

теидов низкой плотности в плазме крови больных хронической сенсоневральной тугоухостью.

3. Гиполипидемические препараты следует шире включать в терапевтический комплекс у пациентов с гипоакузией на фоне атеросклероза сосудов головного мозга.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Алмазов, В. А. Пограничная артериальная гипертензия / В. А. Алмазов, Е. В. Шляхто, Л. А. Соколова. — СПб.: Гиппократ, 1992. — 192 с.
2. Бурбелло, А. Т. Современные лекарственные средства: Клинико-фармакологический справочник практического врача / А. Т. Бурбелло, А. В. Шабров. — М.: ОЛМА Медиа Групп, 2007. — 800 с.

3. Лопотко, А. И. Фармакотерапия при сенсоневральной тугоухости / А. И. Лопотко, М. Ю. Бобшко. — СПб.: Спец. Лит., 1999. — 24 с.

4. Фармакотерапевтический справочник сурдолога — оториноларинголога / А. И. Лопотко [и др.]. — СПб.: «Диалог», 2006. — 408 с.

5. Шлант, Р. К. Клиническая кардиология / Р. К. Шлант, Р. В. Александер; пер. с англ. — СПб.: Невский Диалект, 1998. — 576 с.

6. Филимонов, В. Н. Кохлео-вестибулярные нарушения у больных шейным остеохондрозом с синдромом позвоночной артерии и некоторые вопросы военно-врачебной экспертизы / В. Н. Филимонов // Новости оторинолар. и логопатол. — 2000. — № 3. — С. 210–215.

Поступила 12.01.2009

УДК 618.11-006.6-091.8

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ Е-КАДХЕРИНА ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

А. В. Шульга, В. А. Басинский, С. А. Ляликов, С. Э. Савицкий

Гродненский государственный медицинский университет

В 65 случаях первичного рака яичников иммуногистохимическим методом изучена экспрессия Е-кадхерина. Выявлена зависимость уровня экспрессии от степени дифференцировки, стадии FIGO, наличия метастазов и пятилетней выживаемости.

Ключевые слова: рак яичников, иммуногистохимия, Е-кадхерин.

IMMUNOHISTOCHEMICAL ASSESSMENT OF E-CADHERIN EXPRESSION AT OVARIAN CANCER

A. V. Shulha, V. A. Basinsky, S. A. Lalikov, S. E. Savitsky
Grodno State Medical University

Expression of E-cadherin was investigated with immunohistochemical method in 65 cases of primary ovarian carcinoma. E-cadherin levels depended on cell differentiation, FIGO stage, pre-sence of metastases and five-year survival.

Key words: ovarian cancer, immunohistochemistry, E-cadherin.

Введение

Рак яичников (РЯ) составляет 4–6 % среди злокачественных новообразований у женщин и занимает шестое место по частоте. Ежегодно в мире регистрируется до 205 тыс. новых случаев и 125 тыс. смертей от рака данной локализации [13]. Смертность от РЯ выше, чем от рака шейки матки и эндометрия вместе взятых, а пятилетняя выживаемость в развитых странах не превышает 25–35 % [4, 12]. В Беларуси за 35-летний период число ежегодно заболевших РЯ увеличилось в 1,8 раза и достигло в 2005 г. 827 случаев [3]. Очевидно, что одной из наиболее важных задач современной онкогинекологии является поиск признаков и свойств опухолей, на основе которых можно было бы прогнозировать течение заболевания и определять индивидуальную лечебную тактику. К важнейшим прогностическим факторам РЯ, помимо клинической стадии, относятся гистологический тип и степень

его дифференцировки. Большинство исследователей отмечают, что течение болезни, развитие рецидивов, раковая прогрессия, ответ на лечение у пациентов с одной и той же клинической стадией и морфологической формой бывают различными. К примеру, у больных с пограничными опухолями яичников, несмотря на высокую дифференцировку, нередко возникают рецидивы и метастазы [2]. Эти факты требуют изучения свойств новообразований, детерминированных аномальной экспрессией ряда генов и определяющих агрессивность течения опухоли. В частности, характер взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом и соседними клетками регулируется молекулами клеточной адгезии, которые оказывают влияние на многие процессы, происходящие в клетке, включая клеточный цикл и апоптоз. К наиболее известным, но биохимически и генетически различным семействам адгезионных молекул относятся кадхерины, ин-

тегрины, адгезионные молекулы из суперсемейства иммуноглобулинов, селектины, клеточный детерминант CD 44 [5]. Среди молекул адгезии наибольшего внимания заслуживает определение роли кадхеринов в реализации метастатического потенциала клеток РЯ.

Е-кадгерин — трансмембранный гликопротеин с молекулярным весом 120 kDa, экспрессирующийся на базальной и боковой поверхностях эпителиоцитов в зоне «адгерентных» контактов [1]. Ген Е-кадгерина CDH1 картирован в локусе 16q22.1. Зрелая молекула образована из высококонсервативного цитодомена, трансмембранного домена и сложного экстраклеточного домена, который состоит из множества повторяющихся кадхерин-специфичных фрагментов, для связывания которых необходимы молекулы кальция. Взаимодействия между экстраклеточными доменами молекул Е-кадгерина смежных клеток формируют клеточную адгезию. Цитоплазматический домен Е-кадгерина содержит высококонсервативный участок, который связывается с актиновым цитоскелетом через взаимодействие с катениновым комплексом, состоящим из α - (102 кДа), β - (92 кДа) и γ -катенина/плакоглобина (83 кДа) [5, 10]. Утрата функциональной активности и/или экспрессии любого из элементов комплекса Е-кадгерин/катенины приводит к потере клеткой способности к адгезии и к нарушению нормальной структуры ткани, и, в конечном счете, к инвазивному росту и метастазированию злокачественных опухолей [10]. Рядом исследователей доказано прогностическое значение экспрессии Е-кадгерина у больных раком молочной железы [9], желудка [15] и других локализаций. Однако роль кадхеринов в оценке прогноза РЯ до настоящего времени остается спорной. Некоторыми авторами подтверждается плохой прогноз, связь с клинико-морфологическими характеристиками при понижении экспрессии Е-кадгерина [6, 14]. Вместе с тем, в других исследованиях не было найдено связи между гистотипом, степенью дифференцировки и данным маркером при опухолях яичников [8, 11]. Сведения о важной роли молекул адгезии в осуществлении метастатического потенциала раковых клеток многих локализаций, а также противоречивость данных об их прогностической значимости при РЯ диктует необходимость дальнейшего изучения данных биомолекулярных маркеров.

Цель исследования: изучить уровень экспрессии Е-кадгерина в РЯ разных гистологических типов, степени дифференцировки и клинической стадии, а также его значение в оценке прогноза новообразования.

Материал и метод

Материалом для исследования стали 65 случаев первичного РЯ, выявленных у женщин

Гродненской области в 1999–2002 гг. Клинические сведения получены из амбулаторных карт, историй болезни пациентов и канцер-регистра Гродненского областного онкологического диспансера. Учитывались стадия заболевания согласно классификации FIGO (1988), характер проводимой терапии, осложнения, время появления и характер метастазов, а также продолжительность жизни женщин и причины их смерти. Пациенты, которые умерли от послеоперационных осложнений (в течение 1-го месяца после операции) не включались в наше исследование.

Оценка морфологических параметров проводилась с использованием светового оптического микроскопа «Carl Zeiss» AxioImager A1 при увеличении 100, 200 и 400. Анализ гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, проводился в соответствии с Международной гистологической классификацией (ВОЗ, 2003).

Для иммуногистохимического исследования из парафиновых блоков изготавливались срезы толщиной 5 мкм, переносились на предметные стекла SuperFrost (Menzel-Glaser, Germany). Срезы в вертикальном положении помещали в термостат на 30 мин при температуре 60°C. После этого проводилось депарафинирование в ксилоле и дегидратация в этиловом спирте. Стекла со срезами переносились в подогретый демаскировочный буфер (pH=6,1) и помещались в водяную баню при температуре 98°C на 40 мин. Для блокирования эндогенной пероксидазы проводилась обработка 3 % перекисью водорода в течение 15 минут и наносились первичные антитела к Е-кадгерину (NCH-38, RTU, Dako). Срезы инкубировались в течение 60 минут при комнатной температуре. В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител EnVision фирмы «DAKO» с диамибензидином. Срезы промывали проточной водой, докрашивали гематоксилином Майера и заключали в полистерол. В качестве позитивного контроля на Е-кадгерин использована ткань небной миндалины или рака яичников с известной позитивностью. Негативный контроль во всех случаях проводили с использованием вместо первичных антител 1 % раствора бычьего сывороточного альбумина.

Оценка мембранной экспрессии Е-кадгерина проводилась полуколичественно в 6 полях зрения при увеличении 400 по методике, предложенной Carlos Gamallo и соавторами [7]. Результаты иммуногистохимических реакций оценивали исходя из процента и интенсивности положительно окрашенных опухолевых клеток. Процент (n) положительно окрашенных клеток отражал степень экспрессии маркера, выраженную в баллах (отсутствие экспрессии или окрашено менее 5 % клеток — 0 баллов, n 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: 0 баллов — негативное окрашивание, 1 балл — слабая интенсивность, 2 балла — умеренная интенсивность, 3 балла — выраженная. Для оценки степени окрашивания использовалась программа Aperio Image Score, автоматически измеряющая интенсивность коричневой окраски (продуктов реакции DAB-хромогена). При этом после суммирования показателей степени экспрессии и интенсивности окрашивания было выделено две категории: 1 — с выраженной экспрессией E-кадгерина (при наличии 5–7 баллов), 2 — с редуцированной или отсутствием экспрессии (от 0 до 4 баллов).

Статистическая обработка проводилась с использованием программы «Statistica» 6.0.

Результаты и обсуждение

Анализ материала показал, что в исследуемой группе были женщины в возрасте от 27 до 72 лет, при этом средний возраст больных на момент установления диагноза составил $57,0 \pm 1,25$ лет. В послеоперационном периоде 3,1 % женщин не получали адъювантную терапию, 86,2 % больным было проведено химиотерапевтическое, 10,7 % — лучевое лечение. У 51 (78,5 %) женщины были выявлены регионарные или отдаленные метастазы, в 14 случаях метастазы отсутствовали. Анализ выживаемости показал, что в 15 случаях больные прожили менее года, в 33 наблюдениях — от 1 года до 5 лет, более 5 лет прожили 17 женщин.

В исследуемой группе 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 генера-

лизация процесса наблюдалась в 60 % случаев (третья стадия — 52,3 %, четвертая — 7,7 %).

Анализ данных иммуногистохимического исследования показал, что экспрессия E-кадгерина выявлялась в 59 (90,8 %) случаях РЯ, при этом выраженная реакция с данными антителами (5–7 баллов) отмечалась в 17 наблюдениях (28,8 %), а ее отсутствие наблюдалось в 6 (9,2 %) опухолях, в 8 аденокарциномах было только цитоплазматическое окрашивание. По проценту клеток, экспрессирующих E-кадгерин, опухоли распределились следующим образом: в 23 наблюдениях окрашивалось от 5 до 25 % (1 балл), в 14 — от 26 до 50 % (2 балла), в 11 — от 51 до 75 % (3 балла), в 3 случаях — более 75 % клеток. В большинстве наблюдений (47,5 %) в опухоли доминировала умеренная интенсивность окраски, в 18 случаях (30,5 %) преобладала слабая интенсивность окрашивания, в 13 случаях (22,0 %) — выраженная. Сохранение мембранного типа экспрессии и высокая степень ее выраженности были более характерны для высокодифференцированных аденокарцином. В РЯ с умеренной и низкой степенью дифференцировки наблюдалось слабое окрашивание с данными антителами, которое локализовалось преимущественно в цитоплазме раковых клеток. Следует отметить, что в 75 % высокодифференцированных опухолей степень экспрессии данного маркера превышала 4 балла, а во всех низкодифференцированных новообразованиях она была менее 5 баллов (рисунок 1а). Результаты теста Крускала-Уоллиса свидетельствовали о наличии статистически достоверной связи между экспрессией E-кадгерина и степенью дифференцировки РЯ ($H = 16,05, p = 0,003$).

Установлено, что уровень экспрессии E-кадгерина в злокачественных новообразованиях яичников достоверно зависит от клинической стадии (FIGO) (рисунок 1б). В I стадии 75 % аденокарцином характеризовались величиной экспрессии 5 и более баллов, такой же процент опухолей в IV стадии был оценен 3 и менее баллами (тест Крускала-Уоллиса: $H = 21,46, p = 0,001$).

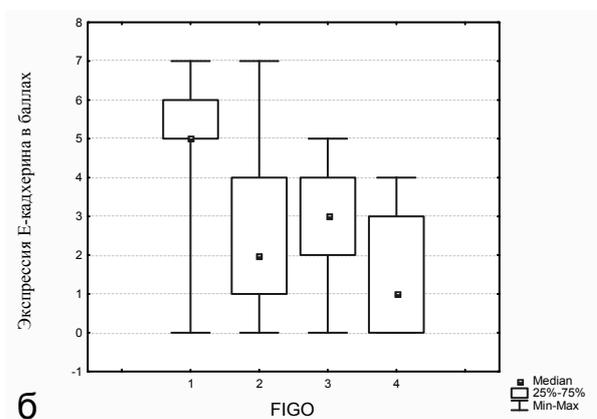
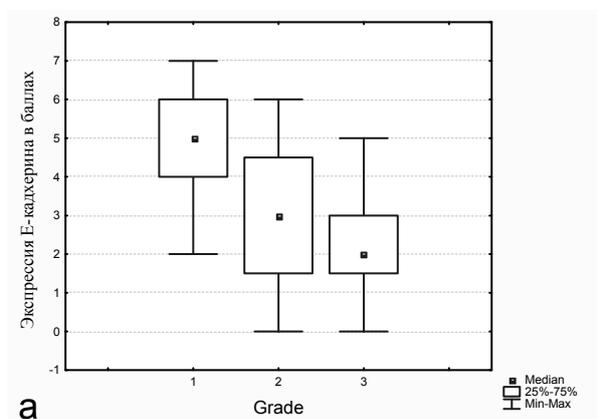
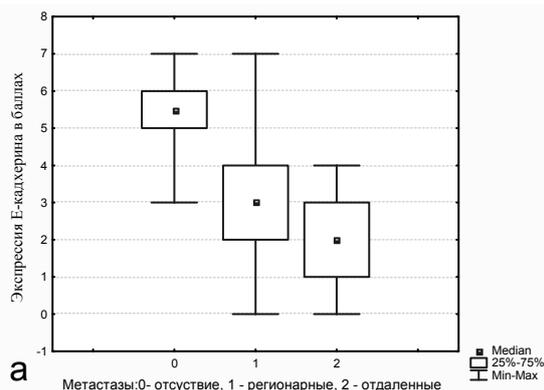


Рисунок 1 — Взаимосвязь уровня экспрессии E-кадгерина в раковых клетках с дифференцировкой новообразования (а) и его клинической стадией (б)

Существенные различия в экспрессии Е-кадгерина в клетках опухолей яичников были обнаружены между группами больных с наличием и отсутствием метастазов. Чаще отсутствие белка отмечалось при наличии отдаленных метастазов. Сохранение мембранного окрашивания клеток РЯ было более характерно для группы пациентов без метастазов (тест Крускала-Уоллиса: $H = 28,63$, $p = 0,0001$). В 100 % случаев при наличии отдаленных метастазов и в 75 % — регионарных метастазов интенсивность экспрессии Е-кадгерина в клетках опухоли была 4 и менее бал-



лов (рисунок 2а). При отсутствии метастазов во всех наблюдениях экспрессия Е-кадгерина была равна или превышала 3 балла, а в 75 % случаев она оценивалась в 5 и выше баллов.

Исследование общей пятилетней выживаемости больных РЯ с помощью метода Каплана-Мейера (рисунок 2б) показало, что в группе пациентов с выраженной экспрессией Е-кадгерина (5–7 баллов) отмечалось более благоприятное течение заболевания, чем в группе с отсутствием или редуцированной реакцией с данными антителами (Wilcoxon test, $p = 0,0001$).

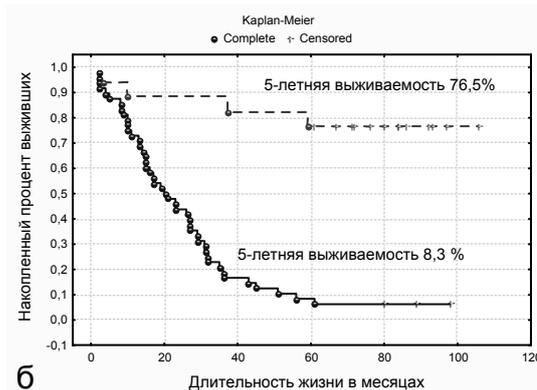


Рисунок 2 — Связь уровня экспрессии Е-кадгерина в раковых клетках с развитием метастазов (а) и общей 5-летней выживаемостью (б) (пунктирная линия характеризует выживаемость при оценке экспрессии Е-кадгерина 5–7 баллов, непрерывная — 0–4 балла)

Следует также отметить, что разные гистологические структуры в опухоли имели особенности окрашивания антителами к Е-кадгерину. В однослойной и многослойной выстилке кист антитела к данному маркеру проявляли высокую степень мембранной экспрессии. В сосочковых структурах, участках эпидермизации эндометриоидных аденокарцином она варьировала, а в солидных пластах, а также в участках инвазивного роста отмечалось заметное ее снижение с преобладанием цитоплазматического окрашивания или полное отсутствие экспрессии.

Выводы

Приведенные данные свидетельствуют о самостоятельном прогностическом значении экспрессии Е-кадгерина клетками рака яичников, ее высокой информативности для определения метастатического потенциала и прогноза новообразования. Наличие иммуногистохимической гетерогенности в новообразованиях отдельных групп пациентов свидетельствует о необходимости расширения изучаемого круга адгезивных молекул и анализа их взаимосвязи в новообразованиях различной степени дифференцировки и клинической стадии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аничков, Н. М. Биологические и клинико-морфологические аспекты учения о метастазировании злокачественных опухолей / Н. М. Аничков // Мед. академ. журнал. — 2003. — Т. 3, № 1. — С. 3–13.
2. Жорданина, К. И. Некоторые аспекты хирургического лечения рака яичников / К. И. Жорданина // Практ. онкол. — 2000. — № 4. — С. 19–22.

3. Эпидемиология злокачественных новообразований в Беларуси / И. В. Залуцкий [и др.]. — М.: Зорны верасень, 2006. — 207 с.
4. Малек, А. В. Поиск генов-мишеней для диагностики и терапии рака яичников / А. В. Малек, Е. В. Бахидзе // Вопросы онкологии. — 2005. — Т. 51, № 2. — С. 182–186.
5. Новик, А. А. Введение в молекулярную биологию канцерогенеза / А. А. Новик, Т. А. Камилова, В. Н. Цыган. — М.: ГЭОТАР МЕД, 2004. — 224 с.
6. The E-cadherin repressor Snail is associated with lower overall survival of ovarian cancer patients / K. Blehnschmidt [et al.] // British Journal of Cancer. — 2008. Vol. 98. — P. 489–495.
7. 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.
8. 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.
9. Lim, S. C. Significance of E-cadherin/beta-catenin complex and cyclin D1 in breast cancer / S. C. Lim, S. M. Lee // Oncol Rep. — 2002. — Vol. 9, № 5. — P. 915–928.
10. Mareel M. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion / M. Mareel, A. Leroy // Physiol Rev. — 2003. — Vol. 83. — P. 337–376.
11. 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.
12. Ozols, R. F. Treatment goals in ovarian cancer / R. F. Ozols // Int J Gynecol Cancer. — 2005. — Vol. 15, № 1. — P. 3–11.
13. Global cancer statistics, 2002 / D. M. Parkin [et al.] // CA Cancer J Clin. — 2005. — Vol. 55. — P. 74–108.
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. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival / Y. N. Zhou [et al.] // World J Gastroenterol. — 2002. — Vol. 8. — P. 987–993.