

2. Мордовцев В.Н., Мордовцева В.В., Мордовцева В.В. Наследственные болезни и пороки развития. М.: Наука; 2004: 40—4.
3. Вульф К., Джонсон Р., Сюрмон Д. Дерматология по Томасу Фитцпатрику. М.: Практика; 2007. 2.
4. Osbone I.P., Fruer A., Webb D. Epidemiology of tuberous sclerosis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1991; 615: 125—8.
5. Hoffman Ch., Schreiner W.D. Residivierender Spontanpneumothorax Symptom des Morbus Bourneville—Pringle. Hautarzt. 1980; 31(2): 91—5.
6. Hunt A. Psychiatric and Psychological Aspects. In: Gomes M., Sampson J., Whittemore V., eds. Tuberous sclerosis. New York-Oxford: Oxford University Press; 1999: 47—62.

Поступила 15.11.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.5-006.5/6-092:612.014.1

Особенности экспрессии Т-кадгерина в кератиноцитах и сосудах эпителиальных опухолей кожи

К.А. Рубина¹, В.Ю. Сысоева¹, Е.В. Семина², Е.И. Юрлова¹, В.А. Молочков³, А.Н. Хлебникова³, Т.Г. Седова³

¹Кафедра биохимии и молекулярной медицины (руководитель — акад. В. А. Ткачук) факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова; ²лаборатория молекулярной эндокринологии НИИ экспериментальной кардиологии (директор — доктор биол. наук В. П. Ширинский) Российского кардиологического научно-производственного комплекса Минздрава России; ³кафедра кожных и венерических болезней (зав. — проф. В.А. Молочков) ФППОВ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

Изучена экспрессия Т-кадгерина в нормальной коже, при псориазе, эпителиальных доброкачественных и злокачественных опухолях кожи. В нормальной коже Т-кадгерин экспрессировали базальные клетки эпидермиса, базальная экспрессия также отмечалась при псориазе, актиническом кератозе, кератоакантоме и поверхностной базалиоме. В клетках злокачественных новообразований (инфильтративная базалиома, метатипический и плоскоклеточный рак) экспрессия Т-кадгерина в опухолевых клетках была резко снижена. Клетки эндотелия сосудов нормальной кожи и доброкачественных новообразований экспрессировали фактор Виллебранда (vWF) и Т-кадгерин. Потеря экспрессии классических маркеров эндотелиальных клеток (vWF), экспрессия α-актина в сосудодобных структурах и гетерогенность в экспрессии Т-кадгерина на сосудах опухолей коррелировали с гистологическими признаками и инвазивным фенотипом более агрессивных опухолей, таких как метатипический рак, инвазивная базалиома и плоскоклеточный рак.

Ключевые слова: опухолевый неангиогенез, эпителиальные опухоли кожи, Т-кадгерин, фактор Виллебранда, α-актин

EXPRESSION OF T-CADHERIN IN KERATINOCYTES AND VESSELS OF EPITHELIAL TUMORS OF THE SKIN

K.A.Rubina, V.Yu.Sysoeva, E.V.Semina, E.I.Yurlova, V.A.Molochkov, A.N.Khlebnikova, T.G.Sedova

The expression of T-cadherin was studied in normal skin, in psoriasis, epithelial benign and malignant tumors of the skin. In normal skin T-cadherin was expressed by epidermal basal cells. Basal expression was also detected in psoriasis, actinic keratosis, keratoacanthoma, and surface basiloма. The expression of T-cadherin was significantly lower in malignant tumor cells (infiltrative basiloма, metatypical and squamous cell cancer). Normal skin vascular endotheliocytes and benign tumor cells expressed von Willebrand's factor (vWF) and T-cadherin. Loss of expression of the classical markers of endothelial cells (vWF), expression of α-actin in vessel-like structures, and heterogeneity of T-cadherin expression in tumor vessels correlated with histological signs and invasive phenotypes of more aggressive tumors, such as metatypical cancer, invasive basiloма, and squamous cell carcinoma.

Key words: tumor neoangiogenesis, skin epithelial tumors, T-cadherin, von Willebrand's factor, α-actin

Несмотря на то, что большинство опухолевых образований кожи сохраняют сходство с нормальной

тканью, из которой они происходят, существуют некоторые варианты с сильно измененной структурой, что

Сведения об авторах:

Рубина Ксения Андреевна — канд. биол. наук, доцент, старший науч. сотр.; Сысоева Вероника Юрьевна — канд. биол. наук, старший преподаватель; Семина Екатерина Владимировна — канд. биол. наук, науч. сотр.; Юрлова Екатерина Ивановна — канд. биол. наук; Молочков Владимир Алексеевич — д-р мед. наук, проф.; Хлебникова Альбина Николаевна — д-р мед. наук, доцент (alb9696@yandex.ru); Седова Татьяна Геннадьевна — канд. мед. наук, доцент.

создает трудности для постановки морфологического диагноза. В отличие от доброкачественных опухолей, которые и формируют компактную массу опухолевых клеток на месте их образования, злокачественные опухоли кожи состоят из клеток, способных проникать через базальную мембрану и метастазировать в другие органы через кровь и лимфатические сосуды. Кроме того, злокачественные новообразования часто характеризуются более высокой скоростью роста, низкой степенью дифференцировки, что гистологически проявляется повышенным митотическим индексом, клеточным и ядерным плеоморфизмом. Одним из важнейших вопросов для диагностики, прогноза и лечения новообразований кожи является дифференциальный диагноз между доброкачественными и злокачественными опухолями кожи.

Обнаружено множество молекулярных маркеров, помогающих определить степень агрессивности и инвазивности новообразований кожи. К таким маркерам относят изменение экспрессии p53, повышение экспрессии транскрипционных факторов, матриксных металлопротеиназ, mib1, Ki-67, c-kit, p63, увеличение фосфорилирования регуляторных белков и рецепторов факторов роста, а также снижение экспрессии E-кадгерина, которое происходит параллельно с повышением экспрессии N-кадгерина и белка десмосом — десмоглеина [1—6].

Т-кадгерин и опухолевый рост

Важную роль в прогрессии опухолей играет неклассический член семейства кадгеринов Т-кадгерин [7]. Как и у классических кадгеринов, у Т-кадгерина есть внеклеточный домен, но в отличие от них он не имеет трансмембранного и цитоплазматического доменов и заякорен на цитоплазматической мембране при помощи гликозилфосфатидилинозитольного (ГФИ) якоря [8]. Поскольку трансмембранный и цитоплазматический домены классических кадгеринов играют ключевую роль в поддержании межклеточных контактов, предполагают, что главная функция Т-кадгерина не связана с межклеточной адгезией [9, 10]. Как и другие ГФИ-заякоренные белки, Т-кадгерин локализуется в липидных плотках/кавеолах [11—13]. Липидные плотки представляют собой участки цитоплазматической мембраны, богатые холестеролом и сфинголипидами и содержащие ГФИ-заякоренные белки и такие сигнальные молекулы, как киназы Src-семейства, рецептор урокиназы и др. [14].

Показано, что Т-кадгерин участвует в регуляции клеточной адгезии, миграции, пролиферации и выживаемости клеток через активацию внутриклеточной сигнализации. В ряде работ было выдвинуто предположение о том, что Т-кадгерин функционирует как фактор опухолевой супрессии; снижение его экспрессии в результате аллельной потери, или гиперметилирования промотора гена, или в результате других причин связывают с ростом и метастазированием определенных видов опухолей [7, 15]. Подавление экспрессии Т-кадгерина коррелирует со злокачественностью фенотипа и онкогенностью рака молочной железы, легких и желчного пузыря [16—18]. Однако при других типах опухолей, таких как рак яичников и остеосаркома, снижение экспрессии Т-кадгерина коррелировало с лучшей выживаемостью пациентов [19, 20]. Повышение экспрессии Т-кадгерина характерно для инвазивных гепатоцеллюлярных карцином и астроцитом, характеризующихся высокой степенью злокачественности, что связано со злокачественной трансформацией астроцитов [21].

Данные о немеланомных новообразованиях кожи и предраковых состояниях весьма противоречивы. В нормальной коже Т-кадгерин экспрессируется в кератиноцитах базального клеточного слоя [22]. При солнечном (актиническом) кератозе наибольшую экспрессию Т-кадгерина наблюдают в атипичных кератиноцитах, в то время как при болезни Боуэна экспрессия

Т-кадгерина сильно изменяется и, в общем и целом, снижается по сравнению с таковой в нормальной коже [23]. Экспрессия Т-кадгерина полностью отсутствует при инфильтрирующем плоскоклеточном раке кожи (ПРК) в связи с нарушением метилирования и делецией гена, а также снижается при базальноклеточной карциноме кожи [22, 24, 25]. В иммортализованной клеточной линии кератиноцитов из плоскоклеточной карциномы повышение экспрессии Т-кадгерина приводит к снижению пролиферации клеток [26].

В то время как одни авторы исследовали корреляцию между гиперметилированием промотора Т-кадгерина или аллельной потерей или изменением экспрессии гена и опухолевой прогрессией, другие изучали эффекты реэкспрессии Т-кадгерина на злокачественные свойства опухолевых клеток на животных моделях при введении клеток *in vivo* мышам. Уменьшение роста опухолей при реэкспрессии Т-кадгерина наблюдают в клетках меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы и карциномы молочной железы [27—29]. Трансфекция клеток молочной железы кДНК Т-кадгерина приводит к подавлению их пролиферации в культуре, что также сопровождается трансформацией фенотипа из злокачественного в нормальный [30]. Повышение экспрессии Т-кадгерина в клетках нейробластомы вызывает подавление способности этих клеток к инвазии и пролиферации в ответ на добавление эпидермального фактора роста (EGF) [31]. Гиперэкспрессия Т-кадгерина в клетках глиомы С6 сочетается со снижением их миграционной активности и подавлением роста и пролиферации клеток в результате блокады клеточного цикла на стадии G₂ [32].

Таким образом, данные *in vivo* и *in vitro* исследований позволяют предполагать, что Т-кадгерин является эндогенным негативным регулятором пролиферации кератиноцитов. Однако как показано ранее, активно пролиферирующие кератиноциты базального слоя эпидермиса также экспрессируют Т-кадгерин, что может свидетельствовать о том, что механизмы участия Т-кадгерина в регуляции роста и инвазии опухолей сложнее, чем просто влияние на пролиферацию клеток.

Т-кадгерин и васкуляризация опухолей

Опухоли способны расти до размера 1—2 мм³ без неоваскуляризации, получая все необходимые питательные вещества путем диффузии. Опухоли, которые не способны стимулировать рост новых сосудов и капилляров, не превышают этот размер [33, 34]. В том случае, если васкуляризация не происходит, новообразованная ткань подвергается некрозу или апоптозу, в то время как рост новых сосудов в опухоль напротив, стимулирует ее рост и прогрессию [35, 36]. Зависимость роста и прогрессии опухолей от неоваскуляризации лежит в основе очень важной и перспективной стратегии противоопухолевой терапии [34, 37]. Хорошо известно, что по сравнению с антипролиферативными препаратами препараты с антиангиогенным действием вызывают быстрое и резкое подавление роста сосудов новообразований, приводя к последующей массивной гибели клеток опухоли [38, 39].

Ангиогенез — процесс, при котором происходят деление и миграция эндотелиальных клеток с последующим формированием новых сосудов, поддерживающих рост и питание опухоли [40, 41]. Опухолевый неоваскуляризация спровоцирован повышением экспрессии клетками опухоли или стромальными клетками таких проангиогенных факторов, как VEGF, или снижением экспрессии антиангиогенных факторов, или и того и другого одновременно [42]. Многие авторы склоняются к тому, что ангиогенез играет ключевую роль в опухолевой прогрессии и метастазировании большинства солидных опухолей человека [42—44]. Во время опухолевого ангиогенеза описывают определенную последовательность событий, приводящих к направленной миграции эндотелиальных клеток через базальную мембрану и миграции периваскулярных стромальных клеток к клеткам опухоли, продуцирующим специфические ангиогенные сигналы. При нормальном ангиогенезе сначала происходят миграция и пролиферация эндотелиальных клеток, а затем гладкомышечные клетки и перicyты стабилизируют вновь сформированные сосуды. Однако вновь сформированные сосуды опухолей обычно представляют собой нестабилизированные тонкостенные капилляры

или синусоиды, состоящие из одного слоя эндотелиальных клеток с базальной мембраной и предрасположенные к спонтанным гемorragиям и тромбозам [45, 46].

Возможно, что Т-кадгерин способен влиять на опухолевый рост не только за счет регуляции пролиферации самих опухолевых клеток, но и подавления неоваскуляризации опухолей. В норме Т-кадгерин экспрессируется в эндотелиальных клетках и клетках сосудистой стенки (гладкомышечные клетки и перicyты) [47]. Однако, как показано в результате во многих исследованиях, паттерн экспрессии Т-кадгерина в сосудах опухолей оказывается измененным по сравнению с таковыми в нормальной ткани [47]. В метастазах в легкие карциномы Льюиса и тератокарциномы F9, раке простаты PC-3 и в рабдомиосаркомы A673 экспрессия Т-кадгерина в эндотелиальных клетках сосудов, проникающих в опухоль, повышена, а в кровеносных сосудах метастазов в легкие меланомы B16F10 экспрессию Т-кадгерина не обнаруживают [48]. На модели рака молочной железы у трансгенных мышей, вызванного вирусом полиомы (MMTV-polyoma virus middle T — PyV-mT), с инактивированным геном Т-кадгерина показано, что недостаток Т-кадгерина подавляет васкуляризацию и рост опухоли молочной железы [49].

При опухолевой неоваскуляризации гепатоцеллюлярной карциномы выявляют повышение экспрессии Т-кадгерина в эндотелиальных клетках внутриопухолевых капилляров, хотя в окружающей ткани и ткани печени Т-кадгерин не обнаруживают [50]. Такое повышение экспрессии Т-кадгерина в эндотелиальных клетках гепатоцеллюлярной карциномы коррелирует со степенью опухолевой прогрессии [50]. Участие Т-кадгерина в ангиогенезе меланомы показано *in vitro* на модели сфероидов, сформированных опухолевыми клетками при сокультивировании с эндотелиальными клетками: повышение экспрессии Т-кадгерина в эндотелиальных клетках потенцировало неоангиогенез [51]. Не исключено, что противоречивые данные, полученные при изучении роли Т-кадгерина в опухолевой прогрессии *in vitro*, обусловлены как нарушением регуляции пролиферации самих опухолевых клеток, так и взаимодействием между эндотелиальными и стромальными клетками внутри растущей опухоли.

Возможным механизмом, лежащим в основе функционирования Т-кадгерина в ангиогенезе, является регуляция траектории роста кровеносных сосудов, поскольку Т-кадгерин — навигационный рецептор для растущих сосудов и прорастающих к своим мишеням аксонов [8, 9].

Материалы и методы

Для выявления возможной роли Т-кадгерина в патогенезе опухолевых образований кожи мы сравнивали экспрессию Т-кадгерина в образцах нормальной кожи, образцах немеланомного рака кожи и связанных с ним предраковых состояниях. Криообразцы кожи от здоровых лиц, пациентов с псориазом, кератоакантомой в стадии роста и стадии стабилизации, кератозом, поверхностными, нодулярными и инфильтрирующими формами базально-клеточного рака (базалиомы), ПРК и метатипическим раком (MP) окрашивали антителами к Т-кадгерину и маркерами клеток сосудов и изучали с использованием флуоресцентного микроскопа.

В работе использовали биопсийный материал кожи человека от 6 здоровых лиц, 5 больных псориазом, 10 — кератоакантомой, 3 — актиническим кератозом, 30 — базалиомой, 5 — ПРК и 5 — MP кожи. Криосрезы кожи (толщина 7 мкм) фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 10 мин. После нескольких отмывок в фосфатно-солевом буфере (PBS) срезы инкубировали в 0,1% растворе бычьего сывороточного альбумина (BCA), содержащем 10% нормальной сыворотки осла для блокирования неспецифического связывания антител. Затем срезы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со смесью первичных антител к Т-кадгерину (ProSci rabbit anti-human) или маркерам эндотелиальных клеток — фактору Виллебранда (BD mouse anti-human) или CD31 (BD mouse anti-human), или маркерам гладкомышечных клеток сосудов и перicyтов — α -актину (Eritomics rabbit anti-human), с последующими отмытками в PBS. Далее отмытые срезы помещали в раствор вторичных антител осла к антителам мыши, конъюгированных с флуорохромом Alexa594,

или к антителам кролика, конъюгированных с флуорохромом Alexa488 («Molecular Probes», 10 мкг/мл в PBS). Ядра клеток докрашивали флуоресцентным красителем DAPI («Molecular Probes»). Готовые срезы заключали в среду Vectashield mounting media («Vector Inc.»). В качестве отрицательного контроля использовали мышиные или кроличьи неспецифичные IgG в соответствующей концентрации. Полученные препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200M, оборудованного цифровой видеокамерой CCD AxioCam HRC и программным обеспечением Axiovision software («Zeiss»), и Adobe Photoshop software («Adobe Systems», США).

Результаты и обсуждение

Нормальная кожа. В нормальной коже наибольшую экспрессию Т-кадгерина наблюдали в базальных кератиноцитах, стромальных клетках и во всех кровеносных сосудах в подлежащей дерме, что было показано при окрашивании антителами к эндотелиальному маркеру фактору Виллебранда (vWF) и маркеру гладкомышечных клеток (ГМК) сосудов — α -актину (рис. 1, а). Полученные нами данные согласуются с результатами других исследований [15]. Также мы обнаружили экспрессию Т-кадгерина в волосяных фолликулах и сальных железах (см. рис. 1, а). В отличие от других исследователей мы выявили экспрессию Т-кадгерина и в супрабазальных слоях эпидермальных кератиноцитов, хотя она была слабее, чем в базальном слое.

Псориаз. Экспрессию Т-кадгерина обнаруживали в кератиноцитах всех слоев эпидермиса, причем базальные кератиноциты больше, чем кератиноциты супрабазального слоя, экспрессировали Т-кадгерин. Также выявили экспрессию Т-кадгерина в стромальных клетках и во всех кровеносных сосудах подлежащей дермы. В псориазической коже по сравнению с нормальной наблюдали аномальное расположение кровеносных сосудов в эпидермальном слое. Данные сосуды, что подтверждено окрашиванием на маркер эндотелия vWF, равномерно экспрессировали Т-кадгерин (рис. 1, б).

Актинический (солнечный) кератоз. Т-кадгерин равномерно экспрессировался в кератиноцитах всех слоев, включая супрабазальные; отмечали незначительное увеличение окраски в базальном слое (рис. 1, в), что согласуется с данными литературы [23]. Экспрессию Т-кадгерина также обнаружили и в кровеносных сосудах дермы (в эндотелиальных клетках и клетках сосудистой стенки), и в стромальных клетках в непосредственной близости от атипичных кератиноцитов. Однако не все сосуды, несущие vWF, экспрессировали Т-кадгерин.

Кератоакантома. В кератоакантоме на стадии стабилизации Т-кадгерин обнаруживали в кератиноцитах всех слоев эпидермиса и кровеносных сосудах опухоли, что подтверждено двойным окрашиванием антителами к Т-кадгерину, маркеру эндотелия vWF и маркеру клеток сосудистой стенки — α -актину (рис. 1, г). Однако часть кровеносных сосудов, пронизывающих кератоакантому на стадии роста, не имело Т-кадгерина (рис. 1, д). Примечательно наличие несвойственной локализации кровеносных сосудов в гипертрофированном слое эпидермиса и вокруг ороговевших клеток на месте будущих гранул кератина. Такое нетипичное расположение крове-

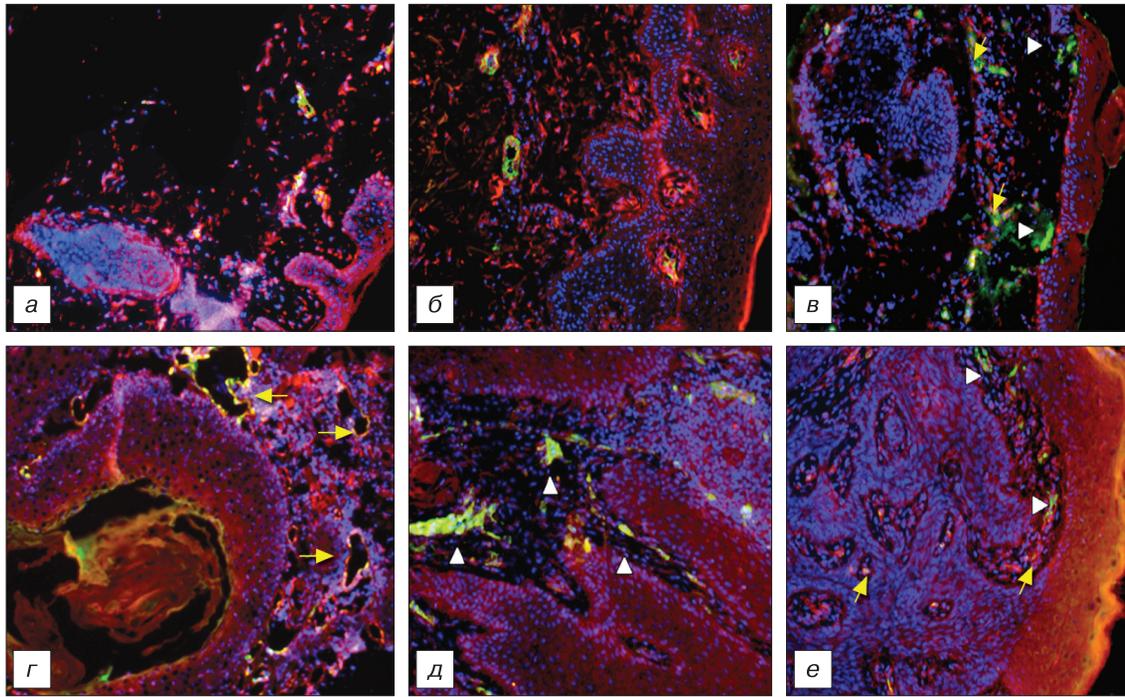


Рис. 1. Двойное иммунофлюоресцентное окрашивание образцов нормальной кожи, псориаза и опухолей с использованием антител к Т-кадгерину (красная флюоресценция) и vWF (зеленая флюоресценция). Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Ув. 600.

а — нормальная кожа; экспрессия Т-кадгерина обнаружена в базальных кератиноцитах и в клетках сосудов в дерме, а также в стромальных клетках;
б — псориаз; экспрессия Т-кадгерина видна в базальных кератиноцитах, в гиперпролиферирующих супрабазальных слоях, клетках стромы и в сосудах, прилежащих к дерме, а также в сосудах, расположенных в пределах эпидермального слоя; экспрессия Т-кадгерина обнаруживается в крупных и малых сосудах (желтый цвет, возникающий при наложении красной и зеленой флюоресценции);
в — солнечный кератоз; экспрессия Т-кадгерина обнаруживается в базальных кератиноцитах, включая супрабазальные слои, с незначительным увеличением в базальном слое; экспрессия Т-кадгерина обнаруживается не во всех vWF-позитивных сосудах; желтыми стрелками показаны сосуды, коэкспрессирующие Т-кадгерин и vWF; vWF-позитивные сосуды, не экспрессирующие Т-кадгерин, показаны треугольными стрелками;
г — кератоакантома в стадии стабилизации; экспрессия Т-кадгерина обнаруживается в кератиноцитах всех слоев; в большинстве сосудов наблюдается коэкспрессия Т-кадгерина и vWF (показано желтыми стрелками);
д — кератоакантома в стадии роста; экспрессия Т-кадгерина обнаруживается в кератиноцитах всех слоев. Не все сосуды экспрессируют Т-кадгерин; треугольными стрелками показаны сосуды, не экспрессирующие Т-кадгерин;
е — инфильтрирующая форма базалиомы; в vWF-позитивных сосудах, окружающих строму, экспрессия Т-кадгерина обнаруживается лишь частично (показана желтыми стрелками). В тоже время, часть образцов опухоли имеют aberrантную экспрессию Т-кадгерина и маркеров сосудистых клеток: часть vWF-позитивных сосудов не экспрессирует Т-кадгерин (показаны треугольными стрелками).

носных сосудов и снижение экспрессии Т-кадгерина при кератоакантоме (КА) в стадии роста, возможно, отражают высокую скорость развития и локальную агрессивность опухоли, поскольку в стадии стабилизации расположение кровеносных сосудов и экспрессия Т-кадгерина сравнимы с таковыми в нормальной коже.

Базально-клеточный рак (базалиома). Поверхностная базалиома характеризовалась ярко выраженной экспрессией Т-кадгерина в клетках опухоли и окружающей строме. Большинство сосудов коэкспрессировали маркеры эндотелиальных клеток vWF и Т-кадгерин, однако, сосуды, в которых экспрессия Т-кадгерина отсутствовала, также детектировали. В *нодулярных базалиомах* экспрессия Т-кадгерина была гетерогенна: в части опухолевых узлов она была резко выражена, в других — слабо или вообще отсутствовала. Полученные нами данные коррелируют с данными некоторых авторов, но не совпадают с данными Т. Takeuchi и соавт. [15, 49], которые обнаружили, что экспрессия Т-кадгерина снижена в образцах базалиомы. В большинстве образцов нодулярной базалиомы сосуды коэкспрессировали Т-кадгерин и vWF, однако, в некоторых из

них отмечалась aberrантная экспрессия Т-кадгерина и маркеров сосудистых клеток: в некоторых vWF-позитивных сосудах экспрессия Т-кадгерина отсутствовала, тем не менее были выявлены структуры, морфологически сходные с сосудами, которые экспрессировали α -актин, но не экспрессировали vWF. В образцах *инфильтрирующей базалиомы* (рис. 1, *е*) Т-кадгерин обнаружили в клетках опухоли и окружающей строме, в то время как в сосудах наблюдали нарушение экспрессии Т-кадгерина и маркеров сосудов: часть vWF-позитивных сосудистых структур не экспрессировала Т-кадгерин. Таким образом, при исследовании образцов базалиомы, характеризующихся малой скоростью роста и низкой инвазивностью, экспрессия Т-кадгерина была выявлена в кератиноцитах, строме и окружающих кровеносных сосудах в 90% образцов.

Плоскоклеточный рак кожи. В образцах умеренно- и низкодифференцированных форм инфильтрирующего ПРК опухолевые клетки глубоко проникали в подлежащую дерму (рис. 2, *а*). В некоторых случаях часть атипичных клеток из изолированных опухолевых «гнезд» и стромальными клетками имели слабое окрашивание на Т-кадгерин. Однако в база-

лиоидных клетках большинства опухолевых «гнезд» экспрессия Т-кадгерина оказалась сниженной. Активированная строма экспрессировала α -актин.

Полученные нами данные о потере экспрессии Т-кадгерина в опухолевых клетках согласуются с результатами других авторов и указывают на то, что снижение экспрессии Т-кадгерина в результате абберантного метилирования гена Т-кадгерина или в результате его делеции коррелирует со степенью агрессивности и инвазивности ПРК [15, 22, 23, 26].

Однако наши результаты показывают, что не только экспрессия Т-кадгерина изменяется в атипичных кератиноцитах. Среди других нарушений можно отметить абберантную экспрессию маркеров сосудов и Т-кадгерина: в части vWF-позитивных сосудов экспрессия Т-кадгерина отсутствовала; в то же время мы обнаружили капиллярноподобные структуры, не несущие vWF, но экспрессирующие Т-кадгерин и α -актин. Следует отметить, что в некоторых образцах ПРК определили области, экспрессирующие CD31/vWF, но морфологически отличающиеся от сосудов (см. рис. 2, а).

Метатипический рак (МР). Опухолевые клетки формируют агрегаты различного размера и обычно не несут Т-кадгерина, однако в некоторых клетках по периферии агрегатов выявляется экспрессия Т-кадгерина (рис. 2, б). Опухолевые массы окружены активированной стромой, несущей Т-кадгерин. Большинство сосудов вокруг опухоли коэкспрессируют маркер эндотелиальных клеток vWF и Т-кадгерин или vWF и α -актин, что соответствует капиллярам и стабильным кровеносным сосудам нормальной кожи. Однако обнаруживаются структуры, морфологически напоминающие кровеносные сосуды, в которых экспрессирован Т-кадгерин или α -актин, но отсутствует классический маркер эндотелиальных клеток vWF (см. рис. 2, б). Аналогично выявили vWF-позитивные сосуды без экспрессии Т-кадгерина.

Полученные нами данные подтверждают тот факт, что потеря экспрессии Т-кадгерина в кератиноцитах эпидермиса биологически связана со злокачественной трансформацией нормальных клеток эпидермиса, что согласуются с данными литературы. Сделано предположение о том, что Т-кадгерин может участвовать в поддержании целостности ткани в нормальных условиях путем предотвращения перемещения клеток [52], именно поэтому экспрессия Т-кадгерина наиболее выражена в кератиноцитах базального слоя, прикрепленных к базальной мембране и разграничивающих эпидермис и дерму [52].

В нормальной коже усиленная пролиферация кератиноцитов наблюдается только в базальном слое и коррелирует с максимальной экспрессией Т-кадгерина в этих клетках. Интересно, что при со-

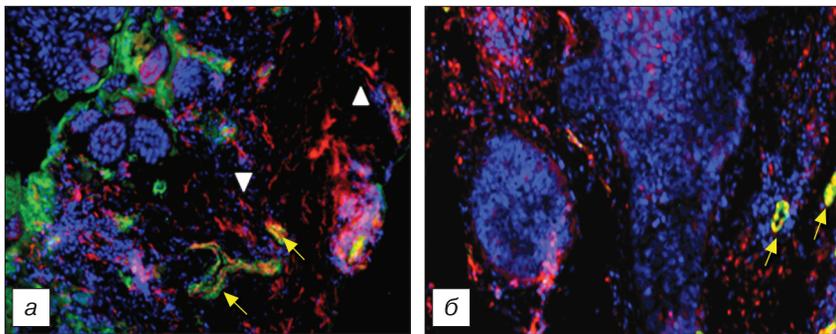


Рис. 2. Двойное иммунофлюоресцентное окрашивание образцов рака кожи с использованием антител к Т-кадгерину (красная флюоресценция) и vWF (зеленая флюоресценция). Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Ув. 600.

а — низкодифференцированная форма плоскоклеточного рака. Экспрессия Т-кадгерина частично обнаруживается в клетках изолированных опухолевых «гнезд», а также в клетках стромы, тем не менее, в большинстве базалоидных клетках в изолированных опухолевых «гнездах» экспрессия Т-кадгерина не наблюдается. Выявлены структуры, морфологически сходные с сосудами и не экспрессирующие CD31 антиген (показаны треугольными стрелками), желтыми стрелками отмечены сосуды с двойной экспрессией CD31 и Т-кадгерина.

б — метатипический рак. Опухолевые клетки образуют узлы различных размеров с редкой экспрессией Т-кадгерина, однако, клетки некоторых опухолевых агрегатов, а также некоторые клетки, расположенные на периферии агрегатов, сохраняют экспрессию Т-кадгерина. Большинство сосудов, окружающих опухолевые агрегаты, коэкспрессируют Т-кадгерин и vWF (показаны желтыми стрелками). В то же время, часть образцов опухоли имеют абберантную экспрессию Т-кадгерина и маркеров сосудистых клеток: часть структур, морфологически сходных с сосудами, экспрессируют Т-кадгерин и не экспрессируют vWF.

зревании эпидермальных кератиноцитов они перемещаются на поверхность кожи, не пересекая слой с максимальной экспрессией Т-кадгерина. При таких предраковых процессах кожи, как кератоакантома в стадии стабилизации и солнечный кератоз, а также при псориазе и поверхностной базалиоме, которые характеризуются медленной или контролируемой скоростью роста клеток, а также сохраняют в большинстве случаев связь с базальной мембраной, паттерн экспрессии Т-кадгерина схож с таковым в нормальной коже. При малигнизации, МР, ПРК и некоторых случаях базалиомы, характеризующихся большим пролиферативным, инвазивным и метастатическим потенциалом, кератиноциты имеют тенденцию расти в малых агрегатах и имеют сниженную экспрессию Т-кадгерина. Возможно, что Т-кадгерин выступает как регулятор пролиферации и миграции кератиноцитов в нормальной коже и как опухолевый супрессор при предраковых состояниях, который ограничивает пролиферацию, регулирует миграцию и взаимодействие кератиноцитов разных слоев. При раке степень агрессии опухолевых клеток коррелирует с потерей ими экспрессии Т-кадгерина.

В образцах нормальной кожи и образцах кожи пациентов с псориазом, кератоакантомой в стадии стабилизации и поверхностной базалиомой все сосуды равномерно экспрессируют маркер эндотелиальных клеток vWF и Т-кадгерин. При кератозе не все vWF-позитивные сосуды несут Т-кадгерин, аналогичная потеря экспрессии Т-кадгерина в некоторых сосудах характерна для ПРК. При кератоакантоме в стадии роста часть кровеносных сосудов также не экспрессирует Т-кадгерин, что, возможно, способствует их прорастанию в слой гипертрофированных и быстро пролиферирующих кератиноцитов и отражает агрессивное поведение данной опухоли в стадии быстрого роста. В образцах МР, инвазивной базалиомы и ПРК

мы наблюдали гетерогенность в экспрессии маркеров сосудов (vWF и маркера гладкомышечных клеток сосудов/перититов — α -актина) и Т-кадгерина. Таким образом, потеря экспрессии классических маркеров эндотелиальных клеток (vWF), экспрессия α -актина в сосудоподобных структурах и гетерогенность в экспрессии Т-кадгерина на сосудах опухолей коррелировали с гистологическими признаками и инвазивным фенотипом таких более агрессивных опухолей, как МР, инвазивная базалиома и ПРК. Возможно, что высокий уровень экспрессии Т-кадгерина в нормальной коже и доброкачественных опухолях предотвращает избыточный рост сосудов, которые также экспрессируют Т-кадгерин по принципу контактного торможения. Опухолевая трансформация сопровождается нарушением экспрессии Т-кадгерина в клетках сосудов, что вызывает абберантную васкуляризацию опухолевых узлов и окружающей стромы. Появление гетерогенных по экспрессии Т-кадгерина кровеносных сосудов/потеря экспрессии Т-кадгерина в кровеносных сосудах в предраковых состояниях, возможно, является одним из прогностически неблагоприятных факторов, свидетельствующих об агрессивности и инвазивном потенциале.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глушакова Н.А. Изменения регуляции межклеточной адгезии при опухолевой трансформации. *Биохимия* 2008; 7: 925—34.
2. Kurzen H., Münzing I., Hartschuh W. Expression of desmosomal proteins in squamous cell carcinomas of the skin. *J. Cutan. Pathol.* 2003; 30(10): 621—30.
3. Oh C.W., Penneys N. p27 and mib1 expression in actinic keratosis, Bowen disease, and squamous cell carcinoma. *Am. J. Dermatopathol.* 2004; 26(1): 22—6.
4. Verdolini R., Amerio P., Goteri G., Bugatti L., Lucarini G., Mannello B., et al. Cutaneous carcinomas and preinvasive neoplastic lesions. Role of MMP-2 and MMP-9 metalloproteinases in neoplastic invasion and their relationship with proliferative activity and p53 expression. *J. Cutan. Pathol.* 2001; 28(3): 120—6.
5. Weigelt B., Peterse J.L., van't Veer L.J. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer.* 2005; 5(8): 591—602.
6. Andreeva A.V., Kutuzov M.A., Tkachuk V.A., Voyno-Yasenetskaya T.A. T-cadherin is located in the nucleus and centrosomes in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009; 297(5): C1168—C1177.
7. Ranscht B., Dours-Zimmermann M.T. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron.* 1991; 7(3): 391—402.
8. Rubina K., Kalinina N., Potekhina A., Efimenko A., Semina E., Poliakov A., et al. T-cadherin suppresses angiogenesis in vivo by inhibiting migration of endothelial cells. *Angiogenesis.* 2007; 10(3): 183—95.
9. Рубина К.А., Ткачук В.А. Т-кадгерин как антиадгезивная молекула и возможный рецептор липопротеидов низкой плотности в клетках кровеносных сосудов. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2004; 8: 968—86.
10. Doyle D.D., Goings G.E., Upshaw-Earley J., Page E., Ranscht B., Palfrey H.C. T-cadherin is a major glycoposphoinositol-anchored protein associated with noncaveolar detergent-insoluble domains of the cardiac sarcolemma. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(12): 6937—43.
11. Philippova M.P., Bochkov V.N., Stambolsky D.V., Tkachuk V.A., Resink T.J. T-cadherin and signal-transducing molecules colocalize in caveolin-rich membrane domain of vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters.* 1998; 429(2): 207—10.
12. Philippova M., Ivanov D., Joshi M.B., Kyriakakis E., Rupp K., Afonyushkin T., et al. Identification of proteins associating with glycosylphosphatidylinositol-anchored T-cadherin on the surface of vascular endothelial cells: role for Grp78/BiP in T-cadherin-dependent cell survival. *Mol. Cell. Biol.* 2008; 28(12): 4004—17. doi: 10.1128/MCB.00157-08.
13. Brown D.A., London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(23): 17221—4.
14. Takeuchi T., Liang S.B., Matsuyoshi N., Zhou S., Miyachi Y., Sonobe H., Ohtsuki Y. Loss of T-cadherin (CDH13, H-cadherin) expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *Lab. Invest.* 2002; 82(8): 1023—9.
15. Adachi Y., Takeuchi T., Nagayama T., Ohtsuki Y., Furihata M. Zeb1-mediated T-cadherin repression increases the invasive potential of gallbladder cancer. *FEBS Letters.* 2009; 583(2): 430—6. doi: 10.1016/j.febslet.2008.12.042.
16. Riener M.O., Nikolopoulos E., Herr A., Wild P.J., Hausmann M., Wiech T., et al. Microarray comparative genomic hybridization analysis of tubular breast carcinoma shows recurrent loss of the CDH13 locus on 16q. *Hum. Pathol.* 2008; 39(11): 1621—9. doi: 10.1016/j.humpath.2008.02.021.
17. Sato M., Mori Y., Sakurada A., Fujimura S., Horii A. The H-cadherin (CDH13) gene is inactivated in human lung cancer. *Hum. Genetics.* 1998; 103(1): 96—101.
18. Suehiro Y., Okada T., Anno K., Okayama N., Ueno K., Hiura M., et al. Aneuploidy predicts outcome in patients with endometrial carcinoma and is related to lack of CDH13 hypermethylation. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14(11): 3354—61. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4609.
19. Zucchini C., Bianchini M., Valvassori L., Perdichizzi S., Benini S., Manara M.C., et al. Identification of candidate genes involved in the reversal of malignant phenotype of osteosarcoma cells transfected with the liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *Bone.* 2004; 34(4): 672—9.
20. Riou P., Saffroy R., Chenailler C., Franc B., Gentile C., Rubinstein E., et al. Expression of T-cadherin in tumor cells influences invasive potential of human hepatocellular carcinoma. *FASEB J.* 2006; 20(13): 2291—301.
21. Zhou S., Matsuyoshi N., Liang S.B., Takeuchi T., Ohtsuki Y., Miyachi Y. Expression of T-cadherin in basal keratinocytes of skin. *J. Invest. Dermatol.* 2002; 118(6): 1080—4.
22. Pfaff D., Philippova M., Buechner S.A., Maslova K., Mathys T., Erne P., Resink T.J. T-cadherin loss induces an invasive phenotype in human keratinocytes and squamous cell carcinoma (SCC) cells in vitro and is associated with malignant transformation of cutaneous SCC in vivo. *Br. J. Dermatol.* 2010; 163(2): 353—63.
23. Takeuch T., Ohtsuk, Y. Recent progress in T-cadherin (CDH13, H-cadherin) research. *Histology and Histopathology.* 2001; 16(4): 1287—93.
24. Takeuchi T., Liang S.B., Ohtsuki Y. Downregulation of expression of a novel cadherin molecule, T-cadherin, in basal cell carcinoma of the skin. *Mol. Carcinogen.* 2002; 35(4): 173—9.
25. Mukoyama Y., Zhou S., Miyachi Y., Matsuyoshi N. T-cadherin negatively regulates the proliferation of cutaneous squamous carcinoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 2005; 124(4): 833—8.
26. Chan D.W., Lee J.M., Chan P.C., Ng I.O. Genetic and epigenetic inactivation of T-cadherin in human hepatocellular carcinoma cells. *Inter. J. Cancer.* 2008; 123(5): 1043—52. doi: 10.1002/ijc.23634.
27. Kuphal S., Martyn A.C., Pedley J., Crowther L.M., Bonazzi V.F., Parsons P.G., et al. H-cadherin expression reduces invasion of malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009; 22(3): 296—306. doi: 10.1111/j.1755-148X.2009.00568.x
28. Lee S.W., Reimer C.L., Campbell D.B., Cheresh P., Duda R.B., Kocher O. H-cadherin expression inhibits in vitro invasiveness and tumor formation in vivo. *Carcinogenesis.* 1998; 19(6): 1157—9.
29. Lee S.W. H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer. *Nature Med.* 1996; 2(7): 776—82.

30. Takeuchi T., Misaki A., Liang S.B., Tachibana A., Hayashi N., Sonobe H., Ohtsuki Y. Expression of T-cadherin (CDH13, H-cadherin) in human brain and its characteristics as a negative growth regulator of epidermal growth factor in neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 2000; 74(4): 1489—97.
31. Huang Z.Y., Wu Y., Hedrick N., Gutmann D.H. T-cadherin-mediated cell growth regulation involves G₁ phase arrest and requires p21 (CIP1/WAF1) expression. *Mol. Cell. Biol.* 2003; 23(2): 566—78.
32. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Sem. Cancer Biol.* 1992; 3(2): 65—71.
33. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nature Med.* 1995; 1(1): 27—31.
34. Holmgren L., O'Reilly M.S., Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Med.* 1995; 1(2): 149—53.
35. Parangi S.B., O'Reilly M., Christofori G., Holmgren L., Grosfeld J., Folkman J., Hanahan D. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93(5): 2002—7.
36. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997; 386(6626): 671—4.
37. Chaplin D.J., Pettit G.R., Hill S.A. Anti-vascular approaches to solid tumour therapy: evaluation of combretastatin A4 phosphate. *Anticancer Res.* 1999; 19(1A): 189—95.
38. Chaplin D.J., Pettit G.R., Parkins C.S., Hill S.A. Anti-vascular approaches to solid tumour therapy: evaluation of tubulin binding agents. *Br. J. Cancer.* 1996; 27(Suppl): S86—S88.
39. Hasan J., Byers R., Jayson G.C. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br. J. Cancer.* 2002; 86(10): 1566—77.
40. Sasano H., Ohashi Y., Suzuki T., Nagura H. Vascularity in human adrenal cortex. *Mod. Pathol.* 1998; 11(4): 329—33.
41. Folkman J. Tumor angiogenesis: from bench to bedside. In: Marmé Dieter, Fusenig Norbert, eds. *Tumor angiogenesis. Basic mechanisms and cancer therapy.* Berlin; Heidelberg: Springer; 2008: 3—28.
42. Offerken B.V., Borre M., Sørensen F.B., Overgaard J. Comparison of methods of microvascular staining and quantification in prostate carcinoma: relevance to prognosis. *APMIS.* 2002; 110(2): 177—85.
43. Rubin M.A., Buyyounouski M., Bagiella E., Sharir S., Neugut A., Benson M., et al. Microvessel density in prostate cancer: lack of correlation with tumor grade, pathologic stage, and clinical outcome. *Urology.* 1999; 53(3): 542—7.
44. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 2000; 6(4): 389—95.
45. Jain R.K., Carmeliet P.F. Vessels of death or life. *Sci. Am.* 2001; 285(6): 38—45.
46. Ivanov D., Philippova M., Antropova J., Gubaeva F., Iljinskaya O., Tararak E., et al. Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature. *Histochem. Cell Biol.* 2001; 115(3): 231—42.
47. Wyder L., Vitaliti A., Schneider H., Hebbard L.W., Moritz D.R., Wittmer M., et al. Increased expression of H/T-cadherin in tumor-penetrating blood vessels. *Cancer Res.* 2000; 60(17): 4682—8.
48. Hebbard L.W., Garlatti M., Young L.J., Cardiff R.D., Oshima R.G., Ranscht B. T-cadherin supports angiogenesis and adiponectin association with the vasculature in a mouse mammary tumor model. *Cancer Res.* 2008; 68(5): 1407—16.
49. Adachi Y., Takeuchi T., Sonobe H., Ohtsuki Y. An adiponectin receptor, T-cadherin, was selectively expressed in intratumoral capillary endothelial cells in hepatocellular carcinoma: possible cross talk between T-cadherin and FGF-2 pathways. *Virchows Arch.* 2006; 448(3): 311—8.
50. Ghosh S., Joshi M.B., Ivanov D., Feder-Mengus C., Spagnoli G.C., Martin I., et al. Use of multicellular tumor spheroids to dissect endothelial cell-tumor cell interactions: a role for T-cadherin in tumor angiogenesis. *FEBS Lett.* 2007; 581(23): 4523—8.
51. Buechner S.A., Philippova M., Erne P., Mathys T., Resink T.J. High T-cadherin expression is a feature of basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* 2009; 161(1): 199—202. doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09195.x.
52. Ivanov D., Philippova M., Allenspach R., Erne P., Resink T. T-cadherin upregulation correlates with cell-cycle progression and promotes proliferation of vascular cells. *Cardiovasc. Res.* 2004; 64(1): 132—43.

Поступила 29.06.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.5-007.23-036.17-02:615.275.2]-085.37

Трансляционная клеточная иммунотерапия в лечении саркомы Капоши у реципиента почечного трансплантата

М. Г. Карташова¹, А. В. Кильдюшевский², В. А. Федулкина³

¹Отделение дерматовенерологии и дерматоонкологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (руководитель — проф. В.А. Молочков); ²отделение экстракорпоральной гемокоррекции и детоксикации ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (руководитель — проф. А.А. Фомин); ³хирургическое отделение трансплантологии и диализа ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (руководитель — проф. А.В. Вагазин)

Представлен случай успешного применения трансляционной клеточной иммунотерапии у больного саркомой Капоши, развившейся через 7 мес после трансплантации почки.

Ключевые слова: саркома Капоши, трансляционная клеточная иммунотерапия, трансплантация почки

Сведения об авторах:

Карташова Мария Геннадиевна — канд. мед. наук, науч. сотр. (maha.ka@mail.ru); Кильдюшевский Александр Вадимович — д-р мед. наук, проф., ведущий науч. сотр. (kildushev@yandex.ru); Федулкина Вероника Андреевна — мл. науч. сотр.