

УДК 576.54

UDC 576.54

**ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ МАЛИГНИЗАЦИИ  
АСТРОЦИТАРНЫХ ОПУХОЛЕЙ МОЗГА  
ЧЕЛОВЕКА НА ЭКСПРЕССИЮ  
КОННЕКСИНА-43****INFLUENCE OF MALIGNIZATIONS LEVEL  
OF ASTROCYTIC HUMAN BRAIN TUMOR ON  
THE EXPRESSION OF CONNEXIN-43**

Гранкина Анастасия Олеговна  
младший научный сотрудник, аспирант  
*Лаборатория функциональной нейроморфологии и  
электронной микроскопии Научно-  
исследовательского института нейрокибернетики  
Академии биологии и биотехнологии Южного  
федерального университета, Ростов-на-Дону,  
Россия, 344090, пр. Стачки, 194/1, к.715*

Grankina Anastasiya Olegovna  
junior researcher, postgraduate student  
*Laboratory of functional neuromorphology and  
electron microscopy of Kogan's Research Institute for  
Neurocybernetics Academy of biology and  
biotechnology, Southern Federal University,  
Rostov-on-Don, Russia*

Проведено исследование 12 образцов  
астроцитарных опухолей головного мозга  
человека, отличающихся по уровню малигнизации  
и гистологическим показателям. В работе  
применялся метод иммуногистохимии с  
использованием коммерческого антитела анти-  
коннексин-43 (Cx 43), предварительное  
тестирование которого проводилось на ткани  
миокарда крыс (положительный контроль).  
Исследование показало, что с повышением уровня  
малигнизации астроцитом, понижается уровень  
экспрессии коннексина-43, что, по-видимому,  
связано с деструкцией межклеточных щелевых  
контактов в ткани опухоли

Study was performed on 12 samples of astrocytic  
human brain tumors, which differ by the level of  
malignancy and histological indications. The study  
was conducted with the method of  
immunohistochemistry using a commercially available  
antibody anti-connexin-43 (Cx 43), a prior test of  
which was carried out on myocardium tissue of rats  
(positive control). The study showed that with the  
increasing of malignant level of astrocytomas, there  
was marked the decreased level of connexin-43  
expression of, which is apparently to be associated  
with the destruction of intercellular gap junctions in  
tumor tissue

Ключевые слова: АСТРОЦИТАРНЫЕ ОПУХОЛИ,  
КОННЕКСИН-43, ИММУНОГИСТОХИМИЯ

Keywords: ASTROCYTIC TUMORS, CONNEXIN-  
43, IMMUNOHISTOCHEMISTRY

## ВВЕДЕНИЕ

Щелевые контакты или gap junction формируются за счет семейства трансмембранных белков – коннексинов, обеспечивающих пассивный межклеточный обмен ионов и небольших молекул массой до 1 кДа [10]. Среди двадцати членов этого семейства особое значение в ЦНС и миокарде принадлежит коннексину-43 (Cx43) [25]. Показано, что во многих опухолевых клетках, например, в предстательной и молочной железе человека, наблюдается снижение экспрессии коннексина-43 [12,13,20,23]. При этом в качестве важного патогенетического механизма злокачественного опухолевого роста в настоящее время рассматривается

нарушение межклеточных взаимодействий, реализуемых посредством щелевых контактов [5,14,22].

В доступной литературе существует не так много информации об изменении щелевых контактов при развитии астроцитарных опухолей головного мозга человека. Эти данные получены, преимущественно, в исследованиях, выполненных на культурах клеток, и отличаются противоречивостью [9,15,26]. Как известно, астроцитарные опухоли являются наиболее распространенным классом первичных нейроэпителиальных опухолей и составляют около половины всех опухолей головного мозга человека. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), астроцитомы классифицируются на 4 уровня или Grade: Grade I (пилоцитарная или пилоидная астроцитомы), Grade II (диффузная астроцитомы: гемистацитарная, протоплазматическая, фибриллярная), Grade III (анапластическая астроцитомы), Grade IV (мультиформная глиобластома).

В последнее время при исследовании астроцитарных новообразований широко используется метод иммуногистохимии, что подтверждается многочисленными исследованиями по различным аспектам данной проблемы [1,2,3,4,8,16,21]. Суть метода заключается в определении локализации антигенов в определенных компонентах тканей, типах клеток и клеточных структурах с помощью специфических антител [7].

В данной статье представлены результаты иммуногистохимического анализа экспрессии белка коннексина-43 на разных уровнях малигнизации астроцитарных опухолей мозга человека.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования было использовано 12 образцов астроцитарных опухолей головного мозга человека, отличающихся по гистологическим показаниям и уровню малигнизации, а именно, по 4 образца астроцитом Grade II, III и IV (глиобластома). Исследование операционного материала человека проводилось в соответствии с лицензией № ФС-61-01-002139 от 9 сентября 2013 года. Образцы фиксировались в 10% забуференном формалине, далее на вибраторе Leica изготавливались фрагменты размером 100 мкм, которые после обезвоживания заливались в парафиновые блоки по общепринятой методике. Следующим этапом являлось приготовление 4 мкм срезов на ультрамикротоме Leica. После депарафинирования и дегидратации срезов проводилась тепловая демаскировка антигенов в цитратном буфере (Dako, Дания). Для иммуногистохимического исследования срезов использовалось первичное кроличье поликлональное антитело – rabbit polyclonal anti-Connexin 43 (Cx43) (кат. №71-0700, Invitrogen, USA) и система визуализации Dako EnVision System + Peroxidase (AEC), Dako Германия. После проведения иммуногистохимической реакции ядра клеток докрашивались гематоксилином.

Срезы инкубировали с первичным антителом к коннексину-43 (anti-connexin 43, rabbit polyclonal, Invitrogen, USA). В качестве положительного контроля использовались образцы миокарда. Визуализация препаратов проводилась при помощи светооптического микроскопа Leica 2500 (Германия). Интенсивность окрашивания рассчитывалась по условной 4-бальной шкале, в которой 1 соответствовала отсутствию окрашивания, 2 – слабому, 3 – умеренному, а 4 – сильному окрашиванию.

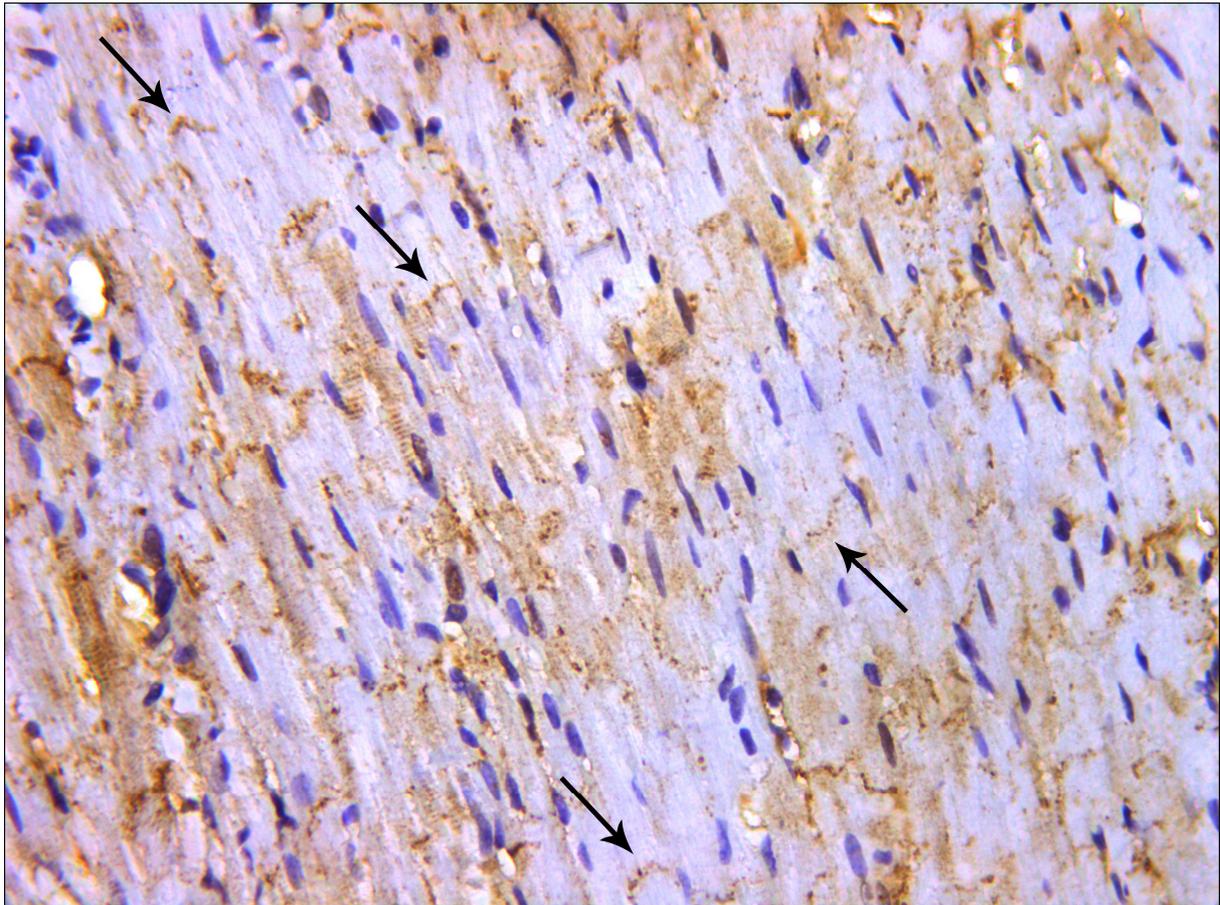
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения связи экспрессии коннексина-43 с прогрессией астроцитарных опухолей мозга человека было проведено иммуногистохимическое исследование срезов астроцитом с использованием специфического антитела к коннексину 43. Все результаты (Таблица 1) рассчитывались по описанной выше 4-х бальной шкале.

Таблица 1 – экспрессия коннексина-43 на разных уровнях малигнизации астроцитарных опухолей мозга человека

Grade (классификация ВОЗ)	Клиникопатологические данные	Количество	Уровень экспрессии коннексина-43
II	Гемистацитарная астроцитомы	2	3
	Протоплазматическая астроцитомы	1	3
	Фибриллярная астроцитомы	1	3
III	Анапластическая астроцитомы	4	2
IV	Мультиформная глиобластома	4	1

Проведенный нами положительный контроль подтвердил специфичность иммуногистохимической реакции с антителом Сх-43, поскольку была выявлена экспрессия данного белка на вставочных дисках кардиомиоцитов, что, согласно литературным данным [17,18], соответствует формированию щелевых контактов в ткани миокарда (рис.1).

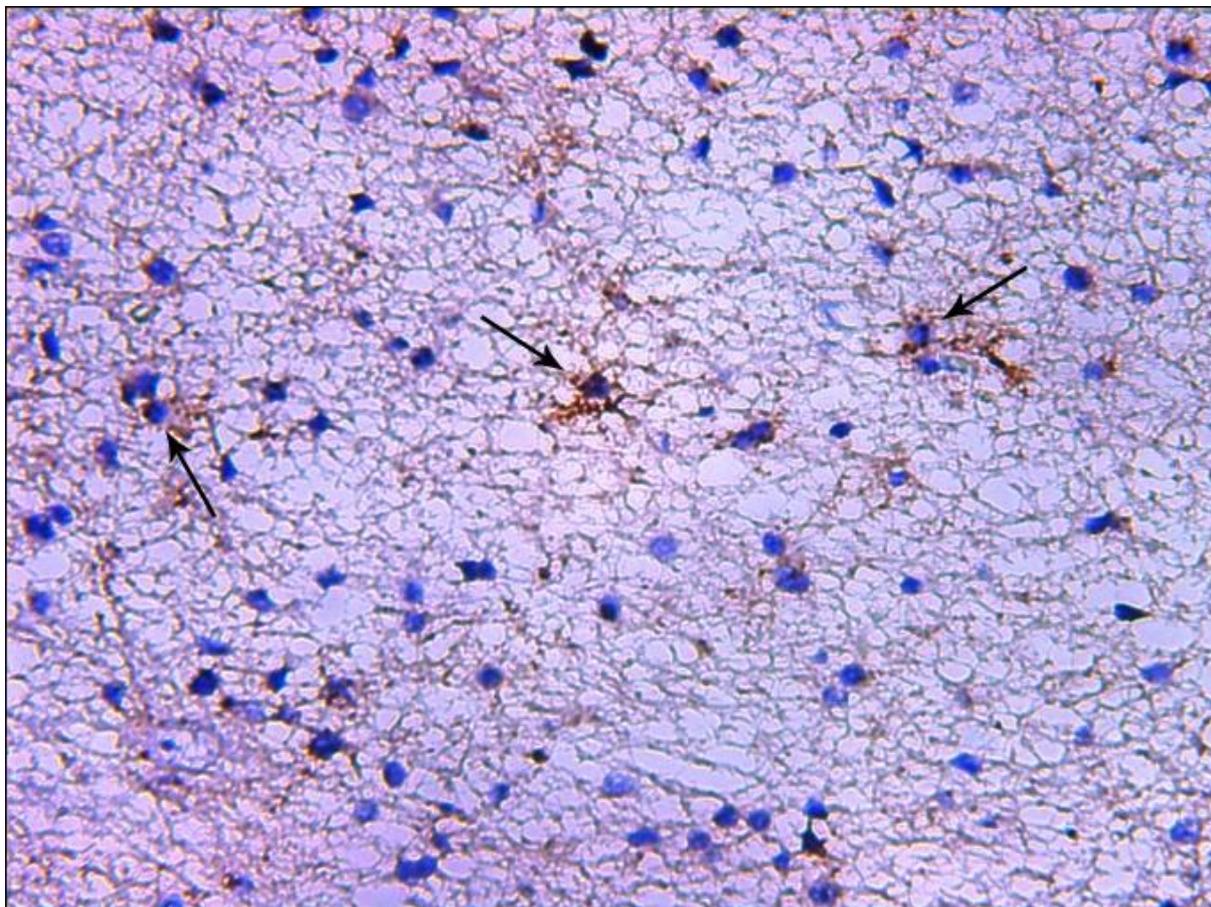


**Рисунок 1.** Экспрессия коннексина-43 в срезе миокарда крысы ( $\times 400$ ). Стрелками отмечены участки экспрессии Cx43 на вставочных дисках.

При изучении ткани мозга в большинстве случаев была выявлена слабая или отрицательная реакция с антителом anti-Cx-43. На гистологических препаратах астроцитомы Grade II среди многочисленных очагов некроза наблюдались несколько типов клеток различной величины: незрелые полиморфные нейроны в светлом окружении, ганглиозные клетки треугольной формы, расположенные группами и цепочками, клетки микроглии с мелкими ядрами, а также астроциты с небольшими цитоплазматическими телами. Также обнаруживались единичные группы, включающие две-три клетки.

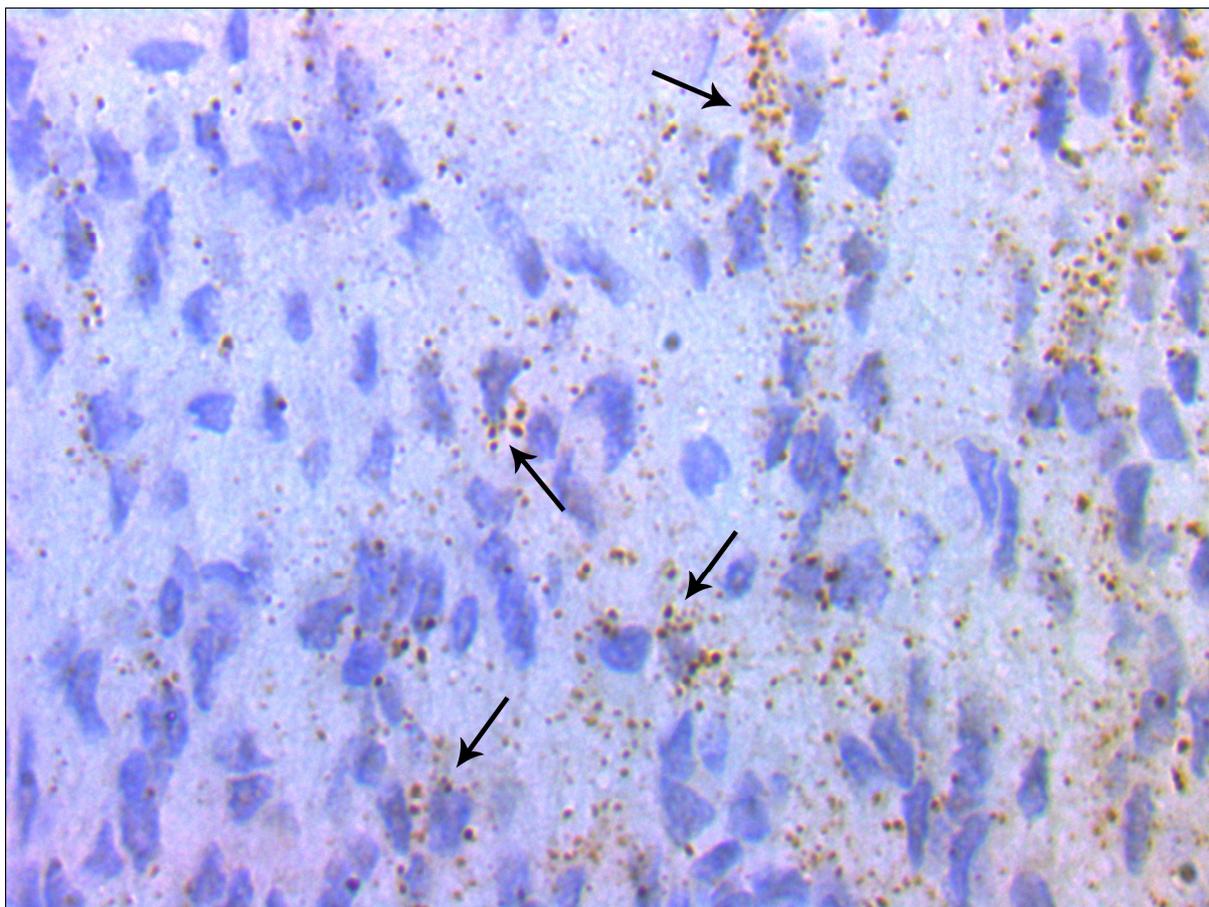
При проведении иммуногистохимической реакции на диффузных астроцитах Grade II в выборочных одиночных астроцитах визуализировалась выраженная реакция на коннексин-43 (рис.2, стрелки),

а также диффузная положительная реакция на некоторых участках опухоли.



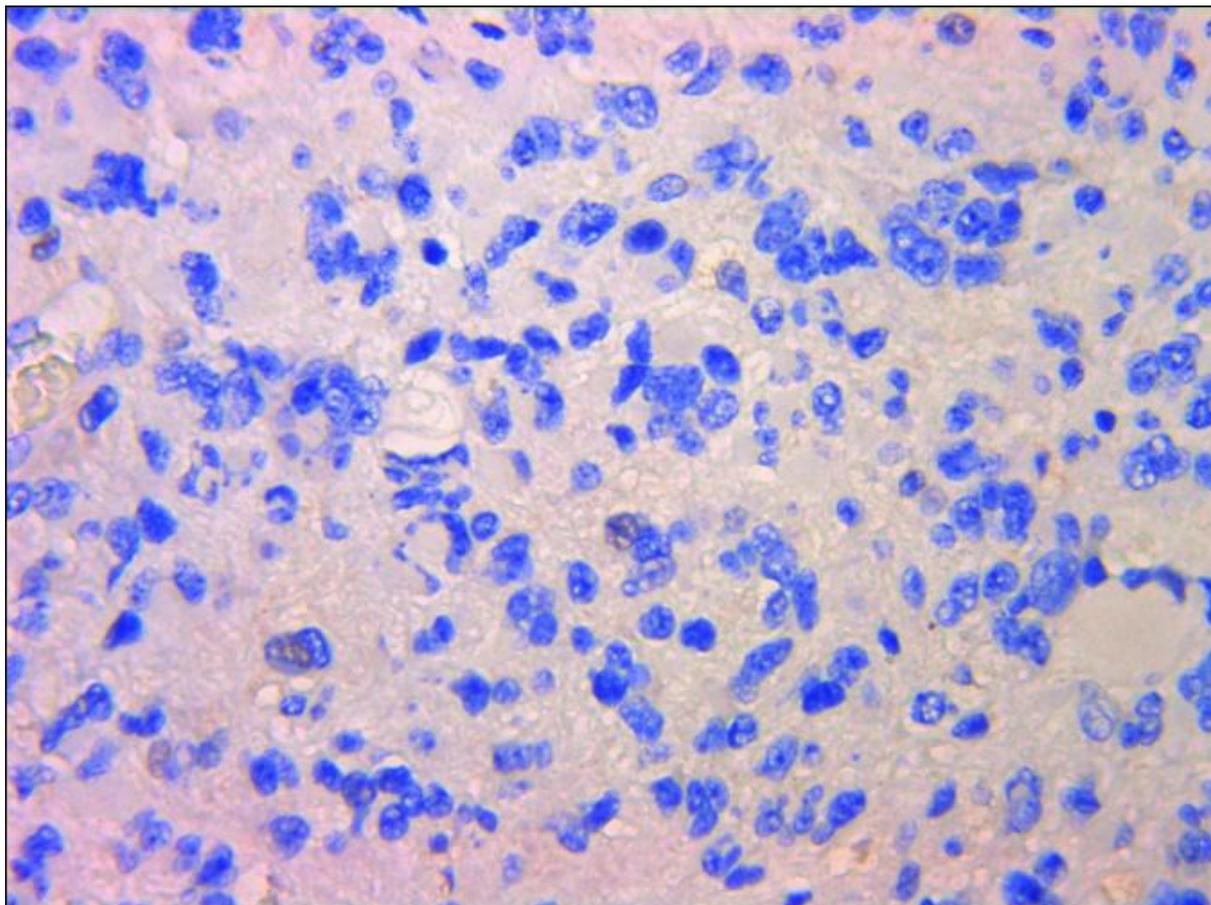
**Рисунок 2. Астроциты (стрелки), экспрессирующие коннексин-43 в астроцитарных опухолях мозга человека Grade II (×400).**

После проведения иммуногистохимической реакции с антителом anti-Cx-43 на препаратах анаптической астроцитомы (Grade III) визуализировалось резкое уменьшение структурных элементов, содержащих данный антиген, наблюдалась характерная «зернистость» за счет гранул хромогена, идентифицирующих локализацию белковых компонентов в цитоплазме и отростках опухолевых клеток (рис.3).



**Рисунок 3. Экспрессия коннексина-43 в анапластической астроцитоме мозга человека Grade III ( $\times 1000$ ). Стрелками обозначены гранулы хромогена.**

На гистологических препаратах мультиформной глиобластомы наблюдались веретенообразные клетки, формирующие тяжи и волокна с гиперхромными мелкими ядрами различной формы, большое количество митозов, в том числе, патологических. На фоне большого количества незрелых вытянутых ядер наблюдались крупные, даже гигантские полиморфные клетки с темными ядрами неправильной формы. Клетки формировали пласты, отмечались очаги некроза и кровоизлияний. После проведения иммуногистохимической реакции с использованием антитела anti-Cx-43 было выявлено отсутствие экспрессии белка коннексина-43 во всех образцах глиобластомы (рис.4).



**Рисунок 4. Отсутствие экспрессии коннексина-43 в мультиформной глиобластоме мозга человека (×400)**

### ОБСУЖДЕНИЕ

Астроцитомы представляют собой гетерогенную группу опухолей нейроэпителиального происхождения и являются самыми частыми первичными опухолями головного мозга, составляя около 50% всех интракраниальных бластом [6,24]. Как правило, они подразделяются на 4 уровня, из которых астроцитома Grade I (пилоцитарная, или пилоидная, астроцитома) считается доброкачественной, но способной к дальнейшему перерождению. Астроцитома Grade II является опухолью с низким уровнем малигнизации, а Grade III – высокомалигнизированной опухолью, при развитии которой наблюдается высокая клеточная пролиферация, ядерная атипия и анаплазия. Самой агрессивной астроцитомой является

мультиформная глиобластома (Grade IV), так как помимо изменений, характерных для астроцитомы Grade III, она приобретает способность к метастазированию. В настоящее время все более пристальное внимание уделяется исследованиям роли межклеточных взаимодействий в процессах злокачественной трансформации и механизмах противоопухолевой резистентности данной группы опухолей. Щелевые контакты занимают особое место среди различных типов межклеточных взаимодействий, поскольку являются ключевым структурно-функциональным фактором поддержания метаболического гомеостаза в нервной ткани. Нами наблюдалось снижение уровня экспрессии белка, формирующего щелевые контакты глиальных клеток мозга (коннексина-43), при повышении степени злокачественности астроцитарной опухоли. Это указывает на связь экспрессии коннексина-43 с прогрессией опухолевого роста, что было показано и в исследованиях других метастатических опухолей [11].

Дальнейшее изучение изменений щелевых контактов, как единственной структурной основы межклеточных взаимодействий в глиальных опухолях, а также их белков-коннексинов будет способствовать расширению существующих представлений о патогенезе злокачественного процесса, выявлению новых диагностических и прогностических показателей и разработке эффективных методов активизации противоопухолевых механизмов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Коршунов А.Г., Сычёва Р.В. Иммуногистохимическое изучение экспрессии онкобелка p53 в астроцитарных глиомах больших полушарий головного мозга // Архив патологии. 1996. № 6. С. 37–42.
2. Коршунов А.Г., Сычева Р.В., Пронин И.Н. и др. Прогностическое значение иммуногистохимического выявления апоптоза и экспрессии белков лекарственной устойчивости в глиобластомах больших полушарий головного мозга // Архив патологии. 2000. № 1. С. 7–11.

3. Коршунов А.Г., Сычева Р.В., Пронин И.Н. и др. Прогностическое значение онкоассоциированных белков и апоптоза в глиобластомах больших полушарий головного мозга // Вопросы нейрохирургии. 1999. № 1. С. 3–7.
4. Коршунов А.Г., Сычёва Р.В. Экспрессия глиального фибриллярного кислого белка и белка S-100 в астроцитарных глиомах головного мозга различной степени злокачественности (иммуногистохимическое исследование) // Архив патологии. 1995. № 4. С. 30–38.
5. Крутовских В.А. Роль межклеточных взаимодействий через щелевые контакты в канцерогенезе. Санкт-Петербург, 2005, 131 с.
6. Пальцев М.А., Аничков Н.М. Атлас патологии опухолей человека. М.: ОАО Издательство «Медицина», 2005. 424 с.
7. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / под ред. Петрова С.В., Райхлина Н.Т. 2-е изд., доп. и перераб. Казань. 2000. 288 с.
8. Юсубалиева Г.М., Баклаушев В.П., Гурина О.И. и др. Иммуногистохимический анализ глиофибрилярного кислого белка в оценке астроглиальной реакции при экспериментальной глиоме С6 // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2010. № 1. С. 17–22.
9. Badoual M., Deroulers C., Aubert M., et al. Modelling intercellular communication and its effects on tumour invasion // Physical biology. 2010. Vol. 7(4): 046013. doi: 10.1088/1478-3975/7/4/046013.
10. Beyer E.C. Gap junctions // International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology. 1993. Vol. 137. С. 1–37.
11. Hirschi K.K., Xu C.E., Tsukamoto T., et al. Gap junction gene cx26 and cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential // Cell Growth Differ. 1996. Vol. 7. P. 861–870.
12. Huang R-P., Hossain M.Z., Sehgal A., et al. Reduced Connexin43 Expression in High-Grade Human Brain Glioma Cells // Journal of Surgical Oncology. 1999. Vol. 70. P. 21–24.
13. Lee S-W, Paul D.L., Keyomarsi K., et al. Transcriptional downregulation of gap junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines // Journal of Cell Biology. 1992. Vol. 118. P. 1213–1221.
14. Naus C.C., Laird D.W. Implications and challenges of connexin connections to cancer // Nature reviews. Cancer. 2010. Vol. 10(6). P. 435–441.
15. Oliveira R., Christov Ch., Guillamo J.S., et al. Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas // BMC Cell Biology. 2005. Vol. 6:7. doi:10.1186/1471-2121-6-7.

16. Ranuncolo S.M., Varela M., Morandi A., et al. Prognostic Value of Mdm2, p53 and p16 in Patients with Astrocytomas // *Journal of Neuro-Oncology*. 2004. Vol. 68 (2). P. 113–121.
17. Severs N.J., Dupont E., Kaba R., et al. Gap junction and connexin remodeling in human heart disease. Gap junctions in development and disease // Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2005. P. 57-82.
18. Severs N.J. Intercellular junctions and the cardiac intercalated disk. In: Harris P., Poole-Wilson P.A. (eds) *Advances in myocardiology*. Plenum, New York, P. 223-242.
19. The 2007 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System / D. N. Louis et al. // *Acta Neuropathol*. 2007. Vol. 114. P. 97–109.
20. Tomasetto C., Neveu M.J., Daley J., et al. Specificity of gap junction communication among human mammary cells and connexin transfections in culture // *Journal of Cell Biology*. 1993. Vol. 122. P. 157–167.
21. Torp S.H. Diagnostic and prognostic role of Ki-67 immunostaining in human astrocytomas using four different antibodies // *Clinical Neuropathology*. 2002. Vol. 21 (6). P. 252–257.
22. Trosko J.E., Ruch R.J. Cell-cell communication in carcinogenesis // *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 1998. Vol. 15(3). P. 208-236.
23. Tsai H., Werber L., Davia M.O., et al. Reduced connexin43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996. Vol. 227. P. 64–69.
24. Wen P.Y., Kesari S. Malignant gliomas in adults // *New England Journal of Medicine*. 2008. Vol. 359 (5). P. 492–507.
25. Yamasaki H., Naus CCG. Role of connexin genes in growth control // *Carcinogenesis* 1996. Vol. 17. P. 1199–1213.
26. Zhang W., Couldwell W.T., Simard M.F., et al. Glioma Cells and Astrocytes Direct Gap Junction Communication between Malignant // *Cancer research*. 1999. Vol. 59. P. 1994-2003.

## REFERENCES

1. Korshunov A.G., Syicheva R.V. Immunogystohimicheskoe izuchenie ekspressii onkobelka p53 v astrocitarnih gliomah bol'shikh polushariy golovnogo mozga // *Arhiv patologii*. 1996. № 6. S. 37–42.
2. Korshunov A.G., Syicheva R.V., Pronin I.N. Prognosticheskoe znachenie immunogystohimicheskogo viyavleniya apoptoza i ekspressii belkov lekarstvennoi ustoychevosti v glioblastomah bol'shikh polusharii golovnogo mozga // *Arhiv patologii*. 2000. № 1. S. 7–11.

3. Korshunov A.G., Syicheva R.V., Pronin I.N. Prognosticheskoe znachenie onkoassociirovannih belkov i apoptoza v glioblastomah bol'shikh polusharii golovnoy mozga // *Voprosy neyrokhirurgii*. 1999. № 1. S. 3–7.
4. Korshunov A.G., Syicheva R.V. Expressiya glial'nogo fibrillyarnogo kislogo belka i belka S-100 v astrocitarnih gliomah golovnoy mozga razlichnoy stepeni zlokachestvennosti (immunogystohimicheskoe issledovanie) // *Arhiv patologii*. 1995. № 4. S. 30–38.
5. Krutovskih V.A. Rol' mejkletochnih bzaimodeystvii cherez chelevie kontakti v kancerogeneze. Sankt-Peterburg. 2005. 131 s.
6. Pal'cev M.A., Anichkov N.M. Atlas patologii opuholey cheloveka. M.: OAO Izdatel'stvo «Medicina». 2005. 424 s.
7. Rukovodstvo po immunogystohimicheskoy diagnostike opuholey cheloveka / pod red. Petrova S.V., Raihlina N.T. 2-e izd., dop. i pererabot. Kazan'. 2000. 288 s.
8. Yusumbaliev G.M., Baklaushev V.P., Gurina O.I. Immunogystohimicheskii analiz gliofibrillyarnogo kislogo belka v ocenke astroglial'noy reakcii pri eksperimental'noy gliome C6 // *Kletochnye tehnologii v biologii i medicine*. 2010. № 1. S. 17–22.
9. Badoual M., Deroulers C., Aubert M., et al. Modelling intercellular communication and its effects on tumour invasion // *Physical biology*. 2010. Vol. 7(4): 046013. doi: 10.1088/1478-3975/7/4/046013.
10. Beyer E.C. Gap junctions // *International Review of Cytology—a Survey of Cell Biology*. 1993. Vol. 137. C. 1–37.
11. Hirschi K.K., Xu C.E., Tsukamoto T., et al. Gap junction gene cx26 and cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential // *Cell Growth Differ.* 1996. Vol. 7. P. 861–870.
12. Huang R-P., Hossain M.Z., Sehgal A., et al. Reduced Connexin43 Expression in High-Grade Human Brain Glioma Cells // *Journal of Surgical Oncology*. 1999. Vol. 70. P. 21–24.
13. Lee S-W, Paul D.L., Keyomarsi K., et al. Transcriptional downregulation of gap junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines // *Journal of Cell Biology*. 1992. Vol. 118. P. 1213–1221.
14. Naus C.C., Laird D.W. Implications and challenges of connexin connections to cancer // *Nature reviews. Cancer*. 2010. Vol. 10(6). P. 435-441.
15. Oliveira R., Christov Ch., Guillamo J.S., et al. Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas // *BMC Cell Biology*. 2005. Vol. 6:7. doi:10.1186/1471-2121-6-7.

16. Ranuncolo S.M., Varela M., Morandi A., et al. Prognostic Value of Mdm2, p53 and p16 in Patients with Astrocytomas // *Journal of Neuro-Oncology*. 2004. Vol. 68 (2). P. 113–121.
17. Severs N.J., Dupont E., Kaba R., et al. Gap junction and connexin remodeling in human heart disease. Gap junctions in development and disease // Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2005. P. 57-82.
18. Severs N.J. Intercellular junctions and the cardiac intercalated disk. In: Harris P., Poole-Wilson P.A. (eds) *Advances in myocardiology*. Plenum, New York, P. 223-242.
19. The 2007 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System / D. N. Louis et al. // *Acta Neuropathol*. 2007. Vol. 114. P. 97–109.
20. Tomasetto C., Neveu M.J., Daley J., et al. Specificity of gap junction communication among human mammary cells and connexin transfections in culture // *Journal of Cell Biology*. 1993. Vol. 122. P. 157–167.
21. Torp S.H. Diagnostic and prognostic role of Ki-67 immunostaining in human astrocytomas using four different antibodies // *Clinical Neuropathology*. 2002. Vol. 21 (6). P. 252–257.
22. Trosko J.E., Ruch R.J. Cell-cell communication in carcinogenesis // *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 1998. Vol. 15(3). P. 208-236.
23. Tsai H., Werber L., Davia M.O., et al. Reduced connexin43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996. Vol. 227. P. 64–69.
24. Wen P.Y., Kesari S. Malignant gliomas in adults // *New England Journal of Medicine*. 2008. Vol. 359 (5). P. 492–507.
25. Yamasaki H., Naus CCG. Role of connexin genes in growth control // *Carcinogenesis* 1996. Vol. 17. P. 1199–1213.
26. Zhang W., Couldwell W.T., Simard M.F., et al. Glioma Cells and Astrocytes Direct Gap Junction Communication between Malignant // *Cancer research*. 1999. Vol. 59. P. 1994-2003.