

УДК 618.11-066:161-066

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИЕЙ, В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ШЕЙКИ МАТКИ

Антонеева И.И., Сидоренко Е.Г., Абакумова Т.В., Пирмамедова С.С.

Ульяновский государственный университет, Ульяновск, e-mail: Naum-53@yandex.ru

Рак шейки матки занимает седьмое место среди всех злокачественных опухолей. Для диагностики злокачественных опухолей применяют определение опухолевых маркеров, характеризующих процесс опухоли. В операционно-биопсийных препаратах 45 больных при начальном процессе рака шейки матки (Т Iа1-Iа2), местно-ограниченном процессе (Т Iб Iа) и распространенном процессе (Т Iб-IV), определяли иммуногистохимически уровень экспрессии p53, Bcl-2 и эпидермального фактора роста. Выявлено усиление экспрессии p53 в эпителии и снижение в строме при прогрессировании рака шейки матки. Экспрессия Bcl-2 в строме и эпителии повышается на стадии Iб-Iа. Сверхэкспрессия эпидермального фактора роста не характерна для рака шейки матки. Оценка уровня экспрессии данных маркеров значима для оценки биологического портрета опухоли при раке шейки матки в динамике опухолевой прогрессии.

Ключевые слова: молекулярные маркеры, рак шейки матки, прогрессирование опухоли

EXPRESSION OF PROTEINS ASSOCIATED WITH THE TUMORAL PROGRESSION, IN MALIGNANT NEW GROWTHS OF THE CERVICAL

Antoneeva I.I., Sidorenko E.G., Abakumova T.V., Pirmamedova S.S.

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, e-mail: Naum-53@yandex.ru

The cervical cancer takes the seventh place among all malignant tumors. To diagnostics of malignant tumors apply definition of the tumoral markers characterizing to a tumoral progression of a cancer. In operational bioptic preparations of 45 patients at initial process of cervical cancer (T Iа1-Iа2), local and limited process (T Iб Iа) and widespread process (T Iб-IV), defined immunohistochemical expression level p53, Bcl-2 and an epidermal factor of growth. Strengthening of an expression of p53 in epithelium and decrease in Strom is revealed when progressing cervical cancer. Bcl-2 expression in stroma and an epithelium raises at Iб-Iа stage. The superexpression of an epidermal factor of growth isn't characteristic for a cancer of cervical neck. The assessment of level of an expression of these markers is significant for an assessment of a biological portrait of a tumor at cervical cancer in dynamics of a tumoral progression.

Keywords: biomolecular markers, cervical cancer, tumoral progression

Рак шейки матки (РШМ) является одной из наиболее актуальных проблем современной онкогинекологии, занимая седьмое место среди всех злокачественных опухолей, третье среди злокачественных опухолей у женщин [14] и второе среди раков органов репродуктивной системы [4]. РШМ имеет выраженную тенденцию к нарастанию заболеваемости у женщин репродуктивного возраста [3]. Согласно официальным данным администрации Ульяновской области, заболеваемость населения области неуклонно растет, ежегодно превышая средний показатель по РФ. При этом отмечается рост, как числа заболеваний РШМ, так и смертности от них. Патологоанатомы всегда стремились связать с морфологией опухоли степень ее клинической агрессивности. Одним из наиболее перспективных направлений в диагностике злокачественных опухолей сегодня является определение опухолевых маркеров, характеризующих способность к опухолевой прогрессии клетки – это белки p53, Bcl-2, Ki-67 и ЭФР [6].

Ген-супрессор p53 кодирует ядерный белок, модулирующий экспрессию генов, ответственный за репарацию ДНК, деление клеток и апоптоз [6, 1]. Почти в половине

случаев злокачественных опухолей обнаруживаются мутации в хромосоме – 17 в области локализации гена-супрессора p53. На сегодня в литературе нет единого мнения относительно динамики экспрессии p53 при прогрессировании РШМ. Согласно данным ряда авторов, он может, как повышаться, так и снижаться при РШМ [8, 9]. Антиген Ki-67 – это ядерный белок, экспрессия которого отмечается в активную фазу клеточного цикла, включая митоз. Согласно данным литературы экспрессия Ki-67 повышается при поражении шейки матки [5, 7].

Белку Bcl-2 принадлежит важная роль в регуляции апоптоза. Показано, что высокая степень экспрессии опухолевой клетки Bcl-2 (белка из семейства Bcl, играющего важную роль в регуляции апоптоза и интегрирующего сигналы для митохондрий), коррелирует с неблагоприятным прогнозом РШМ [15].

Эпидермальный фактор роста (ЭФР) – низкомолекулярный полипептид, который связывается с рецепторами эпидермального фактора роста, как в нормальной, так и патологической клетке. На сегодня идентифицированы по меньшей мере 3 сигнальные системы, которые активируются ЭФР, сти-

мулируя опухолевую прогрессию. Нарушения функциональной активности ЭФР и его рецептора обуславливают более 70% всех злокачественных опухолей. Активация рецепторов ЭФР во всех тканях, вызывая изменения в физиологии клетки: повышается проводимость Na⁺-каналов, увеличивается приток Ca²⁺, экспрессия ряда онкогенов, синтез ДНК, что приводит к изменению дифференцировки, апоптоза, пролиферации, а также ангиогенез. Наличие рецепторов к ЭФР, как правило, неблагоприятно коррелирует с клинико-морфологическими факторами и является признаком плохого прогноза заболевания [13].

В соответствии с вышеизложенным, целью исследования была оценка уровня экспрессии молекулярно-биологических маркеров p53, Ki-67, Bcl-2 и ЭФР в ткани шейки матки на различных стадиях РШМ.

Материал и методы исследования

Материалом для исследования послужили гистологические препараты операционно-биопсийного материала первичной опухоли 45 больных РШМ, полученные до начала исследования. По стадиям заболевания больные распределились следующим образом: начальный процесс (Т Iа1-Iа2) – 15 человек; местно-ограниченный процесс (Т Iб-IIа) – 15 человек; распространенный процесс (Т IIб-IV) – 15 человек.

Образцы опухолевой ткани фиксировали в нейтральном забуференном формалине с обычной стандартной проводкой и заливкой в парафин. Гистологические препараты окрашивали обычными способами и проводили иммуногистохимические исследования. В иммуногистохимической оценке экспрессии mт p53 использовали мышиные моноклональные антитела p53, клон DO-7, Ig G2b (M7001 DakoCytomation) в разведении 1:100 при времени экспозиции 60 минут. Критерием положительной реакции считалась окраска 10% и более ядер опухолевых клеток. Bcl-2 обнаруживался с помощью моноклональных антител к bcl-2, клон bcl-2/100/D₃, IgG₁ (NCL-bcl-2 Novocastra) в разведении 1:80 при инкубации 60 минут. Положительной считалась реакция при цитоплазматической и мембранной окраске более 10% опухолевых клеток. Для выявления ЭФР использовали поликлональные антитела (фирма «Dako»). Полученные в ходе исследования результаты подвергнуты обработке с использованием непараметрических статистических методов (Stata 6.0).

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований установлено увеличение количества атипичных эпителиальных клеток опухоли, экспрессирующих p53 в динамике опухолевой прогрессии. При этом уровень экспрессии p53 в клетках стромы статистически значительно снижается (рис. 1).

Так в группе пациенток с начальным процессом положительная реакция с антителами к p53 была выявлена в 46,06% случаях. У пациенток с местно-распространенным процессом положительная реакция была выявлена в 53,33% случаях и в группе с распространенным процессом – 88,88% случаях (рис. 2). Наряду с p53 наиболее последовательно в канцерогенезе солидных опухолей изучается роль гена bcl-2. Известно, что продукт этого гена, белок Bcl-2, ингибирует p53-зависимый и независимый апоптозные метаболические пути. В свою очередь, белок p53 снижает активность bcl-2, что, возможно, запускает апоптоз в клетках с поврежденной ДНК. Показано, что bcl-2 подавляет Fas-зависимый апоптоз [2]. Изучен механизм, благодаря которому bcl-2 реализует свою функцию при апоптозе [12,11]. Данные относительно уровня экспрессии белка bcl-2 и возможностей использования его в качестве прогностического фактора у больных с солидными опухолями достаточно противоречивы [1].

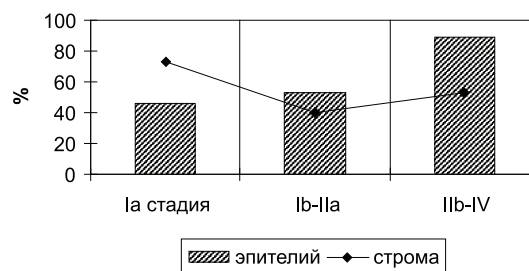


Рис. 1. Экспрессия p53 в эпителии и строме шейки матки в динамике опухолевой прогрессии

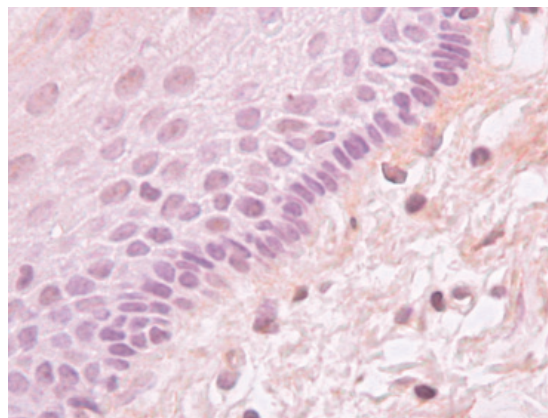


Рис. 2. Экспрессия p53+ в клетках рака шейки матки (микрофото, увел. 600)

Результаты проведенного нами исследования по оценке экспрессии bcl-2 атипичными эпителиальными клетками представлены на рис. 3, 4.

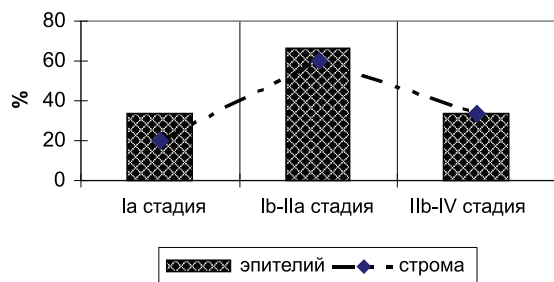


Рис. 3. Экспрессия Vcl-2 в эпителии и строме шейки матки в динамике опухолевой прогрессии

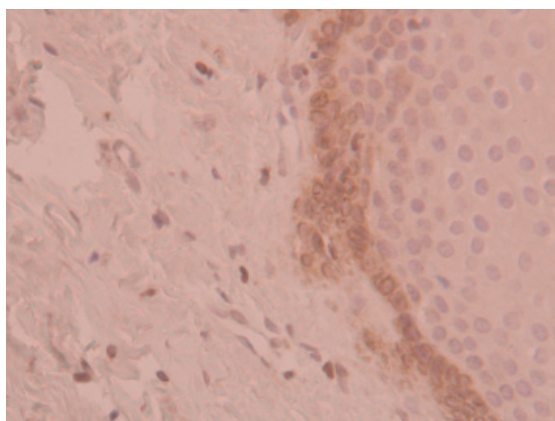


Рис. 4. Содержание Vcl-2+ в клетках рака шейки матки (микрофото, увел.х600)

Показано резкое и значимое усиление экспрессии при местноограниченном процессе по сравнению с начальным процессом (66,67 против 33,33%) и последующее снижение экспрессии при распространенном процессе до 33,33%. Динамика экспрессии Vcl-2 в строме аналогичная (см. рис. 3).

Анализ ИГХ исследований показал, что положительная реакция с антителами к ЭФР была выявлена в группе пациентов на начальной стадии процесса в эпителиальных клетках только у одной больной (6,6%) (рис. 5).

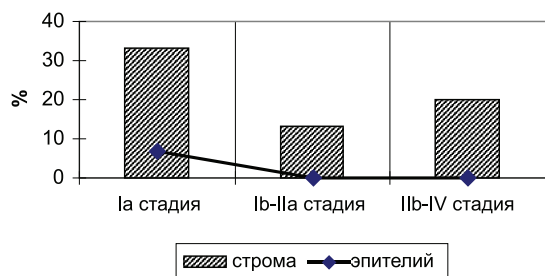


Рис. 5. Экспрессия ЭФР в эпителии и строме шейки матки в динамике опухолевой прогрессии

В строме положительная реакция на ЭФР была выявлена в 5 случаях (3,3%). У пациентов с местно-распространенным процессом положительная реакция на ЭФР

не была выявлена и в строме была выявлена в двух (33,3%) случаях (рис. 6). Также не была выявлена положительная реакция с антителами к ЭФР в эпителиальных клетках у пациенток с распространенным процессом. В строме у пациенток этой группы положительная реакция была выявлена в трех (13,3%) случаях. Согласно данным литературы экспрессия ЭФР наблюдается примерно в 40% злокачественных опухолей ЖКТ, легкого, яичников, матки [10]. При этом можно считать достоверным, что гиперэкспрессия ЭФР играет важную роль в канцерогенезе, является маркером, характеризующим биологическое поведение опухоли и позволяющим индивидуализировать подходы при назначении терапии.

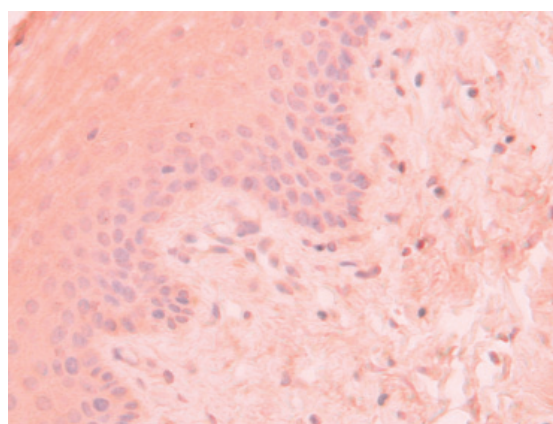


Рис. 6. Экспрессия ЭФР в раковых клетках шейки матки (микрофото, увел.600)

Вывод

Таким образом, определение уровня экспрессии таких биомолекулярных маркеров, как p53, Vcl-2 и ЭФР, имеет несомненное практическое значение для оценки биологического портрета опухоли при РШМ в динамике опухолевой прогрессии. В то же время сверхэкспрессия ЭФР у больших РШМ встречается редко, что, возможно, свидетельствует о его незначительной роли в патогенезе РШМ.

Работа поддержана гос. заданием Минобрнауки России и грантом Президента РФ.

Список литературы

1. Абрамов И.В. Оценка параметров апоптоза в диагностике онкологических заболеваний, их прогнозе и оптимизации схем терапии / И.В. Абрамов, А.А. Фильченков // Вопр. онколгии. – 2003. – Т.49. – С. 21–30.
2. Акимов А.А. Апоптоз и лучевая терапия злокачественных новообразований / А.А. Акимов, С.Д. Иванов, К.П. Хансон // Вопр. онкол. – 2003. – Т.49, №3. – С. 261–269.
3. Барышников А.Ю. Программированная клеточная смерть (апоптоз) / А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин // Рос. онкол. журнал. – 1996. – №1. – С. 58–61.

4. Весна Кезик. Скрининг рака шейки матки // Практическая онкология. – 2009. – Т.10, №2. – С. 59–61.
5. Кондриков Н.И. Значение иммуногистохимического определения биомаркеров плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки / Н.И. Кондриков, М.В. Шамаракова, Ю.В. Горбачева // Акушерство и гинекология. – 2010. – №6. – С. 44–48.
6. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза (обзор) // Биохимия. – 2000. – Т.65, №1. – С. 5–33.
7. Кузнецова М.Е. Иммуногистохимическая оценка пролиферативной активности и репаративных способностей плоскоклеточного рака шейки матки как показателей эффективности лучевой терапии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – СПб., 2008. – 25 с.
8. Петров С.В., Экспрессия клеточных онкогенов в нормальном, метапластическом, диспластическом эпителии и плоскоклеточном раке шейки матки / С.В. Петров, Н.Н. Мазуренко, Н.М. Сухова, И.П. Мороз // Арх. патол. – 1994. – №4. – С. 22–31.
9. Самойлова Э.В. Молекулярные маркеры рака шейки матки: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 1997. – 27 с.
10. Шаназаров Н.А. Роль эпидермального фактора роста и его рецептора в канцерогенезе: молекулярные механизмы их действия / Н.А. Шаназаров, А.Х. Сабиров, С.М. Сироткина // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т.8, №4. – С. 85–90.
11. Herrmann J.L., Cell death signal transduction and Bcl-2 function. / J.L. Herrmann, E. Bruckheimer, T.J. McDonnell // Biochem Soc Trans. – 1996. – Vol.4. – P. 1059–65.
12. Korsmeyer S.J. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death // Cancer Res. – 1999. – 7 Suppl. – P. 1693–1700.
13. Leung B.S. Evidence of an EGF/TGF-alpha-independent pathway for estrogen-regulated cell proliferation / B.S. Leung, L. Stout, L. Zhou // J.Cellular Biochemistry. – 1991. – Vol. 46. – P. 125–133.
14. Parkin D.M. Global Cancer Statistics, 2002 / D.M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, P. Pisani // CA Cancer J.Clin. – 2005. – Vol.55. – P. 74–108.
15. Stoenescu T.M. Assessment tumor markers by immunohistochemistry (Ki67, p53 and Bcl-2) on a cohort of patients with cervical cancer in various stages of evolution / T.M. Stoenescu, L.D. Ivan, N. Stoenescu, D. Azoicai // Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. – 2011. – №115(2). – P. 485–92.
4. Vesna Kezik. Skriniring raka shejki matki // Prakticheskaia onkologija. 2009. T.10, no. 2. pp. 59–61.
5. Kondrikov N.I. Znachenie immunogistohimicheskogo opredelenija biomarkerov ploskokletocnyh intrajepitelial'nyh porazhenij shejki matki / N.I. Kondrikov, M.V. Shamarakova, Ju.V. Gorbacheva // Akusherstvo i ginekologija. 2010. no. 6. pp. 44–48.
6. Koptin B.P. Misheni dejstvija onkogenov i opuholevyh supressorov: kljuch k ponimaniu bazovyh mehanizmov kancerogeneza (obzor) // Biohimija. 2000. T.65, no. 1. pp. 5–33.
7. Kuznecova M.E. Immunogistohimicheskaja ocenka proliferativnoj aktivnosti i reparativnyh sposobnostej ploskokletocnogo raka shejki matki kak pokazatelej jeffektivnosti luchevoj terapii: Avtoref. dis. kand.med.nauk. S.-Pb., 2008. 25 p.
8. Petrov S.V., Jekspressija kletocnyh onkogenov v normal'nom, metaplasticheskom, displasticheskom jepitelii i ploskokletocnom rake shejki matki / S.V. Petrov, N.N. Mazurenko, N.M. Suhova, I.P. Moroz // Arh.patol. 1994. no. 4. pp. 22–31.
9. Samojlova Je.V. Molekuljarnye markery raka shejki matki :Avtoref. dis. kand.med.nauk. Moskva, 1997. 27 p.
10. Shanazarov N.A. Rol' jepidermal'nogo faktora rosta i ego receptora v kancerogneze: molekuljarnye mehanizmy ih dejstvija / N.A. Shanazarov, A.H. Sabirov, S.M. Sirotkina // Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal. 2009. T.8, no. 4. pp.85–90.
11. Herrmann J.L., Cell death signal transduction and Bcl-2 function. / J.L. Herrmann, E.Bruckheimer, T.J.McDonnell // Biochem Soc Trans. 1996. Vol.4. pp.1059–65.
12. Korsmeyer S.J.BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. // Cancer Res. 1999. 7 Suppl. pp.1693–1700.
13. Leung B.S. Evidence of an EGF/TGF-alpha-independent pathway for estrogen-regulated cell proliferation / B.S. Leung, L. Stout, L. Zhou // J.Cellular Biochemistry. 1991. Vol.46. pp.125–133.
14. Parkin D.M. Global Cancer Statistics, 2002 / D.M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, P. Pisani // CA Cancer J. Clin. 2005. Vol.55. pp. 74–108.
15. Stoenescu T.M. Assessment tumor markers by immunohistochemistry (Ki67, p53 and Bcl-2) on a cohort of patients with cervical cancer in various stages of evolution / T.M. Stoenescu, L.D. Ivan, N. Stoenescu, D. Azoicai //Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2011. no. 115(2). pp.485–92.

References

1. Abramov I.V. Ocenka parametrov apoptoza v diagnostike onkologicheskikh zabojevanij, ih prognoze i optimizacii shem terapii / I.V. Abramov, A.A. Fil'chenkov // Vopr.onkolgii. 2003. T.49. pp. 21–30.
2. Akimov A.A. Apoptoz i luchevoj terapii zlokachestvennyh novoobrazovanij / A.A. Akimov, S.D. Ivanov, K.P. Hanson // Vopr.onkol. 2003. T.49, no. 3. pp. 261–269.
3. Baryshnikov A.Ju. Programirovannaja kletocnaja smert' (apoptoz) / A.Ju. Baryshnikov, Ju.V. Shishkin // Ros. onkol.zhurnal. 1996. no. 1. pp. 58–61.

Рецензенты:

Родионов В.В., д.м.н., заведующий П хирургическим отделением ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск;
Слесарев С.М., д.б.н., профессор кафедры биологии и биоэкологии ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 03.07.2012.