

Инвазивная способность и пролиферативная активность меланомы кожи в зависимости от эпигенетического фактора

Аксененко М.Б., Рукуша Т.Г.

ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, 660022, Красноярск, Россия

Представлены данные об оценке инвазивной способности и пролиферативной активности опухоли путем иммуногистохимического определения экспрессии N-кадгерина и Ki-67 у больных меланомой кожи в зависимости от наличия у них мутации V600E онкогена BRAF. B-Raf – серин/треониновая киназа, которая участвует в Ras-Raf-MEK-MAPK-сигнальном пути. Данный сигнальный каскад в норме регулирует пролиферацию и функционирование клеток под контролем факторов роста и гормонов. Мутация гена BRAF определяется в 40–60% меланом с превалированием среди опухолей, расположенных на закрытых участках тела. Выявлено, что экспрессия N-кадгерина у BRAF-позитивных пациентов имела тенденцию к повышению, что в свою очередь может указывать на более выраженные инвазивные характеристики опухоли у данной группы больных. Значимых различий в экспрессии Ki-67 у больных с различным BRAF-статусом не обнаружено ($p > 0,05$), что указывает на отсутствие различий в пролиферативной активности у больных с различным BRAF-статусом.

Ключевые слова: меланома; клеточная пролиферация; опухолевая инвазия; N-кадгерин; Ki-67.

INVASIVE CAPACITY AND PROLIFERATIVE ACTIVITY OF CUTANEOUS MELANOMA AND THE EPIGENETIC FACTOR

Aksenenko M.B., Ruksha T.G.

V.F.Voino-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, 660022, Krasnoyarsk, Russia

The invasive capacity and proliferative activity of the tumor are evaluated by immunohistochemical measurement of N-cadherin and Ki-67 expression in patients with cutaneous melanoma with and without BRAF oncogene V600E mutation. The B-Raf is a serine/threonine kinase involved in the Ras-Raf-MEK-MAPK signal pathway. This signal cascade normally regulates the cell proliferation and functioning, controlled by growth factors and hormones. The BRAF gene mutation is detected in 40-60% melanomas, predominantly in the tumors located in the closed parts of the body. The expression of N-cadherin is liable to increase in BRAF⁺ patients, this, in turn, presumably indicating more marked invasive characteristics of tumors in this patient population. The expression of Ki-67 virtually does not differ in patients with different BRAF status ($p > 0.05$), this indicating no differences in the proliferative activity in these patients.

Key words: melanoma; cell proliferation; tumor invasion; N-cadherin; Ki-67.

Дисрегуляция клеточного цикла и пролиферации клеток является одной из причин развития злокачественных опухолей. Ряд исследователей представили данные о наличии прямой взаимосвязи между экспрессией N-кадгерина и метастатическим потенциалом опухолевых клеток [1]. N-кадгерин, находясь в синергической связи с рецепторами FGF-2 посредством передачи сигналов, способствует увеличению активации и экспрессии матриксных металлопротеиназ, а следовательно, и опухолевой инвазии [2]. Помимо сигнальной функции N-кадгерина, при ме-

тастазировании рассматривается также его функция в поддержании системного распространения опухолевых клеток. Клетки меланомы по мере прогрессии заболевания постепенно теряют способность к экспрессии E-кадгерина, но начинают усиленно экспрессировать N-кадгерин как *in vitro*, так и *in vivo* [3]. Данная замена экспрессии позволяет клеткам активно взаимодействовать с микроокружением, тем самым способствуя дальнейшему развитию опухоли. Экспрессия данного белка осуществляется преимущественно фибробластами и эндотелиальными клетками сосудов [4], что обеспечивает N-кадгерин-зависимую адгезию, а также интра- и экстравазацию в кровеносные сосуды клеток меланомы. Экспрессия N-кадгерина позволяет реализовывать опухолям такие важные функции, как опухолевая инвазия, адгезия и миграция клеток. Кроме адгезивных свойств, появление экспрессии N-кадгерина меланомными клетками обеспечивает

Сведения об авторах:

Аксененко Мария Борисовна, кандидат мед. наук (aksenenko_mariya@mail.ru); Рукуша Татьяна Геннадьевна, доктор мед. наук (tatyana_ruksha@mail.ru).

Corresponding author:

Ruksha Tatyana, MD, PhD (tatyana_ruksha@mail.ru).

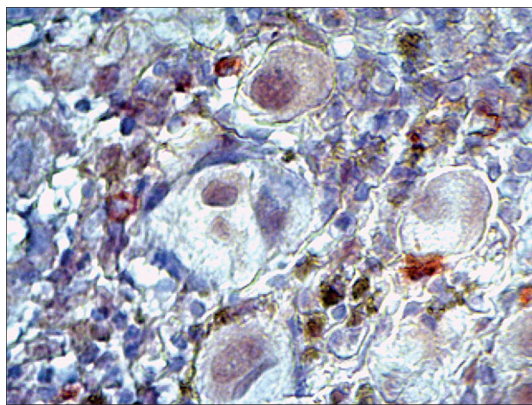


Рис. 1. Экспрессия N-кадгерина в клетках опухолевой ткани и лимфоцитах.

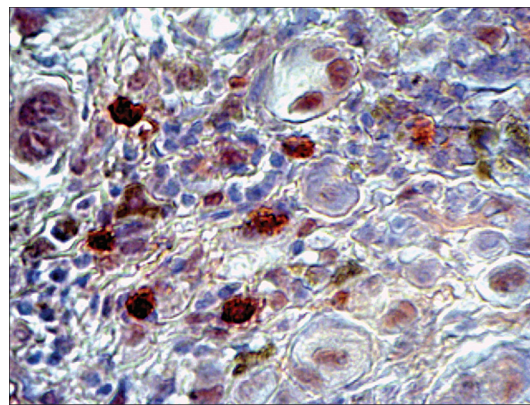


Рис. 2. Экспрессия N-кадгерина в клетках опухолевой ткани.

их коммуникацию с соседними клетками опухоли, а также с дермальными фибробластами [5].

Высокая экспрессия N-кадгерина наблюдается при различных видах злокачественных новообразований, в частности в клетках поджелудочной железы, а также в опухолях нейронального генеза [6, 7].

B-Raf – серин/треониновая киназа, которая участвует в Ras-Raf-МЕК-МАРК-сигнальном пути [8]. Данный сигнальный каскад в норме регулирует пролиферацию и функционирование клеток под контролем факторов роста и гормонов. По данным литературы [9], β -катенин-сигнальный механизм контролирует процесс метастазирования в BRAF-активированных Rpep-дефицитных меланом, при которых в свою очередь отмечается высокая экспрессия N-кадгерина в эксперименте. Мутация гена *BRAF* определяется в 40–60% меланом, с превалированием среди опухолей, расположенных на закрытых участках тела. BRAF-позитивные меланомы представляют собой один из молекулярных подтипов меланомы. В связи с этим является важным изучение особенностей течения, биологического поведения меланом с положительным BRAF-статусом.

Одним из маркеров клеточной пролиферации является Ki-67. Этот белок появляется в ядре клетки в заключительной части фазы G_1 и с высокой интенсивностью экспрессируется до завершения митоза [10]. Прогностическая ценность экспрессии Ki-67 клетками меланомы кожи до сих пор оценивается неоднозначно. По некоторым данным [11], экспрессия Ki-67 не является прогностическим фактором при первичной меланоме. Установлено, что при узловых меланом уровень пролиферации практически не влияет на прогрессию болезни. В узловой меланоме Ki-67 не связан с толщиной опухоли и не оказывает влияния на отсутствие рецидивов или выживание в целом [12]. Имеются данные, что при меланоме слизистых оболочек низкий уровень экспрессии Ki-67 ассоциирован с лучшими показателями выживаемости [13].

Цель исследования – оценить инвазивную способность и пролиферативную активность опухоли путем иммуногистохимического определения экспрессии N-кадгерина и Ki-67 у больных меланомой кожи в зависимости от наличия у них мутации V600E онкогена *BRAF*.

Материалы и методы

Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета. Объектом данного исследования послужили образцы опухолевого материала, полученные из парафиновых блоков от больных меланомой кожи, проходивших лечение в Красноярском краевом онкологическом диспансере. Биоптаты больных меланомой кожи ($n = 80$) получены в Красноярском краевом патологоанатомическом бюро. Перед выделением ДНК стекла пациентов, окрашенные гематоксилином и эозином, оценивали на предмет содержания опухолевых клеток в срезе. В дальнейшем проводили выделение геномной ДНК с помощью набора FFPET DNA-Extraction Kit (“Биолинк”). Анализ мутации BRAF-V600E осуществляли методом аллельспецифической ПЦР в режиме реального времени. Для BRAF-теста выбирали разведение клинического образца ДНК, имеющее значение C_t , наиболее близкое к отрицательному ДНК-стандарту: оптимальным считается, чтобы C_t неизвестных образцов в контрольной реакции отличалось от C_t ДНК контроля не более чем на 2 цикла. Образец ДНК расценивали как положительный (содержащий мутацию), если dC_t образца $\leq dC_t$ положительного контроля, содержащего 5% мутантной ДНК. Образец ДНК считался отрицательным (нет мутации или мутировано менее 1% ДНК-копий гена *BRAF*), если dC_t -образец $> dC_{tm}$, где C_{tm} – C_t положительного стандарта (контроля), содержащего 5% ДНК с мутацией BRAF V600E. Далее пациенты были разделены на 2 группы в соответствии с молекулярно-генетическими подтипами опухоли: 1-я группа ($n = 33$) – пациенты с наличием мутации BRAF V600E, 2-я группа ($n = 47$) – пациенты без мутации BRAF V600E. Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартной методике.

Для определения экспрессии N-кадгерина применяли поликлональные антитела к N-кадгерину (“Abcam”, Великобритания), разведение 1:100. Для определения экспрессии Ki-67 применяли поликлональные антитела к Ki-67 (“Spring Bioscience”, США). В дальнейшем использовали систему детекции Reveal TM Biotin Free System (“Spring Bioscience”, США). В качестве хромогена применяли AEC (“Spring Bioscience”, США).

В качестве индикатора пролиферативной активности использовали индекс пролиферации (ИП) Ki-67, который определяли как долю интенсивно окрашенных ядер при учете 300 клеток, выраженную в процентах.

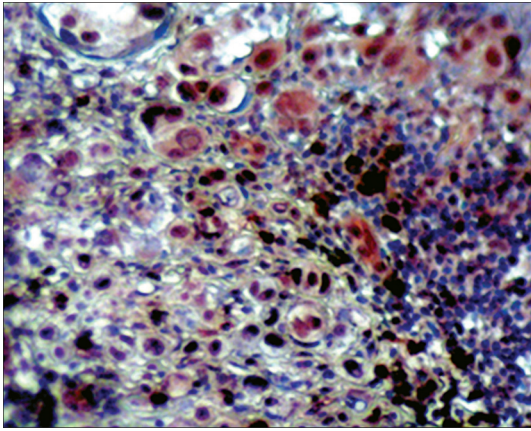


Рис. 3. Экспрессия N-кадгерина в клетках опухолевой ткани. N-кадгеринположительные клетки окрашены красным цветом.

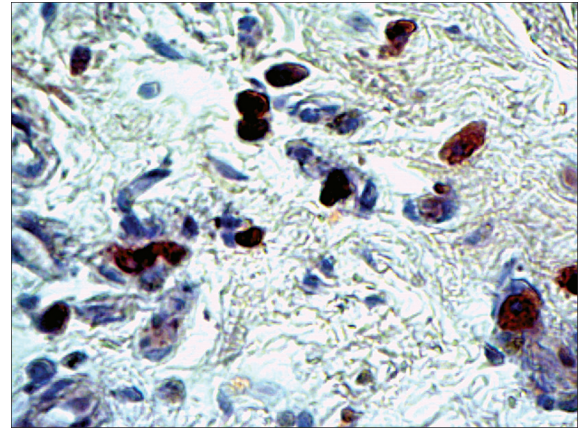


Рис. 4. Экспрессия N-кадгерина в клетках дермы. N-кадгеринположительные клетки окрашены красным цветом.

Для оценки интенсивности иммуногистохимической реакции с N-кадгеринном рассчитывали иммуногистохимический индекс, определяемый по формуле: % интенсивно окрашенных клеток (3+) $\times$ % умеренно иммуноокрашенных клеток (2+) $\times$ % слабоокрашенных клеток (1+).

Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 7.0. Проверку нормальности распределения выборки производили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Учитывая, что характер распределения в данной выборке не являлся нормальным, использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Для оценки различий качественных признаков применяли точный односторонний критерий Фишера. При $p < 0,05$ различия считали статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

Экспрессия N-кадгерина опухолевыми клетками наблюдалась в 39,3% случаев (рис. 1–3). Экспрессия N-кадгерина клетками дермы, в частности фибробластами и лимфоцитами, отмечалась в 66,6% случаев (рис. 4–6), причем в 30,3% случаев экспрессия N-кадгерина наблюдалась только в клетках дермы, а опухолевые клетки при этом оставались интактными. Пациенты, у которых наблюдалась экспрессия N-кадгерина опухолевыми клетками, имели в 41,4% случаев положительный BRAF-статус.

В 58,6% случаев данная мутация отсутствовала. Пациенты, у которых экспрессия N-кадгерина наблюдалась в клетках здоровой кожи (фибробласты, лимфоциты, кератиноциты), имели в 30% случаев положительный BRAF-статус и в 70% случаев не имели данной мутации. Средний иммуногистохимический коэффициент у всех обследованных пациентов с меланомой кожи составил 40,9. При этом иммуногистохимический коэффициент у пациентов с BRAF-положительным статусом был почти в 2 раза выше (65,6), чем у пациентов с BRAF-негативным статусом (34). При этом статистическая значимость различий между данными группами не установлена ($p = 0,19$), но тенденция к увеличению показателя экспрессии N-кадгерина у пациентов с наличием мутации BRAF V600E может свидетельствовать об увеличении инвазивной способности опухоли у пациентов, имеющих мутацию BRAF V600E. Средний возраст BRAF-положительных пациентов составил $51,4 \pm 12,73$ года, у BRAF-негативных пациентов он был более чем на 10 лет старше и составил $66,3 \pm 12,22$ года ($p = 0,18$). На основании исследования данной выборки пациентов можно сделать заключение о том, что экспрессия N-кадгерина не зависит от пола ($p = 0,41$). В группе BRAF-положительных пациентов с высоким уровнем экспрессии N-кадгерина

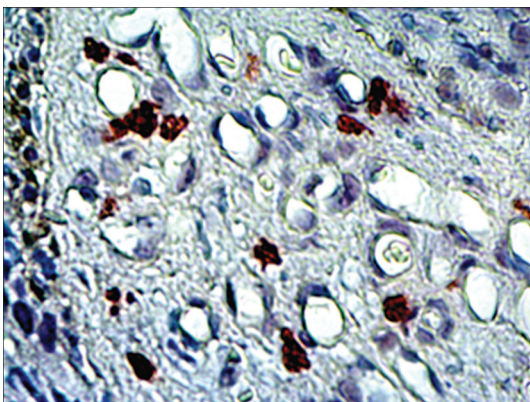


Рис. 5. Экспрессия N-кадгерина в клетках дермы. N-кадгеринположительные клетки окрашены красным цветом.

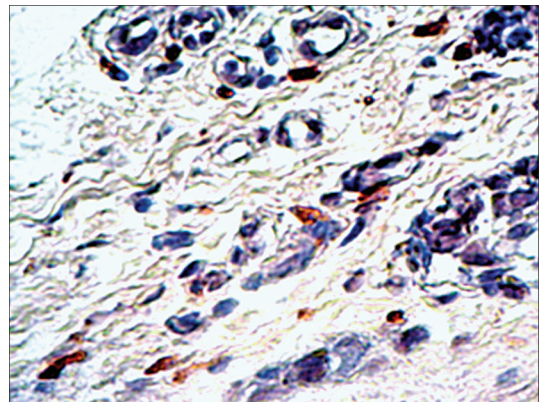


Рис. 6. Экспрессия N-кадгерина в клетках дермы. На фото представлены N-кадгеринположительные фибробласты, лимфоциты.

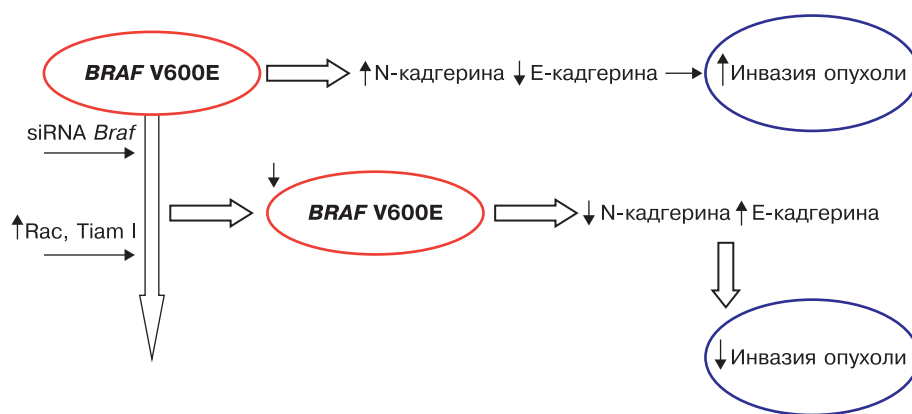


Рис. 7. Регуляция Рас-зависимых кадгеринов мутантным онкогеном *BRAF*.

в 100% случаев имелась узловая форма меланомы, в то время как у *BRAF*-негативных пациентов присутствовали все клинико-морфологические формы заболевания. При оценке уровня экспрессии Ki-67 установлено, что у пациентов с *BRAF*-позитивным статусом ИП был в 2 раза выше, чем у пациентов, не имеющих данной мутации. ИП составил 22,2 и 11,1 соответственно ($p = 0,11$), что говорит об одинаковом характере пролиферативной активности в клетках меланомы независимо от *BRAF*-статуса. Увеличение экспрессии N-кадгерина у пациентов с наличием мутации в гене *BRAF V600E* схематически можно объяснить следующим образом (рис. 7).

Способность опухолевых клеток к инвазии в ткань дермы является критическим событием в развитии меланомы кожи и в итоге индикатором плохого прогноза для пациентов. Однако молекулярные процессы, связанные с приобретением данного инвазивного фенотипа, требуют дальнейшего разъяснения. Мутация *BRAF*, как сказано выше, регулирует инвазивный фенотип опухоли. В клетках меланомы, имеющих мутацию *BRAF V600E*, наблюдается высокий уровень N-кадгерина и низкий уровень E-кадгерина. Показано, что при воздействии на клетки меланомы малыми интерферирующими РНК (siRNA) происходит снижение уровней N-кадгерина и увеличение уровней E-кадгерина [14]. Но для осуществления этого переключения необходимы активизация белков Rac1 и Tiam1, которые в свою очередь показывают сниженную активность в присутствии мутантного *BRAF*. Rac1 является представителем семейства «малых» ГТФаз (семейства ферментов гидролаз, которые связывают и гидролизуют гуанозинтрифосфат), играет роль в регуляции некоторых процессов, происходящих в клетке, включающих реорганизацию актина цитоскелета, осуществление межклеточной адгезии [15]. Кроме того, известно, что Рас защищает клетки от Ras-индуцированного апоптоза через активацию транскрипционного фактора NF-κB [16]. Ингибирование мутантного *BRAF* приводит к снижению инвазивной способности клеток. Однако одновременное ингибирование B-RF и Рас или Tiam1 приводит, наоборот, к усилению инвазивной способности клеток. Отсюда можно сделать вывод,

что мутантный сигнал от *BRAF* подавляет активность Tiam1/Rac, что приводит к увеличению уровня N-кадгерина и снижению уровня E-кадгерина и в конечном счете к повышению инвазивных характеристик опухоли. Таким образом, можно предположить, что при применении препаратов группы *BRAF*-ингибиторов существует опасность увеличения инвазивных характеристик опухоли на фоне функционально измененных Рас и Tiam1. Известно, что *BRAF*-ингибиторы дают краткосрочный терапевтический эффект при *BRAF*-положительных опухолях, что объясняется несколькими причинами, в том числе реактивацией сигнального пути MAPK, активацией иных механизмов передачи сигнала, регулирующих пролиферацию, выживаемость клеток опухоли. *BRAF*-зависимое переключение экспрессии с N-кадгерина на E-кадгерин является важным, но не единственным звеном в реализации инвазивных характеристик опухоли.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ Фонда Министерства образования и науки РФ (МД-901.2013.7)

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kashima T., Nakamura K., Kawaguchi J., Takanashi M., Ishida T., Aburatani H., et al. Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo. *Int. J. Cancer*. 2003; 104(2): 147–54.
2. Hazan R.B., Qiao R., Keren R., Badano I., Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann. NY Acad. Sci.* 2004; 1014: 155–63.
3. Haass N. K., Herlyn M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2005; 10(2): 153–63.
4. Bonitsis N., Batistatou A., Karantima S., Charalabopoulos K. The role of cadherin/catenin complex in malignant melanoma. *Exp. Oncol.* 2006; 28(3):187–93.
5. Gruss C., Herlyn M. Role of cadherins and matrixins in melanoma. *Curr. Opin. Oncol.* 2001; 13(2): 117–23.
6. Rogers C.D., Saxena A., Bronner M.E. Sip1 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during cranial neural crest EMT. *J. Cell Biol.* 2013; 203(5): 835–47.
7. Nakajima S., Doi R., Toyoda E., Tsuji S., Wada M., Koizumi M., et al. N-Cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10 (12, Pt 1): 4125–33.

8. Freeman A.K., Ritt D.A., Morrison D.K. Effects of Raf dimerization and its inhibition on normal and disease-associated Raf signaling. *Mol. Cell.* 2013; 49(4):751–8.
9. Damsky W.E., Curley D.P., Santhanakrishnan M., Rosenbaum L.E., Platt J.T., Gould Rothberg B.E. β -catenin signaling controls metastasis in braf-activated pten-deficient melanomas. *Cancer Cell.* 2011; 20(6): 741–54.
10. Florenes V.A., Maelandsmo G.M., Faye R., Nesland J. M., Holm R. Cyclin A expression in superficial spreading malignant melanomas correlates with clinical outcome. *J. Pathol.* 2001; 195(5): 530–6.
11. Ohsie S.J., Sarantopoulos G.P., Cochran A.J., Binder S.W. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J. Cutan. Pathol.* 2008; 35(5): 433–44.
12. Ilmonen S., Vaheri A., Asko-Seljavaara S., Carpen O. Ezrin in primary cutaneous melanoma. *Mod. Pathol.* 2005; 18 (4): 503–510.
13. Ben-Izhak O., Bar-Chana M., Sussman L., Dobiner V., Sandbank J., Cagnano M., et al. Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma. *Histopathology.* 2002; 41(6): 519–25.
14. Monaghan-Benson E., Burrige K. Mutant B-RAF regulates a Rac-dependent cadherin switch in melanoma. *Oncogene.* 2013; 32(40): 4836–44.
15. Buongiorno P., Pethe V.V., Charames G.S. Esufali S., Bapat B. Rac1 GTPase and the Rac1 exchange factor Tiam1 associate with Wnt-responsive promoters to enhance beta-catenin/TCF-dependent transcription in colorectal cancer cells. *Mol. Cancer.* 2008; 73(7): 1–15.
16. Joneson T., Bar-Sagi D. Suppression of Ras-induced apoptosis by the Rac GTPase. *Mol. Cell Biol.* 1999; 19(9): 5892–901.

Поступила 03.06.14
Received 03.06.14

ДЕБЮТ

© ГАРАНЯН Л.Г., АВАГЯН Д.В., 2014
УДК 615.275.2.036:616.5

Циклоспорин А в дерматологии

Гаранян Л.Г., Авагян Д.В.

Кафедра кожных и венерических болезней (зав. – проф. О.Ю. Олисова) лечебного факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, Россия

Представлены данные литературы о механизме действия препарата циклоспорин А, различных режимах назначения, побочных эффектах, комбинациях с другими препаратами. Приведены клинические данные об эффективности применения иммунодепрессивного препарата в современной дерматологической практике, в терапии таких дерматозов, как псориаз, atopический дерматит, вульгарная пузырчатка, гнездная алопеция и ряда других заболеваний. Имеющиеся в литературе сведения позволяют дать высокую оценку циклоспорино А в лечении этих заболеваний. Описано положительное влияние препарата на пораженную кожу и его способность вызывать клиническую ремиссию.

Ключевые слова: циклоспорин А; иммуносупрессия; псориаз; atopический дерматит; пузырчатка.

CYCLOSPORINE A IN DERMATOLOGY

Garanyan L.G., Avagyan D.V.

I.M.Setchenov First Moscow Medical University, 119991, Moscow, Russia

Published data on cyclosporine A mechanism of action, treatment protocols, side effects, and combinations with other drugs are reviewed. Clinical data on the efficiency of the immunosuppressant, used in modern practical dermatology for therapy of psoriasis, atopic dermatitis, pemphigus vulgaris, alopecia areata, etc., are presented. Published data indicate high efficiency of cyclosporine A in the treatment of these diseases. Positive effects of the drug on the involved skin and induction of clinical remission in response to treatment are described.

Key words: cyclosporine A; immunosuppression; psoriasis; atopic dermatitis; pemphigus.

Циклоспорин А (ЦсА) был выделен в 1969 г. из мицелия двух видов грибов (*Cilindrocarpum lucidum* и *Tolyposcladium infantum*). Это препарат, обладающий мощной иммуносупрессивной активно-

стью, представляет собой циклический липофильный полипептид, содержащий 11 аминокислот. Основными клетками-мишенями для ЦсА являются CD4⁺T-лимфоциты, активация которых лежит в основе развития иммунного ответа. В отличие от других иммуносупрессантов, таких как азатиоприн или циклофосфамид, ЦсА в терапевтических дозах не обладает цитотоксичностью и не влияет на репликацию ДНК. Препарат подавляет действие фосфатазы кальциневрина и снижает активность транскрипции большого числа генов цитокинов, особенно ИЛ-2 [1]. ЦсА блокирует активацию

Сведения об авторах:

Гаранян Лусинэ Гарегиновна, клинический ординатор (lusine90@list.ru); Авагян Джемма Вардановна, клинический ординатор (dgemma_90@mail.ru).

Corresponding author:

Garanyan Lusine, (lusine90@list.ru).