

УДК 618.146-006.6-071:578.827.2

ЭКСПРЕССИЯ e-КАДГЕРИНА – БИОХИМИЧЕСКИЙ МАРКЕР ПРОГРЕССИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПРИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЯХ

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

(Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва)

Представлены результаты исследования иммуногистохимическим методом экспрессии e-кадгерина как биомаркера межклеточных адгезионных связей в образцах тканей цервикальных интраэпителиальных неоплазий. Для оценки экспрессии использован количественный авидин-биотин-пероксидазный метод. Инвазивному раку шейки матки в течение нескольких лет предшествуют предраковые повреждения – цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN) 1, 2, 3, прогноз которых варьирует от регрессии до развития инвазивного рака. Проанализирована экспрессия e-кадгерина в тканях шейки матки больных CIN различной степени и микроинвазивным раком (81 образец), а также пациенток без CIN (10 образцов). Отмечено статистически значимое резкое снижение экспрессии e-кадгерина при CIN3 по сравнению с CIN 1 и 2 и «нормальным» эпителием. Целеобразно использование этого маркера для уточнения тяжести повреждений и индивидуального прогноза течения CIN. Полученные данные открывают путь для создания новых лекарственных средств на основе соединений, влияющих на экспрессию e-кадгерина.

Ключевые слова: CIN, e-кадгерин, маркеры прогрессии, рак шейки матки.

Одна из наиболее часто встречающихся форм рака у женщин – рак шейки матки (РШМ). Преинвазивные повреждения эпителия шейки матки – дисплазии или цервикальные интраэпителиальные неоплазии (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) – инициируются и поддерживаются вирусами папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска и представляют собой этапы канцерогенеза. Они часто встречаются в возрасте от 25 до 40 лет [1]. Последним рубежом перед возникновением инвазивного процесса является CIN3, к которой относят тяжелую дисплазию и преинвазивный рак. CIN3 прогрессирует до инвазивного рака в 12,0–37,5% случаев [2]. Трудно предсказуемое течение цервикальных неоплазий привело к необходимости разделения поражений на легкие повреждения продуктивной фазы болезни с высокой вероятностью регрессии (CIN1, вирусные кондиломы и некоторые CIN2), и тяжелые, соответствующие трансформирующей фазе (некоторые CIN2 и CIN3).

Для разработки таргетных фармакологических препаратов, воздействующих на механизмы опухолевой трансформации цервикального эпителия, а также для уточнения степени тяжести эпителиальных повреждений и составления индивидуального прогноза необходима разработка иммуногистохимических и иммуноцитохимических маркеров, определение которых отдельно или в совокупности позволит пред-

сказать ближайший исход CIN. Это даст возможность в ряде случаев применить консервативную тактику лечения, а хирургические вмешательства сделать более щадящими. Использование специфических маркеров опухолевой конверсии цервикального эпителия поможет значительно улучшить точность, чувствительность и специфичность традиционных программ скрининга рака шейки матки, а в дальнейшем также построить индивидуальный прогноз исхода CIN [3].

Кадгерин – это гликопротеины молекулярной массой от 120 до 130 кДа, участвующие в клеточной адгезии. Межклеточные адгезионные связи играют ключевую роль в формировании ткани и являются важным биомаркером, характеризующим развитие опухоли [4–9]. Кадгерин – один из главных медиаторов адгезии клеток. Потеря этих молекул в опухолевой ткани определяет способность опухолевых клеток к инвазии.

Молекулы e-кадгерина, участвуя в адгезии, определяют архитектуру и дифференцировку кератиноцитов в эпителии. Плоские клетки цервикального эпителия достаточно сильно прикреплены друг к другу и к базальной мембране за счет высокой экспрессии данных молекул адгезии. Известно, что при интраэпителиальных цервикальных неоплазиях имеются изменения в экспрессии e-кадгерина [5]. Снижение его экспрессии блокирует способность к адгезии кле-

ток друг к другу и увеличивает их злокачественный потенциал, способность к инвазивному росту и метастазированию. В частности, предполагается, что снижение экспрессии е-кадгерина является эффективным маркером для оценки потенциальной злокачественности цервикального рака [4]. Снижение экспрессии е-кадгерина статистически значимо ассоциировано с уменьшением общей и безрецидивной выживаемости больных цервикальным раком. В связи с вышесказанным е-кадгерин может быть маркером агрессивного поведения опухоли и потенциальной прогрессии CIN, а также служить мишенью для назначения адъювантной терапии на ранних стадиях болезни [10]. Однако изменения экспрессии е-кадгерина при CIN различной степени требует дополнительного изучения. Целью исследования является изучение экспрессии е-кадгерина в ткани шейки матки иммуногистохимическим методом у больных CIN различной степени.

Материалы и методы

Нами было проведено исследование экспрессии е-кадгерина в условно неизменном эпителии шейки матки с ВПЧ и при CIN различной степени.

Исследовали образцы ткани шейки матки (81 образец), содержащие неоплазированный эпителий от больных с CIN и микрокарциномой, которые лечились в поликлинике РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в период с 2006 по 2008 гг. Исследованные образцы содержали CIN1, CIN2 и CIN3 (27, 25 и 22 образцов соответственно), 7 образцов содержали микроинвазивный рак. В качестве контроля были исследованы 10 образцов условно нормальной ткани шейки матки с признаками инфекции вирусом папилломы человека (ВПЧ). Всем больным после полного обследования сделали петлевую эксцизию патологических участков зоны трансформации или конусовидную ампутацию шейки матки (гистологический материал использовали для исследования). Образцы 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.

Имуногистохимическое исследование проводили иммунопероксидазным методом на срезах блоков тканей шейки матки, фиксированных в формалине и заключенных в парафин. В работе использовали первичные антитела против е-кадгерина. В качестве проявляющей тест-системы использовали набор LSAB+kit

(«Dako», Дания), а в качестве хромогена – DAB+kit («Dako», Дания). Срезы были докрашены гематоксилином и заключены под покрывное стекло.

Для оценки экспрессии маркеров был использован авидин-биотин-пероксидазный метод. Результаты иммуногистохимического анализа оценивали как количественно, так и качественно. Качественная оценка основана на интенсивности окрашивания цитоплазмы: 0 – окрашивание отсутствует, 1 – слабое окрашивание, 2 – окрашивание средней интенсивности, 3 – сильное окрашивание. Количественно оценивали процент окрашенных клеток от 0 до 100%. Экспрессию е-кадгерина рассчитывали по формуле Hscore (histochemical score – гистохимический индекс):

$$1a + 2b + 3c,$$

где a – доля клеток со слабым окрашиванием, %; b – доля клеток с умеренно выраженным окрашиванием, %; c – доля клеток с сильно выраженным окрашиванием, %.

Для проведения статистического анализа использовали программу SPSS vers.13.

Результаты

Экспрессия е-кадгерина наблюдалась на мембране эпителиальных клеток. На рис. 1 показаны типичные микрофотографии экспрессии е-кадгерина в нормальном эпителии и при CIN различной степени. В табл. 1 и 2 представлены обобщенные данные об экспрессии е-кадгерина в исследованных образцах CIN, микрокарциномы и нормального эпителия с признаками ВПЧ-инфекции.

В нормальном эпителии экспрессия е-кадгерина была обнаружена во всех образцах. Клетки имели высокую интенсивность окрашивания и локализовались в базальном и парабазальном слоях эпителия (7 случаев, 70%), во всех пластах эпителия (3 случая, 30%). Средний балл по Hscore в нормальном эпителии составил 186 ± 90 .

При CIN1 маркер также экспрессировался во всех образцах: в 25 (93%) исследованных случаях е-кадгерин-положительные клетки занимали нижнюю и среднюю треть эпителиального пласта, в 2 образцах (7%) – все слои эпителия. При этом интенсивность окрашивания была высокой в 25 случаях (93%) или средней в 2 случаях (7%). Средний балл по Hscore в CIN1 составил 120 ± 68 .

При CIN2 экспрессия е-кадгерина отсутствовала в одном случае (4%). Интенсивность окрашивания антителами к маркеру была высокой в 22 образцах

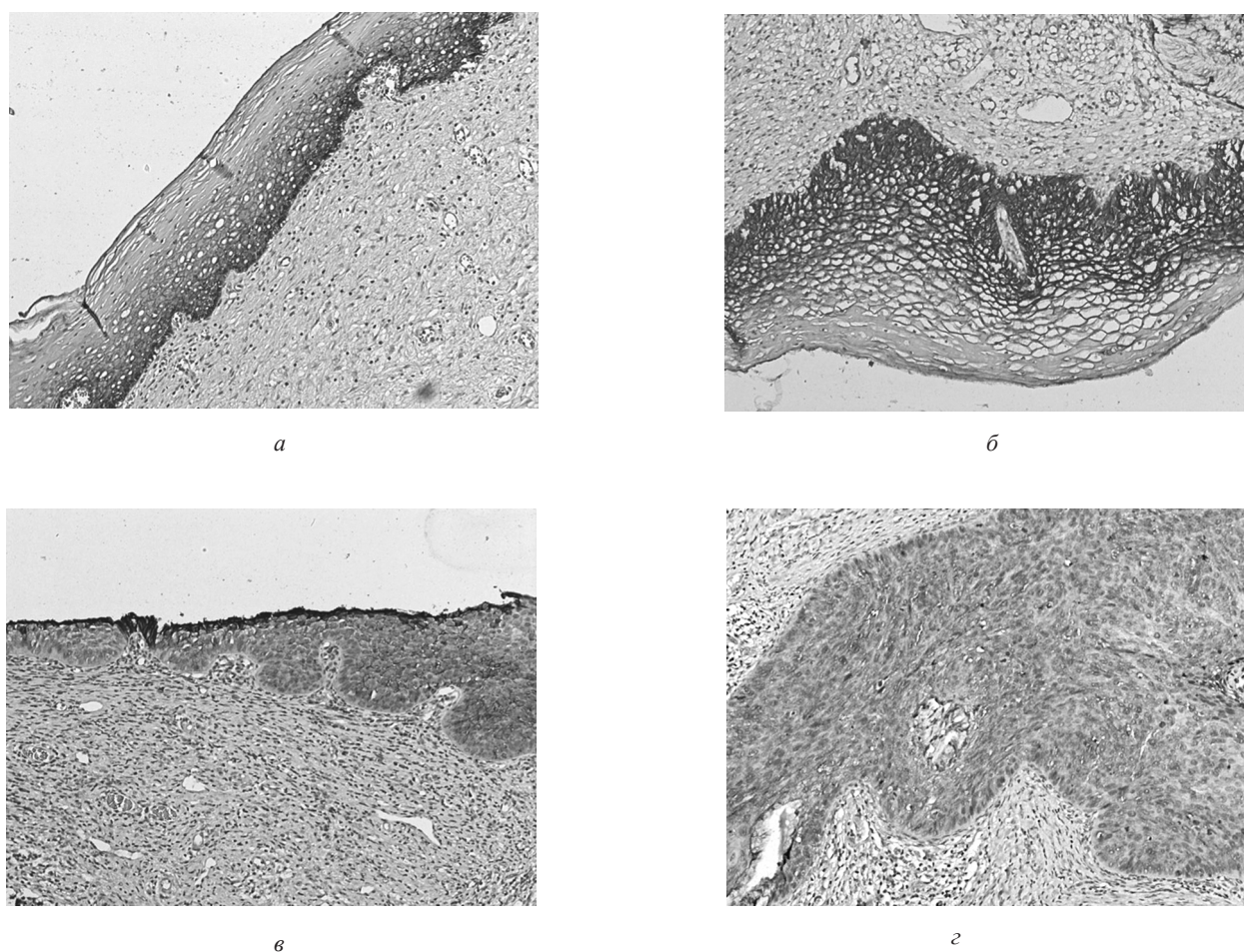


Рис. 1. Микрофотографии срезов условно нормальной ткани шейки матки (а) и CIN1,2,3 (б-г), окрашенных антителами к е-кадгерину. Увеличение $\times 100$ (иммуногистохимическое окрашивание пероксидазным методом, докрасивание гематоксилином)

Таблица 1

Интенсивность экспрессии е-кадгерина в исследованных образцах CIN, микроинвазивного рака и нормального эпителия с ВПЧ (n = 91)

Характеристика эпителия шейки матки	Интенсивность окрашивания е-кадгерина, n (%)				
	0 (отсутствие)	1+	2+	3+	Всего
Нормальный эпителий	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (0)	10
CIN1	0 (0)	0 (0)	2 (7)	25 (93)	27
CIN2	1 (4)	1 (4)	1 (4)	22 (88)	25
CIN3	6 (27)	5 (23)	7 (32)	4 (18)	22
Микроинвазивный рак	4 (58)	1 (14)	2 (28)	0 (0)	7

(92%), средней в одном случае (4%) и низкой также в одном случае (4%). В большинстве случаев (46%) е-кадгерин-положительные клетки локализовались во всех слоях эпителия или в нижней и средней

трети эпителия (42%), а в трех случаях (12%) – поверхностно. Средний балл по Hscore в CIN2 составил 178 ± 114 , а это не намного превышает средний балл в CIN1.

Т а б л и ц а 2

Экспрессии е-кадгерина в слоях эпителия в исследованных образцах CIN, микроинвазивного рака и нормального эпителия с ВПЧ ($n = 91$)

Характеристика эпителия шейки матки	Экспрессия е-кадгерина в слоях эпителия, n (%)					
	0 (отсутствие)	все	нижняя треть	нижняя и средняя треть	поверхностный слой	всего
Нормальный эпителий	0 (0)	3 (30)	3 (30)	4 (40)	0 (0)	10
CIN1	0 (0)	2 (8)	19 (70)	6 (22)	0 (0)	27
CIN2	1 (4)	11 (44)	5 (20)	5 (20)	3 (12)	25
CIN3	6 (27)	2 (9)	2 (9)	1 (5)	11 (50)	22
Микроинвазивный рак	4 (58)	0 (0)	1 (14)	0 (0)	2 (28)	7

При CIN3 шесть исследованных образцов (27%) были отрицательными по е-кадгерину. Четыре из 16 (25%) положительных случаев имели высокую экспрессию маркера в неоплазированных клетках, 7 (44%) – среднюю и 5 (31%) – низкую. Окрашенные клетки локализовались преимущественно в поверхностных слоях эпителия (в 11 из 16 (69%) случаях). Все слои эпителия были окрашены только в двух случаях (12%). Средний балл по Hscore составил 36 ± 37 .

Из семи исследованных образцов с микроинвазивным раком экспрессия е-кадгерина отсутствовала в четырех случаях (57%). При этом в положительных случаях интенсивность окрашивания была слабой (в 1 случае) или средней (в 2 случаях); е-кадгерин-положительные клетки локализовались в поверхностных слоях или средней трети эпителия. Средний балл по Hscore составил 9 ± 11 . Данные по экспрессии е-кадгерина в нормальном эпителии и при CIN представлены на рис. 2.

Обсуждение

В нашем исследовании мы показали, что резкое снижение экспрессии е-кадгерина наблюдается при CIN3 по сравнению с CIN1, CIN2 и «нормальным» эпителием. Этот факт может помочь при уточнении степени тяжести неоплазий, определении принадлежности клинических случаев CIN 2 к легким или тяжелым повреждениям.

Наши исследования подтверждаются данными литературы, где было показано снижение экспрессии е-кадгерина при прогрессии неоплазий [11]. Особенно низкий уровень е-кадгерина находят при CIN3, очагах микроинвазии и инвазивном раке. При этом наблюда-

ется последовательное снижение уровня е-кадгерина от CIN1 и CIN2 к CIN3 и микроинвазивному раку.

В нашем исследовании уровень экспрессии е-кадгерина при CIN1 и CIN2 был статистически незначимо выше, чем в нормальном эпителии. Однако в ряде случаев при CIN2 наблюдалось резкое снижение экспрессии маркера, что вероятно ассоциировано с повышенным риском прогрессирования болезни у этих больных.

Отсутствие снижения экспрессии е-кадгерина при CIN1 и CIN2 в нашем исследовании можно объяснить следующим образом. CIN1 и многие CIN2 представляют собой продуктивную папилломовирусную инфекцию с высокой вероятностью регрессии. Возможность регрессии определяется презентацией антигенов вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска дендритными клетками Лангерганса, мигрирующими внутри эпителиального пласта в лимфатические узлы. Вследствие презентации антигенов ВПЧ-инфекция чаще всего элиминируется в течение 18–24 месяцев с регрессией легкой степени неоплазии. Имеются экспериментальные данные о том, что повышение экспрессии е-кадгерина в клеточных линиях поврежденных ВПЧ кератиноцитов усиливает миграцию клеток Лангерганса и адгезию их к инфицированным ВПЧ-кератиноцитам [13]. Эти исследования могут объяснить некоторое повышение экспрессии е-кадгерина у наших больных CIN1 и CIN2. Это может свидетельствовать о защитной роли экспрессии е-кадгерина при CIN легкой степени и является благоприятным прогностическим фактором – маркером предстоящей регрессии без исхода в тяжелые неоплазии. При возникновении CIN3 экспрессия

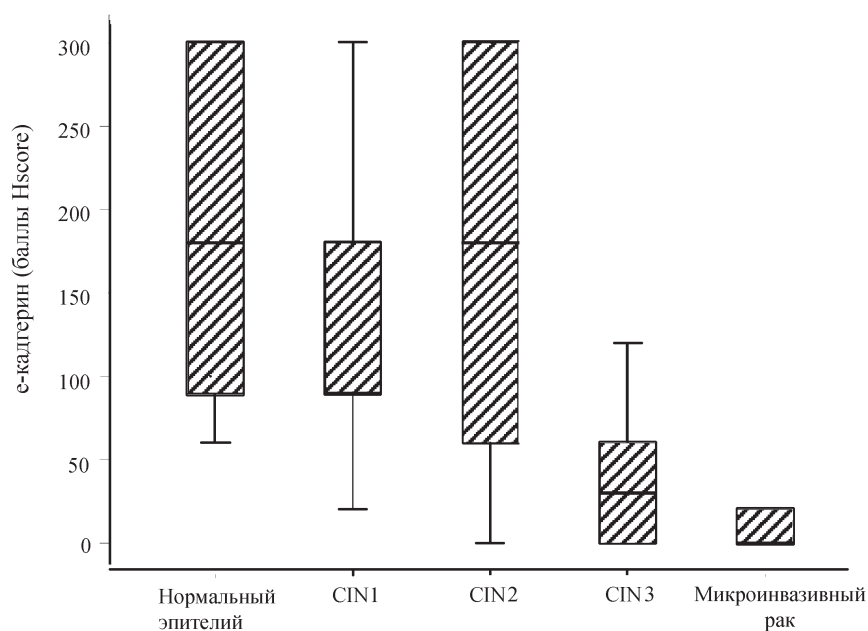


Рис. 2. Экспрессия е-кадгерина в CIN различной степени

е-кадгерина подавляется белком E7 ВПЧ [14], играющим вместе с белком E6 основную роль в опухолевой трансформации эпителиальных клеток. Поэтому в образцах CIN3 нами, как и большинством исследователей, наблюдалось снижение экспрессии е-кадгерина. Клиническим следствием снижения его экспрессии является увеличение вероятности появления цитологических изменений в мазках. Имеются также данные, что при сохранении экспрессии е-кадгерина у больных CIN3 наблюдаются ложноотрицательные результаты мазков.

Следует заметить, что по полученным нами результатам, как и по данным многих авторов, экспрессия е-кадгерина не снижается при персистирующей ВПЧ-инфекции и может рассматриваться как независимый фактор прогноза CIN [12]. Фактор экспрессии

е-кадгерина совместно с другими маркерами течения интраэпителиальных неоплазий шейки матки, к примеру, теломеразы [15] можно будет использовать в будущем для улучшения диагностики тяжести неоплазии до применения инвазивных методов обследования, для построения индивидуального прогноза течения CIN, для предупреждения прогрессии и лечения предраковых эпителиальных повреждений шейки матки.

Таким образом, экспрессию е-кадгерина следует считать перспективным маркером для прогнозирования течения интраэпителиальных неоплазий шейки матки. Анализ экспрессии е-кадгерина, проведенный в работе, позволит перейти к разработке таргетных препаратов для предупреждения прогрессии и лечения рассмотренного заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wright T.C., Kurman R.J., Ferenczy A. Precancerous lesions of the cervix. Blaustein's pathology of the female genital tract. Springer-Verlag, 1995. С. 229.
2. McCredie M.R., Sharples K.J., Paul C. et al. // *Lancet Oncol* 2008. N 9. С. 425.
3. Keating J.T., Ince T., Crum C.P. // *Adv. Anat. Pathol.* 2001. N 8. С. 83.
4. Kaplanis K., Kiziridou A., Liberis V., Destouni Z., Galazios G. // *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2005. **26**. N 6. P. 608.
5. Bremnes R.M., Veve R., Hirsch F.R., Franklin W.A. // *Lung. Cancer.* 2002. **36**. N 2. 115.
6. Yaldizl M., Hakverdi A.U., Bayhan G., Akku Z. // *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2005. **26**. N 1. P. 95.
7. Rosenau J., Bahar M.J., Wasillewski R., et al. // *Transplantation.* 2002. **73**. N 3. P. 386.
8. Van de Putte G., Kristensen G.B., Baekelandt M., Lie A.K., Holm R. // *Gynecol. Oncol.* 2004. **94**. N 2. P. 521.
9. Roa I.E., Villaseca M., Araya J.C., Roa J., Aretxabal X.U., Miranda M. // *Rev. Chil. Cir.* 2001. **53**. N 5. P. 504.

10. Dursun P., Yuce K., Usubutun A., Ayhan A. // Int. J. Gynecol. Cancer. 2007. **17**. N 4: 843.
11. Branca M., Ciotti M., Giorgi C., Santini D., Di Bonito L., Costa S., Benedetto A., Bonifacio D., Di Bonito P., Papa P., Accardi L., Syrjanen S., Favalli C., Syrjanen K. // Inter. J. Gynecol. Pathol. 2008. **27**. N 2. P. 265.
12. Laurson J., Khan S., Chung R., Cross K., Raj K. // Carcinogenesis. 2010. **31**. N 5. P. 918.
13. Branca M., Giorgi C., Ciotti M., Santini D., Di Bonito L., Costa S., Benedetto A., Bonifacio D., Di Bonito P., Papa P., Accardi L., Mariani L., Syrjanen S., Favalli C., Syrjanen K. // Eur J Gynaecol Oncol. 2006. **27**. N 3. P. 215.
14. Caberg J.H., Hubert P.M., Begon D.Y., Herfs M.F., Roncarati P.J., Boniver J.J. // Carcinogenesis. 2008. **29**. N 7. P. 1441.
15. Petrenko A., Korolenkova L., Skvortsov D., Fedorova M., Skoblov M., Baranova A., Zvereva M., Rubtsova M., Kissel'jov F. // Biochimie. 2010. **92**. N 12. P. 1827.

Поступила в редакцию 12.02.12

e-CADHERIN EXPRESSION IS BIOCHEMICAL MARKER IN CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA

L.I. Korolenkova, E.V. Stepanova, V.D. Ermilova, A.U. Barishnikov, V.V. Bryusgin

(Blokhin's Cancer Research Centre)

The original paper contains the results of immunohistochemical studies on e-cadherin expression in cervical intraepithelial neoplasia. To evaluate the quantitative expression was used avidin-biotin peroxidase method. Cervical intraepithelial neoplasias (CIN) are the lesions that for some years precede invasive cervical cancer. CIN outcomes are variable in terms of regression and progression rates. E-cadherin expression was tested in cervical tissues of CIN patients (81 sample) and HPV-infected women with no CIN (10 samples). Significant e-cadherin down-regulation was revealed in CIN3 samples in compare to CIN1-2 and «normal» epithelium. The marker should be considered as a useful tool in CIN grade assessment and individual outcome prognosis. These data open the way for the creation of new pharmaceuticals based on the search for compounds that affect the expression of e-cadherin.

Key words: *CIN, e-cadherin, progression markers, cervical cancer.*

Сведения об авторах: *Короленькова Любовь Ивановна* – ст. науч. сотр. поликлиники НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН канд. мед. наук (l.korolenkova@mail.ru); *Степанова Евгения Владиславовна* – зав. лабораторией биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза НИИ ДиЭТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, докт. мед. наук; *Ермилова Валерия Дмитриевна* – вед. науч. сотр. отдела патологической анатомии опухолей человека РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, канд. мед. наук; *Барышников Анатолий Юрьевич* – профессор, директор НИИ ЭД и ТО ГУ РОНЦ РАМН им. Н.Н. Блохина, руководитель лаборатории экспериментальной лабораторий и биотерапии опухолей, докт. мед. наук; *Брюзгин Владимир Васильевич* – профессор, зав. поликлиникой НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, докт. мед. наук.