

В. Є. Вотєва, С. І. Тертишний

## Імуногістохімічні особливості розподілу молекул міжклітинної адгезії в доброякісних та злоякісних менингіомах головного мозку

Запорізький державний медичний університет

**Ключові слова:** менингіома, міжклітинна адгезія, E-cadherin,  $\beta$ -catenin.

Менингіоми є поширеними новоутвореннями головного мозку, становлять 24–30% від усіх первинних внутрішньочерепних пухлин. З метою визначення рівня експресії молекул міжклітинної адгезії  $\beta$ -catenin та E-cadherin у зразках менингіом головного мозку, що видалили під час нейрохірургічних операцій у 20 хворих (віком від 25 до 75 років), імуногістохімічними методами досліджена експресія цих молекул у доброякісних і злоякісних менингіомах. Встановлений кореляційний зв'язок між рівнем експресії  $\beta$ -catenin та E-cadherin у злоякісних та доброякісних менингіомах. Показали, що різні варіанти доброякісних менингіом відрізняються за рівнем експресії  $\beta$ -catenin і, навпаки, мають подібний рівень експресії E-cadherin. Більшість доброякісних менингіом характеризуються вірогідно вищими рівнями експресії молекул міжклітинної адгезії, ніж анапластичні.

### Иммуногистохимические особенности распределения молекул межклеточной адгезии в доброкачественных и злокачественных менингиомах головного мозга

В. Е. Вотєва, С. И. Тертишний

Менингиомы являются распространенными новообразованиями головного мозга и составляют 24–30% от всех первичных внутримозговых опухолей. С целью определения уровня экспрессии молекул межклеточной адгезии  $\beta$ -catenin и E-cadherin в образцах менингиом головного мозга, которые были удалены во время нейрохирургических операций у 20 больных (в возрасте от 25 до 75 лет), иммуногистохимическими методами исследована экспрессия этих молекул в доброкачественных и злокачественных менингиомах. Установлена корреляционная взаимосвязь между уровнем экспрессии  $\beta$ -catenin и E-cadherin в злокачественных и доброкачественных менингиомах. Показано, что разные варианты доброкачественных менингиом отличаются по уровню экспрессии  $\beta$ -catenin и, наоборот, имеют похожий уровень экспрессии E-cadherin. Большинство доброкачественных менингиом характеризуются достоверно большими уровнями экспрессии молекул межклеточной адгезии, чем анапластические.

**Ключевые слова:** менингиома, межклеточная адгезия, E-cadherin,  $\beta$ -catenin.*Патология.* – 2014. – №3 (32). – С. 92–95

### Immunohistochemical peculiarities of cell adhesion molecules distribution in benign and malignant brain meningiomas

W. E. Voteva, S. I. Tertishniy

**Aim.** Meningiomas are widespread neoplasms of the brain, constituting 24–30% of all primary intracranial tumors. In order to determine the expression level of cell adhesion molecules  $\beta$ -catenin and E-cadherin in 20 specimens of brain with the help of immunohistochemical methods the expression of these molecules in benign and malignant meningiomas was investigated.

**Methods and results.** The correlation relationship between the expression level of  $\beta$ -catenin and E-cadherin in malignant and benign meningiomas was determined. It is shown that the expression level of  $\beta$ -catenin in the different subtypes of benign meningiomas differs and, conversely, they have a similar expression level of E-cadherin.

**Conclusion.** Most of benign meningiomas are characterized by significantly higher expression levels of cell adhesion molecules than anaplastic ones.

**Key words:** Meningioma, Cell Adhesion, E-cadherin,  $\beta$ -catenin.*Pathologia.* 2014; №3 (32): 92–95

Менингіоми є поширеним новоутворенням головного мозку, становлять 24–30% від усіх первинних внутрішньочерепних пухлин. Стадія гістологічної злоякісності є найбільш корисним провісником рецидиву [1]. Так, доброякісні менингіоми (grade I) мають ризик рецидиву майже 7–25 %, атипові (grade II) рецидивують у 29–52% випадків і анапластичні (grade III) із частотою 50–94%. Але (крім градації за стадіями злоякісності) інші фактори ризику рецидиву не є повністю з'ясованими у випадку доброякісних менингіом. Більшість менингіом, що трапляються у клінічній практиці, становлять доброякісні (grade I), найкращим лікуванням є тотальне видалення пухлини, але у разі

інвазії у прилеглі структури (тверда мозкова оболонка, кістки черепа і паренхіма мозку) мета лікування зазвичай не досягається.

Виникнення епітеліально-мезенхімального перетворення під час прогресії пухлини пояснює важливі механізми для початкового етапу метастазування – інвазії, коли неінвазивні пухлинні клітини набувають рухливості та зрештою дисемінують до віддалених органів. Критерієм епітеліально-мезенхімального перетворення є втрата молекул міжклітинної адгезії – E-cadherin. Численні повідомлення багатьох дослідників вказують, що E-cadherin відіграє важливу роль у розвитку пухлин ЦНС, зокрема – менингіом [2,3,4,8].  $\beta$ -catenin, який

безпосередньо з'єднаний із цитоплазматичним кінцем E-cadherin, утворює E-cadherin/ $\beta$ -catenin комплекс. Руйнування цього з'єднання безпосередньо пов'язане з біологічною поведінкою пухлинних клітин, впливаючи на їх відокремлення і повторну адгезію [5,6,7]. За даними деяких досліджень, рівень експресії E-cadherin/ $\beta$ -catenin прогресивно зменшується зі зростанням ступеня анаплазії, є певний зв'язок між наявністю цих молекул і стадією менінгіоми за ВООЗ (2007) [3]. Інші дослідники стверджують: зменшений рівень мембранної експресії  $\beta$ -catenin і/або E-cadherin вказує на пошкодження міжклітинної взаємодії незалежно від ступеня злоякісності менінгіом [10].

### Мета роботи

Визначити рівень експресії молекул міжклітинної адгезії E-cadherin та  $\beta$ -catenin у доброякісних та анапластичних менінгіомах головного мозку, що необхідний для прогнозування їхніх інвазивних властивостей.

### Пацієнти і методи дослідження

Проведене комплексне гістологічне та імуно-гістохімічне (ІГХ) дослідження архівного матеріалу менінгіом головного мозку, що видалили під час нейрохірургічних операцій у 20 хворих (віком від 25 до 75 років). Середній вік хворих становив  $53 \pm 2,97$  року, серед пацієнтів переважали жінки (84% видалених менінгіом). Першу групу становили 15 доброякісних менінгіом ( $n=15$ ), серед них було 5 менінготеліоматозних варіантів ( $n=5$ ), 5 перехідних ( $n=5$ ) та 5 фібробластичних ( $n=5$ ). Друга група представлена 5 анапластичними менінгіомами ( $n=5$ ), із них у трьох випадках спостерігали рецидив. Для мікроскопічного й ІГХ дослідження шматочки менінгіом фіксували в нейтральному забуференому 10% формаліні і заливали в парафін, згодом виготовляли серійні зрізи завтовшки 4 мкм.

Згідно зі стандартизованими протоколами в парафінових зрізах після температурного демаскування антигенів шляхом нагрівання на водяній бані у Трис-ЕДТА буфері (рН=9,0) та пригнічення активності ендогенної пероксидази 3% розчином перекису водню виконували ІГХ дослідження з використанням відповідних первинних антитіл і систем візуалізації EnVision+ («ДАКО», – Данія) з діамінобензидином. Інвазивну активність визначали за допомогою моноклональних антитіл до E-cadherin Mo a-Hu E-cadherin, Clone NCH-38 («ДАКО», Данія) та Mo-Hu Beta-Catenin, Clone  $\beta$ -Catenin-1 («ДАКО», Данія). Результати кожної ІГХ реакції оцінювали напівкількісним методом шляхом підрахунку відсотка позитивно забарвлених клітин у полі зору мікроскопа AxioPlan 2 («Carl Zeiss», ФРН) при збільшенні  $\times 200$ . У кожному випадку аналізували 200 клітин у 5 полях зору.

Експресія E-cadherin виявлена на мембрані пухлинних клітин, а  $\beta$ -catenin – на мембрані та у вигляді навколоядерних гранул. Інтенсивність експресії E-cadherin та  $\beta$ -catenin оцінювали за шкалою імунореактивності як результат помноження балів відсотка імунопозитивних клітин і балів, що визначені за шкалою інтенсивності

їх забарвлення. Відсоток імунопозитивних клітин визначали в балах:  $<5\%$  клітин=0 балів;  $5-10\%=1$ ;  $11-50\%=2$ ;  $51-80\%=3$ ;  $>80\%=4$  бали. Позитивна експресія – наявність світлого жовтувато-коричневого кольору до шоколадно-коричневого. Інтенсивність забарвлення клітин визначали в балах: відсутність експресії – 0 балів; жовтуватий колір 1; яскраво-жовтий – 2 і коричневий – 3 бали. Індекс імунореактивності становив від 0 до 12 балів та оцінювали так: 0 балів (–), 1–3 бали (+), 4–6 балів (++) ,  $>6$  балів (+++).

Результати статистично опрацювали на персональному комп'ютері з використанням ліцензійної програми «Statistica® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., ліцензія № AXXR712D833214FAN5). Обчислювали середнє значення (M), стандартну помилку репрезентативності середнього значення (m), розраховували 95% довірчий інтервал середнього значення. Кореляційний зв'язок виявляли з вирахуванням коефіцієнта Пірсона. Результати вважали вірогідними при  $p < 0,05$ .

### Результати та їх обговорення

У всіх досліджених доброякісних менінгіомах виявлені помірна та виражена мембранна експресія  $\beta$ -catenin. Тільки в одному менінготеліоматозному варіанті зареєстрований низький рівень експресії. Згідно з результатами, котрі отримали Zhou K. et al. [3], рівень експресії  $\beta$ -catenin та E-cadherin вірогідно не відрізняється між різними варіантами менінгіом. При порівнянні рівня експресії  $\beta$ -catenin між менінготеліоматозними та змішаними варіантами менінгіом встановили, що він вірогідно вищий у змішаних (перехідних) варіантах ( $11,28 \pm 0,32$  бала у змішаних проти  $7 \pm 0,90$  бала в менінготеліоматозних,  $p < 0,05$ ). Оцінювання рівня експресії  $\beta$ -catenin у фібробластичних варіантах виявило, що він був вірогідно вищим, ніж у менінготеліоматозних ( $11,1 \pm 0,40$  бала проти  $7 \pm 0,90$  бала,  $p < 0,05$ ). Порівняльний аналіз змішаних та фібробластичних варіантів виявив відсутність вірогідних відмінностей між рівнем експресії цього маркера ( $11,28 \pm 0,32$  бала у змішаних проти  $11,1 \pm 0,40$  бала у фібробластичних,  $p > 0,05$ ).

В анапластичних менінгіомах відзначили найнижчий рівень експресії  $\beta$ -catenin, що підтверджується даними інших дослідників [3,10]. В одному випадку в рецидивуючій анапластичній менінгіомі спостерігали дифузну помірну мембранну експресію в усіх полях зору. У двох випадках рецидивуючих менінгіом (grade III) виявили фокальну помірну і неповну мембранну експресію з вогнищевою експресією в ядрі та цитоплазмі, що вказує на руйнування комплексу E-cadherin/ $\beta$ catenin, відокремлення  $\beta$ -catenin і транслокацію його в ядро, а це є важливою ознакою епітеліально-мезенхімального перетворення [4]. Порушення зв'язку між E-cadherin та  $\beta$ -catenin в щільних контактах між клітинами призводить до транслокації  $\beta$ -catenin в ядро, що вважається провідним механізмом епітеліально-мезенхімального перетворення. У дослідженнях Pecina-Slaus N. et al. виявлено [4], що експресія  $\beta$ -catenin прогресивно підвищується

від менинготеліальних до атипичних менингіом, 60% анапластичних пухлин проявляють збільшення експресії та ядерну локалізацію цього білка. В медулобластомах ядерна локалізація  $\beta$ -catenin вважається сприятливим фактором щодо подальшого прогнозу хвороби [9].

Найвищий рівень експресії E-cadherin спостерігали у фібробластичних варіантах доброякісних менингіом, він був вищим, ніж у змішаних, але вірогідно не відрізнявся ( $6,8 \pm 1,16$  бала проти  $5,04 \pm 0,85$ ,  $p > 0,05$ ). Менинготеліоматозні варіанти характеризувалися нижчим рівнем експресії, ніж фібробластичні, але результати не були вірогідними ( $4,76 \pm 0,82$  бала проти  $6,8 \pm 1,16$  бала,  $p > 0,05$ ). Рівень експресії E-cadherin майже не відрізнявся між менинготеліоматозними ( $4,76 \pm 0,82$  бала) та змішаними варіантами менингіом grade I ( $5,04 \pm 0,85$  бала),  $p > 0,05$ . Відсутність відмінностей між рівнем експресії E-cadherin у доброякісних менингіомах підтверджується даними інших авторів [2,3].

Анапластичні менингіоми характеризувалися помірним і низьким рівнем експресії E-cadherin, який становив  $3,68 \pm 0,97$  бала. У двох випадках рецидивуючих менингіом (grade III) відсутня експресія E-cadherin, в одному наявна помірна вогнищева (місцями виражена) мембранна експресія. Дані, які отримали вчені, щодо рівня експресії цих молекул міжклітинної адгезії в менингіомах вказують: існує зворотний зв'язок між стадією злоякісності, наявністю інвазії у суміжні структури та рівнем експресії E-cadherin та  $\beta$ -catenin, зі зростанням ступеня анаплазії, у більшості інвазивних менингіом відзначається зменшений рівень експресії цих маркерів [2,3].

При розподілі менингіом за ступенем злоякісності згідно із класифікацією ВООЗ (2007) на доброякісні (grade I) та анапластичні (grade III) та порівнянні рівня експресії молекул міжклітинної адгезії  $\beta$ -catenin та E-cadherin встановили, що доброякісні менингіоми (grade I), характеризувалися вираженою експресією  $\beta$ -catenin, яка була вірогідно вищою ( $p < 0,05$ ), ніж в анапластичних (grade III) менингіомах (табл. 1). Зменшення рівня експресії

$\beta$ -catenin при зростанні ступеня анаплазії свідчить про набуття інвазивних властивостей пухлинними клітинами, що відзначили інші дослідники [3,10]. Щодо рівня експресії E-cadherin (табл. 1), то він був вищим серед доброякісних менингіом, але результати не були вірогідними ( $p > 0,05$ ). Але, незважаючи на це, зауважимо: більшість доброякісних менингіом виявляли дифузну помірну або виражену експресію E-cadherin від 4 (++) до 12 (+++) балів.

Кореляційний аналіз засвідчив, що між рівнем експресії  $\beta$ -catenin та E-cadherin у менинготеліоматозних менингіомах наявний прямий зв'язок середньої сили (коефіцієнт Пірсона  $r = +0,44$ ), прямий зв'язок середньої сили – у змішаних варіантах доброякісних менингіом (коефіцієнт Пірсона  $r = +0,31$ ). У фібробластичних менингіомах між рівнем експресії  $\beta$ -catenin та E-cadherin існує кореляційний зв'язок слабкої сили (коефіцієнт Пірсона  $r = +0,23$ ). Анапластичні менингіоми (grade III) характеризувалися наявністю прямого помірного зв'язку між рівнем експресії  $\beta$ -catenin та E-cadherin (коефіцієнт Пірсона  $r = +0,65$ ). Отже, можна стверджувати, що обидві молекули міжклітинної адгезії функціонують як єдине ціле в різних гістологічних варіантах менингіом і незалежно від ступеня злоякісності. Цитоплазматичний домен кадгерину опосередковано зв'язаний із цитоскелетом через катенін, отже, закріплює молекулу адгезії у клітині. Пошкодження структури однієї з них у результаті мутацій, які надзвичайно часто трапляються в менингіомах, може призвести до втрати клітинного контактного гальмування і, як наслідок, до набуття інвазивних властивостей пухлинними клітинами.

### Висновки

1. Доброякісні менингіоми характеризуються вірогідно вищим рівнем експресії  $\beta$ -catenin, ніж злоякісні. Поряд із тим рівень експресії  $\beta$ -catenin між різними гістологічними варіантами доброякісних менингіом вірогідно відрізняється, з найбільш вираженою експресією у змішаних та фібробластичних варіантах. На відміну від цього рівень експресії E-cadherin вірогідно не відрізняється між різними варіантами доброякісних менингіом.

2. В анапластичних менингіомах рівень експресії E-cadherin був значно знижений, при цьому в рецидивуючих менингіомах відзначена майже повна відсутність мембранної експресії E-cadherin.

3. Між рівнем експресії  $\beta$ -catenin та E-cadherin у всіх досліджених варіантах доброякісних менингіом та в анапластичних менингіомах встановлений прямий кореляційний зв'язок, що вказує: обидві молекули міжклітинної адгезії функціонують як єдине ціле в різних гістологічних варіантах менингіом, незалежно від ступеня злоякісності.

**Перспективи подальших досліджень** передбачають пошук терапевтичних мішеней для лікування інвазивних менингіом та відкриття нових вірогідних маркерів для прогнозування інвазивних властивостей менингіом.

Таблиця 1

### Порівняльна характеристика рівня експресії E-cadherin/ $\beta$ -catenin у доброякісних (grade I) і злоякісних (grade III) менингіомах головного мозку (M $\pm$ m)

Гістологічний варіант менингіоми та ступінь злоякісності (grade)	Рівень експресії $\beta$ -catenin (бали)	Рівень експресії E-cadherin (бали)	Коефіцієнт Пірсона ( $r_{xy}$ )
Менинготеліоматозна (grade I)	$7 \pm 0,90$	$4,76 \pm 0,82$	+0,44
Змішана (grade I)	$11,28 \pm 0,32$	$5,04 \pm 0,85$	+0,31
Фібробластична (grade I)	$11,1 \pm 0,40$	$6,8 \pm 1,16$	+0,23
Анапластична (grade III)	$5,16 \pm 0,83$	$3,68 \pm 0,97$	+0,65

### Список літератури

1. World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System / Eds D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee. – Geneva, 2007. – 309 p.
2. Slug, Twist, and E-Cadherin as immunohistochemical biomarkers in meningeal tumors / M. Nagaishi, S. Nobusawa, Y. Tanaka et al. // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – №9. – e46053.
3. The potential involvement of E-cadherin and beta-catenins in meningioma / K. Zhou, G. Wang, Y. Wang et al. // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5. – №6. – e11231.
4. Pecina-Slaus N. Epithelial-to-mesenchymal transition: possible role in meningiomas / N. Pecina-Slaus, T. Cicvara-Pecina, A. Kafka // *Front. Biosci (Elite Ed)*. – 2012. – №4. – P. 889–896.
5. Curtis M.W. E-cadherin/catenin complexes are formed cotranslationally in the endoplasmic reticulum/Golgi compartments / M.W. Curtis, K.R. Johnson, M.J. Wheelock // *Cell Commun. Adhes.* – 2008. – Vol. 15. – №4. – P. 365–378.
6. van Roy F. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin / F. van Roy, G. Berx // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – Vol. 65. – №23. – P. 3756–3788.
7. Stemmler M.P. Cadherins in development and cancer / M.P. Stemmler // *Mol. Biosyst.* – 2008. – Vol. 4. – №8. – P. 835–850.
8. Differential expression of E-cadherin gene in human neuroepithelial tumors / F.J. Motta, E.T. Valera, A.K. Lucio-Eterovic et al. // *Genet. Mol. Res.* – 2008. – Vol. 7. №2. – P. 295–304.
9. Beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee / D.W. Ellison, O.E. Onilude, J.C. Lindsey et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol. 23. – №31. – P. 7951–7957.
10. Altered expression of beta-catenin/E-cadherin in meningiomas / E.C. Brunner, B.F. Romeike, M. Jung et al. // *Histopathology*. – 2006. – Vol. 49. – №2. – P. 178–187.
1. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., & Cavenee, W.K. (Eds.). (2007). *World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System*. IARC, Lyon.
2. Nagaishi, M., Nobusawa, S., Tanaka, Y., Ikota, H., Yokoo, H., & Nakazato, Y. (2012). Slug, Twist, and E-Cadherin as immunohistochemical biomarkers in meningeal tumors. *PLoS One*, 7(9), doi: 10.1371/journal.pone.0046053.
3. Zhou, K., Wang, G., Wang, Y., Jin, H., Yang, S., & Liu, C. (2010). The potential involvement of E-cadherin and beta-catenins in meningioma. *PLoS One*, 5(6), doi: 10.1371/journal.pone.0011231.
4. Pecina-Slaus, N., Cicvara-Pecina, T., & Kafka, A. (2012). Epithelial-to-mesenchymal transition: possible role in meningiomas. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 1(4), 889–896.
5. Curtis, M.W., Johnson, K.R., & Wheelock, M.J. (2008). E-cadherin/catenin complexes are formed cotranslationally in the endoplasmic reticulum/Golgi compartments. *Cell communication & adhesion*, 15(4), 365–378. doi: 10.1080/15419060802460748.
6. van Roy, F., & Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 65(23), 3756–3788. doi: 10.1007/s00018-008-8281-1.
7. Stemmler, M. P. (2008). Cadherins in development and cancer. *Molecular bioSystems*, 4(8), 835–850. doi: 10.1039/b719215k.
8. Motta, F.J., Valera, E.T., Lucio-Eterovic, A.K., Queiroz, R. G., Neder, L., Scrideli, C. A., et al. (2008). Differential expression of E-cadherin gene in human neuroepithelial tumors. *Genetics and molecular research: GMR*, 7(2), 295–304.
9. Ellison, D.W., Onilude, O.E., Lindsey, J.C., Lusher, M. E., Weston, C. L., Taylor, R. E., et al. (2005). Beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(31), 7951–7957.
10. Brunner, E.C., Romeike, B.F., Jung, M., Comtesse, N., & Meese, E. (2006). Altered expression of beta-catenin/E-cadherin in meningiomas. *Histopathology*, 49(2), 178–187.

### References

#### Відомості про авторів:

Вотева В.С., заочний аспірант каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, E-mail: vanda.voteva@yandex.ru.  
Тертишний С.І., д. мед. н., професор каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет.

Надійшла в редакцію 15.10. 2014 р.