

Л.И. Короленкова, Е.В. Степанова, В.Д. Ермилова, А.Ю. Барышников, В.В. Брюзгин

ЭКСПРЕССИЯ pAkt ПРИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЯХ И МИКРОИНВАЗИВНОМ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ

ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Целью исследования являлось изучение экспрессии pAkt в эпителии шейки матки иммуногистохимическим методом в 81 образце CIN различной степени и микроинвазивного рака шейки матки и в 10 образцах условно неизмененного эпителия с папилломовирусной инфекцией. Наблюдалось значимое увеличение экспрессии pAkt при CIN2, CIN3 и микроинвазивном раке по сравнению с условно неизмененным эпителием и CIN1, в которых экспрессия отсутствовала. Процент pAkt-положительных клеток прогрессивно увеличивался по мере увеличения тяжести неоплазии и составил $7\pm 5\%$ при CIN2, $15\pm 13\%$ при CIN3 и $17\pm 15\%$ при микроинвазивном раке. Доля pAkt-положительных случаев при CIN3 была в 1,7 раза выше (41%), чем при CIN2 (24%). Анализ экспрессии pAkt в совокупности с другими маркерами можно использовать в иммуногистохимических тестах для индивидуального прогноза течения CIN, а в будущем — в иммуноцитохимических тестах для улучшения диагностики степени неоплазии до применения инвазивных методов обследования. Для разработки многокомпонентной системы маркеров с индексацией необходимы дополнительные исследования со значительно большим количеством наблюдений.

Ключевые слова: CIN, микроинвазивный рак шейки матки, pAkt, маркеры прогрессии

Рак шейки матки (РШМ)—второй по частоте рак женских половых органов. В 2008 г. по данным системы GLOBOCAN, в мире отмечено 529800 новых случаев заболевания и 275100—смерти от РШМ. Дисплазии или цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN) относятся к преинвазивным повреждениям эпителия шейки матки. Иницируемые и поддерживаемые персистирующей папилломовирусной инфекцией высокого канцерогенного риска, CIN представляют собой этапы развития РШМ и наиболее часто встречаются у молодых женщин в репродуктивном возрасте [9]. Развитие процесса от момента инфицирования до инвазивного рака занимает несколько

лет и даже десятилетий [3]. CIN1 —слабая дисплазия относится к легким эпителиальным повреждениям с высокой потенцией к спонтанной регрессии (60-70%). Прогрессию до CINII и более отмечают у 11-20% больных. Группа CIN2 (умеренная дисплазия), хотя и отнесена наряду с CIN3 к тяжелым эпителиальным повреждениям, но неоднородна и состоит из случаев продуктивной ВПЧ-инфекции, способной к регрессии, и трансформирующей, с большой перспективой исхода в CIN3, а затем и в инвазивный рак. Последним рубежом перед возникновением инвазивного процесса является CIN3, к которой принадлежат тяжелая дисплазия и преинвазивный рак. Прогрессия до инвазивного рака в течение 30 лет происходит у 37,5% больных [3-5,8]. Прогнозирование течения заболевания, оценка перспектив перехода одной степени неоплазии в другую и исхода в инвазивный рак является важной и пока нерешенной задачей.

Для уточнения степени тяжести эпителиальных повреждений и составления индивидуального прогноза необходима разработка иммуногистохимических и иммуноцитохимических маркеров, определение которых отдельно или в совокупности позволит предсказать ближайший исход CIN. Это даст возможность в ряде случаев применить консервативную тактику ведения, а хирургические вмешательства сделать более щадящими, используя минимальные объемы иссечения зоны трансформации шейки матки. Применение специфических маркеров опухлевой конверсии цервикального эпителия может значительно улучшить точность, чувствительность и специфичность традиционных программ скрининга рака шейки матки, а в дальнейшем также использовать эти молекулярные мишени для целенаправленной терапии и построения индивидуального прогноза больных CIN [2].

Семейство Akt-серин-треониновых протеинкиназ (Akt1,2,3) принимает участие в контроле за основными клеточными процессами, такими как метаболизм глюкозы, клеточный рост, пролиферация и дифференцировка, апоптоз и клеточная миграция [1]. Akt блокируют апоптоз, запускают клеточный цикл, способствуют таким образом выживанию генетически трансформирован-

ных клеток и патологическому ангиогенезу. Активация Akt является многоэтапным процессом, сопровождающимся как мембранной транслокацией, так и фосфорилированием [6]. Высокую экспрессию pAkt обнаруживают при различных опухолях. Повышенная экспрессия pAkt ассоциируется с плохим прогнозом заболевания [7]. Однако экспрессия pAkt при CIN не изучалась.

Целью исследования является изучение экспрессии pAkt в ткани шейки матки иммуногистохимическим методом у больных CIN различной степени и микроинвазивным раком.

Материал и метод

Нами было проведено исследование экспрессии pAkt в нормальной ткани шейки матки и при CIN различной степени.

Были исследованы 81 образец ткани шейки матки, содержащий неоплазированный эпителий, от больных с CIN и микрокарциномой, лечившихся в поликлинике РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в период с 2006-2008 гг. Исследованные образцы содержали CIN1—27, CIN2—25, CIN3—22 и микроинвазивный рак—в 7 случаях. В качестве контроля были исследованы 10 образцов условно нормальной ткани шейки матки с признаками ВПЧ-инфекции. Всем больные после полного обследования были выполнены петлевая эксцизия патологических участков зоны трансформации или конизация шейки матки, гистологический материал которых был использован для исследования. Образ-

цы были зафиксированы в нейтральном формалине и заключены в парафин по стандартной методике. До проведения иммуногистохимического анализа все случаи были пересмотрены морфологом для уточнения степени CIN и соответствия блоков выбранным срезам.

Иммуногистохимическое исследование проведено иммунопероксидазным методом на срезах блоков тканей шейки матки, фиксированных в формалине и заключенных в парафин. В работе использовали первичные антитела против pAkt. В качестве проявляющей тест-системы использован набор LSAB+kit (Dako, Дания), в качестве хромогена—DAB+kit (Dako, Дания). Срезы были докрашены гематоксилином и заключены под покровное стекло.

Для оценки экспрессии маркеров был использован авидин-биотин пероксидазный метод. Результаты иммуногистохимического исследования оценивали как количественно, так и качественно. Качественная оценка основывалась на интенсивности окрашивания цитоплазмы и (или) ядер: 0-окрашивание отсутствует, 1- слабое окрашивание, 2- окрашивание средней интенсивности, 3-сильное окрашивание. Количественно оценивали процент окрашенных клеток от 0 до 100%.

Статистический анализ проводился с использованием программы SPSS vers. 13.

Результаты

Экспрессия pAkt наблюдалась в ядрах эпителиальных клеток. На рис. 1 показаны типичные микрофотографии экспрессии pAkt в «нормальном эпителии» и при CIN разной степе-

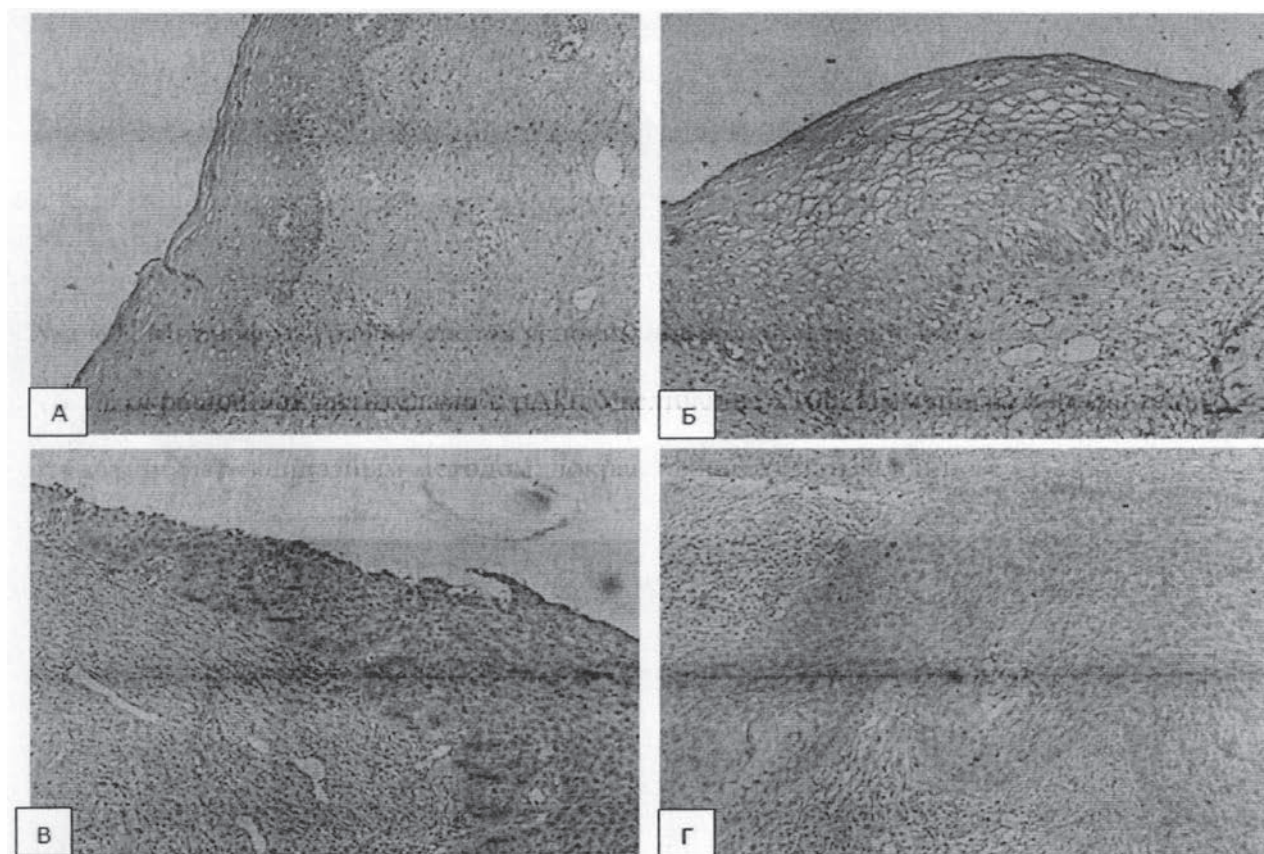


Рис. 1. Микрофотографии срезов условно нормальной ткани шейки матки (А) и CIN 1-3 (Б-Г), окрашенных антителами к pAkt. Увеличение x100. Иммуногистохимическое окрашивание пероксидазным методом, докрашивание гематоксилином.

ни. В «нормальном эпителии» окрашивания антителами к pAkt не наблюдалось. Также нами не обнаружено экспрессии pAkt в эпителиальных клетках в абсолютном большинстве случаев CIN1—26 из 27(96%). CIN2 окрашивание антителами к pAkt обнаружено в 14 из 25 (56%) случаев. В одном случае (7%) pAkt-положительные клетки локализовались в базальном и парабазальных слоях, в 13 (93%)—во всех слоях эпителия. При этом доля положительных клеток варьировала от 1% до 20%, средняя доля положительных клеток составила $7\pm 5\%$.

При CIN3 окрашивание антителами к pAkt определялось в 17 из 22 случаев (77%). Во всех образцах экспрессия обнаружена во всех слоях эпителия. Средняя доля pAkt-положительных клеток составила $15\pm 13\%$ (от 2% до 30%). При микроинвазивном раке экспрессия pAkt обнаружена в 4 из 7 (57%) случаев. pAkt-положительные клетки локализовались во всех слоях эпителия. Средняя доля положительных по маркеру клеток составила $17\pm 15\%$ (от 2% до 30%). Наблюдается статистически значимое увеличение количества pAkt-положительных клеток при CIN3 по сравнению с CIN2 ($p=0,007$), CIN1 и нормой ($p<0,001$). При микроинвазивном раке количество pAkt-положительных клеток также было значимо выше по сравнению с CIN1 ($p=0,001$) и нормой ($p=0,049$).

Все случаи были разделены на положительные по pAkt, если наблюдалось окрашивание не менее 10% эпителиальных клеток, и отрицательные—при окрашивании менее 10%. Количество pAkt-положительных случаев при CIN3 было в 1,7 раза выше, чем при CIN2 (табл. 1).

Обсуждение

В настоящем исследовании показано, что увеличение pAkt-положительных клеток наблюдается при CIN2, CIN3 и микроинвазивном раке по сравнению с «нормальным» эпителием и CIN1.

Отсутствие экспрессии в «нормальном» эпителии при ВПЧ-инфекции и практическое отсутствие при CIN1 (в 26 случаях из 27) свидетельствует о перспективности использования pAkt как одного из маркеров для построения прогноза течения CIN, наряду с другими маркерами в единой тестовой системе. Вероятно, экспрессию pAkt в одном случае CIN1 можно рассматривать как признак потенциальной прогрессии до CIN2. Мы разделили все анализируемые случаи на отрицательные и положительные по маркеру в зависимости от количества положительных клеток. В качестве «точки разделения» было взято наличие не менее 10% положительных клеток. Доля положительных случаев при CIN3 была больше (41%) по сравнению с CIN2 (24%) в 1,7 раза, а по сравнению с CIN1 (4%)—в 10,25 раза. pAkt-положительные клетки имеют высокий пролиферативный потенциал и низкую способность к апоптозу, что является характеристикой опухолевых клеток-предшественников. Таким образом, высокий уровень экспрессии pAkt может быть ассоциирован с более быстрой прогрессией CIN.

В исследование было включено небольшое количество случаев микроинвазивного рака. Снижение частоты pAkt-положительных случаев при микроинвазивном раке по сравнению с CIN3 (28,5% против 41% случаев) статистически незначимо и может быть объяснено недостаточным количеством наблюдений. Кроме того, возможно, при развитии инвазивного рака включаются альтернативные механизмы стимуляции пролиферации, клеточного роста и выживаемости, подавления апоптоза через другие сигнальные пути без участия pAkt.

Экспрессию pAkt следует рассматривать как один из возможных маркеров для прогнозирования течения интраэпителиальных неоплазий шейки матки. Анализ экспрессии этого маркера в совокупности с другими можно использовать в иммуногистохимических тестах для индивидуального прогноза течения CIN, а в бу-

Таблица 1.

Экспрессия pAkt в эпителиальных клетках в исследованных образцах CIN, микроинвазивного рака и «нормального эпителия» с ВПЧ (n=91).

Характеристика эпителия шейки матки	Экспрессия pAkt, n (%)			
	Нет экспрессии	Менее 10% клеток	Более или равно 10% клеток	Всего
«Нормальный эпителий»	10 (100)	0 (0)	0 (0)	10
CIN1	26 (96)	1 (4)	0 (0)	27
CIN2	11 (44)	8 (32)	6 (24)	25
CIN3	5 (23)	8 (36)	9 (41)	22
Микроинвазивный рак	3 (43)	2 (28,5)	2 (28,5)	7

душем—в иммуноцитохимических тестах для улучшения диагностики степени неоплазии до применения инвазивных методов обследования. При этом каждый маркер будет иметь свою удельную значимость, а совокупность их—определять индекс, характеризующий степень повреждений и их прогноз. Для разработки многокомпонентной системы маркеров с индексацией необходимы дополнительные исследования со значительно большим количеством наблюдений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bhaskar PT, Hay N: The two TORCs and Akt//Dev Cell.- 2007.-Vol.12, P. 487-502.
2. Keating JT, Ince T, Crum CP. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis, // Adv Anat Pathol. — 2001 .Vol. 8.-P.83-92.
3. McCredie MR, Sharples KJ, Paul C et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study//Lancet Oncol 2008, Vol. 9. — P425-434.
4. Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CHPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications // J Pathol. — 2006. — Vol.208. —P. 152-164.
5. Song S-H, Lee J-K, Oh M-J, Hur J-Y et al. Risk factors for the progression or persistence of untreated mild dysplasia of the uterine cervix // Int J Gynecol Cancer. — 2006. — Vol. 16. — P. 1608-1613.
6. Testa JR Belacosa A: AKT plays a central role in tumorigenesis // Proc Natl Acad Sci USA 2001.-Vol. 98. P. 10983-10985.
7. Toker Yoeli-Lerner M. Akt signaling and cancer: Surviving but not voving on. Cancer Res. — 2006. — Vol. 66. — P. 3963-3966.
8. Tranbaloc P. Natural history of precursor lesions of cervical cancer//Gynecol Obstet Fertil. 2008. — Vol. 6. — P. 650-655.
9. Wright TC Jr, Massad LS, Dunton C J, Spitzer et al. / 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ // J Low Genit Tract Dis. 2007. — Vol. 11. — P. 223-239.

*L.I. Korolenkova, E.V. Stepanova, Y.D. Ermilova,
A.Yu. Barishnikov, V.V. Bruzgin*

pAkt EXPRESSION IN CIN AND MICROINVASIVE CERVICAL CANCER

N.N. Blokhin Russian Oncological Scientific Center of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The study objective was an immunohistochemical evaluation of pAkt expression in 81 CIN and microinvasive cervical cancer tissue samples and 10 samples of relatively “normal” cervical epithelium of HPV-infected women. pAkt expression showed significant up-regulation in CIN2, CIN3 and microinvasive cancer in compare to CIN1 and “normal” epithelium. The rate of pAkt- positive cells increased progressively by cervical neoplasia grade advancement reaching 7±5% in CIN2, 15±13% in CIN3 и 17±15% in microinvasive cancer. The rate of pAkt-positive cases in general was 1,7-fold higher in CIN3 (41%) than in CIN2 (24%). pAkt expression in conjunction with other markers may be used in immunohistochemical studies for individual CIN outcome prognosis and prospectively in immunocytochemical tests for CIN grade diagnostics improvement before using invasive methods. To elaborate multicomponent system of markers with their indexation there is a need for further investigations with greater number of cases.