

Е. Г. Сидоренко, И. И. Антонеева,
Т. П. Генинг, Д. Р. Арсланова, Т. В. Абакумова

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ¹

Аннотация. В операционно-биопсийных препаратах 45 больных раком шейки матки на различных клинических стадиях заболевания при иммуногистохимическом исследовании определяли уровень экспрессии таких биомолекулярных маркеров, как p53, Bcl-2, и эпидермальный фактор роста. Выявлено, что экспрессия эпидермального фактора роста встречается редко, а также четко прослеживается усиление экспрессии p53 в эпителии и его снижение в строме при прогрессировании рака шейки матки. Экспрессия Bcl-2 в строме и эпителии повышается на стадии Ib–IIa. Определение уровня экспрессии данных маркеров имеет несомненное практическое значение для оценки биологического портрета опухоли при раке шейки матки в динамике опухолевой прогрессии.

Ключевые слова: биомолекулярные маркеры, рак шейки матки, прогрессирование опухоли.

Abstract. In the course of immunohistochemical research the authors have determined the level of expression of p53 and Bcl-2 biomolecular markers and the epidermal factor of growth in operational-biopsy preparations for 45 patients with cervical cancer at various clinical stages of the disease. It is revealed that the expression of the epidermal factor of growth is uncommon, the expression of p53 intensifies in epithelia and decreases in a stroma subject to cervical cancer progression. The expression of Bcl-2 rises in a stroma and an epithelium at the stage Ib–IIa. Definition of the expression level of the given markers has an undoubtable practical value for estimation of a biological portrait of a tumor at cervical cancer in dynamics of tumoral progression.

Key words: biomolecular markers, cervical cancer, tumor progression.

Злокачественные опухоли рака шейки матки (РШМ) – одна из актуальных проблем клинической онкологии. По данным Международного агентства по изучению рака, каждый год регистрируется около 490 тыс. новых случаев РШМ, при этом свыше 55 % женщин умирает от этого заболевания [1]. Природа РШМ рассматривается как последовательный многоступенчатый процесс: от неизменного эпителия шейки матки до интраэпителиальной неоплазии и до инвазивного рака [2].

Патологоанатомы всегда стремились связать с морфологией опухоли степень ее клинической агрессивности. Так, гистологические классификации опухолей разрабатывались с учетом уровня злокачественности составляющих их нозологических форм. Сегодня одним из наиболее перспективных направлений в диагностике злокачественных опухолей является определение опухолевых маркеров, что может давать дополнительную информацию о биологической особенности опухоли. Большое внимание уделяется изучению маркеров, характеризующих апоптоз, пролиферацию клетки, – это белки p53, Bcl-2, Ki-67 и EGFR, ЭФР [3].

Ген-супрессор p53 кодирует ядерный белок, модулирующий экспрессию генов, ответственный за репарацию ДНК, деление клеток и апоптоз [4, 5].

¹ Работа поддержана грантом ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

Почти в половине случаев злокачественных опухолей обнаруживаются мутации в хромосоме 17 в области локализации гена-супрессора p53 [6]. 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 [7, 8]. 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 [9, 10].

Белку Bcl-2 принадлежит важная роль в регуляции апоптоза. Показано, что высокая степень экспрессии опухолевой клетки Bid (белка из семейства Bcl, играющего важную роль в регуляции апоптоза и интегрирующего сигналы для митохондрий) коррелирует с неблагоприятным прогнозом РШМ [11].

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 три сигнальные системы, которые активируются ЭФР, стимулируя опухолевую прогрессию. Нарушения функциональной активности ЭФР и его рецептора обуславливают более 70 % всех злокачественных опухолей. Активация рецепторов ЭФР во всех тканях вызывает изменения в физиологии клетки: повышение проводимости Na^+ -каналов, увеличение притока Ca^{2+} , экспрессия ряда онкогенов, синтез ДНК, что приводит к изменению дифференцировки, апоптоза, пролиферации, а также ангиогенезу. Наличие рецепторов к ЭФР, как правило, неблагоприятно коррелирует с клинико-морфологическими факторами и является признаком плохого прогноза заболевания [12].

В соответствии с вышеизложенным целью исследования была оценка уровня экспрессии молекулярно-биологических маркеров p53, 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 распределены следующим образом: начальный процесс ($T_{Ia1-Ia2}$) – 15 человек; местно-ограниченный процесс (T_{Ib-IIa}) – 15 человек; распространенный процесс (T_{Ib-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 mt p53 использовали мышинные моноклональные антитела p53, клон DO-7, Ig G2b (M7001 DakoCytomation) в разведении 1:100 при времени экспозиции 60 мин. 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/D₅, IgG_i (NCL-Bcl-2 Novocastra) в разведении 1:80 при инкубации 60 мин. 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 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 значимо снижается (рис. 1, 2).

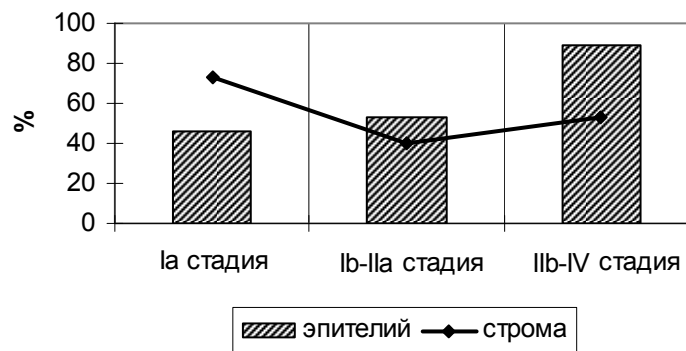


Рис. 1. Экспрессия p53 в эпителии и строме шейки матки в динамике опухолевой прогрессии

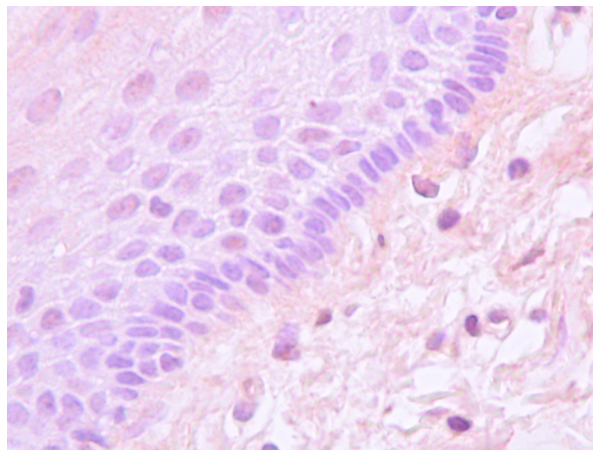


Рис. 2. Экспрессия p53+ в клетках рака шейки матки (микрофото, ×600)

Так, в группе пациенток с начальным процессом положительная реакция с антителами к p53 была выявлена в 46,06 % случаях. У пациенток с местнораспространенным процессом положительная реакция была выявлена в 53,33 % случаях и в группе с распространенным процессом – в 88,88 % случаях. 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 [13]. Изучен механизм, благодаря которому Bcl-2

реализует свою функцию при апоптозе [14, 15]. Данные относительно уровня экспрессии белка Bcl-2 и возможностей использования его в качестве прогностического фактора у больных с солидными опухолями достаточно противоречивы [5].

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

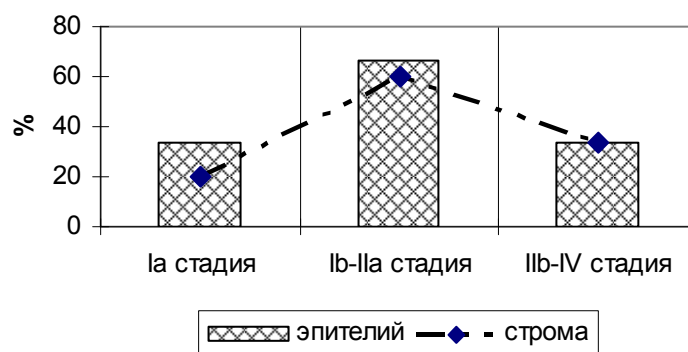


Рис. 3. Экспрессия Bcl-2 в эпителии и строме шейки матки в динамике опухолевой прогрессии

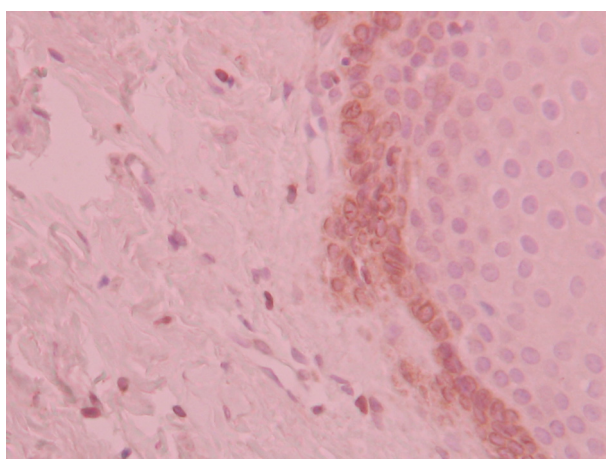


Рис. 4. Содержание Bcl-2+ в клетках рака шейки матки (микрофото, ×600)

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 Bcl-2 в строме аналогичная (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).

В строме положительная реакция на ЭФР была выявлена в пяти случаях (3,3 %). У пациентов с местнораспространенным 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 антитела-

ми 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 [16]. 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.

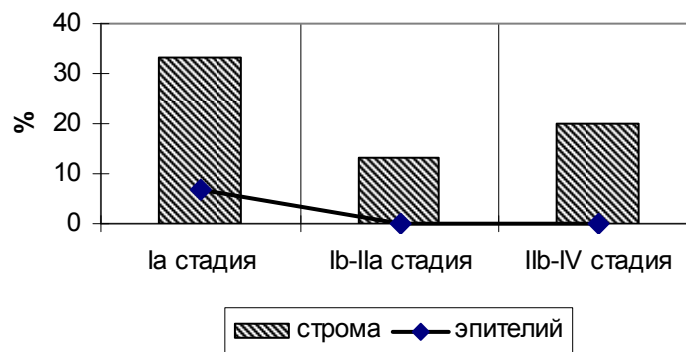


Рис. 5. Экспрессия ЭФР в эпителии и строме шейки матки в динамике опухолевой прогрессии

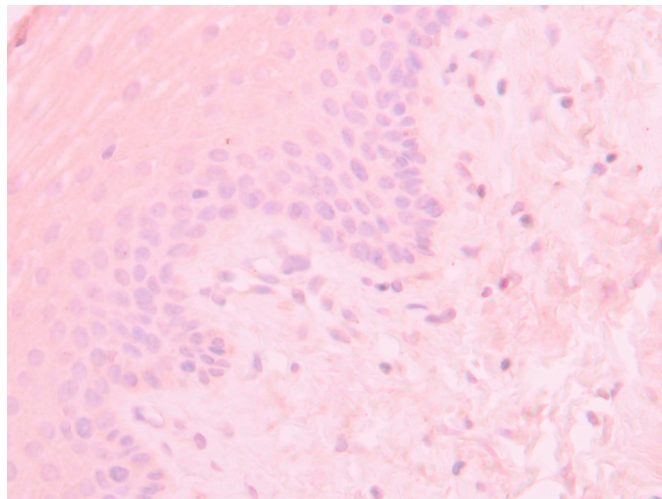


Рис. 6. Экспрессия ЭФР в раковых клетках шейки матки (микрофото, $\times 600$)

Вывод

Таким образом, определение уровня экспрессии таких биомолекулярных маркеров, как p53, Bcl-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 больных РШМ встречается редко, что, возможно, свидетельствует о его незначительной роли в патогенезе РШМ.

Список литературы

1. **Кезик, В.** Скрининг рака шейки матки / Весна Кезик // Практическая онкология. – 2009. – Т. 10, № 2. – С. 59–61.
2. **Parkin, D. M.** Global Cancer Statistics, 2002 / D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, P. Pisani // CA Cancer J. Clin. – 2005. – V. 55. – P. 74–108.
3. **Барышников, А. Ю.** Программированная клеточная смерть (апоптоз) / А. Ю. Барышников, Ю. В. Шишкин // Российский онкологический журнал. – 1996. – № 1. – С. 58–61.
4. **Копнин, Б. П.** Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза (обзор) / Б. П. Копнин // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 1. – С. 5–33.
5. **Абрамов, И. В.** Оценка параметров апоптоза в диагностике онкологических заболеваний, их прогнозе и оптимизации схем терапии / И. В. Абрамов, А. А. Фильченков // Вопросы онкологии. – 2003. – Т. 49. – С. 21–30.
6. **Soussi, T.** p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis / T. Soussi, K. Dehouche, C. Beroud // Hum Mutat. – 2000. – V. 15. – P. 105–113.
7. **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 др. // Архив патологии. – 1994. – № 4. – С. 22–31.
8. **Самойлова, Э. В.** Молекулярные маркеры рака шейки матки : автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.14 / Самойлова Э. В. – М., 1997. – 27 с.
9. **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.
10. **Кузнецова, М. Е.** Иммуногистохимическая оценка пролиферативной активности и репаративных способностей плоскоклеточного рака шейки матки как показателей эффективности лучевой терапии : автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.14 / Кузнецова М. Е. – СПб., 2008. – 25 с.
11. **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. Azoicăi // Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. – 2011. – Apr.-Jun. – V. 115, № 2. – P. 485–492.
12. **Leung, B. S.** Evidence of an EGF/TGF- α -independent pathway for estrogen-regulated cell proliferation / B. S. Leung, L. Stout, L. Zhou // J. Cellular Biochemy. – 1991. – V. 46. – P. 125–133.
13. **Акимов, А. А.** Апоптоз и лучевая терапия злокачественных новообразований / А. А. Акимов, С. Д. Иванов, К. П. Хансон // Вопросы онкологии. – 2003. – Т. 49, № 3. – С. 261–269.
14. **Korsmeyer, S. J.** BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death / S. J. Korsmeyer // Cancer Res. – 1999. – № 59 (7 Suppl). – Apr. 1. – P. 1693–1700.
15. **Herrmann, J. L.** Cell death signal transduction and Bcl-2 function / J. L. Herrmann, E. Bruckheimer, T. J. McDonnell // Biochem. Soc. Trans. – 1996. – Nov. – V. 24, № 4. – P. 1059–1065.
16. **Шаназаров, Н. А.** Роль эпидермального фактора роста и его рецептора в канцерогенезе: молекулярные механизмы их действия / Н. А. Шаназаров, А. Х. Саби-ров, С. М. Сироткина // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 4. – С. 85–90.

Сидоренко Екатерина Геннадьевна

аспирант, Институт медицины, экологии и физической культуры, Ульяновский государственный университет

E-mail: nikolaenkova73@mail.ru

Sidorenko Ekaterina Gennadyevna

Postgraduate student, Institute of medicine, ecology and physical culture, Ulyanovsk State University

Антонеева Инна Ивановна

доктор медицинских наук, доцент, кафедра онкологии и лучевой диагностики, Институт медицины, экологии и физической культуры, Ульяновский государственный университет

E-mail: aii72@mail.ru

Antoneeva Inna Ivanovna

Doctor of medical sciences, associate professor, sub-department of oncology and radiodiagnostics, Institute of medicine, ecology and physical culture, Ulyanovsk State University

Генинг Татьяна Петровна

доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии, Ульяновский государственный университет

E-mail: Naum-53@yandex.ru

Gening Tatyana Petrovna

Doctor of biological sciences, professor, head of sub-department of physiology and pathophysiology, Ulyanovsk State University

Арсланова Динара Ришатовна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Ульяновский государственный университет

E-mail: monika_rainbow@mail.ru

Arslanova Dinara Rishatovna

Candidate of biological sciences, senior staff scientist, Ulyanovsk State University

Абакумова Татьяна Владимировна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Ульяновский государственный университет

E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

Abakumova Tatyana Vladimirovna

Candidate of biological sciences, senior staff scientist, Ulyanovsk State University

УДК 616-006:616-018

Молекулярные маркеры рака шейки матки / Е. Г. Сидоренко, И. И. Антонеева, Т. П. Генинг, Д. Р. Арсланова, Т. В. Абакумова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2012. – № 1 (21). – С. 18–24.