

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ РАКА ВУЛЬВЫ

Бусарова А.В.¹, Порханова Н.В.¹, Ульянова Е.П.², Золотарева Е.И.², Сагакянц А.Б.², Шульгина О.Г.², Махова Т.А.³, Черникова Е.Н.², Бакулина С.М.²

¹ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1» Минздрава Краснодарского края, Краснодар, e-mail: ellina_ue@bk.ru;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

³ГБУ РО «Областной центр охраны здоровья семьи и репродукции», Минздрава Ростовской области, Ростов-на-Дону

Цель: оценка особенностей экспрессии маркеров E-кадгерина, N-кадгерина и Desmocollin 3 при раке вульвы и рассмотрение их в качестве прогностических факторов. Материалом для исследования явились парафиновые блоки опухолей 50 больных с верифицированным диагнозом «плоскоклеточный рак». Больные были распределены на 2 группы: контрольная группа – рак вульвы T1-2N0-M0 (G2); основная группа – рак вульвы T1-2N1-M0 (G2) с метастазами в паховые лимфоузлы. Для ИГХ-исследования использовали моноклональные мышиные антитела к E- и N-кадгерину и поликлональные к Desmocollin 3, для визуализации - систему детекции UltraVision Quanto Detection System HRP DAB. Сравнение групп проводилось с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (U-критерий), критерия χ^2 Пирсона с оценкой относительного риска (RR). В результате было отмечено в опухолях пациенток с метастатическим поражением статистически значимое снижение E-кадгерина в 2,3 раза по сравнению с опухолями без метастазов. Увеличение N-кадгерина в 2,9 раза и уменьшение Desmocollin 3 в 1,8 раза в группе с метастазами статистической значимости не имели. При сравнении абсолютных значений было определено, что в группе с метастатическим поражением количество пациенток с положительным статусом N-кадгерин было в 2,7 раза выше, E-кадгерин+ - в 2,9 раза ниже, Desmocollin 3+ - в 2,4 ниже по сравнению с группой без метастазов. Таким образом, статистически значимые различия в экспрессии E-кадгерина однозначно дают возможность предложить данный маркер как фактор прогноза метастазирования, тогда как для оценки маркеров N-кадгерина и Desmocollin 3 необходимо более расширенное исследование.

Ключевые слова: рак вульвы, эпителиально-мезенхимальный переход, маркеры прогноза, E- и N-кадгерины, Desmocollin 3.

CHARACTERISTICS OF EXPRESSION OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION MARKERS IN VARIOUS TYPES OF VULVAR CANCER

Busarova A.V.¹, Porkhanova N.V.¹, Ulianova E.P.², Zolotareva E.I.², Sagakyants A.B.², Shulgina O.G.², Makhova T.A.³, Chernikova E.N.², Bakulina S.M.²

¹Clinical Oncology Dispensary No.1, Krasnodar, e-mail: ellina_ue@bk.ru;

²National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don;

³Regional Center of Family Health and Reproduction, Rostov-on-Don

Objective: to assess the expression of E-cadherin, N-cadherin and Desmocollin 3 markers in vulvar cancer and consider them as prognostic factors. The study material included paraffin blocks of tumors from 50 patients diagnosed with verified squamous cell carcinoma. The patients were divided into 2 groups: control group - T1-2N0-M0 (G2) vulvar cancer; main group - T1-2N1-M0 (G2) vulvar cancer with metastases to inguinal lymph nodes. Monoclonal mouse antibodies to E- and N-cadherin and polyclonal antibodies to Desmocollin 3 were used for the IHC study, and the UltraVision Quanto Detection System HRP DAB was used for visualization. The groups were compared using non-parametric Mann-Whitney test (U-test) and Pearson's χ^2 test with Relative Risk (RR) score. As a result, a statistically significant decrease in E-cadherin by 2.3 times was noted in metastatic tumors, compared with tumors without metastases. An increase in N-cadherin by 2.9 times and a decrease in Desmocollin 3 by 1.8 times in the group without metastases had no statistical significance. The comparison of absolute values showed that the number of patients positive for N-cadherin in the group with metastases was 2.7 times higher, E-cadherin+ - 2.9 times lower, Desmocollin 3+ - 2.4 times lower, compared to the group with metastases. Thus, statistically significant differences in the expression of E-cadherin suggest this marker as a prognostic factor for metastasis, while a more extended study is needed to evaluate N-cadherin and Desmocollin 3 markers.

Keywords: vulvar cancer, epithelial-mesenchymal transition, prognostic markers, E- and N- cadherin, Desmocollin 3.

Рак вульвы встречается редко, составляя всего 4% гинекологических злокачественных новообразований. Наиболее распространенный подтип – плоскоклеточная карцинома, выявляется в более 76% случаев данного заболевания [1]. Рак вульвы долгое время считался болезнью женщин в постменопаузе, однако в последние годы средний возраст заболеваемости снизился, что может быть связано с увеличением случаев инфицирования ВПЧ во всем мире [2].

Принято считать, что основным механизмом прогрессии злокачественных опухолей эпителиального происхождения, большинство которых представлены карциномами, является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [3]. В результате ЭМП эпителиальные клетки утрачивают клеточную полярность и стабильную межклеточную адгезию, которая во многих случаях связана с угнетением экспрессии E-кадгерина, и начинают приобретать особенности мезенхимального фенотипа с увеличением экспрессии N-кадгерина и виментина. Именно такое «переключение кадгеринов» обеспечивает миграционную активность и способность к инвазии раковых клеток в соседние ткани, что приводит к метастазированию и тем самым снижению общей выживаемости пациентов [4]. Регуляция продукции E-кадгерина тесно связана с экспрессией Desmocollin 3. Desmocollin 3 (DSC3) представляет собой белок трансмембранной адгезии десмосом, который участвует в канцерогенезе при различных типах рака. Сверхэкспрессия DSC3 снижает пролиферацию клеток, способность к образованию колоний, вызывает остановку клеточного цикла G0/G1 и способствует апоптозу [5]. Увеличение экспрессии данного белка значительно ингибирует активность пути Akt и увеличивает экспрессию E-кадгерина. Напротив, снижение экспрессии Desmocollin 3 тесно связано с агрессивным течением заболевания и плохим прогнозом [6]. В последнее время выполнено достаточно много публикаций о прогностической роли белков E-кадгерина, N-кадгерина и Desmocollin 3 при таких локализациях, как колоректальный рак, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы. Однако исследования, в которых бы рассматривались маркеры ЭМП при раке вульвы, единичны. Поэтому целью нашей работы стало выявление особенностей экспрессии маркеров E-кадгерина, N-кадгерина и Desmocollin 3 при раке вульвы и рассмотрение их в качестве прогностических факторов.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены по 25 больных в возрасте от 29 до 80 лет: I группа – рак вульвы T₁₋₂N₀-M₀ (G2) без метастазов; II группа – рак вульвы T₁₋₂N₁-M₀ (G2) с метастазами в паховые лимфоузлы. Пациентки проходили плановое лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России в 2015-2020 гг. и подписывали информированное согласие на обработку персональных данных и передачу сведений, составляющих врачебную тайну на передачу биологического материала. Гистологически был верифицирован плоскоклеточный рак вульвы (n=50).

Морфологические исследования выполняли на базе патологоанатомического отделения ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (Ростов-на-Дону). Для фиксации материала использовали раствор 10%-ного нейтрального забуференного формалина с последующей стандартной проводкой. Далее приготавливали срезы толщиной 3-5 мкм. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили на срезах с парафиновых блоков опухолей, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Для ИГХ-исследования применяли протокол, опубликованный ранее [7]. Использовали моноклональные мышиные антитела к E-кадгерину (клон 12#, Cloud-Clone Corp.), к N-кадгерину (клон 389, Invitrogen, США) в разведении 1:300 и поликлональные к Desmocollin 3 (Invitrogen, США) в разведении 1:300. Для визуализации применяли систему детекции UltraVision Quanto Detection System HRP DAB. Экспрессия E- и N-кадгерина, а также Desmocollin 3 была полуколичественно проанализирована в соответствии с процентным соотношением клеток и интенсивностью окраски: 0 (0 -10%); 1+ (11 - 30%); 2+ (31 - 70%); 3+ (>70%). Экспрессия считалась положительной, если оценка была ≥ 2 . Результаты иммуногистохимической реакции проводились с применением светового микроскопа AxioLab.A1 (Германия) при увеличении объектива x200, x400. Полученные данные обрабатывали методом статистической обработки с помощью пакета прикладных программ Statistica 13,0 (StatSoftInc., США). Изучаемые данные проверяли на соответствие нормальному распределению по критерию Шапиро-Уилка. В связи с тем что распределение оказалось далеко от нормального, сравнение групп проводилось с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (U-критерий) и критерия χ^2 Пирсона. Дополнительно оценивали относительный риск и статистическую значимость, исходя из значений 95%-ного доверительного интервала.

Результаты исследования и их обсуждение. В результате исследования нами было выявлено, что максимальное окрашивание опухолевых клеток маркером E-кадгерин (90%) наблюдалось у пациенток без метастатического поражения, тогда как максимальная экспрессия N-кадгерина (45%) была отмечена у больных с поражением в лимфоузлы. Минимальные значения E-кадгерина (15%) были определены в опухолях пациенток основной группы, наименьшие значения N-кадгерина (1-2%) - у пациенток контрольной группы. Кроме того, нами было отмечено отсутствие экспрессии N-кадгерина в опухолях пациенток только контрольной группы у 36% (9). Процентный разброс опухолевых клеток, окрашенных E-кадгеринном, у пациенток был достаточно большой как в контрольной группе, так и основной. При окрашивании N-кадгеринном в опухолях пациенток исследуемых групп значительного

разброса отмечено не было. Процентное содержание и медианы значений отображены в диаграммах размаха (рис. 1) и в таблицах 1 и 2.

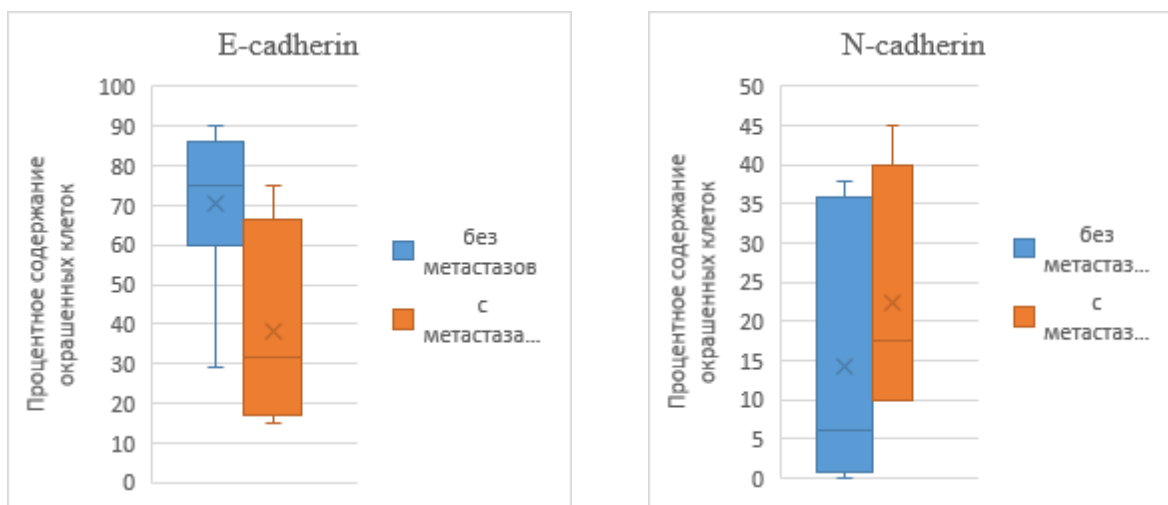


Рис. 1. Диаграмма размаха уровня экспрессий E-кадгерина и N-кадгерина в опухолях вульвы у пациенток исследуемых групп

Таблица 1

Уровень экспрессии E-кадгерина в опухолях пациенток исследуемых групп

Уровень экспрессии, %	Группы больных				p-value
	I (с метастазами) (n=25)		II (без метастазов) (n=25)		
	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
E-кадгерин	32	15-75	75	29-90	0,031*

Примечание: * - отличия показателей статистически значимы между группами больных ($p < 0,05$).

Таблица 2

Уровень экспрессии N-кадгерина в опухолях пациенток исследуемых групп

Уровень экспрессии, %	Группы больных				p-value
	I (с метастазами) (n=25)		II (без метастазов) (n=25)		
	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
N-кадгерин	17,5	10-45	6	0-38	0,067

Данные, приведенные в таблице 1 и 2, демонстрируют, что наше исследование выявило наличие статистически значимых различий только экспрессии E-кадгерина в опухолях пациенток исследуемых групп. Значения экспрессии данного маркера преобладали в 2,3 раза в группе пациенток без метастатического поражения. Значения N-кадгерина, наоборот, превалировали в 2,9 раза в группе пациенток с метастатическим поражением, но без статистической значимости ($p \geq 0,05$).

На рисунке 2 представлены различные варианты экспрессии E-кадгерина и N-кадгерина у некоторых пациенток данного исследования.

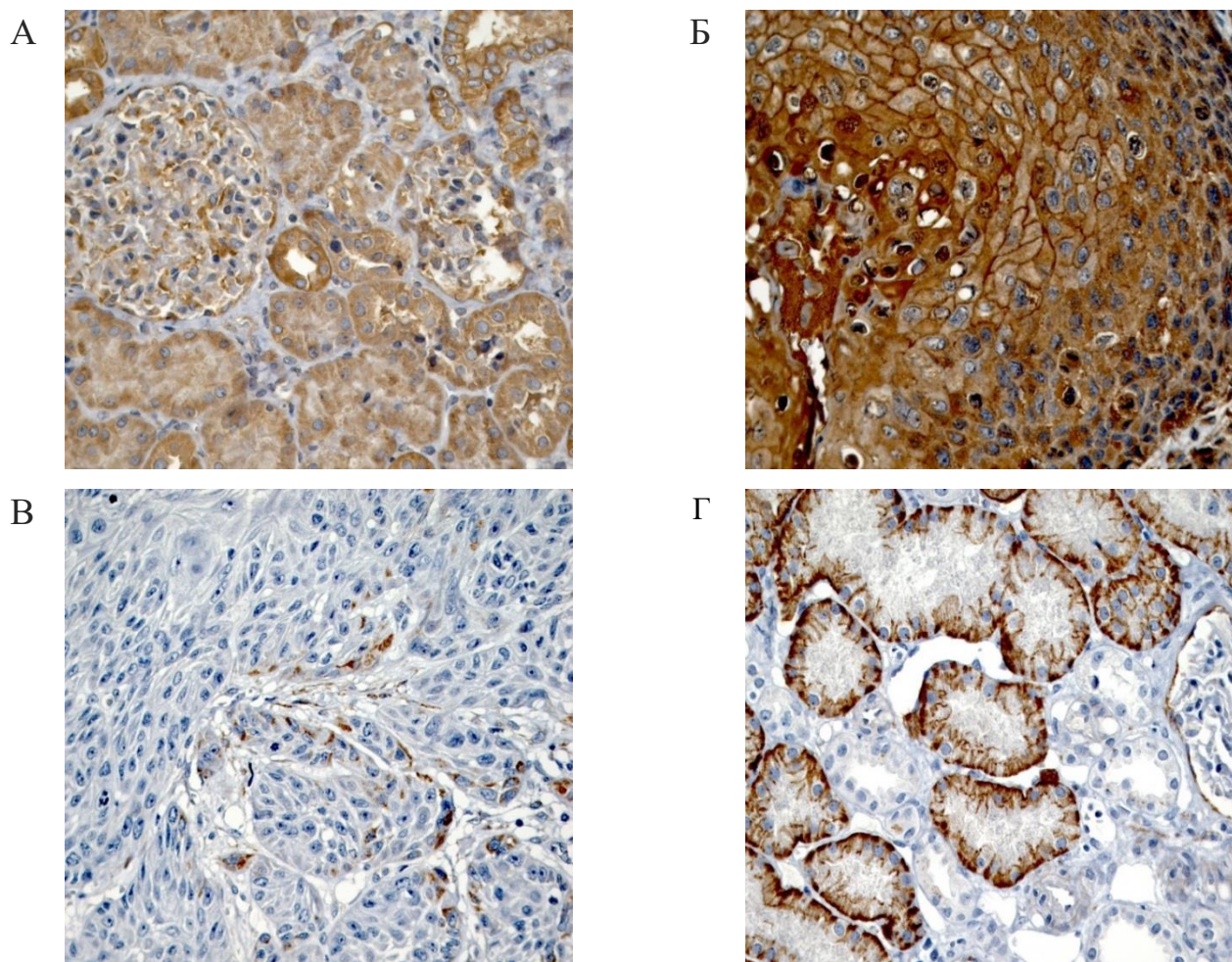


Рис. 2. А и Б - экспрессия E-кадгерина в опухолевых клетках: А – больная Д. из основной группы (умеренная степень интенсивности - 2+). X 400; Б – больная З. из контрольной группы (высокая степень интенсивности – 3+). X 400. В и Г - экспрессия N-кадгерина в опухолевых клетках: В – больная Т. из контрольной группы (отсутствие экспрессии). X 400; Г – больная Д. из основной группы (высокая степень интенсивности – 3+). X 400

При анализе экспрессии белка *Desmocollin 3* были получены следующие результаты. Максимальное окрашивание клеток маркером *Desmocollin 3* (45%) наблюдалось в опухолях пациенток без метастатического поражения. Минимальное окрашивание (10%) нами было отмечено как в опухолях пациенток с метастазами, так и без метастазов. Процентный разброс окрашенных клеток в опухолях был незначительный также в обеих исследуемых группах (рис. 3, табл. 3).

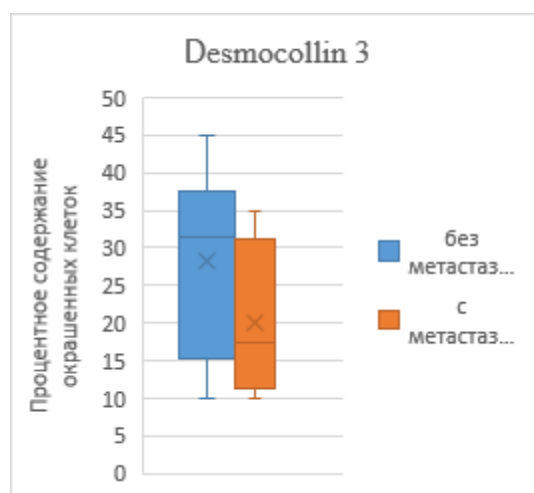


Рис. 3. Диаграмма размаха уровня экспрессии *Desmocollin 3* в опухолях вульвы у пациенток исследуемых групп

Таблица 3

Уровень экспрессии *Desmocollin 3* в опухолях пациенток исследуемых групп

Уровень экспрессии, %	Группы больных				p- value
	I (с метастазами) (n=25)		II (без метастазов) (n=25)		
	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
<i>Desmocollin 3</i>	17,5	10-35	31,5	10-45	0,227

Из данных, приведенных в таблице 3, видно, что наше исследование не выявило наличие статистически значимых различий экспрессии *Desmocollin 3* в опухолях пациенток исследуемых групп. Значения экспрессии *Desmocollin 3* хоть и преобладали в опухолях пациенток без метастатического поражения в 1,8 раза, однако статистической значимости отметить не удалось ($p \geq 0,05$).

На рисунке 4 представлены различные варианты экспрессии *Desmocollin 3* у некоторых пациенток данного исследования.

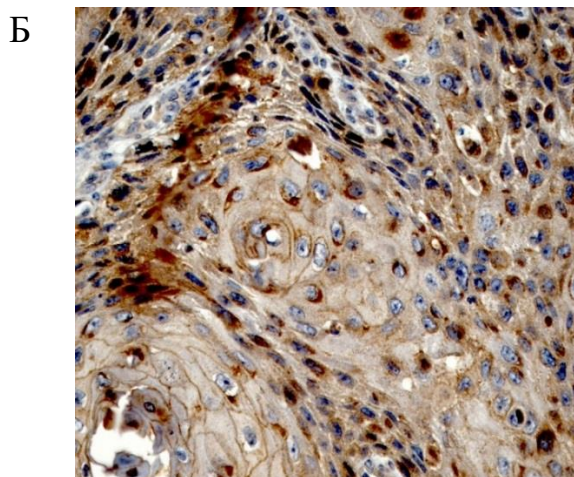
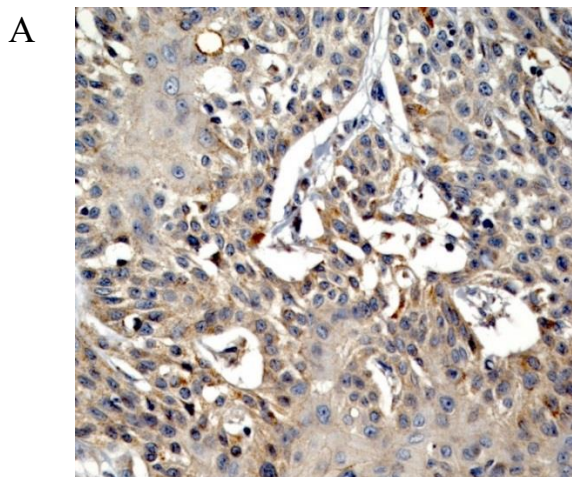


Рис. 4. Экспрессия *Desmocollin 3* в опухолевых клетках: А – больная К. из основной группы (низкая степень интенсивности - 1+). X 400; Б – больная З. из контрольной группы (высокая степень интенсивности – 3+). X 400

Помимо вышеизложенного, нами была проведена статистическая обработка результатов для оценки экспрессии исследуемых маркеров как факторов риска метастазирования при раке вульвы. Полученные результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4

Распределение числа пациенток с положительной и отрицательной экспрессией исследуемых маркеров в опухолях вульвы изучаемых групп

Фактор риска	Группы больных				χ^2 p-value	RR, 95% ДИ
	I (с метастазами) (n=25)		II (без метастазов) (n=25)			
	Абсол.	%	Абсол.	%		
Е-кадгерин+	10	40	23	92	15,062 <0,001*	2,9; 1,69-5,03
Е-кадгерин-	15	60	2	8		
N-кадгерин+	19	76	8	32	9,742 0,002*	2,7; 1,30-5,60
N-кадгерин-	6	24	17	68		
Desmocollin +	7	28	17	68	8,013 0,005*	2,4; 1,21-4,66
Desmocollin -	18	72	8	32		

Примечание: * - статистически значимые отличия между группами основная и контрольная ($p \geq 0,05$).

В результате статистического анализа (табл. 4) были определены χ^2 Пирсона и относительные риски (RR) наличия положительного или отрицательного статуса исследуемых маркеров (Е- и N-кадгерина, *Desmocollin 3*) в опухоли пациенток с раком вульвы. В результате было выявлено, что в группе с метастатическим поражением преобладали пациентки с положительным статусом N-кадгерин, тогда как в группе без метастатического поражения преобладали пациентки с положительным статусом Е-кадгерин и *Desmocollin 3*. Количество пациенток с N-кадгерин+ было выше в 2,7 раза, Е-кадгерин+ - в 2,9 раза, *Desmocollin 3*+ - в 2,4 раза. Все различия имели статистическую значимость ($p \geq 0,05$).

Итак, наше исследование выявило ряд особенностей в экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода при раке вульвы. Отличительной чертой данного перехода является активация N-кадгерина с одновременным подавлением экспрессии Е-кадгерина, которые регулируются сложной сетью сигнальных путей и факторов транскрипции. Потеря Е-кадгерина в раковых клетках приводит к метастатическому распространению за счет высокой адгезии к внеклеточному матриксу и более высокой инвазивности. Данный факт был подтвержден и в нашем исследовании на материале рака

вульвы. Вышеописанные результаты совпали с большинством исследований, проведенных при других злокачественных образованиях. Так, например, в работе Rosso M. было показано, что линии клеток рака яичников с более высокой экспрессией E-кадгерина показали меньшую устойчивость к гибели, более низкую адгезию к внеклеточному матриксу и более слабую инвазивность по сравнению с клеточными линиями с высокой экспрессией N-кадгерина [8]. Аналогичные данные были получены и в эксперименте на мышах с применением экзосом. Yang S.S. с соавторами показали, что в моделях с экзосомами РМЖ снижение экспрессии E-кадгерина и повышение экспрессии N-кадгерина усиливало инвазию рака молочной железы и способствовало образованию метастазов в легкие [9]. В исследованиях Мнихович М.В. с соавторами отмечалось, что при РМЖ снижение экспрессии E-кадгерина значительно чаще выявлялось у пациенток с метастазами в печень, развившимися в разные сроки [10].

Помимо вышеизложенного, снижение экспрессии белка E-кадгерина является одним из прогностических факторов при светлоклеточном раке почки [11], колоректальном раке [12], раке простаты [13] и др.

Наряду с изменениями экспрессии N-кадгерина, регуляция E-кадгерина тесно связана с экспрессией белка Desmocollin 3. В работе T.Cui с соавторами показано, что Desmocollin 3 подавляет рост опухолевых клеток при колоректальном раке посредством ингибирования пути Akt и регуляции E-кадгерина, поэтому снижение его экспрессии связано с более высокой степенью злокачественности, метастазированием и более неблагоприятным прогнозом [14]. В нашем исследовании данный результат также был подтвержден, хотя и без статистической значимости.

Выводы. Таким образом, проведенное иммуногистохимическое исследование выявило особенности экспрессии маркеров E-кадгерина, N-кадгерина и Desmocollin 3 при раке вульвы с разной распространенностью. Статистически значимые различия в экспрессии E-кадгерина однозначно дают возможность предложить данный маркер как фактор прогноза метастазирования, тогда как для оценки прогностической значимости маркеров N-кадгерина и Desmocollin 3 необходимо более расширенное исследование.

Список литературы

1. Сагакянц А.Б. Объединенный иммунологический форум: современные направления развития фундаментальной и прикладной онкоиммунологии (Новосибирск, 2019) // Южно-Российский онкологический журнал. 2020. № 1 (2). С. 36-45. DOI: 10.37748/2687-0533-2020-1-2-5.
2. Olawaiye A.B., Cuello M.A., Rogers L.J. Cancer of the vulva: 2021 update. Int. J. Gynaecol Obstet. 2021. vol. 155 (1). P. 7-18. DOI: 10.1002/ijgo.13881.

3. Brabletz S., Schuhwerk H., Brabletz T., Stemmler M.P. Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression. *EMBO J.* 2021. vol. 40. no. 18. e108647. DOI: 10.15252/embj.2021108647.
4. Loh C.Y., Chai J.Y., Tang T.F., Wong W.F., Sethi G., Shanmugam M.K., Chong P.P., Looi C.Y. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges. *Cells.* 2019. vol. 8. no 10. P. 1118. DOI: 10.3390/cells8101118.
5. Shafraz O., Rübsam M., N Stahley S., L Caldara A., P Kowalczyk A., M Niessen C., Sivasankar S. E-cadherin binds to desmoglein to facilitate desmosome assembly. *Elife.* 2018. vol. 7. P. e37629. DOI: 10.7554/eLife.37629.
6. Ульянова Е.П., Статешный О.Н., Сагакянц А.Б., Харатегзов Д.А., Непомнящая Е.М., Шульгина О.Г., Черникова Е.Н., Алейник Е.В. Особенности экспрессии десмоколлина 1 и десмоколлина 3 при разных подтипах немелкоклеточного рака легкого // *Вопросы онкологии.* 2022. № 68 (S3). С. 130-131.
7. Неродо Г.А., Новикова И.А., Златник Е.Ю., Непомнящая Е.М., Дженкова Е.А., Иванова В.А., Вереникина Е.В., Ульянова Е.П., Таджибаева Ю.Т. Прогностическая значимость некоторых иммуногистохимических маркеров у больных раком вульвы // *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки.* 2017. № 4-2 (196-2). С. 96-103.
8. Rosso M., Majem B., Devis L., Lapyckyj L., Besso M.J., Llauradó M., Abascal M.F., Matos M.L., Lanau L., Castellví J., Sánchez J.L., Benavente A.P., Gil-Moreno A., Reventós J., Margalef A.S., Rigau M., Vazquez-Levin M.H. E-cadherin: A determinant molecule associated with ovarian cancer progression, dissemination and aggressiveness. *PLoS ONE.* 2017. vol. 12. no. 9. P. e0184439. DOI: 10.1371/journal.pone.0184439.
9. Yang S.S., Ma S., Dou H., Liu F., Zhang S.Y., Jiang C., Xiao M., Huang Y.X. Breast cancer-derived exosomes regulate cell invasion and metastasis in breast cancer via miR-146a to activate cancer associated fibroblasts in tumor microenvironment. *Exp. Cell. Res.* 2020. vol. 391. no. 2. P. 111983. DOI: 10.1016/j.yexcr.2020.111983.
10. Мнихович М.В., Кактурский Л.В., Безуглова Т.В., Мидибер К.Ю., Буньков К.В., Эрзиева А.Г. Сравнительная иммуногистохимическая оценка экспрессии Е-кадгерина и β -катенина при метастатическом и неметастатическом раке молочной железы неспецифического типа // *Опухоли женской репродуктивной системы.* 2018. № 14 (2). С. 14-20.
11. Розенфельд И.И. Изучение экспрессии гена е-кадгерина // *Современные концепции и парадигмы образования в условиях мирового эпидемиологического кризиса.* 2020. С. 56-58.

12. Новикова И.А., Кит О.И. Особенности экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода – E-кадгерина и ZEB1 – при колоректальном раке // Исследования и практика в медицине. 2021. № 8 (2). С. 23-33. DOI: 10.17709/2410-1893-2021-8-2-2.
13. Воронина Е.С., Фомкин Р.Н., Бучарская А.Б., Палатова Т.В., Попков В.М., Маслякова Г.Н. Прогностическая значимость оценки экспрессии иммуногистохимических маркеров и степени патоморфоза до и после лечения больных раком простаты высокого риска прогрессирования // Саратовский научно-медицинский журнал. 2019. № 15 (2). С. 318-324.
14. Cui T., Yang L., Ma Y., Petersen I., Chen Y. Desmocollin 3 has a tumor suppressive activity through inhibition of AKT pathway in colorectal cancer. *Exp. Cell. Res.* 2019. vol. 378 (2). no. 124-130. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.03.015.