

# Изучение роли канонического Wnt-сигнального пути в формировании амелобластомы

И.И.Бабиченко<sup>1</sup>, В.Ф.Рыбальская<sup>1</sup>,  
Н.С.Цимбалист<sup>1</sup>, В.А.Семкин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра патологической анатомии  
Российского университета дружбы народов,  
Москва

<sup>2</sup>Центральный НИИ стоматологии и  
челюстно-лицевой хирургии, Москва

Амелобластома является одонтогенной опухолью с местнодеструктурирующим типом роста и характерной локализацией (в 99,1% случаев) в области моляров нижней челюсти. Известно, что источником происхождения амелобластомы является ткань зубного зачатка, однако молекулярные механизмы роста опухоли полностью не изучены. Целью настоящей работы было изучение роли Wnt-сигнального пути в формировании амелобластомы. Иммуногистохимическим методом было исследовано распределение β-катенина и белка клеточной пролиферации Ki-67 в различных гистологических вариантах 74 случаев амелобластомы. С помощью корреляционного анализа показана умеренная и достоверная связь пролиферативной активности эпителиальных клеток амелобластомы с ядерной локализацией β-катенина ( $r=0,264$ ,  $p=0,025$ ). При этом, только ядерная локализация β-катенина характерна для наиболее агрессивных вариантов амелобластомы, таких как базальноклеточный и десмопластический.

**Ключевые слова:** Wnt-сигнальный путь, β-катенин, Ki-67, амелобластома.

## The Role of Canonical Wnt Signaling in Ameloblastoma Development

I.I.Babichenko<sup>1</sup>, V.F.Rybalskaya<sup>1</sup>,  
N.S.Tsimbalist<sup>1</sup>, V.A.Semkin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathological Anatomy, RUDN  
University, Moscow

<sup>2</sup>Department of Surgical Dentistry, Central  
Research Institute for Dentistry and  
Maxillofacial Surgery, Moscow

Ameloblastoma is an odontogenic tumor with locally invasive type of growth, localized in the area of molars of the lower jaw (in 99.1% of the cases). Ameloblastomas arises from dental epithelial cells; however, molecular mechanisms of tumor growth are not entirely investigated. The aim of this study was to estimate the role of Wnt-signaling pathway in development of ameloblastomas. The distribution of b-catenin and Ki-67 protein was investigated immunohistochemically in

different histological types of ameloblastomas (74 cases). Spearman analysis showed moderate and significant correlation between proliferative activity of epithelial cells and nuclear localization of β-catenin in ameloblastomas ( $r=0,264$ ,  $p=0,025$ ). Only the nuclear localization of β-catenin in basal cell ameloblastomas and desmoplastic ameloblastomas make them the most aggressive.

**Keywords:** Wnt-signaling pathway, β-catenin, Ki-67, ameloblastoma.

Амелобластома является одонтогенной опухолью с местнодеструктурирующим типом роста и характерной локализацией (в 99,1% случаев) в области моляров нижней челюсти [1]. Известно, что источником происхождения амелобластомы является одонтогенный эпителий, однако молекулярные механизмы роста опухоли полностью не изучены. Морфологически данная опухоль имеет сходство с эмалевым органом челюсти. Амелобластома считается доброкачественной опухолью, однако ее клиническое течение сопровождается деформацией лица, высоким процентом рецидива (до 50–90%) [2, 3], однако отсутствие метастазов, позволяет считать ее местнодеструктурирующей. Опухоль нередко бывает случайной рентгенологической находкой, представленной на снимке однокамерным или многокамерным образованием, которое может быть связано с коронкой зуба [4]. По патогенезу амелобластомы берут свое начало из эпителиальной выстилки одонтогенных кист, из элементов зубной пластинки или из клеток базального слоя слизистой оболочки полости рта [4]. Однако молекулярные механизмы, приводящие к развитию опухоли, пока не исследованы. Wnt-сигнальный путь играет важную роль в процессах развития зубов, его регуляция осуществляется через систему рецепторов и активацию ядерного транскрипционного фактора. Вероятно, развитие опухоли связано с тем, что активация Wnt-сигнального пути идет аномальным путем [5], что предположительно является причиной роста амелобластомы [4]. Wnt/β-катенин – сигнальный путь лежит в основе формирования организма, эмбрионального развития, дифференцировки клеток [6].

Выделяют канонический и неканонический Wnt-сигнальные пути. Для активированного Wnt/β-катенин (или канонического) сигнального пути характерна ядерная локализация белка β-катенина, запускающего транскрипцию генов, отвечающих за клеточный цикл [7]. Неканонический Wnt-сигнальный путь [8] контролирует организацию цитоскелета [9, 10] и кальциевый обмен [11].

Целью настоящей работы было изучение роли канонического β-катенин-зависимого Wnt-сигнального пути в формировании амелобластомы.

### Материалы и методы

Для работы из архива лаборатории патологической анатомии отдела общей патологии ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» были отобраны 74 амелобластомы. Все случаи были систематизированы по гистологическому строению по вариантам, описанным в классификации, предложенной американскими стоматологами [12]. Для исследования распределения β-катенина в клетках опухоли и подсчета индекса Ki-67 в различных гистологических вариантах амелобластомы был выбран иммуногистохимический метод. Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартному протоколу. Депарафинизацию срезов и высокотемпературную демаскировку

Распределение экспрессии $\beta$ -катенина и пролиферативной активности клеток в амелобlastомах различных гистологических вариантов		
Гистологический вариант	Ядерная локализация $\beta$ -катенина, количество случаев (%)	Ki-67 MO (Q1; Q2), %
Плексиформный	14 (56,5%)	6,5 (4,5; 10,0)
Фолликулярный	10 (55,5%)	4,5 (1,0; 8,0)
Зернистоклеточный	4 (80%)	3,0 (1,0; 4,0)
Акантоматозный	5 (55,5%)	10,0 (2,0; 15,0)
Базальноклеточный	6 (100%)	21,0 (12,0; 25,0)
Монокистозный	6 (85,7%)	2,0 (1,0; 4,0)
Десмопластический	3 (100%)	5,0 (2,0; 10,0)
Периферическая амелобlastома	2 (66%)	5,5 (4,0; 7,0)

Рис. 1. Иммуногистохимическая реакция при базальноклеточном варианте амелобlastомы с антителами к белку  $\beta$ -катенину (интенсивное окрашивание ядер опухолевых клеток). Окраска ДАБ-гематоксилин ( $\times 400$ )

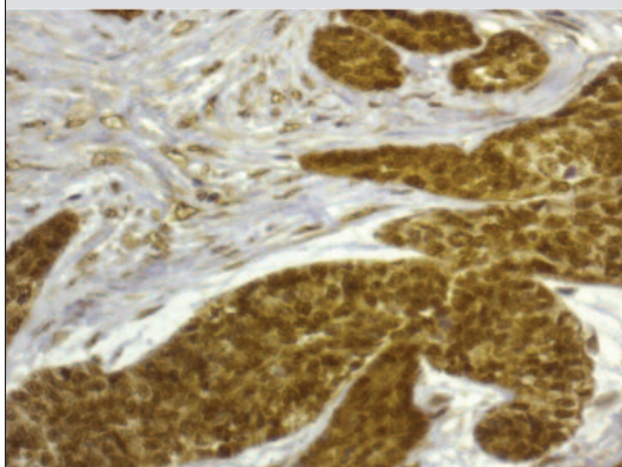
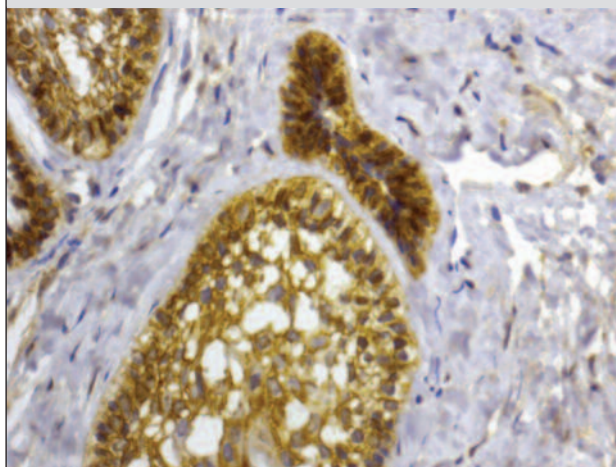


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция при фолликулярном варианте амелобlastомы с антителами к белку  $\beta$ -катенину (интенсивное окрашивание мембраны и цитоплазмы опухолевых клеток). Окраска ДАБ-гематоксилин ( $\times 400$ )



антител осуществляли при помощи РТ-модуля. Для выявления тканевых антигенов использовали моноклональные кроличьи антитела к  $\beta$ -катенину (Epitomics) и моноклональные мышьиные антитела к белку Ki-67 (Dako Cytomation). Иммуногистохимическая реакция проводилась на аппарате Autostainer 360 Thermo scientific. Для визуализации реакции применялась система детекции UltraVision Quanto Detection System HRP DAB, полученные срезы докрашивали гематоксилином Майера. Для оценки активности Wnt-пути оценивали количество случаев с ядерной (рис. 1) либо с мембранной и цитоплазматической локализацией  $\beta$ -катенина (рис. 2) в клетках амелобlastомы. Ядра Ki-67-положительных клеток на каждые 300 клеток амелобlastомы подсчитывали на увеличении 200 в 10 полях зрения и определяли индекс Ki-67. Результат оценивался в процентах. Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи программы STATISTICA 10.0 в среде Windows 7, после оценки нормальности распределения данных по W-критерию Шапиро-Уилка, достоверность различий для количественных признаков с ненормальным распределением осуществляли с помощью U-критерия Манна-Уитни, при этом указаны медианы, 25-й и 75-й перцентили признаков, отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Корреляционные взаимоотношения между индексом пролиферации клеток и локализацией  $\beta$ -катенина оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена.

## Результаты и обсуждение

Морфологическая классификация амелобlastомы включает следующие гистологические варианты: плексиформный, фолликулярный, зернистоклеточный, акантоматозный, базальноклеточный, мо-

нокистозный, десмопластический и периферическую амелобlastому [12]. Клинически для некоторых гистологических вариантов амелобlastомы характерна большая агрессивность и склонность к злокачественному течению, чем у других. Проведенные исследования выявили  $\beta$ -катенин во всех гистологических вариантах амелобlastомы (таблица). При этом преимущественно ядерная его локализация отмечена в базальноклеточном варианте амелобlastомы (см. рис. 1), десмопластическом и зернистоклеточном.

Данные гистологические варианты, опираясь на ранее проведенные нами исследования [13], мы отнесли к наиболее агрессивным вариантам амелобlastомы. Преимущественно внеядерная локализация  $\beta$ -катенина наблюдалась при фолликулярном варианте амелобlastомы (рис. 2).

Для оценки пролиферативной активности клеток различных вариантов амелобlastомы был использован индекс пролиферации с белком Ki-67. Известно, что показатели пролиферативной активности клеток на основе выявления белка Ki-67, позволяют различать доброкачественные и злокачественные одонтогенные опухоли, характеризующиеся агрессивным клиническим течением [14].

В настоящих исследованиях корреляционный анализ между ядерной локализацией  $\beta$ -катенина и пролиферативной активностью клеток по белку Ki-67 в различных гистологических вариантах амелобlastомы показал наличие умеренной положительной и достоверной корреляции ( $r=0,264$ ,  $p=0,025$ ).

Активация Wnt/ $\beta$ -катенин-сигнального пути происходит с момента передачи сигнала Wnt-1 к рецептору Frizzled, что ведет к образованию комплекса Wnt с липопротеинами низкой плотности LRP5/6. Активируется белок Dishevelled, ингибирующий

деградацию  $\beta$ -катенина. Стабилизированный  $\beta$ -катенин накапливается в цитоплазме и проникает в ядро [15]. С помощью факторов транскрипции TCF/LEF  $\beta$ -катенин активирует процесс транскрипции. TCF/LEF это многофункциональные белки, контролирующие активацию определенных генов при наличии передачи сигнала Wnt-пути, избирательно связываясь с участками ДНК [16]. Пролиферативная активность клеток связана с активацией Wnt/ $\beta$ -катенин сигнального пути [17].

### Выводы

Накопление  $\beta$ -катенина в клетках амелобластомы свидетельствует о том, что в амелобластомах активирован Wnt- сигнальный путь, протекающий по каноническому пути. С помощью корреляционного анализа показана умеренная и достоверная связь пролиферативной активности эпителиальных клеток амелобластомы с ядерной локализацией  $\beta$ -катенина ( $r=0,264$ ,  $p=0,025$ ). При этом, только ядерная локализация  $\beta$ -катенина характерна для наиболее агрессивных вариантов амелобластомы – базально-клеточного и десмопластического.

### Литература

1. Adekeye E.O., Lavery K.M. Recurrent ameloblastoma of the maxillo-facial region. Clinical features and treatment. J Maxillofac Surg. 1986; 14: 153–7.
2. Sailer H.F., Tarawneh F., Fourkas P., Antoniadis D.Z., Athanasiou A.E. Surgical, orthodontic and prosthodontic rehabilitation of a patient with follicular ameloblastoma: a case report. Eur J Dent. 2010; 4: 192–6.
3. Семкин В.А., Бабиченко И.И., Усачев Е.С., Зарецкая А.С. Клинико-морфологическая характеристика амелобластом. Стоматология. 2013; 92: 4: 40–43. / Semkin V.A., Babichenko I.I., Usachev E.S., Zareckaja A.S. Kliniko-morfologicheskaja harakteristika ameloblastom. Stomatologija. 2013; 92: 4: 40–43. [in Russian]
4. Zhenhui Wei, Ming Zhong, Yan Guo, Yan Wang, Meisi Ren, Zhaoyuan Wang, Expression of  $\beta$ -catenin and AXIN2 in ameloblastomas Wspolczesna Onkol. 2013; 17 (3): 250–256.
5. Xu H.T., Wang L., Lin D., Liu Y., Liu N., Yuan X.M., Wang E.H. Abnormal beta-catenin and reduced axin expression are associated with poor differentiation and progression in non-small cell lung cancer. Am J Clin Pathol. 2006; 125: 534–41.
6. Niehrs C., Acebron S.P. Mitotic and mitogenic Wnt signalling. EMBO J. 2912; 31: 2705–2713.
7. Amerongen R., Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. Development. 2009 Oct; 136 (19): 3205–14.
8. van Amerongen R. Alternative Wnt pathways and receptors. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Oct 1; 4 (10).
9. May-Simera H.L., Kelley M.W. Cilia, Wnt signaling, and the cytoskeleton. Cilia. 2012 May 2; 1 (1): 7.
10. Goodrich L.V., Strutt D. Principles of planar polarity in animal development. Development. 2011 May; 138 (10): 1877–92.
11. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. Cell Calcium. 2005 Sep-Oct; 38 (3–4): 439–46.
12. Shaikhi Kh., Neiders N., Chen F., Aguirre A. Morphological Variants of Ameloblastoma and Their Mimickers. North American Journal of medicine and Science, Jan, 2012; 5: 1: 20–28.
13. Рыбальская В.Ф., Цимбалист Н.С., Бабиченко И.И., Семкин В.А. SOX2 как потенциальный маркер выявления клеток, обладающих плюрипотентными свойствами в амелобластомах различных гистологических вариантов. Материалы международной научной конференции «Эволюция научного знания». Россия, Москва, 2016; 59–65. / Rybal'skaja V.F., Cimbalist N.S., Babichenko I.I., Semkin V. A. SOX2 kak potencial'nyj marker vyjavlenija kletok, obladajushhij pljuripotentnyimi svojstvami v ameloblastomah razlichnyh gistologicheskij variantov. Materialy mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii «Jevoljucija nauchnogo znanija». Rossija, Moskva, 2016; 59–65. [in Russian]
14. Бабиченко И.И., Семкин В.А., Усачев Е.С., Катушкина А.А. Экспрессия Ki-67 и матричной металлопротеиназы-9 в фолликулярной кисте, кератокистозной одонтогенной опухоли и амелобластоме. Архив патологии. 2013; 75: 1: 10–16. / Babichenko I.I., Semkin V.A., Usachev E.S., Katushkina A.A. Jekspressija Ki-67 i matriksnoj metalloproteinazy-9 v follikuljarnoj kiste, keratokistoznoj odontogennoj opuholi i ameloblastome. Arhiv patologii. 2013; 75: 1: 10–16. [in Russian]
15. Li V.S., Ng S.S., Boersema P.J., Low T.Y., Karthaus W.R., Gerlach J.P., Mohammed S., Heck A.J., Maurice M.M., Mahmoudi T., Clevers H. Wnt Signaling through Inhibition of  $\beta$ -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. Cell. 2012; 149: 1245–1256.
16. Cadigan K.M., Marian L. Waterman, TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Nov 1; 4 (11).
17. Sugioka K., Mizumoto K., Sawa H. Wnt regulates spindle asymmetry to generate asymmetric nuclear  $\beta$ -catenin in C. elegans. Cell. 2011 Sep 16; 146 (6): 942–54.

### Сведения об авторах:

**Бабиченко Игорь Иванович** – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии медицинского института РУДН, Москва

**Рыбальская Виктория Федоровна** – ассистент кафедры патологической анатомии РУДН, Москва

**Цимбалист Наталья Сергеевна** – ассистент кафедры патологической анатомии РУДН, Москва

**Семкин Василий Александрович** – д.м.н., профессор, заведующий отделением хирургической стоматологии ЦНИИС и ЧЛХ, Москва