

© АЛЕКСИНСКИЙ В.С., БАСИНСКИЙ В.А., 2010

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ $\beta$ -КАТЕНИНА ПРИ МЕЛАНОМАХ КОЖИ

АЛЕКСИНСКИЙ В.С., БАСИНСКИЙ В.А.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

**Резюме.** По данным иммуногистохимического исследования проанализированы адгезивные свойства клеток меланомы кожи. Показано влияние данного прогностического маркера на клинический прогноз новообразования, а также зависимость его от стадии инвазивного роста по Кларку, толщины опухоли по Breslow, распространённости первичной опухоли (pT).

**Ключевые слова:** меланома, клеточная адгезия,  $\beta$ -катенин.

**Abstract.** On the basis of the immunohistochemical research data the adhesive properties of skin melanoma cells were analyzed. The influence of this prognostic marker on the clinical prognosis of the tumor, as well as its dependence on the stage of invasive growth by Clark, the thickness of the tumor by Breslow, the prevalence of primary tumor (pT) were shown.

Изучение прогностической роли экспрессии молекул адгезии при злокачественных новообразованиях является на сегодняшний день перспективным направлением в молекулярной онкологии. Одними из таких молекул, обеспечивающих адгезивные свойства клеток, являются молекулы  $\beta$ -катенина.  $\beta$ -катенин – белок, связанный с цитоплазматическим доменом E-cadherin, выполняет две несвязанные функции, одной из которых является важная роль в межклеточной адгезии, а второй – роль сигнального компонента пути Wnt/wg. Wnt/wg-сигнализация результирует в накопление  $\beta$ -катенина с последующей активацией транскрипции определенных целевых генов. Дерегуляция  $\beta$ -катенин-опосредованной передачи сигналов происходит главным образом посредством генетических альтераций APC, генов  $\beta$ -catenin

(CTNNB1), AXIN1, AXIN2 и играет важную роль в происхождении многих злокачественных опухолей, таких, как рак толстой кишки, меланома, гепатоцеллюлярная карцинома, рак яичников, эндометриальный рак, медуллобластома и рак простаты. Мутации  $\beta$ -катенина являются решающим шагом в прогрессии этих новообразований, играя важную роль в контроле клеточной пролиферации и клеточной смерти [1, 2].

Уровень  $\beta$ -катенина в клетке регулируется посредством фосфорилирования сериновых и треониновых остатков молекулярного комплекса GSK-3beta, закодированных в экзоне 3 гена CTNNB1. В клеточных линиях меланомы были найдены мутации, изменяющие участки фосфорилирования GSK-3beta и приводящие к клеточному накоплению  $\beta$ -катенина и учредительной транскрипции целевых генов Tcf/Lef [3]. Помимо соматической гетерозиготной мутации, связанной с потерей в экзоне 3 CTNNB1, мутационным анализом были идентифицированы также гетерозигот-

**Адрес для корреспонденции:** 230024, г. Гродно, ул. Поповича, д.15а, кв. 38, р.тел. 8(0152) 43-34-57, тел. моб. 8033-621-57-45, e-mail: aleksinskie2@mail.ru.  
– Алексинский В.С.

ная делеция в пределах экзона 7 AXIN2 и соматическая биаллельная делеция в пределах APC. Таким образом, описаны меланомы с мутациями в CTNNB1, APC и AXIN2. Данный факт предполагает, что при развитии меланомы дерегуляция Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнального пути может комбинироваться с инактивацией системы MMR [2]. Однако наиболее вероятной прямой целью Wnt/ $\beta$ -catenin передачи сигналов является ген CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4), промоция которого осуществляется в присутствии Tcf/Lef [4].

Прогностическая ценность  $\beta$ -катенина была показана при увеальной меланоме. Экспрессия  $\beta$ -катенина коррелировала с прогнозом пациентов. В частности, пропорция  $\beta$ -катенин-иммунореактивных клеток была статистически достоверно выше в опухолях, полученных от пациентов с более низкой выживаемостью, что демонстрирует активацию Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнального пути в увеальной меланоме [5].

Однако роль  $\beta$ -катенина в прогнозе и развитии меланомы кожи остаётся пока не совсем ясной и на сегодняшний день активно изучается.

Считается, что ядерный  $\beta$ -катенин несомненно вовлечен в злокачественную трансформацию меланоцитов, однако механизм проявления этого эффекта остаётся неясным.  $\beta$ -катенин вызывает иммортализацию меланоцитов, а  $\beta$ -катенин-индуцированная иммортализация при совместном действии с MAP-киназными путями ведёт к развитию меланомы. К стабилизации  $\beta$ -катенина и его перемещению из цитоплазмы в ядро, где он регулирует транскрипцию, приводит дерегуляция Wnt/ $\beta$ -catenin-сигнального пути, которая может происходить как через индукцию/репрессию, так и посредством определенных мутаций в различных звеньях этого сигнального пути [6, 7].

Важную роль Wnt-пути в развитии и прогрессии меланомы демонстрирует и тот факт, что при обработке клеток меланомы anti-Wnt-2 антителом происходит ингибирование передачи сигналов Wnt и индукция апоптоза, что не только коррелирует с уменьшенной экспрессией Wnt-2, но также сопровождается

ингибированием канонического пути Wnt и уменьшением уровня Dvl и цитозольного  $\beta$ -катенина [8]. Однако в опытах на B16-BL6-клетках меланомы мышей была показана неоднозначная роль генного блокирования  $\beta$ -катенина. В частности, несмотря на то, что повышенные уровни белка  $\beta$ -катенин часто ассоциированы с усилением клеточной пролиферации, блокирование гена  $\beta$ -catenin могло вызвать промоцию метастазирования опухоли посредством реконструкции клеточного адгезивного комплекса. Таким образом, генное блокирование  $\beta$ -катенина в клетках меланомы замедляет их рост, но в то же время ускоряет формирование легочных метастазов у мышей посредством уменьшения количества кадгерина в клетках опухоли [9].

При сравнительном изучении экспрессии протеинов семейства катенинов в меланомах и меланоцитарных невусах существенных различий найдено не было [10]. Однако в сходных сравнительных исследованиях было обнаружено различие в иммуногистохимическом окрашивании первичной меланомы и меланоцитарных невусов к  $\gamma$ -катенину, тогда как различие в экспрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ -катенинов при данных новообразованиях отсутствовало. Эти результаты указывают, что в меланоцитарных поражениях происходят качественные изменения в экспрессии молекул адгезии, которые могут отражать различные стадии прогрессии этих новообразований [11]. Подобные результаты подтверждаются исследованиями меланома-ассоциированных пигментных невусов, т.е. невусов-предшественников меланом. Так, было найдено, что избыток  $\beta$ -катенина действительно может играть роль в опухолевой прогрессии меланомы: цитоплазматическая реактивность к  $\beta$ -катенину была обнаружена в первичных меланомах кожи, но отсутствовала в их предшественниках – меланома-ассоциированных внутридермальных пигментных невусах. Но поскольку в тех случаях, когда предшественниками меланомы являлись диспластические и врождённые пигментные невусы, цитоплазматическая реактивность к  $\beta$ -катенину была обнаружена не только в первичной меланоме кожи, но также и в ее меланома-ассоциированных пигментных невусах,

то следует считать, что одной лишь стабилизации  $\beta$ -катенина недостаточно, чтобы сыграть решающую роль в инициации меланомы [12].

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение экспрессии молекул адгезии  $\beta$ -катенин в меланоме кожи при разных стадиях инвазивного роста опухоли по Кларку, различной толщине новообразования по Breslow, его распространённости (pT) и гистологического варианта.

### Методы

Материалом для исследования послужили 60 меланом кожи, полученные путём тотальной эксцизии в Гродненской областной клинической больнице в период с 2000 по 2003 г. Всем больным было проведено хирургическое лечение без применения лучевой и химиотерапии. Среди заболевших было 19 мужчин и 41 женщина. Возраст больных колебался в пределах от 29 до 80 лет. При анализе гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, использовалась классификация ВОЗ (2003).

При гистологическом исследовании преобладали меланомы, находящиеся на 4-й и 5-й стадиях инвазивного роста по Кларку (54,39% и 24,56% соответственно). При этом не было ни одного наблюдения меланомы кожи, находящейся на первой стадии, определяемой по Кларку, а меланомы на 2-й и 3-й стадиях составили 3,51% и 17,54%.

Иммуногистохимическому (ИГХ) исследованию было подвергнуто 42 случая.

ИГХ исследование материала проводили на парафиновых срезах по стандартной методике с использованием антител к  $\beta$ -катенину ( $\beta$ -Catenin-1, 1:200, «Dako»). Демаскировку антигена осуществляли при 98°C в водяной бане в течение 40 мин., применяя цитратный буфер pH=6,1. В качестве системы визуализации использовали EnVision с ДАБ-хромогеном. Проводились положительные и отрицательные контрольные реакции. Внутренним контролем послужило окрашивание эпидермального пласта (рис. 1).

В связи с невозможностью точно идентифицировать отдельные клетки в гистоло-

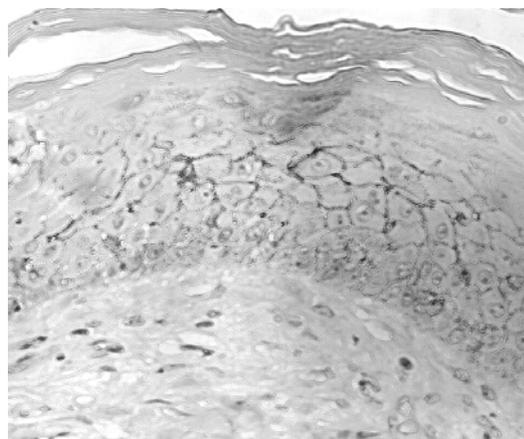


Рис. 1. Экспрессия  $\beta$ -катенина клетками эпидермиса. Иммуногистохимическая окраска с антителами к  $\beta$ -катенину. Увеличение 400.

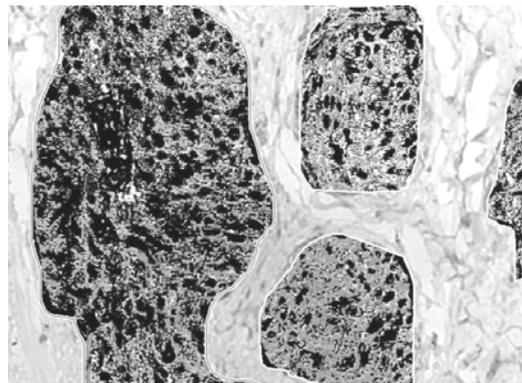


Рис. 2 Результат работы алгоритма «positive pixel count» анализатора Aperio Image Scope.

гических срезах оценка экспрессии  $\beta$ -катенина проводилась при помощи компьютерной программы Aperio ImageScope\_v9.1.19.1567 в максимально возможном количестве полей зрения, полученных при увеличении 400 (рис. 2). Результаты ИГХ реакций оценивались исходя из показателя «позитивность» (positivity), определяемого компьютерной программой. Данный показатель представляет собой отношение количества позитивно окрашенных пикселей к общему количеству пикселей в оцениваемых участках. Анализу подвергались только участки среза, содержащие опухолевые про-

лифераты. Крупные стромальные прослойки и просветы сосудов исключались при помощи инструмента «negative pen tool».

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 38 случаях меланомы. В 4 опухолях реакция отсутствовала. Во всех случаях наблюдений имела место мембранная или мембранно-цитоплазматическая экспрессия  $\beta$ -катенина (рис. 3). Отсутствие ядерной экспрессии  $\beta$ -катенина подтверждает мнение некоторых исследователей о том, что мутации  $\beta$ -катенина в первичной меланоме, в отличие от клеточных линий меланомы, являются редкостью. Тем не менее, активация  $\beta$ -катенина, проявляющаяся его ядерной и/или цитоплазматической локализацией, является частой в меланоме, и в некоторых случаях это может отразить фокальную и транзитную активацию Wnt-пути в опухоли [13].

Максимальное значение показателя позитивности составило 0,56, минимальное – 0,02. Среднее значение данного показателя составило  $0,25 \pm 0,019$ .

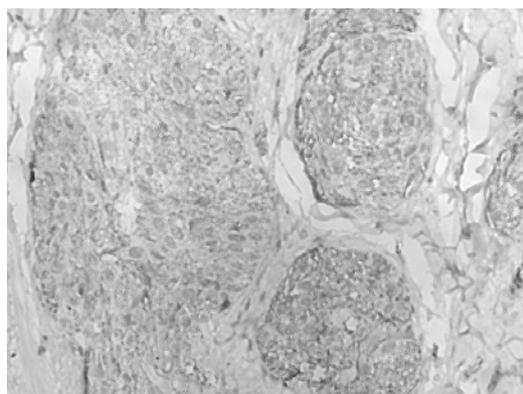


Рис. 3. Мембранно-цитоплазматическая экспрессия  $\beta$ -катенина клетками меланомы. Иммуногистохимическая окраска с антителами к  $\beta$ -катенину. Увеличение 400.

При статистическом анализе полученных данных путём сравнения двух независимых групп (тест Манна-Уитни) было найдено достоверное различие между группой меланом, находящихся на 2-й стадии инвазивного роста по Кларку, и группами меланом, находящихся на 3-й, 4-й и 5-й стадиях ( $p=0,046, 0,035$  и  $0,03$  соответственно) (рис. 4).

По литературным данным, повышение уровня ядерного  $\beta$ -катенина как в первичной опухоли, так и в метастазах, коррелирует со сниженной экспрессией маркеров пролифера-

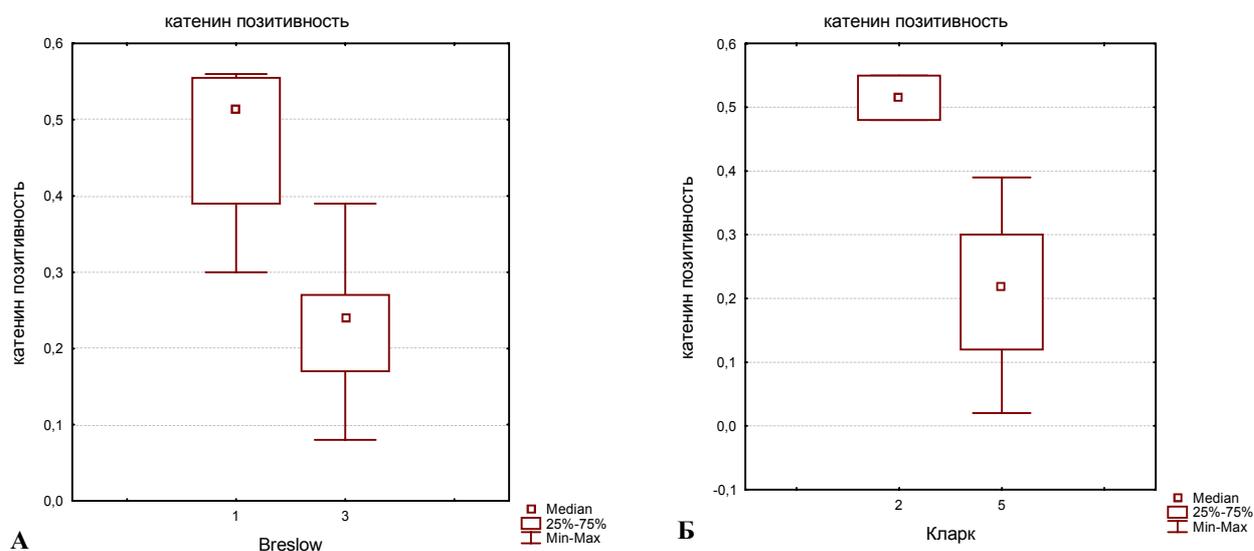


Рис. 4. Взаимосвязь позитивности  $\beta$ -катенина в клетках меланомы с толщиной новообразования по Breslow (А) и стадией инвазивного роста по Кларку (Б).

ции и лучшей выживаемостью, поскольку WNT3A регулирует гены, вовлеченные в дифференцировку меланоцитов, и некоторые из этих генов подавляют прогрессию меланомы. Считается, что потеря ядерного  $\beta$ -катенина связана с прогрессией меланомы, что отражает нарушение клеточной дифференцировки, обусловленное нарушением гомеостатической функции Wnt/  $\beta$ -catenin-сигналикации [14]. Предполагается, что стабилизированный  $\beta$ -катенин сокращает количество меланобластов *in vivo* и вызывает иммортализацию первичных меланоцитов кожи посредством «молчания» p16 (Ink4a)-промотора. Стабилизированный  $\beta$ -катенин совместно с активизированным онкогеном N-Ras приводит к меланоме с высокой пенетрантностью и коротким латентным периодом [7].

При использовании в качестве независимого группирующего признака толщины опухоли, определяемой по Breslow, все случаи меланомы были разбиты на четыре группы, соответствующие стадиям pT. Были найдены достоверные различия в уровне экспрессии  $\beta$ -катенина между меланомами толщиной до 1 мм (соответствует стадии pT1) и меланомами толщиной более 1 мм ( $p=0,023, 0,007, 0,011$  при сравнении с группами меланом, находящихся на стадиях pT1, pT2 и pT3 соответственно) (рис. 4).

Достоверные различия уровня экспрессии  $\beta$ -катенина в группах меланом различных гистологических типов не выявлены.

### Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что в тонких меланомах (толщиной до 1 мм), а также в меланомах, находящихся на ранних стадиях биологического роста (2-й уровень инвазии по Кларку), имеет место высокий уровень мембранной и мембранно-цитоплазматической экспрессии молекулы клеточной адгезии  $\beta$ -катенин. Тогда как в меланомах толщиной более 1 мм по Breslow, а также в меланомах, демонстрирующих глубокую инвазию дермы, наблюдается снижение уровня экспрессии  $\beta$ -катенина, что, вероятно, отражает потерю клетками опухоли адгезивных

свойств по мере её прогрессии. Таким образом, снижение уровня экспрессии  $\beta$ -катенина в меланоме может служить неблагоприятным прогностическим признаком, отражающим прогрессирование заболевания. Известно, что в отдельных работах предполагается связь экспрессии  $\beta$ -катенина с подвижностью клеток в агрессивной меланоме, поскольку активно мигрирующие клетки меланомы демонстрируют ядерное и цитоплазматическое накопление  $\beta$ -катенина и активную транскрипцию с LEF/TCF-связанного сайта, следствием чего является преобладание экспрессии LEF-1 mRNA в активно мигрирующих клетках, полученных от метастатических меланом [15]. Наши исследования демонстрируют потерю мембранно-цитоплазматической экспрессии  $\beta$ -катенина клетками меланомы на поздних стадиях биологического роста, когда миграционная активность опухолевых клеток предположительно возрастает.

### Литература

1. Morin, P.J. beta-catenin signaling and cancer. / P.J. Morin // *Bioessays*. – 1999. – Vol. 21(12). – P. 30-1021.
2. Concomitant activation of Wnt pathway and loss of mismatch repair function in human melanoma / D. Castiglia [et al.] // *Genes Chromosomes Cancer* – 2008 – Vol. 47(7) – P. 24-614.
3. Cytoplasmic and nuclear accumulation of beta-catenin is rarely caused by CTNNB1 exon 3 mutations in cutaneous malignant melanoma / K. Omholt [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2001. – Vol. 92(6). – P. 839-42.
4. CTLA-4 is a direct target of Wnt/beta-catenin signaling and is expressed in human melanoma tumors / K.V. Shah [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 2008. – Vol. 128(12) – P. 9-2870.
5. Expression of Wnt5a and its downstream effector beta-catenin in uveal melanoma / W. Zuidervaart [et al.] // *Melanoma Res.* – 2007 – Vol. 17(6) – P. 6-380.
6. Bypassing melanocyte senescence by beta-catenin: A novel way to promote melanoma / L. Larue [et al.] // *Pathol. Biol. (Paris)*. – 2009 [Epub. Ahead of print].
7. Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development / V. Delmas [et al.] // *Genes Dev.* – 2007 – Vol. 21(22) – P. 35-2923.
8. An anti-Wnt-2 monoclonal antibody induces apoptosis in malignant melanoma cells and inhibits tumor growth / L. You [et al.] // *Cancer Res.* – 2004 – Vol. 64(15) – 9-5385.
9. Gene silencing of beta-catenin in melanoma cells retards their growth but promotes the formation of pulmonary

- metastasis in mice / Y. Takahashi [et al.] // Int. J. Cancer. – 2008. – Vol. 123(10) – P. 20-2315.
10. Zhang, X.D. Expression of catenins and p120cas in melanocytic nevi and cutaneous melanoma: deficient alpha-catenin expression is associated with melanoma progression / X.D. Zhang, P. Hersey // Pathology – 1999 – Vol. 31(3) – P. 239-46.
  11. E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions / R. Silve [et al.] // J. Pathol. – 1998 – Vol. 186(4) – P. 350-5.
  12. Cytoplasmic beta-catenin is lacking in a subset of melanoma-associated naevi, but is detectable in naevus-associated melanomas: potential implications for melanoma tumorigenesis? / G. De Panfilis [et al.] // Br. J. Dermatol. – 2009 – Vol. 160(3) – P. 8-600.
  13. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma / D.L. Rimm [et al.] // Am. J. Pathol. – 1999. – Vol. 154 (2) – P. 9-325.
  14. Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model / A.J. Chien [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106(4). – P. 8-1193.
  15. Constitutive activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway in migration-active melanoma cells: role of LEF-1 in melanoma with increased metastatic potential / T. Murakami [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001 – Vol. 288(1) – P. 8-15.

*Поступила 20.09.2010 г.  
Принята в печать 06.12.2010 г.*

---

---