

*С.С. КІРЄЄВА, Н.П. ЮРЧЕНКО, М.В. СИДОРЕНКО,
Н.Ю. ПЕРШКО, В.С. ПРОЦИК*

**ЕКСПРЕСІЯ МАРКЕРНИХ БІЛКІВ ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ
ТА ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН: РЕГУЛЯТОРНОГО ЯДЕРНОГО БІЛКУ
P₆₃ І ЦИТОКЕРАТИНІВ СК_{5/14} У ЕПІТЕЛІЇ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ
ПОРОЖНИНИ РОТА ПРИ ПЕРЕДРАКОВИХ СТАНАХ
ТА У ОСІБ З ГРУПИ РИЗИКУ**

*ДУ “Відділення біотехнічних проблем діагностики” Ін-ту проблем кріобіології
і кріомедицини НАН України, Національний інститут раку, м. Київ*

Після відкриття епітеліальних стовбурових клітин в епітеліальній тканині набула актуальності концепція розвитку рака з ракових стовбурових клітин. Концепція розвитку пухлин епітеліального генезу із стовбурових клітин та їх трансформація у ракові стовбурові клітини базується на тому, що так звані ракові стовбурові клітини мають спільні властивості з епітеліальними стовбуровими клітинами, а саме: самооновлення та здатність до проліферації та диференціювання, але відрізняються від епітеліальних стовбурових клітин нерегульованим асиметричним поділом клітин, які відповідають за самооновлення та генерацію популяції пухлинних клітин і які у кінцевому результаті складають гетерогенність ракової пухлини. Багато досліджень свідчать про те, що здатність до самооновлення і диференціювання має тільки субпопуляція пухлинних клітин, які названо раковими стовбуровими клітинами, в той час як решта популяції пухлинних клітин не мають здатності ініціювати розвиток новоутворення, підтримувати ріст пухлини та утворювати метастази [1, 3, 9, 20, 26, 28, 37, 40].

На сьогодні *in vivo* та *in vitro* доведено існування ракових стовбурових клітин у раку молочної залози, пухлинах мозку, простати, легенів, кишечника, підшлункової залози, печінки, шкіри, у меланомі та у плоскоклітинному раку голови та шиї; вони визначаються за допомогою специфічних молекулярних маркерів та по активності ензиматичних реакцій [2, 12, 14, 19, 25, 26, 30, 39].

Сучасні дослідження свідчать про те, що ракові стовбурові клітини формують малі групи клітин у новоутворенні і походять як з нормальних стовбурових клітин, так і з комітованих прогеніторних клітин, які дають початок пухлинному росту з відповідним фенотипом та експресованим генетичним профілем, на що вказують їх спільні білкові маркери. Вважається, що у епітелії слизової оболонки порожнини рота нішою для стовбурових клітин є матрикс базальної мембрани, а базальний шар епітелію є анатомічною локалізацією тканинспецифічних стовбурових і прогеніторних клітин. Їх маркерами до цього часу вважаються: основний регуляторний ядерний білок епітеліальних стовбурових і прогеніторних клітин p63, цитокератини СК5/14, CD44, ALDH1, а CD44 та ALDH1 визнані не тільки маркерами епітеліальних стовбурових клітин, а також і маркерами ракових стовбурових клітин у плоскоклітинному раку голови та шиї [6-9, 20, 22, 35].

Епітеліальні стовбурові та їх дочірні прогеніторні клітини базального шару експресують ядерний регуляторний білок p63, який є критичним для підтримання стовбурових і прогеніторних клітин, необхідний для тканинного морфогенезу за умов нормального функціонування епітелію та при регенерації останнього у разі його ушкодження. Білок p63 ініціює програму стратифікації епітелію, і експресія ізоформ p63 у клітинах базального шару зрілого епітелію є результатом індукції програми стратифіка-

ції – підтримки сквамозно-епітеліального фенотипу. У зрілому епітелії ізоформи p63 забезпечують антидиференціальні та антиапоптичні механізми у стовбурових клітинах базального шару, підтримують проліферативний потенціал прогеніторних клітин та ініціюють стратифікацію кератиноцитів для відновлення епітелію [4, 17, 29].

Ген p63 клонований в декількох лабораторіях і визначений як член родини транскрипційних факторів p53. Ген p63 локалізується на хромосомі 3q27-28 і є членом родини генів p53, провідних у регуляції клітинного циклу та апоптозу після пошкодження ДНК. Транскрипційний фактор p63 є ключовим регулятором експресії цитокератинів СК5/14, і критичним для розвитку та функціонування епітеліальної тканини [17, 38].

СК5/14 – це парні цитоплазматичні кератини, які також експресують клітини базального шару епітелію і вважаються також білками стовбурових/прогеніторних клітин епітелію слизової оболонки. Експресія таких високомолекулярних цитокератинів у базальному шарі сквамозного епітелію пов'язана з проліферативним потенціалом цих клітин. Стратифіковані епітеліальні тканини подібно до епідермісу безперервно відокремлюються від поверхні і замінюються новими клітинами, отриманими від проліферуючих прогеніторних базальних клітин [21, 27, 33].

На часі актуальними постають дослідження біології епітеліальних стовбурових і прогеніторних клітин при гістопатологічному прогресуванні у епітелії слизової оболонки порожнини рота з метою не тільки пізнання ролі цих клітин у канцерогенезі, а також удосконалення гістологічної діагностики [5, 23].

Мета дослідження – дослідити експресію маркерних білків епітеліальних стовбурових та прогеніторних клітин: регуляторного ядерного білку p63, цитокератинів СК5/14 та їх біологію у епітелії слизової оболонки порожнини рота при передракових станах та в слизовій оболонці у осіб з групи епідеміологічного ризику.

Матеріал і методи

Матеріал дослідження: біопсія слизової оболонки порожнини рота від 13 осіб ,

що не палили і померли не від онкологічної хвороби (контрольна група, чоловіки, вік 32-68 років, матеріал бюро судово-медичної експертизи); біопсія слизової оболонки від 10 осіб, що палили і також померли не від онкологічної хвороби (група ризику, чоловіки віком 40-61 р., матеріал бюро судово-медичної експертизи); біопсія слизової оболонки від 42 хворих чоловіків, які палили (вік 33-84 р.) і за патогістологічним діагнозом мали патологічні зміни у слизовій оболонці та передракові стани: папіломатоз (у 4), папіломатоз з малігнізацією (у 1), гіперплазія епітелію (у 5), лейкоплакія (у 5), дисплазія низька (у 5), дисплазія середня (у 9), дисплазія висока (у 5), інтраепітеліальний рак (Ca in situ) (у 8). Всі діагнози верифіковані в гістологічній лабораторії Національного інституту раку.

Методи дослідження – гістологічні та імуногістохімічні технології для виявлення маркерних білків епітеліальних стовбурових та прогеніторних клітин: регуляторний ядерний білок епітеліальних стовбурових та прогеніторних клітин p63 (антиген p63, clone 4A4 до усіх ізоформ білку), цитокератини СК5/14 (антиген до двох цитокератинів СК5/14, clone LL002); система візуалізації “Dako Cytomation”. Результати імуногістохімічної реакції оцінювались шляхом підрахунку кількості позитивно забарвлених ядер клітин для білку p63 та цитоплазми клітин для цитокератинів СК5/14. У кожному спостереженні частка імуногістохімічно мічених ядер з p63 та клітин з СК5/14 визначалась у відсотках: підраховувався відсоток клітин з маркером у 10 полях по 100 клітин, а також середній відсоток, а його показник оцінювався як індекс імуногістохімічного мічення клітин (ІМ%). Експресія досліджених білкових маркерів оцінювалась гістотопографічно у шарах епітелію: у клітинах базального і супрабазальних його шарів, а також в залежності від гістопатологічних змін у слизовій оболонці порожнини рота.

Результати дослідження та їх обговорення

Аналіз стану слизової оболонки порожнини рота у чоловіків, що не палили, показав, що з 13 проаналізованих біопсій в 10 спостереженнях слизова оболонка була у

межах морфологічної норми, і ці спостереження склали контрольну групу. У решти – 3 спостереженнях (вік померлих – 45, 71, 82 р.) були виявлені ознаки дисплазії епітелію (низька, середня, висока), і вони не

ввійшли у контрольну групу та оцінені як такі, що мають гістопатологічні зміни у слизовій оболонці. Ці спостереження були включені у групу пацієнтів з передраковими станами слизової оболонки порожнини рота.

Таблиця 1

Індекс імуногістохімічного мічення клітин (ІМ%) з маркерними білками р63 і СК_{5/14} та їх гістотопографія в клітинних шарах епітелію слизової оболонки порожнини рота у осіб контрольної групи

Вік обстежених, (роки)	ІМ (%) клітин в нормальній слизовій оболонці порожнини рота у обстежуваних контрольної групи			
	р63 базальний шар епітелію /коливання у полях	р63 супрабазальні шари епітелію /коливання у полях	СК _{5/14} базальний шар епітелію /коливання у полях	СК _{5/14} супрабазальні шари епітелію /коливання у полях
32	63,0 / 46-82	5,4 / 2-9	30,8 / 30-35	4,0 / 2-10
33	52,7 / 44-65	4,0 / 2-6	26,0 / 5-34	2,0 / 2-8
34	44,8 / 40-52	4,6 / 2-7	30,8 / 13-35	4,0 / 2-8
42	36,2 / 21-48	7,0 / 0-18	26,0 / 5-33	2,0 / 2-8
44	42,8 / 20-48	7,6 / 0-18	39,7 / 15-61	5,0 / 2-10
49	37,0 / 13-60	10,0 / 0-20	36,7 / 15-63	0,2 / 0-1
55	42,6 / 40-54	4,0 / 2-8	36,4 / 22-48	4,0 / 2-6
57	46,8 / 38-54	3 / 0-9		2,0 / 0-2
60	35,4 / 22-48	7,4 / 2-16	34,6 / 32-54	1,0 / 0-10
68	34,6 / 32-54	0	34,8 / 5-36	0

Таблиця 2

Індекс імуногістохімічного мічення клітин (ІМ%) з маркерними білками р63 і СК_{5/14} та їх гістотопографія в клітинних шарах епітелію слизової оболонки порожнини рота у обстежуваних групи ризику

Вік обстежених (роки)	Слизова оболонка порожнини рота	ІМ (%)			
		р63 базальний шар епітелію /коливання у полях	р63 супрабазальні шари епітелію /коливання у полях	СК _{5/14} базальний шар епітелію /коливання у полях	СК _{5/14} супрабазальні шари епітелію /коливання у полях
50	Гіперплазія	66,3 / 44-72	0,2 / 0-2	50,2 / 20-80	0
52	Гіперплазія	52,4 / 38-59	0	50,2 / 36-56	0
51	Дисплазія низька	31,8 / 28-34	10 / 0-20	16,3 / 0-35	6,2 / 2-12
45	Дисплазія низька	24,5 / 4-29	9,9 / 0-40	20,4 / 4-28	3,6 / 0-10
54	Дисплазія середня	20,4 / 0-100	16,2 / 0-36	16,3 / 0-35	12,4 / 0-28
53	Дисплазія середня	31,3 / 16-54	13,8 / 0-29	23,0 / 16-36	6,4 / 0-12
40	Дисплазія висока	22,5 / 0-56	37,2 / 0-76	20,2 / 4-28	36,2 / 15-47
55	Дисплазія висока	46,8 / 38-53	44,2 / 36-58	38,7 / 15-63	20,5 / 37-58
56	Дисплазія висока	47,6 / 40-57	51,1 / 18-36	22,2 / 7-56	46,6 / 40-56
61	Дисплазія висока/ Інтраепітеліальний рак	40,3 / 15-55	56,3 / 20-65	31,2 / 16-50	36,0 / 20-65

Клітини, які експресують маркерний регуляторний ядерний білок епітеліальних стовбурових/прогеніторних клітин p_{63} і їх цитокератини $CK_{5/14}$ у морфологічно нормальному епітелії слизової оболонки, переважали серед клітин базального шару (базальний шар, коливання ІМ p_{63} – 34,6-63,0%; $CK_{5/14}$ – 26,0-39,7%) і в невеликому відсотку спостерігались у супрабазальних шарах, що розташовані безпосередньо за базальним (парабазальний/супрабазальний шар, коливання ІМ) p_{63} – 3,0-10,0%; $CK_{5/14}$ – 1,0-5,0%), (рис. 1, 2). У поверхневих супрабазальних шарах нормального, морфологічно незмінного епітелію слизової оболонки клітин з експресією маркерних білків p_{63} , $CK_{5/14}$ не виявлено. Це свідчить про нормальні процеси відновлення клітин епітелію досліджуваної слизової оболонки порожнини рота у осіб контрольної групи.

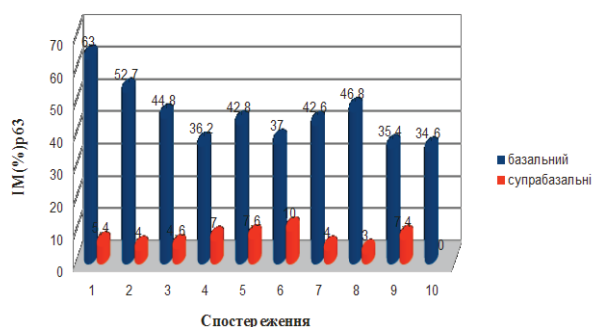


Рис. 1. Індекс імуногістохімічного мічення клітин (ІМ%) з маркерним білком p_{63} в базальному шарі та супрабазальних шарах епітелію слизової оболонки порожнини рота у осіб контрольної групи.

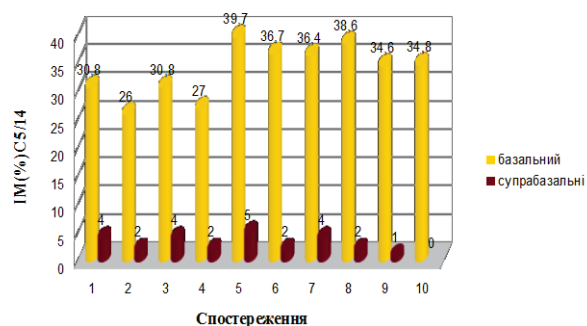


Рис. 2. Індекс імуногістохімічного мічення клітин (ІМ%) з маркерними цитокератинами $CK_{5/14}$ в базальному шарі та супрабазальних шарах епітелію слизової оболонки порожнини рота у осіб контрольної групи.

Регуляторний ядерний білок p_{63} і цитокератини $CK_{5/14}$ є маркерними білками переважно клітин базального шару, які експресуються у епітеліальних стовбурових і прогеніторних клітинах та забезпечують функціонування цих клітин у базальному шарі епітелію слизової оболонки, а саме: самооновлення стовбурових та проліферацію прогеніторних клітин. Тому цей ядерний білок епітеліальних стовбурових / прогеніторних клітин забезпечує не тільки статус “qwo” стовбурових клітин, а також є молекулярним “годинником” проліферації та подальшого включення програми диференціювання клітин стратифікованого сквамозного епітелію [5, 11, 17, 24].

Гістологічний аналіз слизової оболонки порожнини рота у осіб, які палять, виявив в ній гістопатологічні зміни. Серед досліджених біопсій діагностовано як гіперпластичні, так і диспластичні процеси з переходом до полів з ознаками трансформованого фенотипу – інтраепітеліального раку. Слід зазначити, що гістологічні зміни у слизовій оболонці оцінювались у групі ризику на біопсійному матеріалі слизової оболонки, яка візуально не мала проявів передпухлинного процесу, тому, безумовно, в цих спостереженнях ми маємо гістопатологічно змінені мікроскопічні поля клітин у слизовій оболонці з ознаками гіперпластичних та диспластичних процесів і ще несформовані візуально передракові стани, але для зручності формалізації змін у слизовій оболонці вони визначені за класифікацією цих станів: гіперплазія, дисплазія (низька, середня, висока), інтраепітеліальний рак.

Аналіз експресії p_{63} і $CK_{5/14}$ у епітелії слизової оболонки порожнини рота в осіб з групи ризику (тютюнопаління, постійна дія мутагенів/канцерогенів з тютюну та інших) показав, що клітини, які експресують маркерний ядерний регуляторний білок стовбурових/прогеніторних клітин p_{63} та їх цитокератини $CK_{5/14}$, з розвитком дисплазійних процесів у слизовій оболонці реєструються не тільки серед клітин базального шару епітелію, а також у невластивих для нормального епітелію клітинах центральних та поверхневих супрабазальних шарів, де в нормі кератиноцити не діляться, а лише диференціюються та дозрівають.

Суттєве збільшення індексу імуногістохімічного мічення клітин (ІМ%) р₆₃ і СК_{5/14} у супрабазальних шарах епітелію слизової оболонки в переважній більшості спостережень було чітко пов'язане зі ступенем прояву дисплазійних процесів – з дисплазією епітелію високого ступеня та полями клітин з ознаками трансформованого фенотипу у слизовій оболонці (рис. 3, 4, 5, 6). Ці дані свідчать про участь клітин, які експресують маркерні білки епітеліальних стовбурових і прогеніторних клітин р₆₃ і СК_{5/14} серед клітин центральних і поверхневих супрабазальних шарів епітелію слизової оболонки з дисплазійними процесами, у формуванні полів клітин з трансформованим фенотипом у осіб, що палять, які відносяться до групи ризику розвитку раку порожнини рота [36].



Рис. 3. Індекс імуногістохімічного мічення клітин ІМ (%) з маркерним білком р₆₃ в шарах епітелію слизової оболонки порожнини рота у осіб з групи ризику в залежності від гістопатологічних змін у слизовій оболонці (спост. 1, 2 – гіперплазія; 3, 4 – дисплазія (низька); 5, 6 – дисплазія (середня); 7, 8, 9 – дисплазія (висока); 10 – дисплазія висока/ інтраепітеліальний рак).

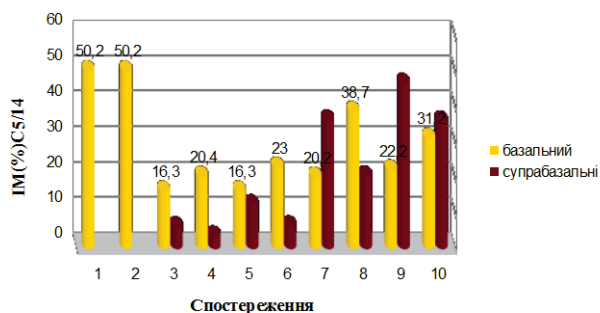


Рис. 4. Індекс імуногістохімічного мічення клітин ІМ (%) з маркерними цитокератинами СК_{5/14} в шарах епітелію слизової оболонки порожнини рота у осіб з групи ризику в залежності від гістопатологічних змін у слизовій оболонці (спост. 1, 2 – гіперплазія; 3, 4 – дисплазія (низька); 5, 6 – дисплазія (середня); 7, 8, 9 – дисплазія (висока); 10 – дисплазія висока/ інтраепітеліальний рак).

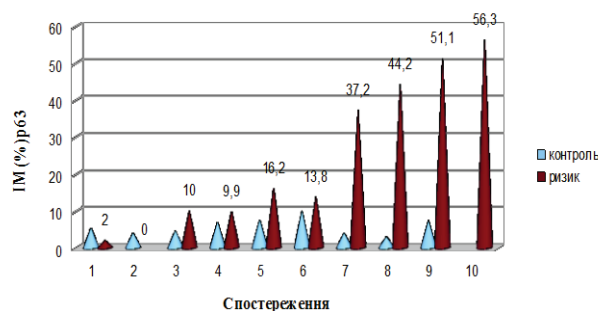


Рис. 5. Індекс імуногістохімічного мічення клітин ІМ (%) з маркерним білком р₆₃ в супрабазальних шарах епітелію слизової оболонки порожнини рота у осіб з груп контролю та ризику в залежності від гістопатологічних змін у слизовій оболонці (спост. 1, 2 – гіперплазія; 3, 4 – дисплазія (низька); 5, 6 – дисплазія (середня); 7, 8, 9 – дисплазія (висока); 10 – дисплазія висока/ інтраепітеліальний рак).

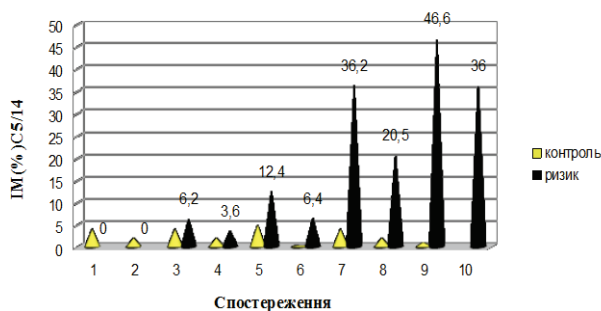


Рис. 6. Індекс імуногістохімічного мічення клітин ІМ (%) з маркерними цитокератинами СК_{5/14} в супрабазальних шарах епітелію слизової оболонки порожнини рота у осіб з групи контролю і ризику в залежності від гістопатологічних змін у слизовій оболонці (спост. 1, 2 – гіперплазія; 3, 4 – дисплазія (низька); 5, 6 – дисплазія (середня); 7, 8, 9 – дисплазія (висока); 10 – дисплазія висока/ інтраепітеліальний рак).

Реєстрація суттєвої частки клітин, які експресують маркерні білки епітеліальних стовбурових/прогеніторних клітин р₆₃, СК_{5/14} серед клітин центральних та поверхневих супрабазальних шарів епітелію у полях дисплазійного епітелію, підтверджує наші дані про реєстрацію клітин з фенотипом базальних клітин у поверхневих шарах буккального епітелію, отриманих нами при цитологічному аналізі (фарбування за традиційним методом Папаніколау) препаратів буккальної слизової оболонки осіб, які палять, та у хворих на плоскоклітинний рак порожнини рота (15).

Епітеліальна дисплазія використовується сьогодні як основний гістологічний критерій оцінки прогнозування клітинної трансформації. Трансформований фенотип у епітелії слизової оболонки порожнини рота, що морфологічно реалізується через дисплазію і дисплазію високого ступеня, за сучасною гістологічною класифікацією передракових станів відноситься до раку у власне слизовій оболонці (інтраепітеліальний рак – Ca in situ [18, 31].

Аналіз експресії маркерних білків p63 і СК_{5/14} у слизовій оболонці хворих з клінічними проявами передракових станів в порожнині рота і з верифікованим патгістологічним діагнозом, також виявив збільшення індексу імуногістохімічного мічення клітин ІМ (%) p63 і СК_{5/14} у супрабазальних шарах епітелію слизової оболонки в залежності від гістопатологічних змін у останній. Найвищі показники ІМ (%) p63 і СК_{5/14} були у лейкоплакіях з ознаками дисплазії та інтраепітеліальному раку (рис. 7, 8). Доказом того, що клітини базального шару, які експресують маркерний регуляторний ядерний білок епітеліальних стовбурових/прогеніторних клітин p63 та їх цитокератини СК_{5/14}, задіяні у формуванні трансформованого фенотипу, слугують також і високі показники цих клітин (ІМ більше 50%), визначені у супрабазальних шарах епітелію досліджених лейкоплакіях, які у великому відсотку, якщо не проводити лікування, трансформуються у рак, та у спостереженні папіломатозу з малігнізацією.

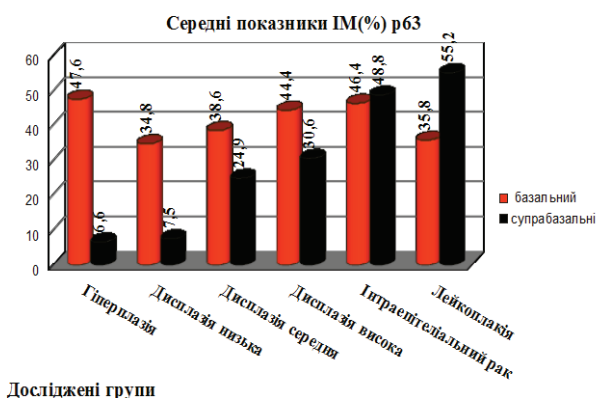


Рис. 7. Індекс імуногістохімічного мічення клітин (ІМ%) p63 в базальному та супрабазальних шарах епітелію слизової оболонки у групах хворих з передраковим станом в слизовій оболонці порожнини рота.

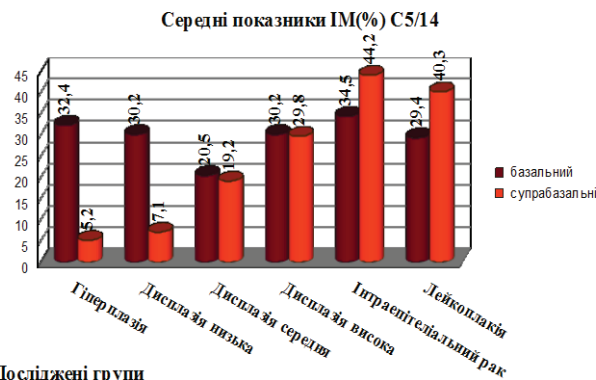


Рис. 8. Індекс імуногістохімічного мічення клітин ІМ(%) СК_{5/14} в базальному та супрабазальних шарах епітелію слизової оболонки у обстежуваних групах хворих з передраковим станом в слизовій оболонці порожнини рота.

Визначення експресії маркерних білків епітеліальних стовбурових і прогеніторних клітин p63 і СК_{5/14} у слизовій оболонці хворих з передраковими станами у ротовій порожнині підтвердило висновок про участь клітин, що експресують ці білки, в утворенні трансформованого фенотипу в дисплазіях середнього та високого ступеня, а також у слизовій оболонці з іншими передраковими станами (лейкоплакія, папіломатоз), де морфологічно було виявлено поля атипового епітелію, та при інвазивному раку, що було показано при дослідженні плоскоклітинного раку порожнини рота [32].

Отримані результати дають підстави стверджувати, що в утворенні трансформованого фенотипу в епітелії слизової оболонки порожнини рота задіяні епітеліальні стовбурові та прогеніторні клітини базального шару, які за умов аномальної регенерації у відповідь на постійну дію на слизову оболонку факторів канцерогенезу (канцерогени та мутагени з тютюну; професійні та з навколишнього середовища контакти з мутагенами) мутують чи виходять з-під контролю регуляторних сигнальних шляхів, а потім мутують. Це проявляється в нерегульованій проліферації та міграції (просуванні) стовбурових/прогеніторних клітин, не диференціюючись, за межі базального шару у невласиві для них центральні й поверхневі супрабазальні шари епітелію, де вони не диференціюються при дозріванні та регене-

рації епітелію, а формують мікрополя, які проходять усі стадії клітинної трансформації та гістопатологічного прогресування. Не виключається можливість некерованої проліферації також прогеніторних клітин і на межі базальний шар/підслизова. Аналіз джерел літератури свідчить про суттєві порушення у сигнальних шляхах регуляції епітеліальних стовбурових клітин та мутації у слизовій оболонці порожнини рота [7, 10, 22, 32, 34, 40].

Висновки

1. Визначено епітеліоцити, які експресують маркерні білки епітеліальних стовбурових і прогеніторних клітин базального шару p63 і СК_{5/14}, у центральних та поверхневих супрабазальних шарах дисплазійного епітелію та при інтраепітеліальному раку.

2. Показано зв'язок супрабазальної експресії (центральні та поверхневі супрабазальні шари епітелію) маркерних білків епітеліальних стовбурових та прогеніторних клітин p63 і СК_{5/14} у епітелії слизової оболонки порожнини рота зі стадією гістопатологічного прогресування у слизовій оболонці при передракових станах (дисплазія середня, висока, інтраепітеліальний рак) та у осіб з групи ризику, що свідчить про участь клітин, які експресують ці маркерні білки, в утворенні трансформованого фенотипу.

3. Імуногістохімічна оцінка експресії маркерних білків епітеліальних стовбурових і прогеніторних клітин p63 і СК_{5/14} у клітинах супрабазальних шарів епітелію може бути застосована для диференціальної гістологічної діагностики дисплазій та інтраепітеліального раку у слизовій оболонці порожнини рота.

1. Al-Hajj M., Clarke M.F. Self-renewal and solid tumor stem cells // *Oncogene*. – 2004. – Vol. 20, №23. – P. 7274-7282.
2. Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2003. – Vol. 100. – P. 3983-3988.
3. Alison M.R., Islam S., Wright N.A. Stem cells in cancer: instigators and propagators? // *J. Cell Science*. – 2010. – Vol. 123. – P. 2357-2368.
4. Barbieri C.T., Pietenpol J.A. p63 and epithelial biology // *Experimental Cell Res*. – 2006. – Vol. 312, №6. – P. 695-706.
5. Bartoluzzi M.C., Yurqel L.S., Dekker N.P., Jordan R.C., Reqezi J.A. Assessment of p63 expression in oral squamous cell carcinoma and dysplasias // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endoc*. – 2004. – Vol. 98, №6. – P. 698-704.
6. Chen Y.-C., Chen Y.-W., Hsu H.-S., Tseng L.-M., Huang P.-I., Lu K.-H., Chen D.-T., Tai L.-K., Yung M.-C., Chang S.-C., Ku H. H., Chiou S. H., Lo W. L. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2009. – Vol. 385. – P. 307-313.
7. Chinn S.B, Darr O.A., Peters R.D., Prince M.E. The role of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells in tumorigenesis, metastasis, and treatment failure. *Front Endocrinol. (Lausane)*. – 2012. – Vol. 3. – P. 90. Published online 2012 August 3. doi: 10.3389/fendo.2012.00090.
8. Clay M.R., Tabor M., Owen J.H., Carey T.E., Bradford C.R., Wolf G.T., Wicha M.S., Prince M.E. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase // *Head Neck*. – 2010. – Vol. 32. – P. 1195-1201.
9. Costea D., Gammon L., Kitajima K., Harper L., Mackenzie I. Epithelial stem cells and malignancy // *J. Anat*. – 2008. – Vol. 213, №1. – P. 45-51.
10. Davis S.J., Divi V., Owen J.H., Bradford C.R., Carey T.E., Papagerakis S., Prince M.E. Metastatic potential of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma // *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg*. – 2010. – Vol. 136. – P. 1260-1266.
11. Di Como C.J., Urist M.J., Babayan I., Drobnjak M., Hedvat C.V., Teruya-Feldstein J., Pohar K., Hoos A., Cordon-Cardo C. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues // *Clin. Cancer Res*. – 2002. – Vol. 8. – P. 494-501.
12. Fang D., Nguyen T.K., Leishear K., et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas // *Cancer Res*. – 2005. – Vol. 65, №20. – P. 9328-9337.
13. Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis // *Cell*. – 1990. – Vol. 61. – P. 759-67.

14. Kim C.F.B., Jackson E.L., Woolfenden A.E., Lawrence S., Babar I., Vogel S., Crowley D., Bronson R.T., Jacks T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer // *Cell*. – 2005. – Vol. 121. – P. 823-835.
15. Kirieieva S., Yurchenko N., Shukaleyevych V. Serial cytological assay of buccal exfoliated cells as technology for mass screening of individuals with risk of oral cancer for monitoring and cancer prevention. 4th International Conference, Cancer prevention 2006, Advances in Molecular and Clinical Aspects of Cancer Prevention, 16-18 February, St. Gallen, Switzerland // *Europ. J. Cancer*. – 2006. – Vol. 4, №1. – P. 52.
16. Knudson A.G. Two genetic hits (more or less) to cancer // *Nature Rev. Cancer*. – 2001. – Vol. 1, №2. – P. 157-162.
17. Koster M.I., Kim S., Mills A.A., DeMayo F.J., Roop D.R. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program // *Genes Dev*. – 2004. – №18. – P. 126-131.
18. Levis Roy Eversole Dysplasia of the upper aerodigestive tract squamous epithelium // *Head Neck Pathol*. – 2009. – Vol. 3, №1. – P. 63-68.
19. Li C., Heidt D.G., Dalerba P., Burant C.F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke M. F., Simeone D.M. Identification of pancreatic cancer stem cells // *Cancer Res*. – 2007. – Vol. 67. – P. 1030-1037.
20. Li L., Neaves W. B. Normal stem cells and cancer stem cells; The niche matters // *Cancer Res*. – 2006. – Vol. 66, № 9. – P. 4553-4557.
21. Moll R., Divo M., Langbein L. The human keratins: biology and pathology // *Histochem. Cell Bio*. – 2008. – Vol. 129, №6. – P. 705-733.
22. Monroe M.M., Anderson E.C., Clauburgh D.R., Wong M.H. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma // *J. Oncol*. – 2011. – Vol. 2011. – P. 762-780.
23. Muzio L., Santarell A., Caltabiano R., Rubini C., Pieranici T., Trevisiol L., Lanzafone S., Buto P., Piattell A. p63 expression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma // *Hum. Pathol*. – 2005. – Vol. 36, №2. – P. 187-194.
24. Nylander K., Vojtesek B., Nenutil R., Lindgren B., Roos G.W., Zhanxiang W., Sjostrom B., Dahlqvist A., Coates P.J. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells // *J. Pathol*. – 2002. – Vol. 198. – P. 417-427.
25. O'Brien C.A., Pollett A., Gallinger S., Dick J.E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice // *Nature*. – 2007. – Vol. 445. – P. 106-110.
26. Prince M., Sivanandan R., Kaczorowski A., Wolf G., Kaplan M., Dalerba P., Weissman I., Clarke M., Ailles L. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – Vol. 104. – P. 973-978.
27. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells // *Nature*. – 2001. – Vol. 414. – P. 105-111.
28. Romano R.A., Ortt K., Birkaya B. et al An active role the Delta Np63 isoforms p63in regulating basal keratin genes K5, K14 andirecting epidermal cell fate // *Pleo. Sone*. – 2009. – Vol. 204, №5. – P. 5623-5628.
29. Rosen J.M., Jordan C.T. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm // *Science*. – 2009. – Vol. 324, №5935. – P. 1670-1673.
30. Senoo M., Pinto F., Crum C.P., McKoen F. p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia // *Cel*. – 2007. – Vol. 3129, №3. – P. 523-536.
31. Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M., Bonn V.E., Hawkins C., Squire J., Dirks P.B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors // *Cancer Res*. – 2003. – Vol. 63. – P. 5821-5828.
32. Sobin L.H., Wittekind C.H. Head and Neck tumors-lips and oral cavity. In Wittekind CH, editor, TNM classification of malignant tumors, 5th ed. International Union Against Cancer, New York: Wiley-Liss. – 1997. – P. 59-62.
33. Takeda T., Sugihara K., Hirayama Y., Hirano M., TanumaJ-I, Semba I. Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and expression in oral epithelial dysplasia // *Oral Pathology and Medicine*. – 2006. – Vol. 35, №6. – P. 369-375.
34. Truong A.B., Khavari P.A. Control of keratinocyte proliferation and differentiation by p63 // *Cell Cycle*. – 2007. – Vol. 6, №3. – P. 295-299.
35. Vermeulen L., de Sousa e melo F., Richel D.J., Medema J.P. The developing cancer-stem-cell model: clinical challenges and opportunities // *Lancet Oncol*. – 2012. – Vol. 13. – P. 83-89.
36. Wang S.J., Wong G., de Heer A.M., Xia W., Bourguignon L.Y.W. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression // *Laryngoscope*. – 2009. – Vol. 119. – P. 1518-1530.
37. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*. – 2009. – Vol. 45. – P. 309-316.
38. Wicha M.S., Liu S., Dontu D. Cancer stem cells: an old idea-a paradigm shift // *Cancer Res*. 2006. – Vol. 66. – P.1883-1890; discussion 1895-1896.
39. Xin L., Lawson D.A., Witte O.N. The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis // *Proc. Acad. Sci. USA*. – 2005. – Vol. 102, №19. – P. 6942-6947.
40. Yang A., Kaghad M., Wang Y. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with

transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities // Mol. Cell. – 1998. - №2. – P. 305-316.

41. Zhang Z, Filho MS, Nör JE. The biology of head and neck cancer stem cells // Oral Oncol. – 2012. – Vol. 48, №1. – P. 1-9.

Надійшла до редакції 03.10.13.

© С.С. Кіреєва, Н.П. Юрченко, М.В. Сидоренко, Н.Ю. Першко, В.С. Процик, 2014

**ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРНЫХ БЕЛКОВ
ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ И
ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК:
РЕГУЛЯТОРНОГО ЯДЕРНОГО БЕЛКА P₆₃
И ЦИТОКЕРАТИНОВ СК_{5/14} В ЭПИТЕЛИИ
СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА
ПРИ ПРЕДРАКОВЫХ СОСТОЯНИЯХ
И У ЛИЦ ИЗ ГРУППЫ РИСКА**

*Киреева С.С., Юрченко Н.П., Сидоренко М.В.,
Першко Н.Ю., Процик В.С. (Киев)*

Резюме

Оценивалась экспрессия маркеров эпителиальных стволовых и прогениторных клеток p₆₃, CK_{5/14} и их биология в эпителии слизистой оболочки полости рта у пациентов с предраковыми поражениями и с риском развития рака. С этой целью исследовались биопсии слизистой оболочки полости рта от 10 мужчин, которые не курили сигарет (контрольная группа, материал судебно-медицинской экспертизы) и 13 куривших (группа риска, мат. суд-мед экспертизы), а также 42 биопсии предраковых поражений. В слизистой оболочке полости рта от лиц, которые курили (группа риска), и в предраковых поражениях выявлено аномальное распределение клеток, которые экспрессируют p₆₃ и CK_{5/14} в супрабазальных слоях эпителия. Супрабазальная экспрессия и ИМ (%) p₆₃ и CK_{5/14} коррелируют с дисплазией высокой степени и Ca in situ. Это свидетельствует об участии клеток, которые экспрессируют маркерные белки эпителиальных стволовых /прогениторных клеток p₆₃, CK_{5/14} в образовании трансформированного фенотипа и биологии рака полости рта. Иммуногистохимическая оценка ИМ (%) клеток с p₆₃ и CK_{5/14} в супрабазальных слоях эпителия слизистой оболочки полости рта может быть использована для дифференциальной диагностики дисплазии и интраэпителиального рака (Ca in situ) в слизистой оболочке полости рта.

Ключевые слова: слизистая оболочка полости рта, группа риска, предраковые поражения, дисплазия, Ca in situ, эпителиальная стволовая/прогениторная клетка, маркеры, p₆₃, CK_{5/14}.

**EXPRESSION OF MARKER PROTEINS
OF THE EPITHELIAL STEM
AND PROGENITOR CELLS, REGULAR
NUCLEAR MARKER P₆₃ AND CYTOKERATINS
CK_{5/14} IN EPITHELIUM OF ORAL MUCOSA
FROM PATIENTS WITH PRECANCEROUS
LESIONS AND RISK OF ORAL CANCER**

*Kiryeeva S.S., Yurchenko N.P., Sidorenko M.V.,
Perszko N.Yu., Protsyk V.S. (Kiyev)*

Summary

The expression markers of epithelial stem / progenitor cells p₆₃ and CK_{5/14} and their biology in epithelium of oral mucosa in patients with precancerous lesions and epidemiological risk of oral cancer was estimated. The study include biopsy specimens of oral mucosa from 10 men that nonsmoking tobacco (control group, material forensic medical examination), with 13 smoking tobacco (epidemiological risk group, material forensic medical examination), of 42 precancerous lesions. The alteration of oral mucosa were classified according to the UICC criteria. In oral mucosa from individuals with smoking habits (group risk) and in precancerous lesions showed anomaly distribution of cells that expressed markers p₆₃ and CK_{5/14} in suprabasal layers. Suprabasal immunoeexpression and Labeling Index (LI %) of p₆₃ and CK_{5/14} correlate with height dysplasia and Ca in situ. Its to confirm the participation of cells, that expressed of markers proteins of the epithelial stem //progenitor cells p₆₃, CK_{5/14} in formation of transformation phenotype and biology of oral cancer. The immunohistochemical estimation of Labeling Index (LI %) of p₆₃, CK_{5/14} cells in suprabasal epithelial layers of oral mucosa can be used for differential diagnostic dysplasia and Ca in situ.

Key words: oral mucosa, risk group of oral cancer, precancerous lesions, dysplasia, Ca in situ, epithelial stem cell, markers, p₆₃, CK_{5/14}.