

# ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 616-066.6:618.11-006.6:612.014.462:612.11

## РЕДОКС-ЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ В НЕОПЛАЗМЕ ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ\*

Д.Р. Долгова<sup>1</sup>, И.И. Антонеева<sup>1,2</sup>, Е.Г. Сидоренко<sup>1,2</sup>, Т.П. Генинг<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ульяновский государственный университет,

<sup>2</sup>Ульяновский областной клинический онкологический диспансер

Изучено изменение параметров системы «перекисное окисление липидов – антиоксиданты» и экспрессия bcl-2, Ki-67 в опухолевой ткани больных раком шейки матки на разных стадиях опухолевого процесса. Показано, что в неоплазме больных с распространенным опухолевым процессом наблюдается накопление ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов наряду с истощением ферментов 1 звена антиоксидантной защиты (СОД, каталазы), а также увеличение экспрессии bcl-2, Ki-67 в паренхиме и строме опухолевой ткани РШМ.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, оксидативный стресс, Ki-67, bcl-2.

**Введение.** Рак шейки матки (РШМ), несмотря на наличие сформировавшихся классических подходов в профилактике, диагностике и лечении, продолжает оставаться важнейшей проблемой онкологии, занимая второе место среди злокачественных новообразований женских репродуктивных органов [2; 20]. На протяжении 20 лет в Российской Федерации в соответствии с общей тенденцией развитых индустриальных стран отмечено постепенное снижение заболеваемости РШМ (стандартизированный показатель – 10,8) [14], однако четко прослеживается рост заболеваемости РШМ среди молодых женщин в возрастной группе до 40 лет, особенно заметный среди женского населения моложе 29 лет [13].

В Ульяновской области заболеваемость РШМ за период 2005–2009 гг. имеет выраженную тенденцию к увеличению. Прирост

заболеваемости за последние 5 лет составил 6,1 тыс. на 100 тыс. населения, в России – 0,9 тыс. на 100 тыс. [1].

Биологическое поведение опухолей, в том числе РШМ, остается в достаточной степени непредсказуемым даже для больных с одинаковой стадией заболевания. До настоящего времени одной из проблем в диагностике дисплазии и РШМ является отсутствие достоверных критериев, позволяющих объективизировать полученные патоморфологические данные и использовать их в качестве прогностических факторов при оценке течения РШМ [8; 12].

По современным представлениям, состояние системы «перекисное окисление липидов – антиоксиданты» (ПОЛ-АО) в организме играет важную роль в развитии опухолевого процесса. Накапливающиеся в литературе данные о молекулярных механизмах действия различных свободнорадикальных молекул свидетельствуют об их участии в регуляции роста и дифференцировки клеток [17]. Это стимулирует интерес к изучению

\* Работа поддержана грантом госзадания Минобрнауки РФ (№4.1219.2011), грантом Президента РФ (16.120.11-836-МК).

роли свободных радикалов в регуляции пролиферации опухолевых клеток в процессе развития неоплазмы [23]. Злокачественный рост, который является болезнью регуляции, в первую очередь регуляции размножения и дифференцировки, может сопровождаться изменениями или сбоями в работе системы ПОЛ-АО [4]. Автором кислородно-перекисной концепции канцерогенеза Б.Н. Лю высказано предположение о том, что результаты любых воздействий, интенсифицирующих свободнорадикальные процессы, должны проявиться прежде всего в клетках неоплазмы, поскольку именно они наиболее подготовлены к переходу в указанное состояние и, следовательно, объективно чувствительнее к подобным воздействиям [10; 11].

Постоянное образование прооксидантов в живых системах уравновешено той же скоростью их дезактивации антиоксидантами. Антиоксидантные ферменты (АОФ), контролируя концентрацию радикалов, могут выступать в качестве регуляторов пролиферации. Длительное локальное повышение антиоксидантной активности одновременно стимулирует свободнорадикальное окисление. Подобное физиологическое состояние клеток, сопряженное с нарушением нормальной регуляции свободнорадикальных реакций, называют «окислительным стрессом», являющимся универсальным механизмом клеточных повреждений [9; 22].

**Цель исследования.** Оценка редокс-зависимых процессов в неоплазме при прогрессировании рака шейки матки.

**Материалы и методы.** Материалом для данного исследования послужила опухолевая ткань от 60 больных РШМ и 20 больных с доброкачественными новообразованиями половых органов. Больные находились на обследовании и лечении в гинекологическом отделении Ульяновского областного клинического онкологического диспансера в 2009–2011 гг. У всех больных диагноз был подтвержден гистологическим исследованием. Стадирование осуществляли по системе FIGO. В первую клиническую группу вошли пациентки с начальным опухолевым процес-

сом (Ia), во вторую – с местноограниченным процессом (Ib-IIa), в третью – с распространенным процессом (IIb-IV). Гомогенат опухоли готовился на Tris-HCl-буфере (pH=7,4).

Интенсивность ПОЛ оценивали по уровню вторичного продукта – малонового диальдегида (МДА) в тесте с тиобарбитуровой кислотой [2]. Активность супероксид-дисмутазы (СОД) определяли по М. Nishikimi в модификации Е.Е. Дубининой [5; 21], каталазы, глутатион-редуктазы – по А.И. Карпищенко [6]; глутатион-S-трансферазы – по W.H. Habig [16]. Активность ферментов и содержание МДА в гомогенатах опухолевой ткани пересчитывалась на мг белка, определенного по методу Брэдфорда [15].

Иммуногистохимическое исследование было выполнено с использованием моно- и поликлональных антител для выявления онкобелков Bcl-2, Ki67 (фирма Dako). Bcl-2 обнаруживался с помощью моноклональных антител к Bcl-2, клон Bcl-2/100/D<sub>5</sub>, IgG<sub>i</sub> (NCL-bcl-2 Novocastra) в разведении 1:80 при инкубации 60 мин. Положительной считалась реакция при цитоплазматической и мембранной окраске более 10 % опухолевых клеток. Пролиферативная активность опухоли оценивалась как процент Ki-67-положительных клеток от общего числа опухолевых клеток. Bcl-2 обнаруживался с помощью моноклональных антител к bcl-2, клон Bcl-2/100/D<sub>5</sub>, IgG<sub>i</sub> (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 оценки достоверности различий данных в двух группах использовался непараметрический критерий Манна-Уитни (Stata 6.0).

**Результаты и обсуждение.** В опухолевой ткани у больных 1-й группы уровень МДА составил  $3,39 \pm 0,199$  мкмоль/мг белка, во 2-й группе –  $3,47 \pm 0,224$  мкмоль/мг белка, в 3-й –  $3,26 \pm 0,179$  мкмоль/мг белка, что значительно ( $p < 0,05$ ) отличалось от уровня МДА в ткани внешне неизменной шейки матки ( $2,11 \pm 0,131$  мкмоль/мг белка) (рис. 1).

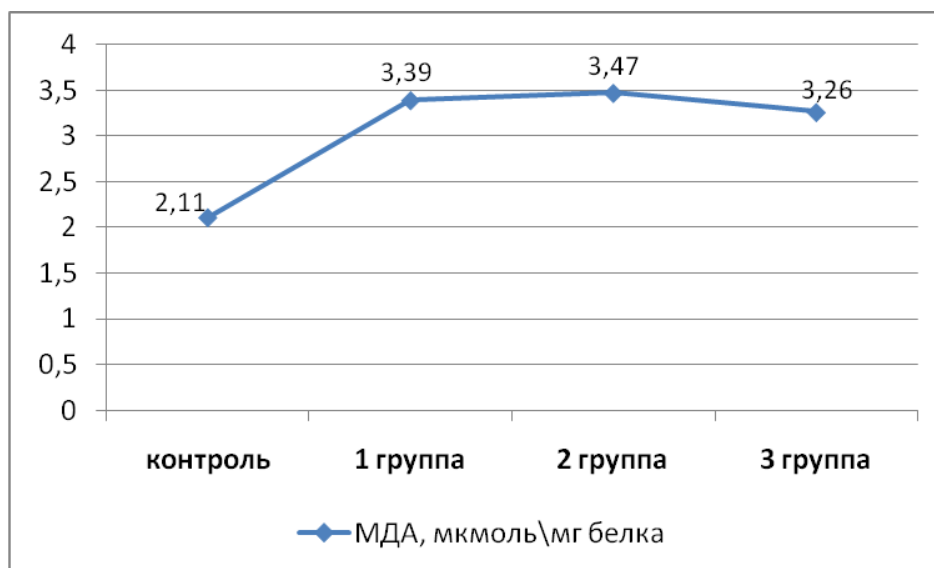


Рис. 1. Содержание МДА в опухолевой ткани при прогрессировании РШМ

Ключевым ферментом антиперекисной защиты клеток считают СОД, инактивирующую супероксид-анион-радикал и работающую в клетке в каскаде с ферментами, способными разлагать перекись водорода, – каталазой и пероксидазой. Активность СОД в опухолевой ткани, значительно повышенная ( $p < 0,05$ ) по отношению к группе сравнения у пациентов с начальным РШМ ( $3,21 \pm 0,246$  усл. ед./мг белка против  $0,71 \pm 0,169$  усл. ед./мг белка), снижается на стадии Ib-IIa до  $1,91 \pm 0,177$  усл. ед./мг белка и продолжает снижаться на стадиях Пь-IV ( $1,52 \pm 0,567$  усл. ед./мг белка). Сходная динамика активности имела место и для ка-

талазы опухолевой ткани. Незначительно повышенная ( $p > 0,05$ ) на начальной стадии заболевания ( $0,13 \pm 0,005$  ммоль/мг белка против  $0,12 \pm 0,003$  ммоль/мг белка в контроле) активность каталазы последовательно и значительно ( $p < 0,05$ ) снижалась на последующих стадиях заболевания ( $0,09 \pm 0,003$  ммоль/мг белка и  $0,07 \pm 0,003$  ммоль/мг белка при местнораспространенном и распространенном опухолевом процессах соответственно).

Установлено существенное и значимое ( $p < 0,05$ ) возрастание активности ферментов глутатионовой группы при прогрессировании РШМ (рис. 2).

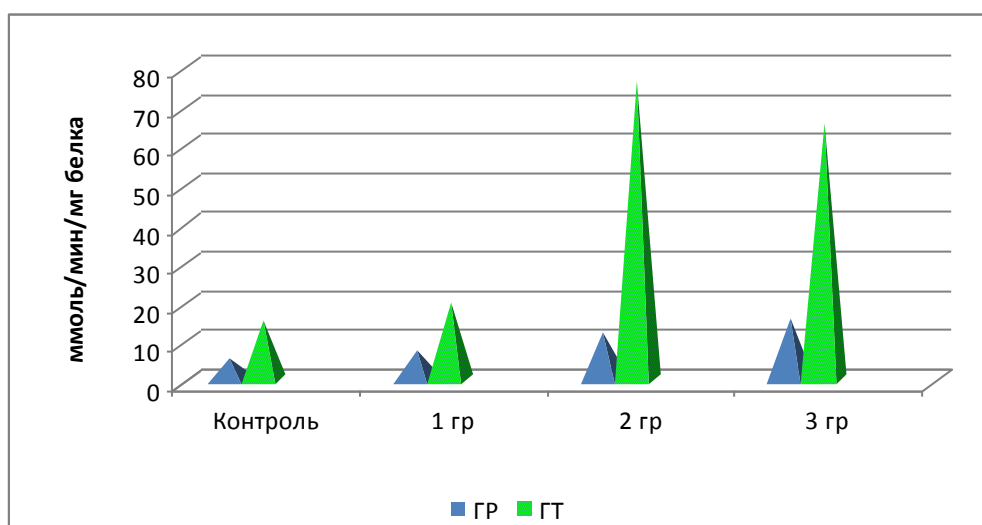


Рис. 2. Активность глутатион-зависимых ферментов в опухолевой ткани больных на разных стадиях РШМ

Активность ГР при РШМ Ia стадии составила  $7,23 \pm 0,389$  ммоль/мин/мг белка, при Ib-IIa стадиях –  $11,83 \pm 0,818$  ммоль/мин/мг белка, при IIb-IV стадиях –  $15,44 \pm 0,330$  ммоль/мин/мг белка против  $5,63 \pm 0,192$  ммоль/мин/мг белка в контроле. Активность ГТ при Ia РШМ составила  $19,41 \pm 1,985$  ммоль/мин/мг белка; при Ib-IIa стадиях она достигает  $76,09 \pm 4,894$  ммоль/мин/мг белка против  $15,24 \pm 0,286$  ммоль/мин/мг белка в контроле, оставаясь достоверно высокой ( $p < 0,05$ ) и при IIb-IV стадиях ( $65,46 \pm 1,826$  ммоль/мин/мг белка).

Таким образом, по мере прогрессирования опухолевого процесса при снижении активности СОД и каталазы имело место увеличение активности глутатион-зависимых ферментов. Существует мнение, что подобная динамика ферментативного звена антиоксидантной системы в злокачественных клет-

ках указывает на ведущую роль ГТ и ГР в инактивации пероксидов [3; 19]. Кроме того, снижение активности СОД и каталазы может свидетельствовать о снижении генерации  $H_2O_2$ , ингибирующей размножение клеток, в динамике прогрессии РШМ. Повышение содержания ГТ и ГР при одновременном снижении активности каталазы и СОД усиливает диспропорцию образования  $O_2$  и  $H_2O_2$ .

Иммуногистохимический анализ показал, что во внешне неизменной шейке матки Ki-67+ клетки в эпителии составили  $7,6 \pm 3,2$  %, в строме –  $3,0 \pm 0,4$  %. В 1-й группе пациенток Ki-67 экспрессировали  $93,3 \pm 3,2$  % клеток в эпителии и  $66,7 \pm 1,7$  % клеток в строме, у пациенток 2-й группы – в  $91,6 \pm 4,8$  % и  $40,0 \pm 1,4$  % соответственно. В 3-й группе больных экспрессия Ki-67 в клетках эпителии составила  $88,9 \pm 4,5$  %, в клетках стромы –  $66,7 \pm 3,1$  % (рис. 3).

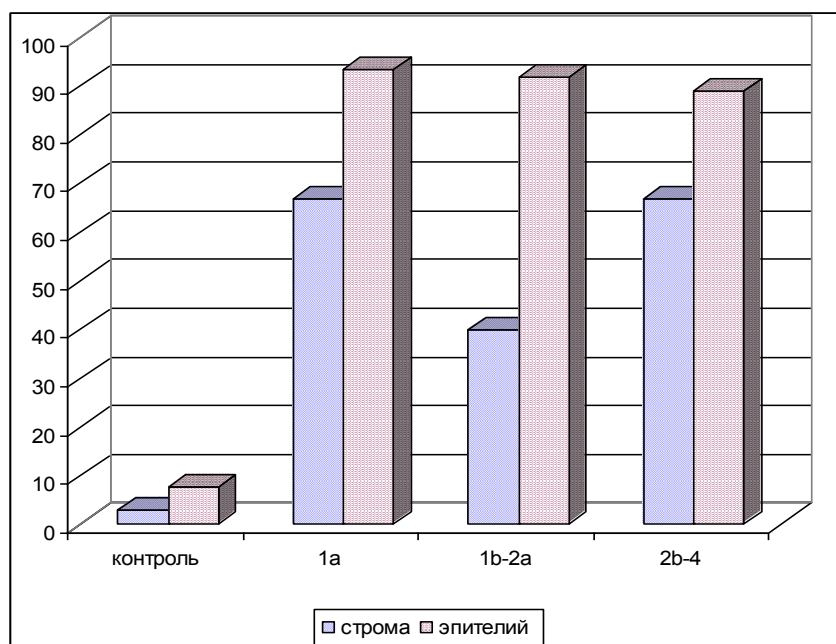


Рис. 3. Экспрессия Ki-67 в эпителии и строме шейки матки в динамике опухолевой прогрессии

Во внешне неизменной шейке матки Vcl-2 экспрессировали  $23,4 \pm 2,7$  % в эпителии и  $9,6 \pm 2,8$  % клеток в строме. Наблюдаются значимое усиление экспрессии Vcl-2 в эпителии при местноразличенном процессе по сравнению с начальным РШМ ( $66,7 \pm 5,8$  против  $33,3 \pm 2,5$  %) и внешне неизменной шейкой матки и последующее снижение экс-

прессии при распространенном процессе до  $33,3 \pm 3,1$  % (рис. 4). Динамика экспрессии Vcl-2 в строме аналогичная. При начальном РШМ Vcl-2+ клетки составили  $7,4 \pm 2,1$  %, при местно-ограниченном процессе –  $12,6 \pm 4,2$  %, при распространенном опухолевом процессе –  $8,0 \pm 2,6$  %.

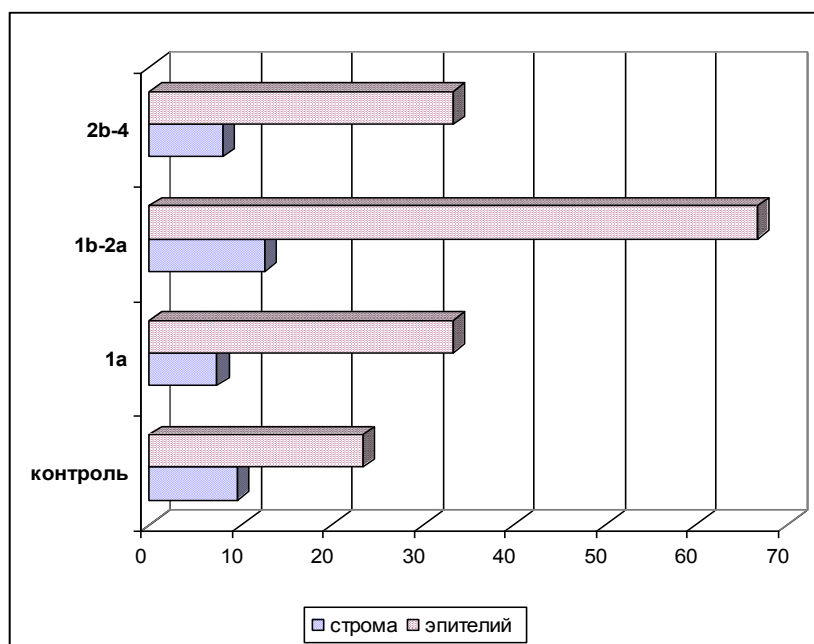


Рис. 4. Экспрессия Vcl-2 в эпителии и строме шейки матки в динамике опухолевой прогрессии

Таким образом, прогрессирование РШМ сопровождается повышением пролиферативной активности раковых клеток, наиболее выраженной при местно-ограниченном процессе. Также отмечено увеличение уровня Vcl-2, что говорит об усилении антиапоптотического фактора, что объясняет высокий злокачественный потенциал этих новообразований.

**Заключение.** Опухолевая трансформация сопровождается изменениями внутриклеточного метаболизма, в том числе образования и утилизации АФК. Нами показаны повышение активности СОД и каталазы в опухолевой ткани на стадии Ia и снижение их антиоксидантной активности при прогрессировании РШМ (Ib-IV стадиях). При этом наблюдается усиление активности ферментов глутатионовой системы – ГТ, ГР – и повышение уровня МДА. Снижение активности СОД – фермента, катализирующего в митохондриях реакцию дисмутации  $O_2$  с образованием  $H_2O_2$ , а также повышение активности глутатион-зависимых ферментов, ГТ и ГР, участвующих в разложении перекисей, может свидетельствовать о том, что количество супероксидного анион-радикала, усиливающего пролиферацию, возрастает, а количество  $H_2O_2$ , ингибирующей клеточную пролиферацию, значительно снижено.

Данные литературы свидетельствуют о том, что пролиферативный индекс служит независимым прогностическим показателем 5-летней общей и безрецидивной выживаемости пациенток РШМ [18; 19]. Нами установлено, что количество клеток Ki-67+ на всех клинических стадиях РШМ в эпителии значительно выше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с внешне неизменной шейкой матки и достоверно не изменяется при прогрессировании опухоли. Количество клеток, экспрессирующих Ki-67 в строме опухоли, также достоверно выше на всех клинических стадиях заболевания по сравнению с внешне неизменной шейкой матки.

Более чем в 2 раза повышен уровень экспрессии bcl-2 при местно-ограниченном процессе по сравнению с начальным и распространенным процессом. По мере нарастания неопластических изменений экспрессия bcl-2 уменьшается; таким образом, не выявлено прямой связи высокой пролиферативной активности эпителиальных клеток со сверхэкспрессией bcl-2.

Полученные результаты позволяют предположить, что при прогрессировании РШМ на фоне оксидативного стресса возникают популяции клеток со сниженным содержанием  $H_2O_2$  и высокой пролиферативной активностью.

1. *Андреева, Л.И.* Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // *Лабораторное дело.* – 1988. – №11. – С. 41–43.
2. *Антонеева, И.И.* Анализ заболеваемости раком шейки матки в Ульяновской области / И.И. Антонеева, Е.Г. Сидоренко, Т.П. Генинг // *Креативная хирургия и онкология.* – 2011. – №2. – С. 33–35.
3. *Горожанская, Э.Г.* Роль глутатион-зависимых пероксидаз в регуляции утилизации липопероксидов в злокачественных опухолях / Э.Г. Горожанская, В.Б. Ларионова, Г.Н. Зубрихина // *Биохимия.* – 2001 – Т. 66, вып. 2. – С. 273–278.
4. *Горожанская, Э.Г.* Содержание глутатиона и активность глутатиона-S-трансферазы как фактор прогноза эффективности лекарственной терапии больных раком яичников / Э.Г. Горожанская, В.Б. Ларионова, Г.Н. Зубрихина // *Российский онкологический журн.* – 2002. – №5. – С. 29–32.
5. *Дубинина, Е.Е.* Биологическая роль супероксидного анион-радикала и супероксиддисмутазы в тканях организма / Е.Е. Дубинина // *Успехи современной биологии.* – 1989. – Т. 108, вып. 1 (4). – С. 3–18.
6. *Карпищенко, А.И.* Медицинские лабораторные технологии и диагностика : справ. : в 2 т. / А.И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 1999. – 564 с.
7. *Кезик, В.* Скрининг рака шейки матки / В. Кезик // *Практическая онкология.* – 2009. – Т. 30, №2. – С. 59–61.
8. *Козаченко, А.В.* Новые направления в диагностике и лечении микрокарциномы шейки матки / А.В. Козаченко // *Акушерство и гинекология.* – 2006. – Прил. 2. – С. 56–59.
9. *Крыжановский, Г.Н.* Введение в общую патофизиологию / Г.Н. Крыжановский. – М. : РГМУ, 2000. – 71 с.
10. *Лю, Б.Н.* Физико-химические и биокрибернетические аспекты онкогенеза / Б.Н. Лю, Е.М. Шайхутдинов. – Алма-Ата : Гылым, 1991. – 270 с.
11. *Лю, Б.Н.* Старение, возрастные патологии и канцерогенез (кислородно-перекисная концепция) / Б.Н. Лю. – Алматы : КазНТУ, 2003. – 706 с.
12. *Пожарисский, К.М.* Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний / К.М. Пожарисский, Е.А. Самсонова, В.П. Тен // *Архив патологии.* – 2005. – №2. – С. 13–17.
13. *Ременник, Л.В.* Злокачественные новообразования женских половых органов в России / Л.В. Ременник, Е.Г. Новикова, В.Д. Мокина // *Российский онкологический журн.* – 1997. – №6. – С. 4–8.
14. *Чиссов, В.И.* Злокачественные новообразования в России накануне XXI века как медицинская и социальная проблема / В.И. Чиссов, В.В. Старинский, Л.В. Ременник // *Российский онкологический журн.* – 1998. – №3. – С. 8–20.
15. *Bradford, M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
16. *Habig, W.H.* Glutathione-S-transferase: a novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration / W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby // *J. Biol. Chem.* – 1974. – Vol. 249 (22). – P. 7140–7147.
17. *Harris, S.R.* Oxidative stress contributes to the antiproliferative effects of flavone acetic acid on endothelial cells / S.R. Harris, N.J. Panaro, U.P. Thorgeirsson // *Anticancer. Res.* – 2000. – Vol. 20, №4. – P. 2249–2254.
18. *Keating, J.T.* Ki-67, cyclin E and p16INK4 are complementary surrogate biomarkers for human papillomavirus-related cervical neoplasia / J.T. Keating, A. Cvico, S. Riethdorf // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2001. – Vol. 25. – P. 421–426.
19. *Liu, S.S.* Anti-apoptotic proteins, apoptotic significance in cervical carcinoma / S.S. Liu, B.K. Tsang, A.N. Cheung et al. // *Europ. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 37. – P. 1104–1110.
20. *Molecular detection of human papillomavirus in women with minor grade cervical cytology abnormalities / A. Vince et al. // J. Clin. Virol.* – 2001. – Vol. 20, №1–2. – P. 11–16.
21. *Nishikimi, M.* The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenacine-methosulfate and molecular oxygen / M. Nishikimi, N. Appa, K. Yagi // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1972. – Vol. 46. – P. 849–854.
22. *Superoxide radical production stimulates retroocular fibroblast proliferation in Graves ophthalmopathy / H.B. Burch et al. // Int. J. Biochem.* – 1998. – Vol. 20. – P. 569–580.
23. *Suzuki, Y.* Rapid and specific reactive oxygen species generation via NADPH-oxidase activation during FAS-mediated apoptosis / Y. Suzuki, Y. Ono, Y. Hirabayashi // *FEBS Lett.* – 1998. – Vol. 425, №2. – P. 209–212.

## REDOX-DEPENDENT PROCESSES OF NEOPLASM IN THE CERVICAL CANCER PROGRESSION

D.R. Dolgova<sup>1</sup>, I.I. Antoneeva<sup>1,2</sup>, E.G. Sidorenko<sup>1,2</sup>, T.P. Gening<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Ulyanovsk State University,*

<sup>2</sup>*Ulyanovsk Regional Clinical Cancer Center*

The parameters of system «lipid peroxidation – antioxidants» and the bcl-2, Ki-67 expression in tumor tissue of patients with cervical cancer at different stages of cancer was studied. It is shown that in neoplasm of patients with common neoplastic process the accumulation of TBA-active products of lipid peroxidation, along with the depletion of antioxidant enzymes, a defense (SOD and catalase) as well as increased expression of bcl-2, Ki-67 in the parenchyma and stroma of the tumor tissue cervical cancer was observed.

**Keywords:** cervical cancer, oxidative stress, Ki-67, bcl-2.