

**Р. Ф. Зибиров, С. А. Мозеров**

Медицинский радиологический научный центр им. А. Ф. Цыба – филиал государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр» радиологии МЗ РФ, Калужская область, Обнинск

## **ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ CD82/KAI1 В КЛЕТКАХ ОПУХОЛИ И СТРОМЫ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЯЗЫКА**

УДК 616-006.61

Оценили экспрессию CD82/KAI1 в клетках опухоли и стромы плоскоклеточного рака языка в 81 наблюдении с регионарными метастазами (n = 45) и без метастазов (n = 36). Иммуногистохимическим методом в клетках паренхимы и стромы опухоли оценена экспрессия KAI-1/CD82. Для межгруппового сравнения площади, занимаемой KAI-1/CD82 позитивными клетками опухоли и стромы, применяли U-критерий Манна – Уитни. Для определения связи между клетками опухоли и стромы применялся корреляционный анализ по методу Спирмена.

При плоскоклеточном раке языка с метастазами и без метастазов преобладают наблюдения с низкой экспрессией KAI-1/CD82 опухолевыми клетками и клетками стромы.

Между KAI-1/CD82 позитивными опухолевыми клетками и клетками стромы существует связь, а значимые межгрупповые различия между KAI-1/CD82 клетками стромы подчеркивают важность более детального их изучения.

*Ключевые слова:* рак языка, иммуногистохимия, KAI-1/CD82, клетки опухоли, клетки стромы.

**R. F. Zibirov, S. A. Mozerov**

## **CHARACTERIZATION OF CD82/KAI1 EXPRESSION IN TUMOR AND STROMAL CELLS OF TONGUE SQUAMOUS CELL CARCINOMA**

CD82/KAI 1 expression was evaluated in tumor and stromal cells of squamous cell carcinoma of the tongue in 81 cases with regional metastases (n=45) and without metastases (n=36).

Expression of KI-1/CD82 was evaluated by immunohistochemical method in the tumor and stromal cells. For cross-group comparison of the area occupied by KAI-1/CD82 positive tumor and stroma cells Mann-Whitney U-test was used. To determine the relationship between the tumor cells and the stroma, a Spearman's correlation was used.

In the tongue squamous cell carcinoma with and without metastasis predominate observations with low expression of KAI-1/CD82 by tumor cells and stromal cells. There is a link between KAI-1/CD82 positive tumor cells and stromal cells, and significant intergroup differences between KAI-1/CD82 positive stromal cells emphasizes the importance of their investigation in detail.

*Key words:* tongue cancer, immunohistochemistry, KAI-1/CD82, tumor cells, stromal cells.

Ежегодно в мире от рака ротовой полости умирают 145 тыс. больных [7]. Плоскоклеточный рак языка составляет 25–40 % наблюдений рака ротовой полости и является наиболее частой его локализацией [3].

Белки семейства тетраспанинов вовлечены в процессы клеточной пролиферации, движения, сигнального взаимодействия, регуляцию функций иммунной системы [14]. Изменение экспрессии тетраспанина KAI-1/CD82 в опухолевых клетках связано с прогрессированием рака различных локализаций [2, 10], однако, несмотря на многочисленные исследования, касающиеся экспрессии и функции тетраспанинов в опухолевых клетках, экспрессия и функция тетраспанинов в иммунных клетках остается недостаточно изученной [4].

### **ЦЕЛЬ РАБОТЫ**

Оценить экспрессию KAI-1/CD82 в клетках паренхимы и стромы плоскоклеточного рака языка.

### **МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ**

Нами было изучено 81 наблюдение плоскоклеточного рака языка без предшествующей противоопухолевой терапии, полученное в радиологическом отделении Медицинского радиологического научного центра им. А. Ф. Цыба, в период с 1990 по 2019 г. Материал 54 наблюдений (67 %) принадлежал лицам мужского пола и 27 наблюдений (33 %) – женщинам. Средний возраст мужчин составил (57,7 ± 9,3) г., средний возраст женщин – (59,4 ± 13,4) г.

Количество наблюдений плоскоклеточного рака языка, в зависимости от степени дифференцировки опухоли, составило: высокодифференцированный – 30, умереннодифференцированный – 39, низкодифференцированный – 12. Количество наблюдений, в зависимости от стадии опухоли, составило: T1 – 13, T2 – 33, T3 – 31, T4 – 4. Для статистической обработки все наблюдения были разделены на две группы – с регионарными метастазами (n = 45) и без метастазов (n = 36). Операционно-биопсийный материал фиксировали и подвергали гистологической проводке согласно общепринятым методикам.

С помощью иммуногистохимического метода в клетках паренхимы и стромы опухоли проведена оценка экспрессии KAI-1/CD82 (клон EP 160, «Epitomics», разведение 1:200). Для общей характеристики экспрессии в зависимости от количества опухолевых клеток, экспрессирующих KAI-1/CD82, наблюдениям присвоены следующие баллы: <10 % клеток с экспрессией KAI-1/CD82 – 1 балл, 10–50 % – 2 балла, >50 % – 3 балла. В зависимости от количества клеток стромы, экспрессирующих KAI-1/CD82, наблюдениям присвоены следующие баллы: с низким содержанием KAI-1/CD82 клеток стромы (0–10 %) – 1 балл, умеренным содержанием KAI-1/CD82 клеток стромы (11–54 %) – 2 балла, высоким содержанием KAI-1/CD82 клеток стро-

мы (55–100 %) – 3 балла. Для межгруппового сравнения площади занимаемой KAI-1/CD82 позитивными клетками опухоли и стромы с помощью программы Image J 1.4.3.67 провели подсчет изучаемых клеток в «горячих точках» – участках с самой высокой в количественном отношении экспрессией. Учитывая, что выборки являлись независимыми, для сравнительного межгруппового анализа применяли U-критерий Манна – Уитни. Для определения связи между клетками опухоли и стромы применялся корреляционный анализ по методу Спирмена. При значении коэффициента корреляции:

- 1) при  $r = \pm 0,7-1,0$  связь считалась сильной;
  - 2) при  $r = \pm 0,3-0,699$  связь считалась умеренной;
  - 3) при  $r = 0-0,299$  связь считалась слабой;
- Уровень значимости  $\alpha$  для всех вычислений принимали равным 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика экспрессии KAI-1/CD82 клетками паренхимы и стромы плоскоклеточного рака языка в группе без регионарных метастазов показана в табл. 1. Характеристика экспрессии KAI-1/CD82 клетками паренхимы и стромы плоскоклеточного рака языка в группе с регионарными метастазами показана в табл. 2.

Таблица 1

### Характеристика экспрессии KAI-1/CD82 клетками паренхимы и стромы плоскоклеточного рака языка в группе без регионарных метастазов

Клетки	Баллы		
	1	2	3
Клетки опухоли (количество наблюдений)	34	2	0
Клетки стромы (количество наблюдений)	27	6	3

Таблица 2

### Характеристика экспрессии KAI-1/CD82 клетками паренхимы и стромы плоскоклеточного рака языка в группе с регионарными метастазами

Клетки	Баллы		
	1	2	3
Клетки опухоли (количество наблюдений)	38	6	1
Клетки стромы (количество наблюдений)	26	12	7

Таким образом, в 34 (94 %) из 36 наблюдений рака языка без регионарных метастазов количество опухолевых клеток с экспрессией KAI-1/CD82 можно расценить как низкое (<10 %, рис. 1). В 27 (75 %) из 36 наблюдений этой же группы количество клеток стромы с экспрессией KAI-1/CD82 также можно расценить как низкое (0–10 %, рис. 2). При раке языка с регионарными ме-

тастазами количество опухолевых клеток и клеток стромы с аналогичной низкой экспрессией составило 84 % (38 из 45 наблюдений) и 58 % (26 из 45 наблюдений) соответственно. Показатели центральной тенденции распределения площади KAI-1/CD82 позитивных клеток паренхимы и стромы плоскоклеточного рака языка в «горячих точках» изучаемых групп приведены в табл. 3.

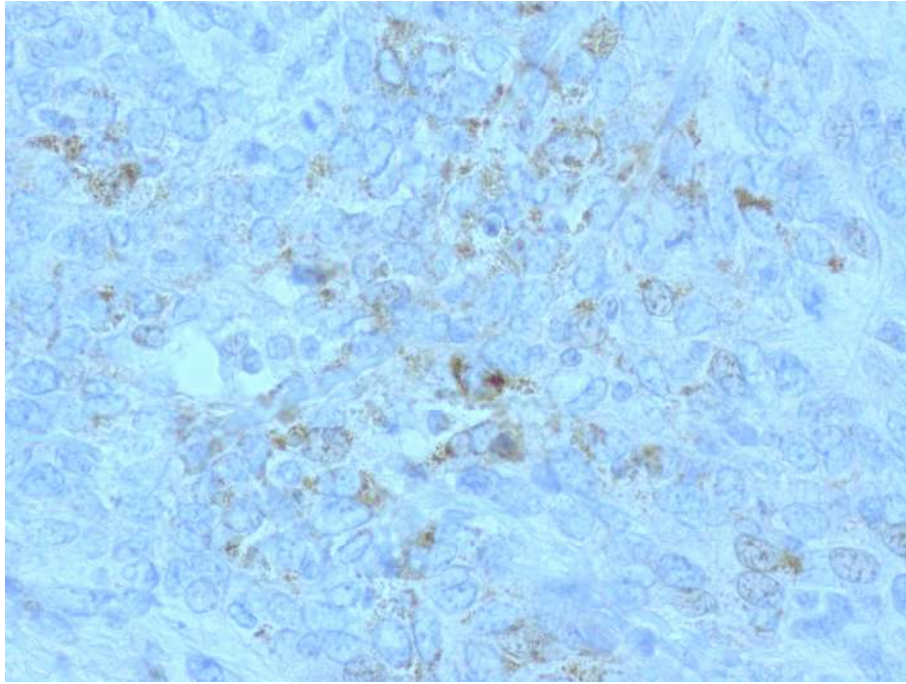


Рис. 1. Низкая экспрессия KAI-1/CD82 опухолевыми клетками плоскоклеточного рака языка; ув. x400 (окуляр x10, объектив x40)

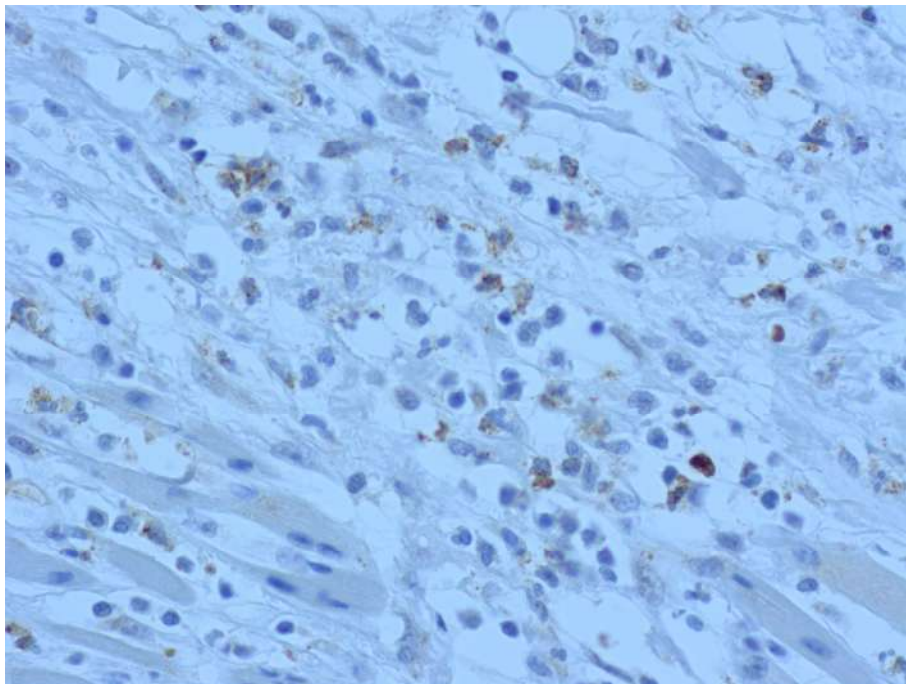


Рис. 2. Низкая экспрессия KAI-1/CD82 клетками стромы плоскоклеточного рака языка; ув. x400 (окуляр x10, объектив x 40)

Таблица 3

**Показатели центральной тенденции распределения KAI-1/CD82 клеток паренхимы и стромы плоскоклеточного рака языка**

Клетки	Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль
KAI-1/CD82 паренхима опухоли, группа без метастазов	0	5,5	25
KAI-1/CD82 паренхима опухоли, группа с метастазами	4	17	37
KAI-1/CD82 строма опухоли, группа без метастазов	2,5	8,3	26
KAI-1/CD82 строма опухоли, группа с метастазами	9,7	20,6	46,4

Из таблицы следует, что более высокие цифры центрального распределения KAI-1/CD82 позитивных клеток паренхимы и стромы опухоли в «горячих точках» (рис. 3, рис. 4) приходятся на наблюдения с регионарными метастазами. Для сравнения площади KAI-1/CD82 позитивных клеток опухоли и стромы в изучаемых группах после их подсчета с помощью программы Image J 1.4.3.67 проведен анализ Манна – Уитни, который не выявил значимых различий между клетками опухоли ( $p > 0,05$ ), однако показал, что площадь KAI-1/CD82 позитивных

клеток стромы при раке языка с регионарными метастазами значительно больше, чем площадь аналогичных клеток стромы в группе без метастазов ( $p = 0,02$ ). Для анализа связи между KAI-1/CD82 позитивными клетками опухоли и стромы проведен корреляционный анализ, который показал умеренную положительную корреляционную связь ( $r = 0,42$ ,  $p < 0,05$ ) при плоскоклеточном раке языка без метастазов и умеренную положительную корреляционную связь ( $r = 0,35$ ,  $p < 0,05$ ) при плоскоклеточном раке языка с метастазами.

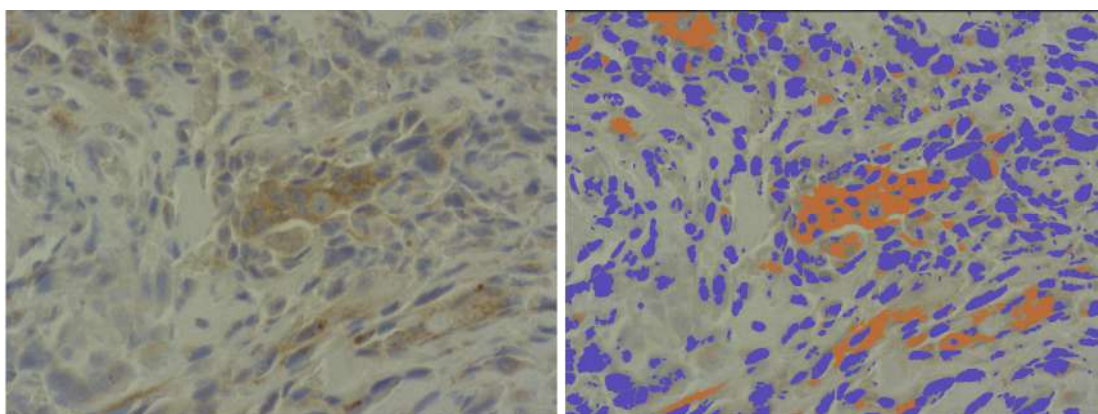


Рис. 3. Площадь KAI-1/CD82 позитивных клеток опухоли в «горячих точках» (окуляр х10, объектив х 40)

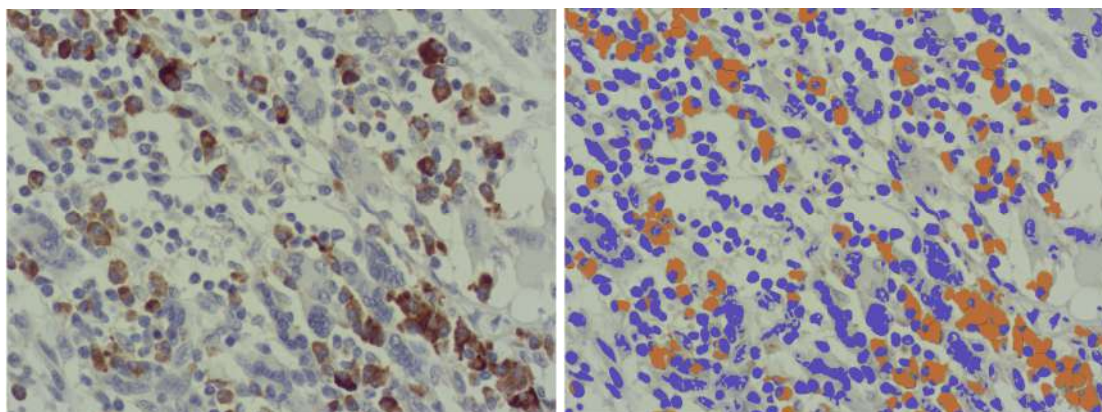


Рис. 4. Площадь KAI-1/CD82 клеток стромы в «горячих точках» (окуляр х10, объектив х 40)

Экспрессия тетраспанина KAI-1/CD82 показана практически во всех тканях [8]. В гематопоэтических клетках экспрессия KAI-1/CD82 выявлена на моноцитах, лимфоцитах, дендритных клетках [14]. Прогрессирование опухоли может происходить как при снижении экспрессии тетраспанинов (KAI-1/CD82, CD9), так при ее увеличении (CD151, Tspan8) [5]. Некоторые исследователи показали, что экспрессия KAI-1/CD82 обратно пропорциональна опухолевой прогрессии и, таким образом, может быть использована как прогностический индикатор [11]. При ра-

ке ротовой полости выявлено, что снижение экспрессии KAI1/CD82 клетками опухоли сопровождалось повышением ее метастатического потенциала [9], хотя другие исследователи не получили такой связи [13]. В проведенном нами исследовании низкая экспрессия KAI-1/CD82 (<10 %) как в клетках паренхимы, так и в клетках стромы преобладала в обеих изучаемых группах. В исследуемых группах мы не выявили значимых различий при сравнении площади KAI-1/CD82 позитивных клеток опухоли ( $p > 0,05$ ), но показали, что площадь KAI-1/CD82 позитивных

клеток стромы при раке языка с регионарными метастазами значимо больше, чем площадь аналогичных клеток стромы в группе без метастазов ( $p = 0,02$ ). Исследования, проведенные на лейкоцитах, выявили важные иммунологические функции тетраспанинов и показали, что они могут быть вовлечены в противоопухолевый иммунный ответ, хотя влияние тетраспанинов в иммунных клетках в противоопухолевом ответе остается недостаточно изученным [4]. Показано, что тетраспанины способны взаимодействовать с белками своего семейства, формируя «тетраспаниновую сеть» [12]. Кроме того, эти белки являются модуляторами сигнальной трансдукции, обеспечивая организацию мембранных доменов через взаимодействие с другими белками, включая интегрины, рецепторы на иммунных клетках [6]. Иммунологическая значимость этих взаимодействий была продемонстрирована на тетраспанин-дефицитных мышах (CD37, CD53, CD81, CD82, Tssc6, CD151), которые имели дефекты гуморального и/или клеточного иммунного ответа [11]. В нашем исследовании с помощью корреляционного анализа показана умеренная положительная связь между KAI-1/CD82 позитивными опухолевыми клетками и аналогичными клетками стромы, следовательно, при увеличении количества KAI-1/CD82 позитивных опухолевых клеток, количество KAI-1/CD82 позитивных клеток стромы также увеличивается, а при уменьшении, соответственно – уменьшается. В то же время, в связи с взаимодействием между клетками паренхимы опухоли и ее стромы, данную связь можно рассмотреть иначе: при увеличении количества KAI-1/CD82 позитивных клеток стромы количество KAI-1/CD82 позитивных опухолевых клеток возрастает, а при уменьшении – уменьшается. Учитывая, что опухолевое микроокружение является существенным компонентом опухоли, показанная связь может являться отражением взаимного паракринного влияния клеток опухолевого микроокружения и опухолевых клеток и свидетельствует о важности дальнейшего детального исследования этого взаимодействия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Adenoviral transduction of MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 inhibits lymph node metastasis in orthotopic lung cancer model / T. Takeda, N. Hattori, T. Tokuhara [et al.]. // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67, № 4. – P. 1744 – 1749. – Direct text.
2. **Bello I. O., Soini Y., Salo T.** Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives // *Oral Oncol.* – 2010 – Vol. 46, № 9. – P. 630 – 635. – Direct text.
3. **Cabañas C., Yáñez-Mó M., van Spriell A. B.** editorial: functional relevance of tetraspanins in the immune system // *Front Immunol.* – 2019. – Vol 10. – P. 1714. – Direct text.
4. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency / M. C. van Zelm, J. Smet, B. Adams [et al.]. // *J Clin Invest.* – 2010. – Vol 120, № 4. – P. 1265 – 1274. – Direct text.
5. Dendritic cell migration and antigen presentation are coordinated by the opposing functions of the tetraspanins CD82 and CD37 / E. L. Jones, J. L. Wee, M. C. Demaria [et al.]. // *J Immunol.* – 2016. – Vol. 196, № 3. – P. 978 – 987. – Direct text.
6. Down-regulation of KAI1/CD82 protein expression in oral cancer correlates with reduced disease free survival and overall patient survival / R. D. Farhadieh, R. Smee, K. Ow [et al.]. // *Cancer Lett.* – 2004. – Vol. 213, № 1. – P. 91 – 98. – Direct text.
7. Expression of metastasis suppressor gene in (KAI1/CD82) in oral squamous cell carcinoma and its clinic-pathological significance / Y. Imai, T. Sasaki, Y. Shinagava [et al.]. // *Oral Oncol.* – 2002. – Vol. 38, № 6. – P. 551 – 561. – Direct text.
8. Global cancer statistics, 2012 / L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel [et al.] // *CA: A cancer journal for clinicians.* – 2015. – Vol. 65, № 2. – P. 87 – 108. – Direct text.
9. **Hemler, M. E.** Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages / M. E. Hemler // *Nat Rev Cancer.* – 2014. – Vol. 14, № 1. – P. 49 – 60. – Direct text.
10. KAI1 gene is differently expressed in papillary and pancreatic cancer: influence on metastasis / X. Z. Guo, H. Friess, X. D. Shao [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2000. – Vol. 6, № 6. – P. 866 – 871. – Direct text.
11. **Liu, W. M.** KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor / Liu W. M., Zhang X. A. // *Cancer Lett.* – 2006. – Vol. 240, № 2. – P. 183 – 194. – Direct text.
12. Molecular interactions shaping the tetraspanin web / S. J. van Deventer, V. E. Dunlock, A. B. van Spriell // *Biochem Soc Trans.* – 2017. – Vol. 45, № 3. – P. 741 – 750. – Direct text.
13. MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression in normal and various cancer tissues / C. Huang, T. Taki, M. Adachi [et al.] // *Int J Oncol.* – 1997. – Vol. 11, № 5. – P. 1045 – 1051. – Direct text.
14. Overexpression of KAI1/CD82 suppresses in vitro cell growth, migration, invasion and xenograft growth in oral cancer / J. Chai, L. Du, J. Ju [et al.] // *Molecular medicine reports.* – 2017. – Vol. 15, № 4. – P. 1527 – 1532. – Direct text.
15. **Schaper, F.** Antitumor immunity is controlled by tetraspanin proteins / F. Schaper, A. B. van Spriell // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1185. – Direct text.