

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ
И ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ МАРКЕРОВ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ

А.А. ДОЛЖИКОВ

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85*

Аннотация. Рак шейки матки занимает 5-е место среди наиболее частых злокачественных новообразований у женщин в Российской Федерации, является вторым по частоте в возрасте от 15 до 44 лет. Канцерогенез в шейке матки является длительным и многостадийным процессом, вовлекающим многих биологических факторов, прежде всего, регуляторов клеточного цикла. Нами исследована роль оценки экспрессии белков p16, Ki67, циклооксигеназы 2 типа (COX-2) и циклина D1 в определении биологического потенциала плоскоклеточного рака шейки матки. 37 случаев CIN III и 23 случая инвазивного рака шейки матки были изучены с применением технологии TMA-блоков. Во всех случаях инвазивного плоскоклеточного рака выявлено повышение экспрессии COX-2 в опухолевых элементах, сопровождавшееся снижением ее уровня в клетках реактивного инфильтрата в строме. В случаях гиперэкспрессии p16 не обнаружено повышения ядерной реакции на циклин D1. Иммуногистохимическое определение COX-2 представляется одним из полезных маркеров при диагностике цервикальных неоплазий. Дальнейшие исследования изменений экспрессии COX-2 могут быть перспективными для определения ее роли в опухолевой прогрессии, реакции опухоли на лечение и прогноза для пациентов. На основании опубликованной литературы обсуждаются возможные биологические роли COX-2 и маркеров клеточного цикла.

Ключевые слова: рак шейки матки, маркеры клеточного цикла, COX-2.

IMMUNOMORPHOLOGICAL INVESTIGATION OF METABOLIC AND PROLIFERATION
MARKERS IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE UTERINE CERVIX

A.A. DOLZHIKOV

Belgorod National Research University

Abstract. Cervical cancer ranks as the 5-th most frequent cancer among women in Russian Federation and the second most frequent cancer among women between 15 and 44 years of age. Cervical cancerogenesis is a long multi-step process with involvement of many biological factors, primarily cell-cycle regulators. We investigated the roles of p16-protein, Ki-67, Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Cyclin D1 expression in the determination of the biological potential of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Thirty-seven cases of CIN III and twenty-three cases of invasive cancers were analyzed using TMA- blocks. The increased expression of COX-2 in all invasive cervical cancers was detected, followed by the decreased number of COX-2 positive cells of the tumor stroma. In p16 over-expressing cases of invasive carcinomas the nuclear expression of Cyclin D1 was not found. Immunohistochemical detection of COX-2 appears to be one of useful biological markers in pathological diagnosis of cervical neoplasms. Further studies on the changes of COX-2 expression levels may be helpful for determination of its role in the tumor progression, the response to treatment and patient prognosis. On the basis of the published literature the possible biological roles of COX-2 and cell-cycle markers are discussed.

Key words: cervical cancer, cell-cycle markers, COX-2.

При определении биологического потенциала опухолей и соответствующей лечебной тактики, в том числе способов таргетной терапии, в настоящее время все большее диагностическое значение придается молекулярным маркерам клеточного цикла, межклеточной адгезии и взаимодействий с межклеточным матриксом, метаболической активности опухолевых клеток [1-3]. Наиболее значимыми маркерами, применяемыми при диагностике плоскоклеточного рака шейки матки, являются ядерный белок Ki-67 и ингибитор циклин-зависимых киназ 4 и 6 типов (Cdk4,6) является белок p16INK4a (p16), который препятствует образованию комплекса Cyclin D/Cdk4,6 и G1-S переходу в клеточном цикле. Одним из биологически активных факторов с широким спектром действия является циклооксигеназа 2 типа (COX-2), обеспечивающая синтез простагландинов, вызывающая подавление апоптоза, активацию ангиогенеза, повышение адгезии опухолевых клеток к внеклеточному матриксу, увеличивая их метастатический потенциал. Показано, что уровень экспрессии COX-2 является независимым прогностическим показателем при раке эндометрия [2]. Повышение ее экспрессии достоверно ассоциировано со снижением 5-летней выживаемости вне зависимости от стадии заболевания. Информативность иммуногистохимической оценки уровня COX-2 оказалась даже более высокой, чем определение экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона, Her2/neu и Ki-67.

Научно-практический интерес представляет комплексный анализ маркеров биологического потенциала опухолей, прямо или опосредованно связанных с регуляцией пролиферативной активности, выживаемости и метастатического потенциала опухолевых клеток.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на материале биопсий 37 случаев неинвазивного плоскоклеточного рака шейки матки (цервикальная интраэпителиальная неоплазия III/рак *in situ*) и 23 случаев инвазивных плоскоклеточных карцином. Для иммуногистохимического исследования материал подготавливался в виде мультиблоков (Tissue Micro Arrays) с диаметром столбиков по 2 мм. Иммуногистохимические реакции выполнены по стандартным диагностическим протоколам с применением высокотемпературной демаскировки антигенов. Использованы поли- и моноклональные антитела против белка Ki-67 (клон SP6), p16 (p16INK4a), циклина D1 (SP42), COX-2 (SP21). Для количественного анализа препараты сканировали на сканере Mirax Desk с последующим изучением с помощью программы Panoramic Viewer 1.15.2. Для статистической обработки использована программа Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение. При сопоставлении патоморфологических картин и результатов иммуногистохимических исследований установлено следующее. Маркер пролиферации Ki-67 существенно облегчает оценку степени изменений цервикального эпителия в сравнении со стандартной оценкой митотической активности, которая зависит от технических факторов, является более трудоемкой и не лишенной субъективизма. В неизменном многослойном плоском эпителии индекс Ki-67 (% иммунопозитивных клеток) в среднем составляет $6,6 \pm 1,8\%$, в участках с умеренной дисплазией (CIN II) — $43,0 \pm 9,0\%$, при CIN III/раке *in situ* и инвазивных карциномах - более 70% ($72,8 \pm 9,3\%$). Вторым критерием является уровень расположения Ki-67 позитивных ядер. В норме от не выходит за пределы базального слоя и ближайшего уровня парабазальных клеток. При CIN III Ki-67 позитивные клетки содержатся во всех слоях эпителия. Столь же значимой является оценка экспрессии белка p16. Во всех случаях инвазивных карцином выявлена умеренная или интенсивная реакция на данный белок, в большей части случаев (13 из 23) высокой интенсивности. При CIN III также преобладала интенсивная реакция на данный белок (23 наблюдения из 37). Тип реакции в обеих группах был преимущественно смешанный (ядерно-цитоплазматический). Интересные результаты получены при изучении экспрессии циклина D1. Положительная реакция выявлялась в базальном слое нормального эпителия с типичной ядерной локализацией. В участках CIN I – CIN II появлялась также слабая или умеренная цитоплазматическая реакция. В очагах инвазивного плоскоклеточного рака нами выявлено снижение или отсутствие экспрессии циклина D1. На первый взгляд это является парадоксальным, так как комплекс Cyclin D/Cdk4,6 является основным в обеспечении G1-S перехода, и в активно пролиферирующих клетках следует ожидать повышение экспрессии циклина D1. Однако при интраэпителиальных неоплазиях и карциномах шейки матки происходит повышение содержания белка p16, обусловленное действием онкогенных вирусов папилломы человека. Основным ингибирующим фактором перехода клеток из G1 в S период клеточного цикла является ген и белок ретинобластомы (pRB), находящийся в клетках в гипофосфорилированном виде в комплексе с киназой E2F, тормозя ее активность, которая определяет G1-S переход. Белок p16 тормозит активность Cdk4, которая в комплексе с циклином D обуславливает фосфорилирование и инактивацию pRB, приводит к повышению активности киназы E2F и стимуляции пролиферативной активности. При действии онкогенных вирусов папилломы человека происходит выключение контроля клеточного цикла с помощью pRB. Вероятно, этого оказывается достаточным для ускорения G1-S перехода и повышения пролиферативной активности без существенного повышения экспрессии циклина D1. Возможно также, что обусловленное вирусной инфекцией резкое повышение экспрессии p16 играет тормозящую роль на активность циклина D1. Необходимо отметить, что в большинстве наших наблюдений превалировала смешанная или цитоплазматическая экспрессия p16. В исследования ряда авторов [4] показано, что появление цитоплазматической реакции на циклин D1, являющегося ядерным белком в G1 периоде, свидетельствует об увеличении фракции клеток, находящихся в S периоде, являясь характерным для более глубоких степеней опухолевой трансформации цервикального эпителия.

Экспрессия COX-2 в исследованном нами материале отличалась в неинвазивных и инвазивных карциномах как в опухолевом эпителии, так и реактивном стромальном инфильтрате. В неизменном эпителии реакция на COX-2 не выявляется, либо находится на низком, близком к фоновому уровню. В 30 из 37 случаев (81,1%) CIN III выявлена умеренная экспрессия, при инвазивных карциномах реакция была позитивной во всех случаях с различной интенсивностью. При CIN III реакция имела гетерогенный характер, в большей степени выражена в участках с наибольшей клеточной атипией и митотической активностью, инвазивные карциномы отличались равномерным распределением реакции во всех опухолевых элементах. Значимые отличия выявлены также при сопоставлении выраженности экспрессии COX-2 в опухолевых элементах и клетках реактивного инфильтрата. В непосредственной близости к участкам CIN III более 70% клеток стромального инфильтрата с выраженной реакцией на COX-2, в строме инвазивных карцином содержание COX-2 реактивных элементов стромального инфильтрата не более 25% (рис. 1). Работы, посвященные изучению особенностей экспрессии COX-2, немногочисленны. Имеющиеся данные свидетельствуют о ее повышении в прямой связи со степенью прогрессии плоскоклеточных поражений [6, 10, 11], в том числе ассоциированных с папиллома-вирусной инфекцией [4, 12] и коинфекцией вирусом иммунодефицита человека 1 типа [6]. Результаты исследований экспрессии COX-2 как маркера чувствительности рака шейки матки к

лучевой терапии неоднозначны. Не получено свидетельств самостоятельной значимости оценки данного фактора при лучевой терапии [7], однако коэкспрессия СОХ-2 эпидермального фактора роста связана с низкой чувствительностью опухоли к лечению [8, 9]. Полученные нами данные относительно особенностей экспрессии СОХ-2 в опухолевых и стромальных структурах сходны с имеющимися единичными литературными данными [5]. Авторами установлена связь худшего прогноза (снижение общей выживаемости) со снижением уровня СОХ-2 в воспалительном инфильтрате в строме опухоли и его относительным повышением в опухолевых элементах.

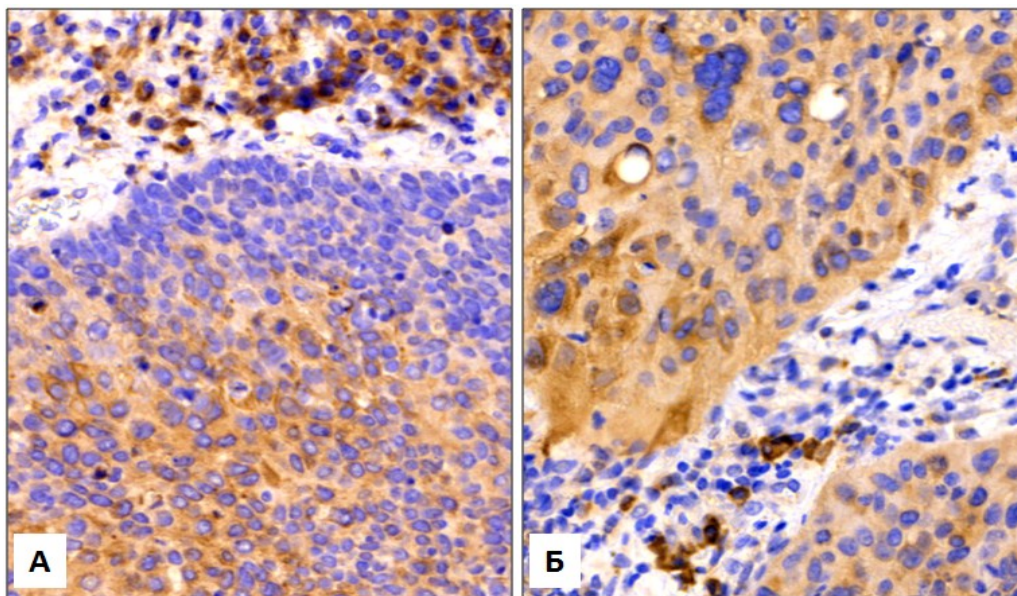


Рис. 1. Различный характер экспрессии СОХ-2 при CIN III (А) и инвазивном раке шейки матки (Б): А – неравномерная реакция средней интенсивности в опухолевом эпителии (нижняя часть микрофото), интенсивная реакция в большей части клеток реактивного инфильтрата; Б – средняя и интенсивная равномерные реакции в опухолевом эпителии (верхняя часть микрофото) при снижении СОХ-2 позитивных клеток в воспалительном инфильтрате. Иммуногистохимические реакции. X 400

Определение особенностей паренхиматозно-стромальных взаимоотношений в опухолях всегда являлось одним из значимых направлений в изучении морфогенеза опухолей и в настоящее время направлено на прикладные вопросы определения биологического потенциала опухолей, их потенциальной чувствительности к терапии. Имеются экспериментальные исследования, указывающие на эффективность блокаторов СОХ-2 – нестероидных противовоспалительных препаратов, при лечении опухолей, в том числе за счет блокады опухолевого ангиогенеза [10, 11]. Полученные нами результаты позволяют сделать следующие выводы.

Выводы:

1. При дифференциальной диагностике цервикальных интраэпителиальных неоплазий и плоскоклеточного рака шейки матки кроме определения экспрессии белка p16 и индекса Ki-67 важными дополнительными маркерами, исследование которых возможно в повседневной диагностике, являются СОХ-2 и циклин D1.
2. Инвазивный потенциал плоскоклеточных неоплазий в большинстве случаев сопровождается повышением экспрессии СОХ-2, снижением ядерной экспрессии циклина D1 при интенсивной реакции на белок p16.
3. При прогрессии плоскоклеточных неоплазий шейки матки происходит снижение экспрессии СОХ-2 в клетках реактивного инфильтрата опухолевой стромы.

Литература

1. Данилова, Н.В. Маркеры стромальной инвазии при фоновых и предраковых изменениях железистого эпителия и аденокарциноме шейки матки / Н.В.Данилова, Ю.Ю.Андреева, Л.Э.Завалишина, П.Г. Мальков // Архив патологии.– 2012.– Т. 74.– №4.– С. 28–33.
2. иммуногистохимические маркеры в качестве прогностических критериев в онкогинекологии / К.М. Пожариский [и др.]// Вопросы онкологии.– 2008.– Т. 54.– № 4.– С. 463–470.
3. Adhesion molecules and p16 expression in endocervical adenocarcinoma / E. Carico [et al.] // Virchovs Arch.– 2009.– Vol. 455.– P. 245–251.
4. Effects of Human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, Ki-67, Cyclin D1, p53 and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma / P. Coneza-Zamora [et al.] // Amer. J. Clin. Pathol.– 2009.– 132.– P. 378–390.

5. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in tumor and stroma compartments in cervical cancer: clinical implications / G. Ferrandina [et al.] // *British Journal of Cancer*.– 2002.– Vol. 87.– P. 1145–1152.
6. The effect of HIV and HPV Co-infection on cervical COX-2 expression and Systemic prostaglandin E₂ levels / D.W. Fitzgerald [et al.] // *Cancer Prev. Res.*– 2012.– 5(1).– P. 34–40.
7. The effect of cyclooxygenase-2 expression on tumor volume response in patients treated with radiotherapy for uterine cervical cancer / M.K. Kang [et al.] // *J. Korean Med. Sci.*– 2009.– Vol. 24.– P. 1170–1176.
8. Correlation between tumor volume response to radiotherapy and expression of biological markers in patients with cervical squamous cell carcinoma / J.M. Noh [et al.] // *J. Gynecol. Oncol.*– 2009.– Vol. 20.– №4.– P. 215–220.
9. Prognostic implications of tumor volume response and COX-2 expression change during radiotherapy in cervical cancer patients / J.M. Noh [et al.] // *Radiation Oncology Journal*.– 2012.– Vol. 30.– №4.– P. 218–225.
10. Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ synthesis are up-regulated in carcinomas of the cervix: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via E2/EP4 receptors / K.J. Sales [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*– 2001.– Vol. 86.– №5.– P. 2243–2249.
11. Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin E receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1 / K.J. Sales [et al.] // *Cancer Res.*– 2002.– 62(2).– P. 424–432.
12. *Sudarshan, S.R.* The HPV-16 E5 protein represses expression of stress pathway genes XBP-1 and COX-2 in genital keratinocytes / S.R. Sudarshan, R. Schktgl, X. Liu // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 2010.– 399(4).– P. 617–622.

Работа выполнена по проекту в рамках государственного задания на оказание услуг (выполнение работ), рег. №629632011.