

На правах рукописи

Цимбалист Наталья Сергеевна

**РОЛЬ WNT/ β – КАТЕНИН СИГНАЛЬНОГО ПУТИ
В ФОРМИРОВАНИИ АМЕЛОБЛАСТОМЫ**

14.03.02– патологическая анатомия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2018

Работа выполнена на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» г. Москва

Научный руководитель:

Бабиченко Игорь Иванович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Официальные оппоненты:

Шехтер Анатолий Борухович – доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории экспериментальной морфологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России», г.Москва (Сеченовский Университет)

Омельяненко Николай Петрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией соединительной ткани ФГБУ "НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова" Минздрава России, г. Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека» (ФГБНУ НИИМЧ).

Защита диссертации состоится « 20 » июня 2018 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.06 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; сайт <http://dissovet.rudn.ru>).

Автореферат размещен на сайте www.vak.ed.gov.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Д 212.203.06

В.А. Горячев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Амелобластома – доброкачественная опухоль, имеющая одонтогенное происхождение, по гистологическому строению схожая с эмалевым органом зуба. Наиболее частая локализация опухоли – это область угла нижней челюсти. Для амелобластомы характерно разнообразное клиническое течение с высокой и низкой вероятностью развития рецидива (50 – 90%) [Калакуцкий Н.В. с соавт., 2012; Dandriyal R. et al., 2011; Laborde A. et al., 2017]. В то же время отсутствие метастазов позволяет предположить, что она занимает промежуточное положение между доброкачественными и злокачественными опухолями, а тип ее роста можно отнести к местнодеструктивному. На рентгенологическом снимке опухоль представляет собой однокамерное или многокамерное образование. Достаточно часто амелобластоме обнаруживают на рентгеновском снимке случайно [Калакуцкий Н.В. с соавт., 2012; Chae M.P. et al., 2015].

Установлено, что основным методом лечения амелобластомы на сегодняшний день является хирургический – кюретаж или резекция челюсти. [Ony N.R. et al., 2012; Catunda I.S. et al., 2013]. Однако объем оперативного вмешательства определяется лечащим врачом и в большинстве случаев выбор метода лечения основывается на размерах опухоли. Следует признать, что четких показаний к выбору метода оперативного вмешательства в зависимости от морфологического типа опухоли не описано. В настоящее время при исследовании операционного и биопсийного материала трудно обойтись без проведения иммуногистохимического исследования, так как оно является высокоинформативным и во многих случаях позволяет определять прогноз заболевания [Khalil E. et al., 2015; Семкин В.А., Бабиченко И.И., 2017].

В настоящее время отсутствуют четкие критерии, позволяющие прогнозировать развитие рецидива. Основываясь на современных молекулярных морфологических методиках, актуальным является выявление молекулярных механизмов рецидивирования, формирования и роста амелобластомы и разработка соответствующих методов лечения. В основе одного из возможных механизмов роста амелобластомы может лежать Wnt/ β -катенин сигнальный путь, который участвует в процессах онкогенеза большинства опухолей: рака толстой кишки, рака предстательной железы, различных вариантов рака щитовидной железы, гепатоцеллюлярного рака. По данным литературы в настоящее время исследований и рекомендаций к лечению амелобластом с помощью препаратов, блокирующих активацию Wnt/ β -катенин сигнального пути нет.

Степень разработанности темы.

Исследования амелобластомы, проводимые в настоящее время на молекулярном уровне немногочисленны. В зарубежной литературе большое

внимание уделено выяснению факторов, которые могут лежать в основе формирования амелобластомы. В классификации ВОЗ 2017 года приводятся данные о том, что этиопатогенез амелобластомы связан с повторяющимися соматическими мутациями в сигнальных путях митоген-активированной протеинкиназы (MAPK) и Hedgehog пути [Kurppa K.J et al., 2014, Sweeney R.T. et al., 2014, Brown N.A. et al., 2014, Soluk-Tekkeşin M. et al., 2018, El-Naggar A.K. et al., 2017].

Интерес к этим сигнальным путям связан с тем, что они являются активными во время развития зубов [Dassule H.R. et al., 2000, Heikinheimo K. et al., 2002, Kumamoto H. et al., 2004], а мутации в компонентах MAPK (BRAF, KRAS и FGFR2) были выявлены как в доброкачественных [Pereira N.V. et al., 2016], так и в злокачественных одонтогенных опухолях [Davies H., 2002, Wright J.M. et al., 2017]. В свою очередь, активный на нескольких стадиях морфогенеза зуба Wnt/ β -катенин сигнальный путь [Liu F., 2008] скорее всего, может участвовать в формировании амелобластомы. Wnt/ β -катенин сигнальный путь играет роль в механизмах роста, пролиферативной активности и дифференцировки клеток, а также в поддержании плюрипотентного состояния стволовых клеток, в том числе эмбриональных [Nusse R., 2008; Dravid G. et al., 2005; Гребенникова Т.А. с соавт., 2016]. Ключевой молекулой канонического сигнального пути является стабилизированный β -катенин, вызывающий устойчивую передачу сигналов Wnt сигналов [Järvinen E. et al., 2006], дисбаланс в структуре передачи сигнала, связанных с β -катенином может привести к развитию опухоли [Valenta T. et al., 2012]. Учитывая гистогенез амелобластомы, исследование передачи сигналов в каноническом Wnt пути изучают на ранних стадиях развития зуба [Zhu X. et al., 2013; Yuan G. et al., 2015; Järvinen E. et al., 2006]. Wnt/ β -катенин сигнальный путь активен на нескольких стадиях морфогенеза зуба, поэтому должен быть жестко регламентирован для нормального развития зубов [Liu F., 2008]. В патогенезе амелобластомы отводят положительную роль белку β -катенину, и отрицательную – белкам-ингибиторам сигнального пути: APC, GSK-3 и AXIN [Wei Z. et al., 2013]. Лиганд Wnt-1, известен как фактор, играющий важную роль в развитии зуба. Wnt-1 выявляется в эмалевом узелке и, вероятно, является центральным регулятором развития зубов [Liu F. et al., 2008]. Wnt/ β -катенин сигнальный путь активен на нескольких стадиях морфогенеза зуба [Liu F., 2008] и, скорее всего, может участвовать в формировании амелобластомы. В литературных источниках, при изучении механизмов одонтогенеза большое значение уделено маркеру клеток, обладающих плюрипотентными свойствами SOX2+. SOX2 выявляется в клетках-предшественниках зуба [Juuri E. et al., 2013]. Некоторые ученые рекомендуют при использовании иммуногистохимического метода диагностики амелобластом использовать сочетание маркеров SOX2 и Ki-67 для выявления наиболее сложных случаев [Lei Y. et al., 2014]. Маркер Ki-67 применяется в иммуногистохимическом исследовании амелобластом для оценки пролиферативной активности клеток

и прогноза заболевания [Бабиченко И.И. и соавт., 2013; Tekkesin M. S. et al., 2012; Abdel-Aziz A. et al., 2012; Nafarzadeh S. et al., 2013; Bologna-Molina R. et al., 2013; Carreón-Burciaga R.G. et al., 2015]. До настоящего времени для разработки таргетной терапии амелобластомы остаётся актуальным поиск ингибиторов сигнальных путей, участвующих в её формировании, одним из которых может являться канонический Wnt/ β -катенин сигнальный путь.

Цель исследования:

Изучить роль канонического Wnt/ β -катенин сигнального пути в формировании и особенностях клинического течения различных морфологических типов амелобластомы

Задачи исследования:

1. Определить клинические особенности пациентов с амелобластомами, связанные с формированием рецидивов.
2. Изучить распределение основных компонентов Wnt/ β -катенин сигнального пути в эпителии зубного зачатка, фолликулярной кисте и различных морфологических типах амелобластомы.
3. Изучить взаимосвязь активности Wnt/ β -катенин сигнального пути с пролиферативной активностью клеток амелобластомы по белку Ki-67.
4. Установить взаимосвязь между активностью Wnt/ β -катенин сигнального пути и наличием плюрипотентных стволовых клеток SOX2⁺ в амелобластоме.
5. Установить роль Wnt/ β -катенин сигнального пути в формировании рецидивов амелобластомы.

Научная новизна:

Впервые показано наличие основных элементов Wnt-сигнального пути в различных морфологических типах амелобластомы.

Впервые выявлены, положительные корреляционные связи между внутриядерной локализацией β -катенина в клетках амелобластомы с их пролиферативной активностью Ki-67, и наличием плюрипотентных клеток SOX2.

Впервые иммуногистохимическим методом показано, что ядерная локализация β -катенина в клетках характеризует агрессивное клиническое течение различных морфологических типов амелобластомы и формирование рецидивов.

Теоретическая и практическая значимость

Проведенное исследование доказывает участие канонического Wnt/ β -катенин сигнального пути в механизмах формирования и роста амелобластомы. Полученные результаты позволяют прогнозировать клиническое течение амелобластомы и выявить наиболее агрессивные морфологические типы, к которым следует отнести плексиформный и базальноклеточный. Результаты исследования позволяют прогнозировать

развитие рецидивов амелобластомы и содержат рекомендации к выбору тактики лечения амелобластомы различных морфологических типов. Полученные данные раскрывают перспективы лечения агрессивных форм амелобластомы с использованием препаратов, блокирующих Wnt–сигнальный путь.

Методология и методы исследования

Выборка настоящего исследования состояла из 76 случаев амелобластомы из архива лаборатории патологической анатомии ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» за 1997 – 2017 годы. Образцы подвергали стандартной обработке для гистологического исследования. В настоящем исследовании иммуногистохимическим методом были изучены корреляционные взаимоотношения между наличием рецидивов, клиническими и морфологическими показателями, к последним относились морфологический тип амелобластомы, пролиферативная активность клеток, наличие плюрипотентных стволовых клеток и локализация основного эффекторного белка Wnt–сигнального пути – β –катенина.

Положения, выносимые на защиту:

1. Установлено, что в основе формирования амелобластомы принимает участие каскад молекул канонического Wnt– сигнального пути.
2. Установлено, что базальноклеточный тип амелобластомы, для которого характерна ядерная локализация β –катенина является клинически агрессивным морфологическим типом амелобластомы.
3. Доказано, что между ядерной локализацией в клетках амелобластомы β –катенина, наличием плюрипотентных стволовых клеток (SOX2) и пролиферативной активностью опухолевых клеток (Ki–67) существует достоверная умеренная положительная корреляционная связь.
4. Установлено, что между ядерной локализацией β –катенина в клетках амелобластомы и формированием рецидивов опухоли существует достоверная умеренная положительная корреляционная связь.

Степень достоверности

Результаты исследования получены на большом клиническом материале 76-ти случаев амелобластомы за период с 1997 по 2017 годы. Обработка клинического материала проведена с использованием современного иммуногистохимического метода в автоматическом режиме на аппарате Autostainer 360 фирмы Thermo Fisher Scientific (USA). Препараты исследовали под микроскопом (Axioplan 2 imaging, Karl Zeis) с фотофиксацией (AxioCam ERc 5s). Статистическая обработка выполнена с применением непараметрических методов программного обеспечения Statistica 10.0.

Апробация работы

Основные положения работы доложены на: Международной научной конференции «SCIENCE HEALTH» 2016 12 – 15 апреля 2016 года; Международной научной конференции «Эволюция научного знания», Россия, Москва (28 – 29 ноября 2016 г.); Научно–практической конференции «Государственная программа профилактики стоматологических заболеваний – основа системы оказания стоматологической помощи» в рамках XVIII Ежегодного научного форума «Стоматология 2016» (7 декабря 2016 г.); Научно–практической конференции «Медицина и фармакология: научные приоритеты ученых» (25 ноября 2016 г., г. Пермь); XIV международной научно–практической конференции «Достижения и проблемы современной науки» (4 декабря 2016 г.); заседании кафедры патологической анатомии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (06.03.2018 г.).

Публикации

По результатам диссертационного исследования опубликовано 11 работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из которых одна – в журнале, включенном в БД Scopus и одна в журнале БД Web of Science.

Внедрение результатов исследования:

Полученные Н.С. Цимбалист данные позволяют выделить критерии, характерные для морфологических типов амелобластомы с агрессивным клиническим течением, что способствует более эффективно решать задачи по составлению прогноза развития рецидива и определения сроков реконструктивно–восстановительной операции. Результаты диссертационной работы Н.С. Цимбалист в 2016–2018г. внедрены в работу лаборатории патологической анатомии ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» Минздрава России.

Полученные результаты диссертационной работы Н.С. Цимбалист в 2016–2017 уч.г. внедрены в учебный процесс кафедры патологической анатомии медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» и используются преподавателями кафедры на лабораторных занятиях при изучении студентами 3 курса дисциплин «Патологическая анатомия» и «Патологическая анатомия головы и шеи».

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста. Включает введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследования, обсуждение и заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, 51 рисунок, 7 таблиц, список литературы содержит – 141 библиографических источников, из них российских – 23 и зарубежных – 118.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения исследования была произведена выборка парафиновых блоков амелобластомы из архива за 1997 – 2017 годы. Для осуществления данной задачи, были проанализированы журналы учета биопсийного материала в лаборатории патологической анатомии отдела общей патологии ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ». В графах журнала содержится краткая информация о каждом случае: порядковый номер биопсии, информация о пациенте – его фамилия, номер истории болезни, пол, возраст, клинические данные (размеры образования, длительность течения заболевания, внешний вид), предполагаемый диагноз лечащего врача и установленный диагноз (или заключение) врача-патологоанатома, наличие влажного архива по каждому конкретному случаю. Было проанализировано около 36000 врачебных заключений и выписаны случаи амелобластомы. Из архивного материала лаборатории по порядковому номеру биопсии были отобраны стекла и парафиновые блоки. Материал обработан совместно с ассистентом кафедры патанатомии медицинского института РУДН Рыбальской В.Ф. Подобранный материал был систематизирован после микроскопии по американской классификации K. Shaikhi (2012) на отдельные морфологические типы.

Все отобранные блоки использовались в дальнейшем для приготовления срезов для иммуногистохимического исследования.

Образцы опухоли были отобраны из вновь поступившего в лабораторию биопсийного материала, своевременно доставленного после оперативных вмешательств по поводу амелобластомы. Образцы ткани были фиксированы в забуференном (10%) нейтральном формалине. Амелобластомы были удалены у пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» (директор академик РАН проф. Кулаков А.А.) в отделениях челюстно-лицевой хирургии (зав. к.м.н. Буцан С.Б.), реконструктивной челюстно-лицевой хирургии микрохирургии и эктопротезирования (зав. д.м.н. Чкадуа Т. З., научный руководитель отдела разработки высокотехнологичных методов реконструктивной челюстно-лицевой хирургии хирургической стоматологии проф., д.м.н. Неробеев А.И, зав. отделением реконструктивной хирургии лица и шеи с микрохирургией д.м.н. Вербо Е.В.), хирургической стоматологии (зав. проф. д.м.н. В.А.Сёмкин). Все проведенные операции представляли собой кюретаж, к которому также относили цистотомию или резекцию (в том числе краевую) челюсти. В большинстве случаев резекции челюсти, особенно часто при рецидивирующих амелобластомах, операции проводились с использованием высоких медицинских технологий с одномоментной установкой титанового эндопротеза или аутоотрансплантата с последующими реконструктивно-восстановительными операциями.

Общее количество рассмотренных случаев – 76. На основе выписанного материала из историй болезни пациентов, амбулаторных карт и биопсийных журналов были составлены журналы исследовательской работы. Полученные данные были систематизированы по морфологическим типам в

хронологическом порядке. Отдельные графы были оставлены под описание иммуногистохимической характеристики.

Для автоматической обработки полученных срезов на автостейнере лаборатории задавалась программа исследования, составленная по протоколу QUANTO после проверки наличия выбранных реагентов.

Спектр используемых первичных антител был определен на первой фазе ИГХ–исследования и включал:

моноклональные кроличьи антитела к Beta– катенин (Clone E247); фирма Thermo scientific; моноклональные мышинные антитела к Ki–67 (Clone MIB–1) фирма Dako; моноклональные кроличьи антитела к SOX2 (Clone SP76); фирма Cell Marque; поликлональные кроличьи антитела к Frizzled–8 фирма GTX; поликлональные мышинные антитела к Wnt–1 фирма GTX (Clone 10C8); поликлональные кроличьи антитела к Lef–1 фирма АВБИОТЕС.

Для количественной оценки результатов проводились морфометрические исследования, считали соотношение окрашенных и неокрашенных ядер на 300 клеток при увеличении $\times 200$. Выделяли локализацию β –катенина на цитоплазматической мембране, в цитоплазме и ядре клетки.

Статистический анализ осуществляли при помощи программы STATISTICA 10.0 в среде Windows 7; 2011, версия 10Build.0.1011.0, разработчик: StatSoft., после оценки нормальности распределения данных по W-критерию Шапиро-Улка, достоверность различий для количественных признаков с ненормальным распределением вычисляли с помощью U-критерия Манна-Уитни, при этом указаны медианы, 25-й и 75-й процентиля признаков. Корреляционные взаимоотношения оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для определения статистических различий использовали критерий Хи–квадрат. Описание количественных величин при нормальном распределении проводили в формате « $M \pm SD$ », с указанием среднего значения и стандартного отклонения. Статистически значимыми считали уровень вероятности ошибки 0,05 ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ демографических показателей у пациентов с амелобластомой

Амелобластомы были удалены оперативным путем у пациентов в возрасте 16–77 лет. Количество пациентов – мужчин составило 36, женщин – 40, в соотношении 1 к 1,1 соответственно. Образцы опухоли были обработаны совместно с ассистентом кафедры патанатомии РУДН Рыбальской В.Ф.

Средний возраст женщин составил ($44,4 \pm 16,5$) лет, мужчин – ($49,3 \pm 15,8$) лет. С помощью критерия Манна – Уитни установлено, что эти

величины статистически значимо не различаются ($p=0.5602$), что показывает однородность выборки настоящего исследования.

Общая характеристика амелобластом

Поражение амелобластомой верхней челюсти было выявлено в 8 случаях (что составило 10% от выборки), нижней челюсти – в 65 случаях (что составило 86%) и в 3 случаях была выявлена периферическая амелобластома, не прорастающая в кость, что соответствовало 4%

При распределении амелобластом по морфологическому типу в соответствии с классификацией К. Shaikhi (2012) было выделено 8 типов: плексиформный, фолликулярный, зернистоклеточный, акантоматозный, базальноклеточный, монокистозный, десмопластический, периферический.

Из 76 амелобластом 24 случая были представлены плексиформным типом, 18 – фолликулярным, 5 – зернистоклеточным, 9 – акантоматозным, 8 – базальноклеточным, 6 – монокистозным, 3 – десмопластическим, 3 – составила периферическая амелобластома.

Иммуногистохимическое исследование маркеров Wnt/ β - катенин сигнального пути в зачатке зуба. Результаты микроскопии

В настоящее время о гистогенезе амелобластомы известно, что опухоль имеет одонтогенное происхождение. Для уточнения механизмов роста и формирования опухоли, мы исследовали зачаток зуба, доставленный в лабораторию в биопсийном материале пациентки 3 лет. Гистологически зачаток зуба представлен скоплением одонтобластов в виде полосы, окружающей клетки пульпы вытянутой формы и внутренним эмалевым эпителием, представленном адамантобластами. Проведенное иммуногистохимическое исследование показало положительное окрашивание ядер адамантобластов и одонтобластов с маркером Ki-67 с индексом пролиферативной активности 10%. В зачатке зуба отмечается внеядерное распределение β -катенина в цитоплазме одонтобластов, мембране и в области ядерной оболочки, а также в ядрах как адамантобластов, так и одонтобластов, что свидетельствует об активности Wnt/ β -катенин сигнального пути.

Иммуногистохимическое исследование белков Wnt/ β - катенин сигнального пути в фолликулярной кисте. Результаты микроскопии

Учитывая научные данные о том, что амелобластома может формироваться из фолликулярной кисты, была исследована активность Wnt/ β -катенин сигнального пути в фолликулярной кисте. С этой целью с 10 её образцами было проведено ИГХ-исследование с антителами к белку β -

катенин. Положительная иммуногистохимическая реакция была отмечена в ядрах, мембране и цитоплазме клеток базального слоя эпителия, в остальных клетках на мембране и в цитоплазме.

Иммуногистохимическое исследование белков Wnt/ β - катенин сигнального пути в амелобластоме

Основными компонентами Wnt/ β -катенин сигнального пути являются лиганд Wnt-1, сигнал с которого передается на рецепторный белок Frizzled, расположенный на цитоплазматической мембране и эффекторный белок β -катенин, который в активной фазе не подвергается деградации, осуществляет передачу сигнала в ядро клетки с последующим запуском транскрипции. Wnt/ β -катенин сигнальный путь был рассмотрен в различных морфологических типах амелобластомы. С образцами амелобластомы было проведено иммуногистохимическое исследование с антителами к белкам Wnt-1, Frizzled-8, β -катенин, Lef-1, которые являются компонентами Wnt/ β -катенин сигнального пути.

Во всех исследованных морфологических типах амелобластомы были выявлены белки Wnt-1, Frizzled, β -катенин, Lef-1, что свидетельствует об участии Wnt/ β - катенин сигнального пути в метаболизме клеток амелобластомы.

Исследование Wnt/ β - катенин сигнального пути в рецидивирующей амелобластоме

При микроскопии препаратов, с которыми было проведено иммуногистохимическое исследование с белком β -катенин было обнаружено неравномерное его распределение в клеточных структурах амелобластомы при сравнении случаев с рецидивами и без рецидива в различных морфологических типах: была отмечена ядерная и внеядерная локализация маркера.

На рисунке 1а представлен плексиформный тип амелобластомы, выявленный у пациента с рецидивом заболевания, с иммуногистохимической окраской на маркер β -катенин. В периферической части палисадно расположенного эпителиального компонента, выявлялась коричневая окраска наружных клеточных мембран, цитоплазмы и выраженная ядерная локализация β -катенина. В центральной части, представленной рыхло расположенными удлинёнными клетками с вытянутым или овальным ядром, отмечена как ядерная, так и внеядерная (цитоплазматическая) локализация β -катенина. На микрофотографии (Рисунок 1б) представлена иммуногистохимическая реакция при плексиформном типе амелобластомы у пациента без развития рецидива с антителами к белку β -катенин. Отмечено внеядерное распределение β - катенина: иммуногистохимический маркер выявлялся на цитоплазматической мембране клеток как периферической, так и центральной части новообразования.

На рисунке 2а представлен базальноклеточный тип амелобластомы, выявленный у пациента с рецидивом заболевания, с иммуногистохимической окраской на маркер β -катенин. В базалоидных клетках гнездовидных скоплений и эпителиальных тяжей с высокой клеточностью была отмечена ядерная локализация маркера на фоне коричневой цитоплазмы. На микрофотографии (Рисунок 2б) представлена иммуногистохимическая реакция при базальноклеточном типе амелобластомы у пациента без развития рецидива с антителами к белку β -катенин. Отмечена мозаичная ядерная локализация маркера на фоне бледно-коричневой цитоплазмы.

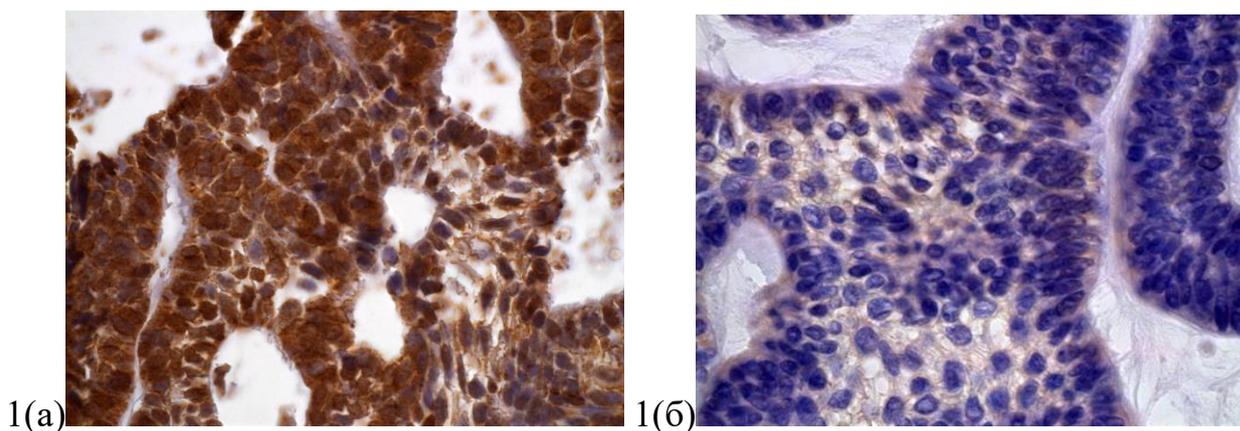


Рисунок 1 – Микрофотография. Иммуногистохимическая реакция при рецидиве (а) и без рецидива (б) плексиформного варианта амелобластомы с антителами к белку β -катенин. Окраска ДАБ-гематоксилин (x1000)

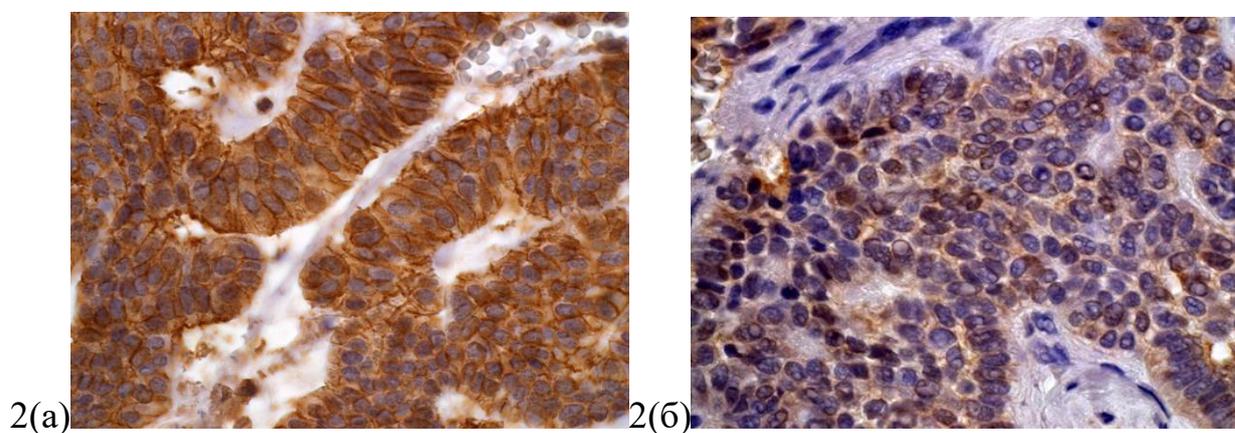


Рисунок 2 – Микрофотография. Иммуногистохимическая реакция при рецидиве (а) и без рецидива (б) базальноклеточного варианта амелобластомы с антителами к белку β -катенин. Окраска ДАБ-гематоксилин (x1000)

Характеристика рецидивирующей амелобластомы

Статистический анализ случаев рецидивирования амелобластомы

Из 76 амелобластом настоящего исследования в 49 случаях отмечался рецидив заболевания, что составило 64,5%. Средний возраст больных с

рецидивом амелобластомы составил $46,6 \pm 15,3$ лет, а с отсутствием рецидива – $46,9 \pm 17,6$, что соответствует среднему возрастному периоду. По критерию Манна–Уитни установлено, что средний возраст больных статистически значимо не различался между больными с наличием и отсутствием рецидива ($p=0,938$), что свидетельствует об однородности выборки.

Количество случаев амелобластомы с локализацией в верхней челюсти составило 8, в нижней челюсти – 65, и, периферической – 3 случая. Из них в 7 случаях с локализацией опухоли в верхней челюсти были рецидивы (87,5%), 42 случая – в нижней челюсти (64,6%). Рецидивов периферической амелобластомы в настоящей выборке не отмечено.

Операции, проводимые пациентам можно было разделить на две большие группы. К первой группе относят ограниченную резекцию, включающую такие оперативные вмешательства, как расширенная биопсия, краевая резекция челюсти, цистэктомия с резекцией корней зубов, резекцию альвеолярного отростка челюсти. Ко второй группе относят радикальную резекцию челюсти, которую проводят одновременно с замещением дефекта аутотрансплантатом из малоберцовой или гребешка подвздошной кости с применением титанового эндопротеза и нередко с экзартикуляцией. К радикальной резекции также относится гемимандибулоэктомия и мандибулоэктомия при обширных поражениях.

В сводной таблице (Таблица 1) представлены оперативные вмешательства, проведенные пациентам до момента рецидива. Из таблицы видно, что после операции в объеме резекции челюсти амелобластома рецидивировала только в 6 случаях, тогда как при проведении ограниченной резекции в 43 случаях. При анализе данных по критерию Хи–квадрат были получены достоверные отличия. Прежде всего следует отметить, что ЦНИИС и ЧЛХ является головной организацией Минздрава РФ в области ЧЛХ и в него поступают пациенты из различных регионов страны для дальнейшего лечения после выявления рецидива амелобластомы.

Большее количество рецидивов встречались в случаях с базальноклеточным (Б) типом амелобластомы (75,0%), плексиформным (П) (75,0%), фолликулярным (Ф) (77,8%). Рецидивы также отмечены в монокистозном (М) (33,3%), акантоматозном (А) (67,0%) и зернистоклеточном (З) типе (60,0%). Исключения составили десмопластический (Д) и периферический (Пе) тип амелобластомы, в которых рецидивов отмечено не было.

В настоящем исследовании были проведены иммуногистохимические исследования с антигенами к белку Ki-67 и белку SOX2 [Бабиченко И.И. с соавт., 2017 (а), Бабиченко И.И. с соавт., 2018 (б)]. Уровни пролиферативной активности и количество плюрипотентных стволовых клеток были подсчитаны соответственно морфологическому типу амелобластомы. В плексиформном типе уровень пролиферативной активности достиг медианы 6,5 с нижним квартилем 4,5 и верхним 10,0, в фолликулярном 4,5 (1,0; 8,0),

зернистоклеточном 3,0 (1,0; 4,0), акантоматозном 10,0 (2,0; 15,0), в базальноклеточной отмечались самые высокие показатели 21,0 (12,0; 25,0), в монокистозном 2,0 (1,0; 2,0), десмопластическом 5,0 (2,0; 10,0), в периферическом 1,0 (0,0; 4,0). Количество плюрипотентных стволовых клеток было неравномерным в различных морфологических типах опухоли: медиана уровня SOX2 в плексиформном типе составила 10,0, с нижним квартилем 0,0 и верхним 30, 0; в фолликулярном отмечалась отрицательная реакция по SOX2 0,0 (0,0;0,0), в акантоматозном 2,0 (0,0;60,0), в базальноклеточном показатели были высокими 55,0 (28,0 ;87,5), в монокистозном 6,0 (0,0;10,0), в десмопластическом отмечались несмотря на отсутствие рецидивов высокие показатели 90,0 (30,0; 95,0), а для периферического типа была отмечена отрицательная реакция 0,0 (0,0;0,0).

Таблица 1
Частота рецидивов амелобластомы при различных видах оперативного вмешательства

Параметры		Количество случаев	Количество и частота рецидивов после оперативных вмешательств	Показатель Хи-квадрат, достоверные различия
Вид оперативного вмешательства	Ограниченная резекция челюсти	59	43 (72,9%)	$\chi^2=6,58$ $p=0,010$
	Радикальная резекция челюсти	17	6 (35,3%)	
Всего		76	49(65,5%)	

В амелобластомах с высокими уровнями SOX2 и высокой пролиферативной активностью отмечалась преимущественно ядерная локализация β -катенина. Проведенный анализ между уровнями маркеров SOX2, Ki-67 и ядерной и внеядерной локализацией β -катенина показал достоверные различия.

На диаграмме (Рисунок 3) показаны медианы, верхний и нижний квартили, а также минимальные и максимальные значения уровня SOX2 в амелобластомах. С помощью U критерия Манн–Уитни был проведен анализ распределения плюрипотентных стволовых клеток (SOX2+) в зависимости от внеядерной и ядерной локализации β -катенина в амелобластомах, который показал наличие статистически значимых различий (U=409,0; p=0,006).

На диаграмме (рисунок 4) показаны медианы, верхний и нижний квартили, а также минимальные и максимальные значения уровня Ki-67 в амелобластомах. С помощью U критерия Манн–Уитни был проведен анализ

распределения пролиферирующих клеток (Ki-67+) в зависимости от внеядерной (1) и ядерной (2) локализации β -катенина в амелобластомах, который показал наличие статистически значимых различий ($U=399,0$; $p=0,005$). Как показано на диаграммах, ядерная локализация β -катенина отмечалась в случаях с большим количеством SOX2 и в случаях с высокой пролиферативной активностью опухоли.

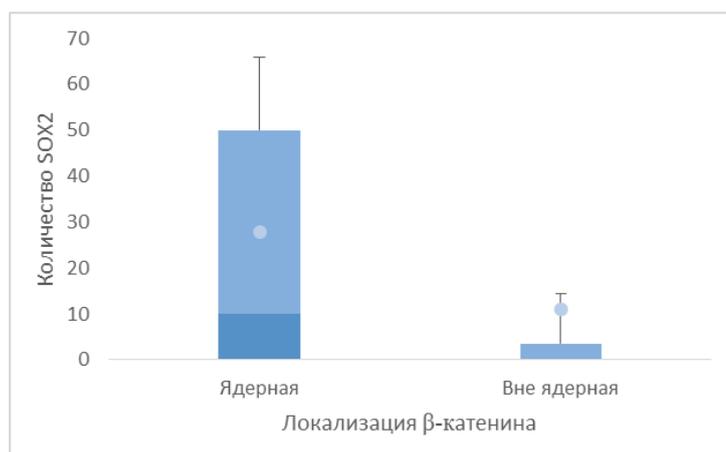


Рисунок 3 – Уровень SOX2 в зависимости от локализации β -катенина

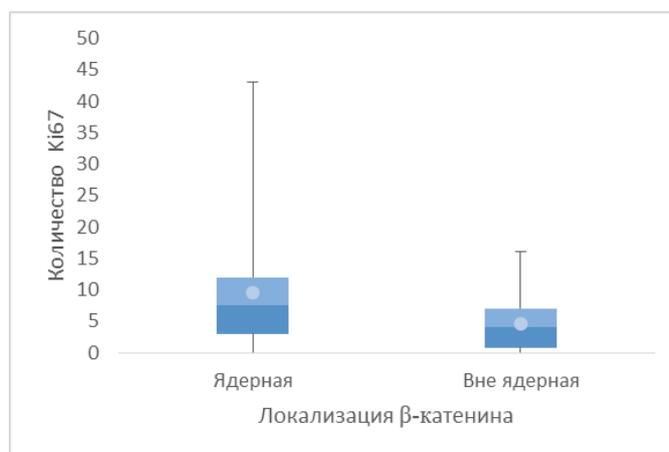


Рисунок 4 – Уровень Ki-67 в зависимости от локализации β -катенина

Во всех 76 амелобластомах без исключения, как показали результаты проведенного ИГХ-исследования, был обнаружен β -катенин. Данный факт подтверждает, что Wnt-сигнальный путь в амелобластоме активен. Однако, распределение β -катенина в клеточных структурах было неравномерным, как показано в разделе микроскопия– его скопление можно было наблюдать как в ядрах клеток, так и во внеядерных структурах– в цитоплазме и на мембране. Была рассмотрена взаимосвязь ядерной и внеядерной локализации β -катенина в клетках амелобластомы с различными показателями – такими как пол и возраст пациентов, с уровнем маркера пролиферативной активности Ki-67 и маркера клеток с плюрипотентными

свойствами SOX2, наличие рецидива в различных морфологических типах амелобластомы.

Wnt/ β -катенин сигнальный путь был активен во всех 8 морфологических типах. Тем не менее, для каждого типа были характерны свои особенности распределения β -катенина в клеточных структурах [Бабиченко И.И. с соавт, 2018 (в)]. В амелобластомах различных морфологических типов распределение β -катенина наблюдалось как в ядрах клеток, так и вне ядра, результаты подсчетов отображены на диаграмме (Рисунок 5).

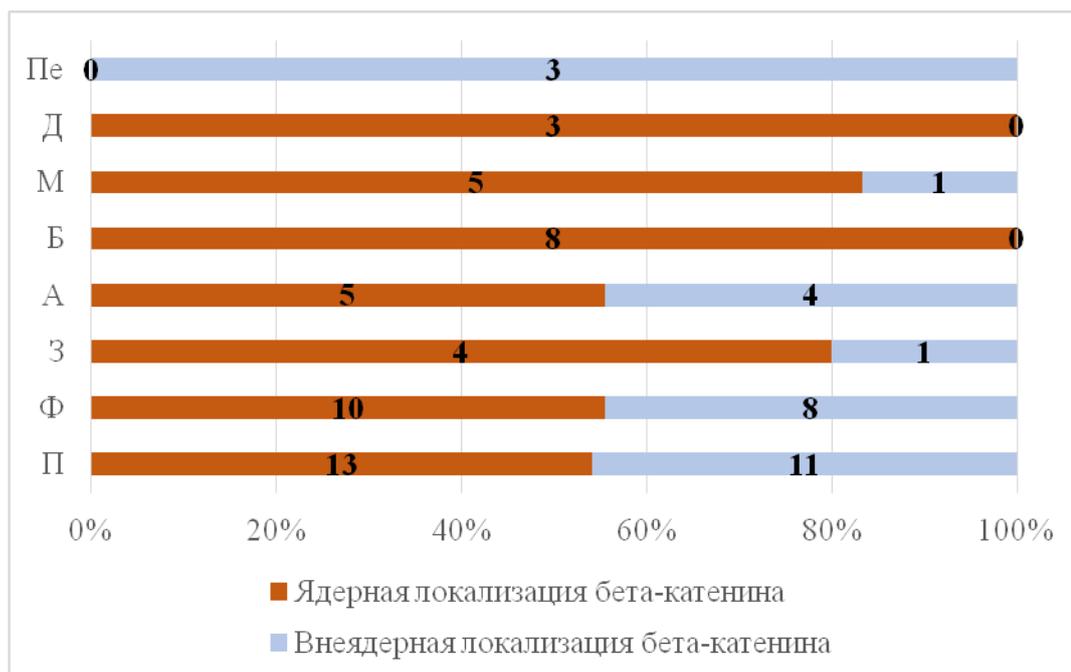


Рисунок 5 – Частота встречаемости ядерной и внеядерной локализации β -катенина в различных морфологических вариантах амелобластом

Преимущественно ядерная локализация (в 100% случаев) β -катенина (на фоне цитоплазматической) отмечена в базальноклеточном и десмопластическом типе, исключительно внеядерная отмечена в периферической амелобластоме. В остальных морфологических типах отмечена как ядерная, так и внеядерная локализация β -катенина: в плексиформном типе частота ядерной локализации составила 54%, в фолликулярном – 55%, в зернистоклеточном – 80%, в акантоматозном 55%, в монокистозном – ядерная 83%.

С помощью критерия Манна–Уитни по параметру ядерная локализация β -катенина сравнили морфологические типы относительно друг друга. Результаты приведены в таблице (Таблица 5)

Таким образом, достоверные различия были отмечены при сравнении базальноклеточного типа с плексиформным типом ($p=0,047$), с периферической амелобластомой ($p=0,014$), в случае сравнения

базальноклеточного типа с фолликулярным отмечалась тенденция к достоверным различиям ($p=0,075$).

Достоверные различия были получены также при сравнении периферической амелобластомы с десмопластическим типом ($p=0,049$), а при сравнении с зернистоклеточным типом ($p=0,073$) и монокистозным ($p=0,052$) отмечалась тенденция к статистически значимым отличиям.

Корреляционные взаимосвязи между ядерной локализацией β -катенина и показателем пролиферативной активности, количеством SOX2, наличием рецидива

Наличие взаимосвязей между ядерной локализацией β -катенина и показателем пролиферативной активности, количеством SOX2, наличием рецидива было определено с помощью корреляционного анализа по Спирмену, результаты которого показаны в таблице 6.

Между индексом пролиферативной активности Ki-67 и ядерной локализацией β -катенина прослеживается положительная умеренная корреляционная связь $r=0,312$, и статистически значимая $p=0,006$.

Между количеством SOX2+ и ядерной локализацией β -катенина также прослеживается положительная умеренная и статистически значимая корреляционная связь $r=0,312$, $p=0,006$.

Между наличием рецидива и ядерной локализацией β -катенина прослеживается положительная умеренная корреляционная связь $r=0,332$, что является статистически значимым $p=0,004$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в ходе настоящего диссертационного исследования, позволяют подвести следующие итоги:

1. Рецидивирование амелобластом у пациентов не связано с возрастом, полом. Выявлена зависимость формирования рецидива у пациентов с амелобластомой с особенностями хирургического лечения и морфологическим типом опухоли.

2. Во всех морфологических типах амелобластомы, в эпителии зачатка зуба и в фолликулярной кисте выявлены белки, участвующие в осуществлении Wnt/ β - катенин сигнального пути: Wnt-1, Frizzled, β -катенин, Lef-1.

3. Между пролиферативной активностью клеток амелобластомы и ядерной локализацией β -катенина, характерной для активного Wnt/ β -катенин сигнального пути, существует достоверная положительная умеренная корреляционная связь.

4. Между количеством плюрипотентных стволовых клеток в амелобластоме и степенью активирования Wnt/ β -катенин сигнального пути,

при ядерной локализации β -катенина, выявлена достоверная положительная умеренная корреляционная связь.

5. Повышенная активность Wnt/ β -катенин сигнального пути связанная с ядерной локализацией β -катенина в клетках амелобластомы, коррелирует с формированием рецидивов в базальноклеточном, плексиформном, акантоматозном и фолликулярном морфологических типах.

Практические рекомендации

1. Иммуногистохимическое определение ядерной локализации β -катенина в клетках амелобластомы позволяет выявлять типы опухоли с агрессивным клиническим течением.
2. Базальноклеточный, плексиформный и акантоматозный гистологические типы амелобластомы характеризуются ядерной локализацией β -катенина, указывающей на активирование Wnt/ β -катенин сигнального пути.
3. Монокистозный и периферический гистологические типы амелобластомы характеризуются редкими рецидивами и преимущественно цитоплазматической и мембранной локализацией β -катенина, для подобных морфологических типов целесообразно использовать кюретаж и краевую резекцию челюсти.
4. Из-за высокой склонности к рецидивированию, высокой пролиферативной активности, наличия плюрипотентных стволовых клеток и высокой активности Wnt/ β -катенин сигнального пути, при установлении базальноклеточного и плексиформного типов амелобластомы следует рекомендовать оперативное вмешательство в объеме резекции челюсти.

Перспективы дальнейшей разработки темы:

В ходе исследования была выявлена роль Wnt/ β -катенин сигнального пути в механизмах формирования амелобластомы. Перспективы дальнейшей разработки темы– углубленное изучение молекулярных основ роста и развития амелобластомы и разработка таргентной терапии, целью которой будет являться блокировка передачи сигнала Wnt-пути с помощью воздействия препаратов на его ключевые белки.

Список научных работ, опубликованных по теме исследования:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК РФ

1. Н.С. Цимбалист, В.Ф. Рыбальская, В.А. Сёмкин, А.И. Неробеев, И.И. Бабиченко Статья «К вопросу об особенностях хирургического лечения различных гистологических вариантов амелобластомы». Журнал

«Медицинский совет». №14 (2017). Издатель ООО «ГРУППА РЕМЕДИУМ». –С. 128–131.

2. И.И. Бабиченко, В.Ф. Рыбальская, **Н.С. Цимбалист**, В.А. Сёмкин. Пролиферативная активность клеток опухоли и распределение SOX2+ плюрипотентных стволовых клеток в различных гистологических вариантах амелобластомы. Журнал «Архив патологии». Том 80, №1, 2018. Издательство «Медиа Сфера» –С.21-26.

3. И.И. Бабиченко, **Н.С. Цимбалист**, В.Ф. Рыбальская, А.А.Шерстнев, В.А. Сёмкин Статья «Роль Wnt/ β – катенин сигнального пути в формировании амелобластомы». Журнал «Стоматология» Том 97, №2, 2018. Издательство «Медиа Сфера». – С. 22-24.

Статьи, опубликованные в других изданиях

4. **Цимбалист Н.С.**, Рыбальская В.Ф., Семкин В.А., Бабиченко И.И. Особенности экспрессии белка SOX2 стволовых клеток в амелобластоме. Журнал Стоматология, изд. Медиа-Сфера – Т. 94, №6, вып.2,6. – 2015, Москва– С.21

5. **Цимбалист Н.С.**, Рыбальская В.Ф. Семкин В.А., Бабиченко И.И. Wnt-сигнальный путь и амелобластомы. Сборник VII международной научной конференции SCIENCE4HEALTH 2016, 12 апреля 2016 года- 15 апреля 2016 года, Москва, Россия. - С. 162-163

6. **Цимбалист Н.С.**, Рыбальская В.Ф., Семкин В.А., Бабиченко И.И.Статья Особенности экспрессии белка β -катенина в амелобластомах. Стоматология». Материалы конференции, Т.95, Номер 6-2, 2016 изд. Медиа Сфера, Москва.- С.53

7. Рыбальская В.Ф., **Цимбалист Н.С.**, Семкин В.А., Бабиченко И.И. Распределение маркера пролиферативной активности Ki-67 в различных гистологических вариантах амелобластом. Сборник научно-практической конференции «Медицина и фармакология: научные приоритеты ученых», г. Пермь, ноябрь 2016. -С.62-65.

8. Рыбальская В.Ф., **Цимбалист Н.С.**, Семкин В.А., Бабиченко И.И. SOX2 как потенциальный маркер выявления клеток, обладающих плюрипотентными свойствами в амелобластомах различных гистологических вариантов. Сборник международной научной конференции «Эволюция научного знания», Россия, Москва, 28-29 ноября 2016 г. Издательский центр РусАльянс «Сова». - С.59-65

9. Рыбальская В.Ф., **Цимбалист Н.С.**, Семкин В.А., Бабиченко И.И. Взаимосвязь размеров амелобластомы с ее гистологическими вариантами». Мультидисциплинарный сборник научных публикаций XIV международной научно-практической конференции «Достижения и проблемы современной науки». Часть 2, г. Санкт-Петербург– 4 декабря 2016 г. – С.23–27.

10. И.И. Бабиченко, В.Ф. Рыбальская, **Н.С. Цимбалист**, В.А. Сёмкин Иммуногистохимические показатели агрессивности клинического течения

амелобластомы. Журнал «Трудный пациент»– Т.15, №3, 2017. Издательский дом «Академиздат». – С.55 – 57

11. И.И. Бабиченко, В.Ф. Рыбальская, **Н.С. Цимбалист**, В.А. Сёмкин Статья «Изучение роли канонического Wnt- сигнального пути в формировании амелобластомы». Журнал «Трудный пациент». Т15, №6-7, 2017. Издательский дом «Академиздат». – С.40 – 42

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Список сокращений и условных обозначений

ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ИГХ	иммуногистохимия
APC	Adenomatous polyposis coli, белок, отрицательный регулятор концентрации β -катенина
Axin	Аксин–1, цитоплазматический белок, подавляющий транскрипцию через бета–катенин
BRAF	B-Raf, serine / threonine-protein kinase B-Raf, серин / треонин-протеинкиназа B-Raf
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2, рецептор фактора роста фибробластов 2
GSK3	Glycogen synthase kinase 3 GSK3, гликогенсинтаза киназа 3 – серин / треонин–протеинкиназа
KRAS	белок семейства Ras, фермент–гидролаза гуанозинтрифосфата
Ki–67	ядерный белок клеточной пролиферации
LEF	ДНК– связывающий белок– фактор транскрипции семейства TCF / LEF
Lef–1	Фактор транскрипции Wnt– пути
SOX2	sex determining region Y-box 2, член семейства транскрипционных факторов SOX
Wnt	группа путей сигнальной трансдукции
β - катенин	бета–катенин, многофункциональный белок

РЕЗЮМЕ

кандидатской диссертации Цимбалист Натальи Сергеевны «Роль Wnt/ β – катенин сигнального пути в формировании амелобластомы»

В настоящем исследовании на молекулярном уровне исследован один из возможных механизмов формирования амелобластомы. На основании результатов иммуногистохимического исследования 76 образцов амелобластомы, показано, что в клетках опухоли наблюдается активность канонического Wnt/ β – катенин сигнального пути. В работе использован широкий спектр антител, позволяющих выявить компоненты Wnt/ β – катенин сигнального пути, на разных этапах передачи сигнала в клетке: Wnt –1, Frizzled, β –катенин, Lef–1. Отдельный раздел посвящен исследованию внутриклеточного распределения белка β – катенина в амелобластомах с рецидивом и без рецидива. Результаты проведенного корреляционного анализа показали наличие положительной связи средней силы между рецидивом амелобластомы и ядерной локализацией β –катенина. В базальноклеточном, плексиформном, акантоматозном и фолликулярном морфологических типах была отмечена повышенная активность Wnt/ β – катенин сигнального пути, что подтвердило агрессивное клиническое течение амелобластомы перечисленных морфологических типов.

SUMMARY

Tsymbalist Natalia Sergeevna "The role of Wnt / β - catenin of the signaling pathway in the formation of ameloblastoma"

In this thesis, one of possible mechanisms of ameloblastoma formation has been studied at the molecular level. The results of studying of 76 ameloblastoma samples by IHC– method showed that the activity of the canonical Wnt / β -catenin of the signaling pathway is observed in tumor cells. A wide range of antibodies for detection Wnt / β -catenin components of the signaling pathway was used at different stages of signal transmission in the cell: Wnt–1, Frizzled, β –catenin, Lef–1. A separate part of the work is devoted to the study of intracellular distribution of β -catenin marker in ameloblastomas with recurrence and no relapse. The results of the conducted correlation analysis showed a positive relationship between the average strength between the recurrence of ameloblastoma and the nuclear localization of β -catenin. In the basal cell, plexiform, acanthomatous and follicular morphological types, the increased activity of the Wnt / β -catenin signaling pathway was observed, which confirmed the aggressive clinical progression of ameloblastoma of the listed morphological types.