

УДК 618.11-006.6-091.8

## ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ $\beta$ -КАТЕНИНА ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

А.В. Шульга, В.А. Басинский, С.Э. Савицкий, О.Е. Кузнецов

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

УОЗ «Гродненская областная клиническая больница»

*В 65 случаях первичного рака яичников иммуногистохимическим методом изучена экспрессия  $\beta$ -катенина. Выявлена зависимость уровня экспрессии от степени дифференцировки, стадии FIGO, наличия метастазов и пятилетней выживаемости.*

**Ключевые слова:** рак яичников, иммуногистохимия,  $\beta$ -катенин, прогноз.

*Expression of  $\beta$ -catenin was investigated with immunohistochemical method in 65 cases of primary ovarian carcinoma. Expression levels depended on the degree of cell differentiation, FIGO stage, presence of metastases and five-year survival.*

**Key words:** ovarian cancer, immunohistochemistry,  $\beta$ -catenin, prognosis.

### Введение

Одним из перспективных направлений оценки инвазивного и метастатического потенциала новообразований является изучение взаимодействия клеток между собой и с внеклеточным матриксом, которое регулируется молекулами клеточной адгезии. К важнейшим из них относятся кадхерины и связанные с ними катенины, интегрины, адгезионные молекулы из суперсемейства иммуноглобулинов, селектины, клеточный детерминант CD 44 [1]. Особый интерес на сегодняшний день представляет  $\beta$ -катенин, поскольку, помимо влияния на адгезивные свойства клетки, он активно участвует и в других процессах, включая клеточный цикл и пролиферацию. Ген  $\beta$ -катенина CTNNB1 локализован в 3p21 хромосоме, молекулярный вес этого многофункционального внутриклеточного протеина составляет 92 kDa. В клетке он присутствует в трех формах: мембранной, цитоплазматической и ядерной. В мембране  $\beta$ -катенин формирует адгезивный комплекс с E-кадхерином и актиновым цитоскелетом с участием  $\alpha$ -катенина [8, 11]. Известно, что  $\beta$ -катенин является важным компонентом типичного (канонического) Wnt-сигнального пути [13]. Цитозольный пул, не связанный с E-кадхерином, очень нестабилен и при отсутствии Wnt сигнала происходит фосфорилирование  $\beta$ -катенина с участием мультимолекулярного комплекса, который включает в себя GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ), CK1 $\alpha$  (casein kinase 1 $\alpha$ ), структурный белок аксин и опухолевый супрессор APC (adenomatous polyposis coli). Данный протеин, включенный в этот комплекс, фосфорилированный GSK-3 $\beta$  и CK1 $\alpha$ , затем расщепляется убиквитиновыми протеосомами [15], но при активации Wnt-пути сигнальной трансдукции происходит ингибирование разрушения  $\beta$ -катенина и он транспортируется в ядро, где в составе комплекса TCF/LEF (T cell factor/Leucocyte enhancer factor) активирует транскрипцию гена циклина D1 и супрессирует ген CDH1 [17]. Результат этих взаимодействий – редукция E-кадхерин-зависимой адгезии и пролиферация. При заживлении язв, например, пролиферирующая клеточная популяция с редуктированной клеточной адгезией будет замещать разрушенный эпителий, а в опухолях – определять злокачественный фенотип [1]. Исследования последних лет доказывают, что  $\beta$ -катенин играет принципиальную роль в канцерогенезе. В 80% колоректального рака нарушение экспрессии  $\beta$ -катенина связано с мутацией в гене APC [12], а также в самом гене CTNNB1 и AXIN1. Подобные мутации также обнаружены при меланоме, гепатоцеллюлярной карциноме, раке тела матки и других опухолях.

Сведения о  $\beta$ -катенине и его участии в Wnt-сигнальном пути при раке яичников (РЯ) немногочисленны и противоречивы. Некоторыми авторами подтверждается плохой прогноз новообразования, а также связь с его клинико-морфологическими параметрами при снижении экспрессии  $\beta$ -катенина [7, 9, 14]. Вместе с тем, в других исследованиях не было найдено взаимосвязи между гистологическим типом, степенью дифференцировки, метастатическим потенциалом и данным маркером [5, 6, 10]. Интересно, что прогностическое значение ядерной экспрессии  $\beta$ -катенина оценивается по-разному: имеются данные как об ухудшении исхода заболевания [4], так и о благоприятном прогнозе у больных [2]. Некоторыми исследователями сообщается о цитоплазматической гиперэкспрессии данного протеина в злокачественных аденокарциномах, по сравнению с доброкачественными опухолями яичников [16]. Таким образом, сведения о важной роли  $\beta$ -катенина в осуществлении межклеточной адгезии и Wnt-сигнальном пути, а также противоречивость данных о его прогностической значимости при РЯ диктует необходимость дальнейшего изучения этого биомолекулярного маркера.

Цель исследования: провести сравнительный анализ экспрессии  $\beta$ -катенина опухолевыми клетками в РЯ разных гистологических типов, степени дифференцировки и клинической стадии.

### Материал и методы

Исследование выполнено на архивном гистологическом материале 65 больных, оперированных по поводу РЯ в Гродненском областном онкологическом диспансере в период с 1999 по 2002 гг. Анализ гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, проводился согласно классификации ВОЗ (2003).

Наиболее частым гистологическим типом РЯ был серозный (72,3%), в 8 наблюдениях выявлена эндометриоидная аденокарцинома, а также по 5 случаев муцинозного и светлоклеточного вариантов новообразования. При этом в 13 случаях степень дифференцировки рака была отнесена к G1, в 32 – к G2, а в 20 – к G3. Первая стадия, согласно классификации FIGO, была установлена у 23,1% женщин, вторая – у 16,9%, а генерализация процесса наблюдалась в 60% случаев (третья стадия – 52,3%, четвертая – 7,7%). Общая пятилетняя выживаемость в исследуемой группе составила 26,15%.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование материала проводили на парафиновых срезах по стандартной методике с использованием антител к  $\beta$ -катенину ( $\beta$ -Catenin-1, 1 : 200, «Dako»). Демаскировку антигена осу-

щественности при 98°C в водяной бане в течение 40 мин., применяя цитратный буфер pH=6,1. В качестве детекционной системы использовали EnVision с ДАБ-хромогеном. Проводились положительные и отрицательные контрольные реакции.

Оценка мембранной экспрессии  $\beta$ -катенина проводилась полуколичественно в 6 случайных полях зрения при увеличении 400 по методике, предложенной С. Gamallo и соавторами [3]. Результаты ИГХ реакций оценивали, исходя из процента и интенсивности положительно окрашенных опухолевых клеток. Процент (п) положительно окрашенных клеток отражал степень экспрессии маркера, выраженную в баллах (отсутствие экспрессии или окрашено менее 5% клеток – 0 баллов, п менее 25% – 1 балл, п от 26% до 50% – 2 балла, п от 51% до 75% – 3 балла и п более 75% – 4 балла). Критерии балльной оценки степени интенсивности окрашивания: отсутствие реакции – 0 баллов, слабое окрашивание – 1 балл, умеренная и выраженная реакция – 2 и 3 балла, соответственно. Кроме того, при учете реакций с антителами к  $\beta$ -катенину отдельно оценивались цитоплазматический и ядерный тип окрашивания (при наличии более 5% окрашенных клеток).

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы Statistica 6.0.

### Результаты и обсуждение

Анализ данных ИГХ исследования показал, что положительная реакция с антителами к  $\beta$ -катенину выявлена в 59 случаях РЯ, а ее отсутствие наблюдалось в 6 опухолях. При этом в подавляющем большинстве наблюдений преобладала мембранно-цитоплазматическая экспрессия  $\beta$ -катенина, в 7 новообразованиях обнаружено только цитоплазматическое окрашивание, а в 4 эндометриодных аденокарциномах с плоскоклеточной метаплазией I клинической стадии выявлялась ядерная экспрессия  $\beta$ -катенина, в 1 серозном раке также имелась ядерная локализация продуктов реакции с данными антителами, но она была в менее 5% клеток.

К особенностям экспрессии  $\beta$ -катенина также следует отнести большую степень ее мембранной выраженности в муцинозных аденокарциномах, где она меньше зависела от степени дифференцировки опухоли.

По проценту клеток, экспрессирующих  $\beta$ -катенин в мембране, опухоли распределились следующим образом: в 19 наблюдениях окрашивалось от 5 до 25% (1 балл), в 24 – от 26 до 50% (2 балла), в 7 – от 51% до 75% (3 балла), в 2 случаях – более 75% клеток. В большинстве наблюдений (52,5%) в аденокарциномах доминировала умерен-

ная интенсивность окраски, в 20 случаях (33,9%) преобладала слабая интенсивность окрашивания, в 8 случаях (13,6%) – выраженная. Сохранение мембранного типа экспрессии и высокая степень ее выраженности были более характерны для высокодифференцированных аденокарцином. В РЯ с низкой степенью дифференцировки реакция с антителами к данному антигену характеризовалась преобладанием цитоплазматической локализации, неравномерной распространенностью и слабовыраженной интенсивностью окрашивания. Результаты теста Крускала-Уоллиса (рис. 1а) свидетельствовали о наличии статистически значимой связи между экспрессией  $\beta$ -катенина и степенью дифференцировки РЯ ( $H=7,4$ ,  $p=0,025$ ).

Также установлено, что уровень экспрессии  $\beta$ -катенина в злокачественных новообразованиях яичников достоверно зависит от клинической стадии (FIGO) (рис. 1б).

Из рисунка 1б видно, что в I стадии 75% аденокарцином характеризовались величиной экспрессии 3 и более баллов, такой же процент опухолей в IV стадии был оценен 3 и менее баллами (тест Крускала-Уоллиса:  $H=8,95$ ,  $p=0,03$ ).

Существенные различия в экспрессии  $\beta$ -катенина были обнаружены между группами больных с наличием и отсутствием метастазов. Чаще отсутствие белка отмечалось при наличии отдаленных метастазов, которые обнаружены у 14 женщин (21,5%). Сохранение мембранного окрашивания клеток РЯ было более характерно для группы пациентов без метастазов (тест Крускала-Уоллиса:  $H=10,98$ ,  $p=0,0041$ ). В 100% случаев при наличии отдаленных метастазов и в 75% – регионарных метастазов интенсивность экспрессии  $\beta$ -катенина в клетках опухоли была 4 и менее баллов (рис. 2а). При отсутствии метастазов в 75% случаев она оценивалась в 4 и выше баллов.

Исследование общей пятилетней выживаемости больных РЯ с помощью метода Каплана-Мейера (рис. 2б) показало, что в группе пациентов с выраженной мембранной экспрессией  $\beta$ -катенина (5-7 баллов) отмечалось более благоприятное течение заболевания, чем в группе с отсутствием или редуцированной реакцией с данными антителами ( $p=0,008$ ).

### Заключение

Приведенные данные свидетельствуют о самостоятельном прогностическом значении экспрессии  $\beta$ -катенина клетками рака яичников, ее высокой информативности для определения метастатического потенциала и прогноза новообразования.

Преобладание мембранно-цитоплазматической экспрессии  $\beta$ -катенина и небольшой процент случаев с толь-

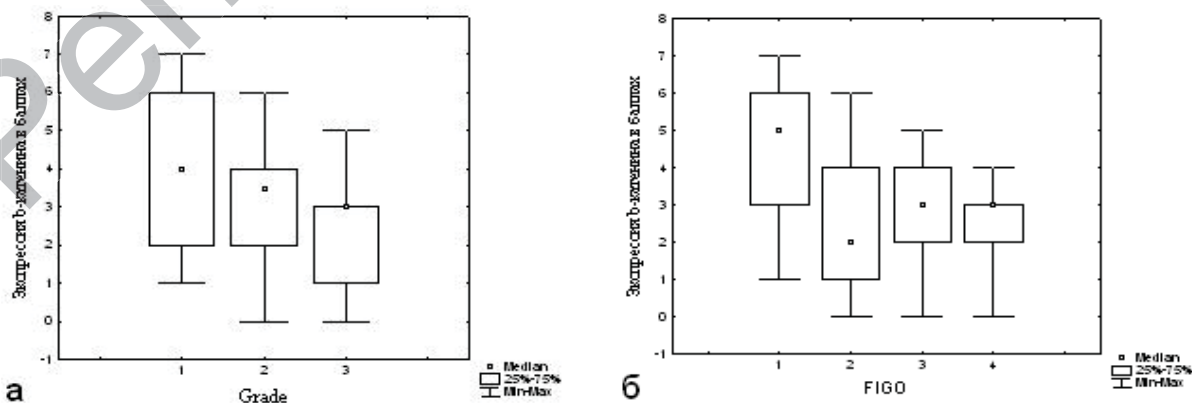
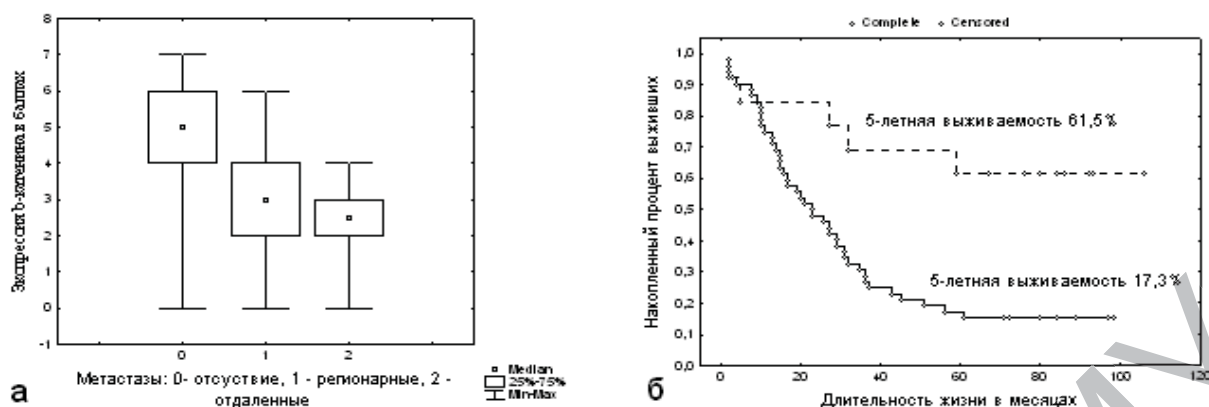


Рисунок 1 – Взаимосвязь уровня экспрессии  $\beta$ -катенина в раковых клетках с дифференцировкой новообразования (а) и его клинической стадией (б)



**Рисунок 2 – Связь уровня экспрессии β-катенина в раковых клетках с развитием метастазов (а) и общей 5-летней выживаемостью (б) (пунктирная линия характеризует выживаемость при оценке экспрессии β-катенина 5-7 баллов, непрерывная – 0-4 балла)**

ко цитоплазматической или ядерной экспрессией свидетельствует о ведущей роли в прогнозе новообразования нарушения свойств межклеточной адгезии, которая обеспечивается β-катенином в комплексе с E-кадхерином. Вместе с тем, полученные данные не позволяют отрицать существенную роль β-катенина в Wnt-сигнальном пути и его влияние на клеточный цикл.

В наблюдениях эндометриоидного рака яичников имеет место ядерная экспрессия β-катенина, которая связана с относительно благоприятным прогнозом.

#### Литература

1. Введение в молекулярную биологию канцерогенеза: учеб. пособие / А.А. Новик [и др.]; под ред. Ю. Л. Шевченко. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 224 с.
2. β-catenin expression, DNA ploidy and clinicopathological features in ovarian cancer: a study in 253 patients / W. Kildal [et al.] // *European journal of cancer*. – 2005. – Vol. 41. – P. 1127-1134.
3. β-Catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas relationship with β-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome / C. Gamallo. [et al.] // *American Journal of Pathology*. – 1999. – Vol. 155. – P. 527-536.
4. Beta-catenin nuclear localization is associated with grade in ovarian serous carcinoma / C.M. Lee [et al.] // *Gynecol. Oncol.* – 2003. – Vol. 88. – P. 363-368.
5. Elevated expression of E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenins in metastatic lesions compared with primary epithelial ovarian carcinomas / T. Imai [et al.] // *Hum. Pathol.* – 2004. – Vol. 35. – P. 1469-1476.
6. Expression of E-cadherin and beta-catenin in primary and peritoneal metastatic ovarian carcinoma / T. Fujioka [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2001. – Vol. 8. – P. 249-255.
7. Faleiro-Rodrigues, C. Title-loss of β-catenin is an independent prognostic factor in ovarian carcinomas: a multivariate analysis / C. Faleiro-Rodrigues, I. Macedo-Pinto, D. Pereira // *Gene Ther. and Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 10. – P. 179-184.
8. Hirohashi, S. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis / S. Hirohashi, Y. Kanai // *Cancer Sci.* – 2003. – Vol. 94. – P. 575-581.
9. Immunoeexpression of Beta-catenin-E-cadherin complex in primary serous ovarian tumors / P. Stawerski [et al.] // *Pol. J. Pathol.* – 2008. – Vol. 59. – P. 27-32.
10. Immunohistochemical patterns for alpha- and beta-catenin, E- and N-cadherin expression in ovarian epithelial tumors / F.R Marques [et al.] // *Gynecol. Oncol.* – 2004. – Vol. 94. – P. 16-24.
11. Mareel, M. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion / M. Mareel, A. Leroy // *Physiol. Rev.* – 2003. – Vol. 83. – P. 337-376.
12. Mutational analysis of the APC/β-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer / A.B. Sparks [et al.] // *Cancer Res.* – 1998. – Vol. 58. – P. 1130-1134.
13. Paul, S. Wnt signaling and cancer development: therapeutic implication / S. Paul, A. Dey // *Neoplasma.* – 2008. – Vol. 55. – P. 165-176.
14. Prognostic significance of E-cadherin–catenin complex in epithelial ovarian cancer / K.A. Voutilainen [et al.] // *J. Clin. Pathol.* – 2006. – Vol. 59. – P. 460-467.
15. Wnt4 inhibits β-catenin/TCF signalling by redirecting β-catenin to the cell membrane / P. Bernard [et al.] // *Biol. Cell.* – 2008. – Vol. 100. – P. 167-177.
16. Xiao, L. Expression of beta-catenin and APC protein in ovarian epithelial tumor and its implication / L. Xiao, Li Yu, Mi Can // *Chin. J. of Canc. Res.* – 2007. – Vol. 19. – P. 72-75.
17. Xu, W. Mechanistic insights from structural studies of β-catenin and its binding partners / W. Xu, D. Kimelman // *Journal of Cell Science.* – 2007. – Vol. 120. – P. 3337-3344.

Поступила 10.02.09