировке (маркер Chx10) и подавление экспрессии белка RON, участвующего в противоопухолевой защите организма.

Полученные данные позволяют считать, что буккальный эпителий может быть высокоинформативным материалом для ранней диагностики нарушений экспрессии сигнальных молекул, коррелирующих с высокой вероятностью развития РМЖ. Наиболее информативными сигнальными молекулами, экспрессия которых снижается в буккальном эпителии при РМЖ, являются факторы противоопухолевой защиты организма CD64 и RON, что совпадает с данными других исследователей [5, 6]. Кроме того, у пациенток с онкологической пато-

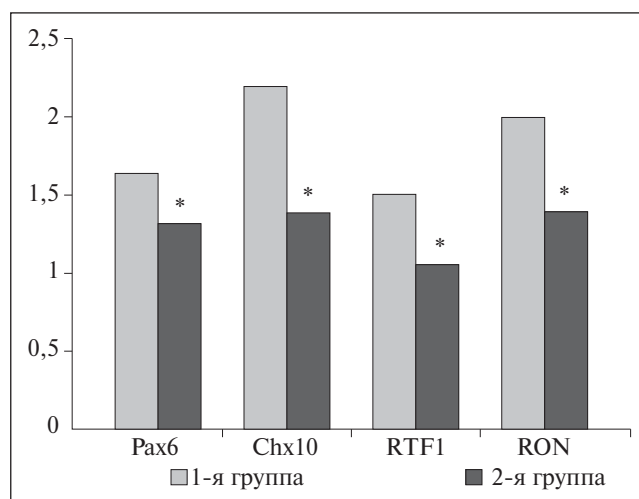


Рис. 2. Площадь экспрессии сигнальных молекул – маркеров дифференцировки различных типов клеток у здоровых женщин (1-я группа) и больных РМЖ (2-я группа)

логией рекомендуется исследование в буккальном эпителии маркеров терминальной дифференцировки клеток – Oct2 и Chx10.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О. и др. Сигнальные молекулы в буккальном эпителии: оптимизация диагностики социально значимых заболеваний // Молекул. медицина. – 2012; 4: 18–23.
2. Рыжавский Б.Я., Холодок Г.Н. Изменения буккального эпителия при некоторых заболеваниях у детей // Клин. лаб. диагностика. – 1995; 2: 39–40.
3. Савельева И.С. Молочные железы и гормональная контрацепция // Гинекология. – 1999; 1 (2): 135–42.
4. Хусаинова И.С., Варулева И.Ю., Кожина Н.А. Оценка цитологических показателей буккального эпителия для диагностики функционального состояния человека // Клин. лаб. диагностика. – 1997; 3: 10–2.
5. Chen W., Liu J., Meng J. et al. A novel variant of the RON receptor tyrosine kinase derived from colorectal carcinoma cells which lacks tyrosine phosphorylation but induces cell migration // Exp. Cell. Res. – 2012; 1234–9.
6. Chen W., Liu J., Meng J. et al. Macrophage polarization induced by neuropeptide methionine enkephalin (MENK) promotes tumoricidal responses // Cancer. Immunol. Immunother. – 2012; 61 (10): 1755–68.
7. Ciarimboli G., Lancaster C., Schlatter E. et al. Proximal tubular secretion of creatinine by organic cation transporter OCT2 in cancer patients // Clin. Cancer. Res. – 2012; 15 (4): 1101–8.
8. Ji J., Wang X. Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma // Semin. Oncol. – 2012; 39 (4): 461–72.
9. Moreira E., Adler R. Effects of follistatin overexpression on cell differentiation in the chick embryo retina // Dev. Biol. – 2006; 298 (1): 272–84.
10. Mornex F., Girard N., Merle P. et al. Tolerance and efficacy of conformal radiotherapy for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. Results of the French RTF1 phase II trial // Cancer Radiother. – 2005; 9 (6–7): 470–6.
11. Tripathi S., Matta A., Kaur J. et al. Nuclear S100A7 is associated with poor prognosis in head and neck cancer // PLoS One. – 2010; 3: 123–9.
12. Yogesh T., Narayan T., Shreedhar B. et al. The expression of E-cadherin and cathepsin-D in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: A comparative analysis between immunohistochemistry and routine histopathology // J. Oral. Maxillofac. Pathol. – 2011; 15 (3): 288–94.
13. Zhang B. CD73 promotes tumor growth and metastasis // Oncoimmunology. – 2012; 1 (1): 67–70.