

Т.Е. Белокриницкая¹, Ю.Н. Пономарева¹, Г.М. Ломнева², Е.В. Вологдин³

ИССЛЕДОВАНИЕ МУТИРОВАННОГО ГЕНА-СУПРЕССОРА P53, АНТИГЕНА ЯДЕР ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ КЛЕТОК И ОНКОГЕНА C-ERB-B2 В ОПРЕДЕЛЕНИИ ПРОГНОЗА ОПУХОЛЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ

¹Читинская государственная медицинская академия (Чита)

²Читинский областной медицинский диагностический центр (Чита)

³Читинский областной онкологический диспансер (Чита)

Предмет изучения. Прогностическое исследование мутированного гена-супрессора p53 (p53mut), антигена ядер пролиферирующих клеток (PCNA) и онкогена C-erb-B2 при опухолях шейки матки.

Материалы и методы. Для иммуногистохимического исследования были использованы биоптаты 112 пациенток с цервикальными опухолями. Определение экспрессии p53mut, PCNA и C-erb-B2 проводили моноклональными антителами («Dako», Дания).

Результаты. Установлено, что общая 5-летняя выживаемость больных с цервикальными опухолями была достоверно выше при низкой экспрессии p53mut, PCNA и C-erb-B2. При проведении анализа зависимости благоприятного прогноза от указанных иммуногистохимических параметров было выявлено, что продолжительность жизни больных раком шейки матки обратно пропорциональна уровню экспрессии p53mut, PCNA и C-erb-B2.

Заключение. Таким образом, результаты проведенного нами исследования могут быть использованы для индивидуального прогнозирования течения цервикальных карцином.

Ключевые слова: шейка матки, рак, прогноз, иммуногистохимия

THE STUDY OF MUTANT SUPPRESSOR GENE P53, PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN AND ONCOGENE C-ERB-B2 IN DEFINING THE PROGNOSIS OF CERVICAL CANCER

T.Ye. Belokrinitskaya¹, Yu.N. Ponomaryova¹, G.M. Lomneva², Ye.V. Vologdin³

¹Chita State Medical Academy, Chita

²Chita Regional Medical Diagnostic Centre, Chita

³Chita Regional Oncologic Centre, Chita

The subject of study. There was a prognostic investigation of mutant suppressor gene p53 (p53mut), Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and oncogene C-erb-B2 in cervical cancer.

Materials and methods. There were used biopstates of 112 patients with cervical cancer under immunohistochemical investigation. The defining of p53mut, PCNA and C-erb-B2 expression was held with monoclonal antibodies («Dako», Denmark).

Results. It was established that general 5-year survival of patients with cervical cancer was statistically higher under low expression of p53mut, PCNA and C-erb-B2. It was indicated that life duration of patients with cervical cancer was in back ration to level of p53mut, PCNA and C-erb-B2 expression in analyzing the dependence of favourable prognosis on stated immunohistochemical parameters.

Conclusion. The results of this investigation may be used for individual prognosis for development of cervical carcinomas.

Key words: cervix uteri, cancer, prognosis, immunohistochemistry

Опухоли шейки матки относятся к группе наиболее часто встречающихся новообразований женских половых органов [1]. Часть опухолей отличается агрессивным развитием, быстрым метастазированием, неблагоприятным прогнозом, другая часть, напротив, характеризуется длительным, безрецидивным течением [3].

Перспективным является поиск прогностических факторов течения цервикального рака. Иммуногистохимическое типирование опухолей шейки матки с использованием молекулярно-биологических маркеров позволяет не только классифицировать раки по критериям клеточной дифференцировки, но и оценивать прогноз заболевания [2, 3, 4].

Одним из критериев опухолевой прогрессии считается мутация гена-супрессора p53, что ассоциировано с агрессивным течением рака в результате блокирования некоторых форм апоптоза. Антиген ядер пролиферирующих клеток, экспрессирующийся практически во всех фазах митотического цикла, является одним из маркеров пролиферативной активности клеточного пула. В свою очередь, экспрессия онкогена C-erb-B2, являющегося рецептором эпидермального фактора роста, придает клеткам свойство неограниченного деления [2, 5, 8].

Целью исследования явилось изучение роли мутированного гена-супрессора p53 (p53mut), антигена ядер пролиферирующих клеток (PCNA) и онкогена C-erb-B2 в прогнозе опухолей шейки матки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В проведенное ретроспективное клинико-морфологическое исследование были включены 112 пациенток с цервикальными опухолями, находившиеся на лечении в областном онкологическом диспансере г. Читы в 1998 – 2000 гг.

Возраст женщин варьировал от 17 до 52 лет, в среднем составляя $38,4 \pm 12,1$ года. По стадиям заболевания больные были распределены следующим образом: внутриэпителиальный рак – 28 ($25,0 \pm 4,1$ %) больных, I стадия – 32 ($28,6 \pm 4,3$ %), II стадия – 23 ($20,5 \pm 3,8$ %) и III стадия – 29 ($25,9 \pm 4,1$ %) пациенток. Стадирование рака шейки матки проводилось в соответствии с гистологической классификацией опухолей женского полового тракта ВОЗ (1995), классификацией по системе TNM и по системе FIGO (1997). Диагностика цервикальных карцином основывалась на результатах объективного исследования, кольпоскопии, цитогистологического и иммуногистохимического методов исследования. В качестве контроля был взят операционный материал – биоптаты здоровых тканей шейки матки 30 пациенток.

При изучении экспрессии p53mut, PCNA и C-erb-B2 использовали образцы тканей шейки матки, полученных при биопсии до проводимого лечения и во время операции по поводу цервикального рака. Иммуногистохимическое исследование p53mut, PCNA и C-erb-B2 проводили стрептавидин-биотином-пероксидазным методом в лаборатории патоморфологии областного диагностического центра г. Читы. Определение экспрессии p53mut, PCNA и C-erb-B2 проводили на серийных парафиновых срезах с помощью моноклональных антител к p53mut (клон D07, разведение 1:100, фирма «Дако», Дания), PCNA (клон PC-10, разведение 1:100, фирма «Дако», Дания), C-erb-B2 (поликлон, разведение 1:200, фирма «Дако», Дания) [4].

Подсчет проводили в 10 произвольно выбранных полях зрения при 400-кратном увеличении. Индексы мечения p53mut и PCNA рассчитывали как отношение числа позитивно окрашенных ядер к общему числу ядер [3]. При определении экспрессии C-erb-B2 использовали полуколичественный метод по интенсивности окрашивания мембран клеток: (+) – слабая реакция, (++) – умеренная и (+++) – выраженная реакция [6].

Статистический анализ данных проводили с применением программы Statistica 6. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – ошибка среднего. Для оценки статистически значимых различий полученных данных использовали критерий Фишера, критический уровень значимости принимался менее или равным 0,05. Анализ выживаемости проводили при помощи метода Каплана – Мейера, при сравнении выживаемости использовали критерий Кокса [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении иммуногистохимического исследования было установлено, что частота обна-

ружения p53mut в опухолях шейки матки составляла $33,9 \pm 4,5$ % (38), уровень экспрессии в среднем был $16,2 \pm 5,5$ % (рис. 1).

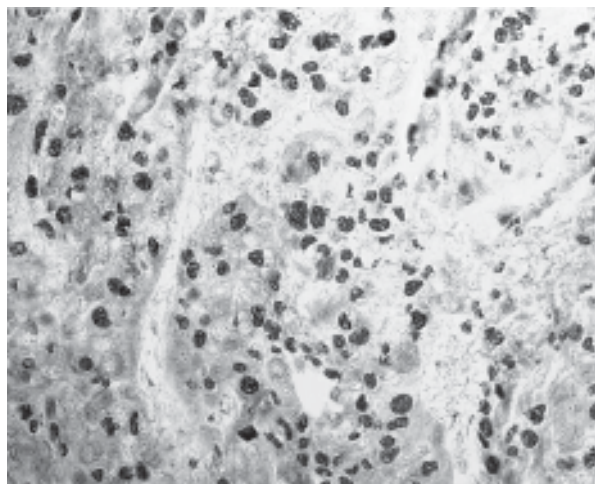


Рис. 1. Экспрессия p53mut в опухолевых клетках низкодифференцированного плоскоклеточного рака шейки матки. Стрептавидин-биотиновый метод, хромоген-диаминобензидин, $\times 400$.

У больных в группе с прогрессированием и рецидивированием заболевания экспрессия p53mut была значительно выше по сравнению с пациентками без появления метастазов и рецидива: $20,1 \pm 6,5$ % и $12,3 \pm 4,1$ % соответственно. Кроме того, процент цервикальных опухолей, экспрессировавших p53mut, также был выше при неблагоприятном клиническом течении рака – $43,8 \pm 4,7$ % (49) против $23,2 \pm 4,0$ % (26) в группе без прогрессирования злокачественного процесса. В контрольной группе экспрессии p53mut обнаружено не было.

Экспрессия PCNA была обнаружена во всех образцах здоровых тканей шейки матки и опухолей с сопоставимой разницей экспрессии этого антигена: $5,5 \pm 1,5$ % против $53,2 \pm 9,0$ % (рис. 2).

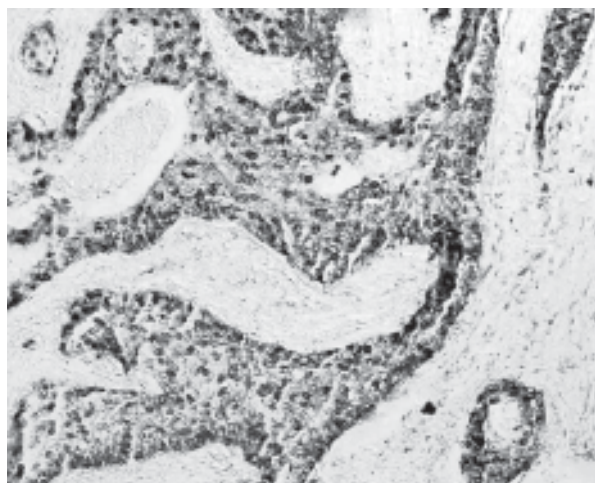


Рис. 2. Экспрессия PCNA в ядрах плоскоклеточного рака шейки матки. Стрептавидин-биотиновый метод, хромоген-диаминобензидин, $\times 400$.

Уровень экспрессии PCNA был значительно выше в группе больных с появлением метастазов и рецидива – $66,2 \pm 16,2$ % по сравнению с груп-

пой пациенток с позитивным прогнозом $33,4 \pm 16,6$.

Определение C-erb-B2-позитивных клеток было отмечено в $20,5 \pm 3,8\%$ (23) случаев цервикального рака. При определении прогноза заболевания в зависимости от экспрессии c-erb-B2 было установлено, что среди опухолей с развитием рецидива и метастазов преобладали опухоли с выраженной и умеренной экспрессией этого онкогена (рис. 3), в свою очередь, в группе больных с безрецидивным и безметастатическим течением преобладающей была слабая C-erb-B2.

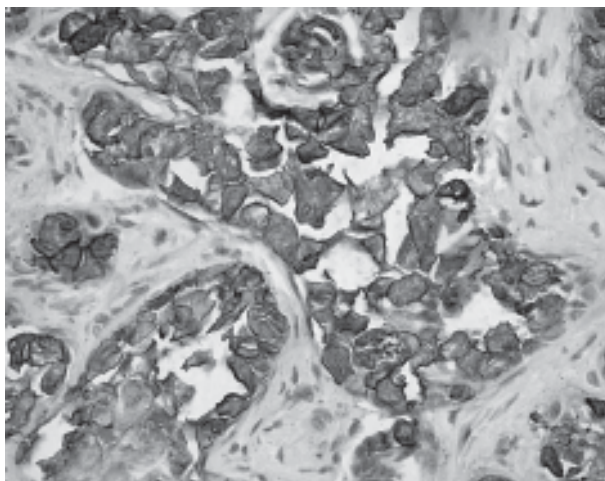


Рис. 3. Экспрессия C-erb-B2 в клетках плоскоклеточного рака шейки матки. Стрелтавидин-биотиновый метод, хромоген-диаминобензидин, $\times 400$.

Таким образом, общая 5-летняя выживаемость больных с цервикальными опухолями оказалась достоверно выше при низкой экспрессии p53mut (рис. 4), PCNA (рис. 5) и C-erb-B2 (рис. 6). При проведении однофакторного анализа зависимости благоприятного прогноза от указанных иммуногистохимических параметров было установлено, что продолжительность жизни больных раком шейки матки обратно пропорциональна уровню экспрессии мутированного гена-супрессора p53, антигена ядер пролиферирующих клеток и онкогена C-erb-B2.

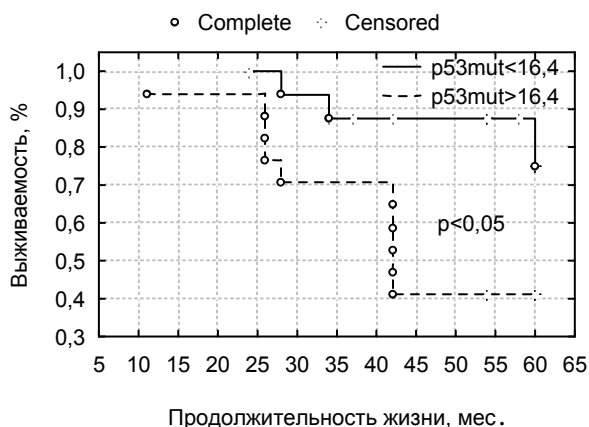


Рис. 4. Общая выживаемость больных с цервикальными опухолями в зависимости от экспрессии p53mut.

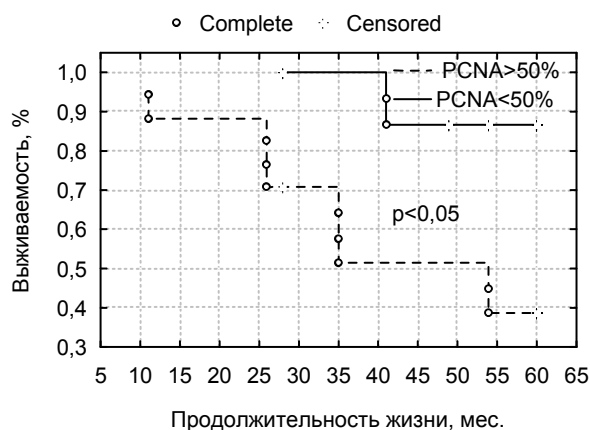


Рис. 5. Общая выживаемость больных с цервикальными опухолями в зависимости от экспрессии PCNA.

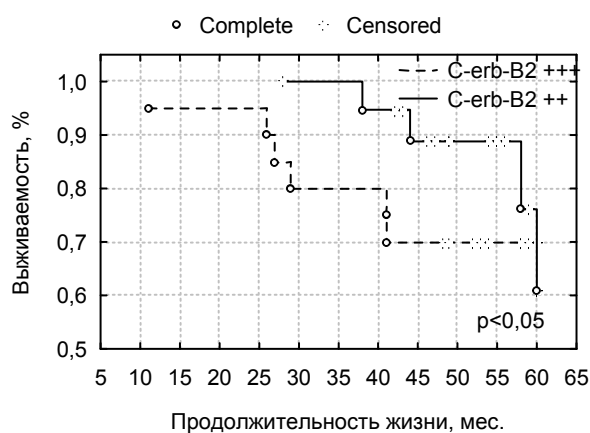


Рис. 6. Общая выживаемость больных с цервикальными опухолями в зависимости от экспрессии онкогена C-erb-B2.

Результаты проведенного нами исследования могут быть использованы для индивидуального прогнозирования течения цервикальных карцином. Пациентки, имеющие опухоли с высокой экспрессией p53mut, PCNA и C-erb-B2, составляют группу риска по прогрессированию рака шейки матки. Особую значимость определяемые иммуногистохимические параметры приобретают на доклиническом этапе опухолевой прогрессии, когда, возможно, уже имеются, но еще клинически не проявились признаки агрессивного поведения рака.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петрова Г.В. Показатели онкологической помощи больным раком шейки матки в России / Г.В. Петрова // Российский онкологический журнал. — 2003. — № 5. — С. 36—39.
2. Пожариский К.М. Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний / К.М. Пожариский, Е.Е. Леенман // Архив патологии. — 2000. — Т. 62, № 5. — С. 3—11.
3. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека // Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. — Казань, 2004. — 456 с.

4. Хариет Э.Р. Иммуноцитохимия: электронная микроскопия / Э.Р. Хариет, К.С. Гаттер // Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. — М.: Мир, 1999. — 558 с.
5. Швемберг И.Н. Апоптоз: роль в нормальном онтогенезе и патологии / И.Н. Швемберг, Л.Б. Гинкул // Вопросы онкологии. — 2002. — Т. 48, № 2. — С. 153–158.
6. Эллиниди В.Н. Практическая иммуноцитохимия / В.Н. Эллиниди, Н.В. Аникеева, Н.А. Максимова. — СПб.: ВЦЭРМ МЧС России, 2002. — 36 с.
7. Юнкеров В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев. — СПб.: ВМедА, 2002. — 266 с.
8. Predictors of outcome in small cell carcinoma of the cervix — a case series / J.M. Jr. Straughn, H.E. Richter, M.G. Conner et al. // Gynecol. Oncol. — 2001. — N 83 (2). — P. 216–220.