

ВЗАИМОСВЯЗЬ АПОПТОЗА И НЕОАНГИОГЕНЕЗА С АКТИВНОСТЬЮ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА ЭСТРОГЕНОВ В ОПУХОЛЯХ ЭНДОМЕТРИЯ

Н.Г. Крицкая, Н.В. Бочкарева, И.В. Кондакова, Л.А. Коломиец,
А.Л. Чернышова, О.В. Савенкова, А.Б. Мунтян

ГУ «НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН», г. Томск

Проблема патогенеза предрака и рака эндометрия (РЭ) в течение многих лет ассоциируется с развитием «эстрогенной теории» [1, 16]. Определенное значение в модуляции эстрогенного сигнала в эндометрии придается ферментам метаболизма эстрогенов (ароматаза, стероид сульфатаза, эстроген гидроксилазы, катехол-О-метилтрансфераза (КОМТ), глутатион-S-трансфераза (ГТ) и др.). В настоящее время канцерогенез рассматривается как многоступенчатый процесс накопления различных генетических повреждений, приводящих к нарушениям регуляции клеточного цикла, апоптоза, утрате способности к полной дифференцировке и связанных с инвазивным ростом неоангиогенезом и метастазированием [4]. Особую актуальность представляют исследования, посвященные изучению активности ферментов метаболизма эстрогенов во взаимосвязи с экспрессией белков-регуляторов клеточного цикла, апоптоза, пролиферации и ангиогенеза в малигнизированном эндометрии для понимания их роли в патогенезе РЭ. Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение экспрессии маркеров апоптоза, неоангиогенеза и p53 во взаимосвязи с экспрессией рецепторов стероидных гормонов и активностью ферментов синтеза и метаболизма эстрогенов в опухолях эндометрия.

В 31 опухоли эндометрия изучена экспрессия онкосупрессорного протеина p53, про- и антиапоптотических белков Bax и Bcl-2, а также рецепторов эстрогенов (ER) и прогестерона (PR). Проводилась оценка ангиогенеза в опухоли путем подсчета количества микрососудов, окрашенных антителами к эндотелиальным клеткам (CD31). В этих же опухолях была оценена активность ферментов метаболизма эстрогенов (ароматазы, стероид сульфатазы, суммарной эстроген 2/4-гидроксилазной активности, КОМТ и ГТ). Средний возраст пациенток составил $58,1 \pm 2,1$ года. Иммуногистохимические исследования и определение активности ферментов выполнены у больных РЭ, которые в основ-

ном находились в постменопаузе, около 29 % пациенток были перименопаузального возраста. Доминировали пациентки с I стадией заболевания, II стадию заболевания имели 35 % больных.

Иммуногистохимические исследования проводили пероксидазно-антипероксидазным методом по традиционной методике. Демаскировку антигенов осуществляли в микроволновой печи. Использовали антитела фирм «Dako» (ER, PR), «Новокастра» (Bcl-2, CD31, p53) и «BD Biosciences-Pharmingen» (Bax). При интерпретации результатов распределения продуктов иммуногистохимической реакции учитывали локализацию и интенсивность окрашивания. Рецептор-положительными считали опухоли, в которых выявлялось более 5–10 % четко окрашенных ядер. При постановке иммуногистохимической реакции с антителами к Bcl-2 и Bax цитоплазматическое и мембранное окрашивание 20 % и более опухолевых клеток принимали за положительную реакцию [7]. Опухоли считали положительными по экспрессии p53 при окрашивании более 25 % опухолевых клеток [17]. Оценка неоангиогенеза в опухолях проводилась путем подсчета количества микрососудов, окрашенных антителами CD31. В препаратах, окрашенных с помощью этого антитела, подсчитывали количество микрососудов в опухоли не менее чем в 10 полях зрения при увеличении 400. Измерение проводили с помощью сетки окуляр-микрометра, имеющей по 17 горизонтальных и вертикальных линий. Подсчитывали число открытых концов микрососудов. Количество сосудов в опухоли менее 10 принимали за низкую плотность микрососудов, 10 и более относили к умеренной и высокой плотности сосудов в опухоли.

Активность ферментов метаболизма эстрогенов определяли в образцах опухоли, которые брали во время операций и хранили в жидком азоте до исследования. Активность ароматазы оценивалась по об-

разованию тяжелой воды из меченного тритием в 1-в-положении андростендиона в описанной ранее модификации [6]. Счет радиоактивности производили на тритиевом канале жидкостного сцинтилляционного счетчика MICROBETA (Perkin Elmer, США). Активность ароматазы выражали в фмоль андростендиона/мг белка в час. Активности стероид сульфатазы оценивали радиометрическим методом [9] и выражали в фмоль эстрон сульфата/мг белка в час. Суммарную активность 2/4-эстроген гидроксилаз определяли радиоферментативным методом и выражали в пмоль метоксиэстрогенов/мг белка в час [15]. Активность КОМТ определяли радиометрическим методом [18] и выражали в мкмоль гваякола/мг белка в час. Активность ГТ определяли по образованию хромогенных конъюгатов глутатиона с 1-хлоро-2,4-динитробензолом, регистрируемого спектрофотометрически при длине волны 340 нм [5]. Активность фермента выражали в мкмоль ХДНБ-SG/ мг белка в мин. Белок в пробах определяли по методу Lowry. Статистическая обработка выполнена с использованием критерия Манна – Уитни и точного критерия Фишера. Результаты представлены в таблицах в виде $M \pm m$, где M – среднее выборочное, m – ошибка среднего.

По результатам иммуногистохимического окрашивания срезов на протоонкоген Bcl-2 вся группа больных РЭ была разбита на 2 подгруппы – с экспрессией Bcl-2 (Bcl-2-позитивные опухоли, $n=19$) и Bcl-2-негативные опухоли ($n=12$). Исследование показало, что в Bcl-2-позитивных и Bcl-2-негативных опухолях эндометрия примерно с одинаковой частотой выявлена умеренная и высокая экспрессия Вах. Примерно в трети опухолей, как Bcl-2-позитивных, так и Bcl-2-негативных, выявлен мутантный p53. В Bcl-2-позитивных опухолях преимущественно выявлялась высоко-развитая сеть кровеносных сосудов (более чем в 73 % случаев), в то время как в Bcl-2-негативных опухолях эндометрия в основном выявлялась низкая плотность сосудов. Опухоли, экспрессировавшие Bcl-2, как правило, содержали PR-рецепторы в отличие от Bcl-2-негативных опухолей эндометрия. При изучении активности ферментов синтеза и метаболизма эстрогенов было выявлено, что в Bcl-2-позитивных активность стероид сульфатазы была статистически значимо выше по сравнению с Bcl-2-негативными опухолями.

При проведении корреляционного анализа были выявлены статистически значимые корреляционные

взаимосвязи между экспрессией Bcl-2 и PR-рецепторами ($r=0,462$, $p=0,009$), экспрессий Bcl-2 и значением плотности микрососудов в опухоли ($r=0,477$, $p=0,007$), экспрессий Вах и возрастом больных ($r=0,580$, $p=0,038$), активностью стероид сульфатазы и экспрессий ER ($r=0,464$, $p=0,049$), активностью ГТ и экспрессий PR ($r=0,589$, $p=0,008$). Корреляционная взаимосвязь между активностью стероид сульфатазы и экспрессией Bcl-2 не достигала статистически значимого уровня. Полученные данные свидетельствуют об определенной дифференциации злокачественных новообразований эндометрия в зависимости от уровня экспрессии Bcl-2. Анализируя выраженность неоангиогенеза и активность ферментов синтеза и метаболизма эстрогенов в опухолях, можно отметить, что, по-видимому, Bcl-2-позитивные опухоли являются более агрессивными по своему биологическому потенциалу, поскольку в этих опухолях наряду с высоким уровнем синтеза эстрогенов выявлялся также высокий уровень неоангиогенеза, причем в подавляющем большинстве эти опухоли несли PR.

Необходимо отметить, что, согласно современной модели регуляции апоптоза, отношение уровня экспрессии белков семейства Bcl агонистов (Вах и др.) и антагонистов (Bcl-2) апоптоза – важный, но не единственный момент, определяющий развитие апоптоза клеток. Существует определенная взаимосвязь между митохондриальным и опосредованным через фактор некроза опухоли путями апоптоза опухолевых клеток [2]. Анализ литературы по апоптозу при РЭ показал, что хорошо изучены лишь отдельные звенья как рецептор-лиганд опосредованного, так и митохондриального механизмов апоптоза. Выявлено, что в опухолях эндометрия, в отличие от нормального, атрофического или гиперплазированного эндометрия, экспрессия Вах и каспазы-3 была высокой и выявлялась в 88 % и 77 % случаев соответственно [11], что полностью согласуется с полученными в нашем исследовании результатами. Показано, что экспрессия Bcl-2, Вах и индекс Bcl-2/Вах не обладают прогностической значимостью в отношении злокачественных опухолей эндометрия [11]. Экспрессия Bcl-2 в аденокарциномах не связана с экспрессией p53, однако положительно коррелирует с PR [12].

Поскольку в нашем исследовании была выявлена достаточно четкая зависимость между экспрессией Bcl-2 и степенью неоангиогенеза, следующим этапом

нашего исследования был анализ экспрессии изучаемых маркеров и активности ферментов синтеза и метаболизма эстрогенов в опухолях эндометрия с различной интенсивностью ангиогенеза. В опухолях с низким уровнем неоангиогенеза Bcl-2 экспрессировался несколько реже, чем в опухолях с умеренным и высоким ангиогенезом. При анализе активности ферментов синтеза и метаболизма эстрогенов выявлено, что в опухолях эндометрия со слабым кровоснабжением активность стероид сульфатазы была статистически значимо ниже по сравнению с опухолями с умеренным и высоким ангиогенезом и составила $56,3 \pm 13,3$ и $107 \pm 19,0$ фмоль эстрон сульфа-

та/мг белка в час соответственно ($p=0,048$).

Полученные данные свидетельствуют, что неоангиогенез и апоптоз в опухолях эндометрия тесно связаны с активностью фермента синтеза эстрогенов стероид сульфатазой, а также с наличием ER и PR в опухоли. В опухолях, экспрессирующих Bcl-2, как правило, выявлялась умеренная или высокая плотность микрососудов, что, по данным ряда авторов, ассоциируется с худшим прогнозом для пациентов [14]. Кроме того, в этих опухолях интенсивность стероид сульфатаза-зависимого пути была выше, чем в Bcl-2-негативных опухолях. Эстрогены для большинства опухолей эндометрия являются митогенами, кроме того,

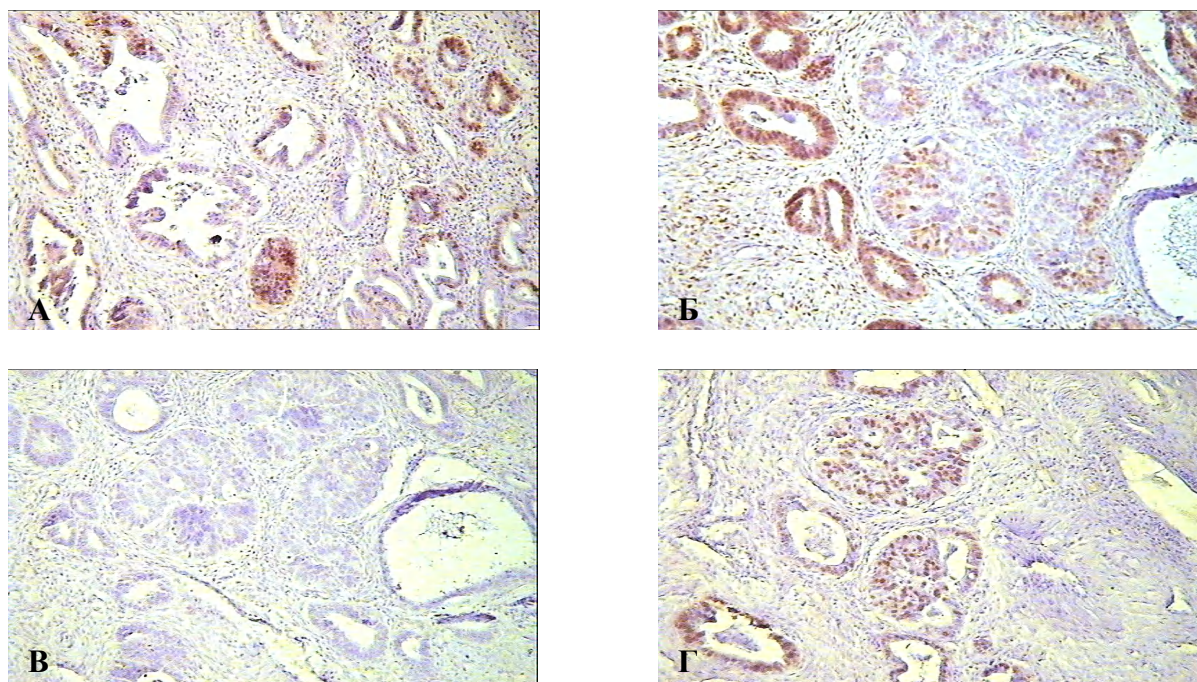


Рис. 1. Микрофото. Умереннодифференцированная аденокарцинома тела матки у больной Н.: а) ядерная реакция на эстрогеновые рецепторы, $\times 400$; б) позитивная реакция на прогестероновые рецепторы в ядрах опухолевых клеток, $\times 160$; в) иммуногистохимическая реакция с антителами к протеину Bcl-2, $\times 160$; г) экспрессия мутантного белка p53 ядрами большинства клеток опухоли, $\times 160$

доказан прямой генотоксический эффект эстрогенных метаболитов [1]. Bcl-2-позитивные опухоли в основном несли PR, однако в отношении ER картина была мозаичной и большинство опухолей не экспрессировали ER. Отсутствие ER в эндометриальной

аденокарциноме тела матки сопровождается нарастанием рецидивов с 12,7 до 29 % и в целом связано с более неблагоприятным прогнозом [8]. Таким образом, совокупность полученных результатов и данных литературы позволяет предположить более неблагоп-

приятный прогноз у группы больных с экспрессией Bcl-2, умеренной и высокой плотностью микрососудов в опухоли, отсутствием ER и высокой активностью стероид сульфатазы.

В то же время ряд клинических случаев полностью не укладывается в данную схему. В нашей клинической практике встретилась больная Н., 52 года. Поступила в НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН с диагнозом рак эндометрия. По данным морфологического исследования соскоба эндометрия на фоне железисто-фиброзного полипа выявлен участок умереннодифференцированной аденокарциномы. Из анамнеза выявлено, что в течение 2 мес беспокоят сукровичные выделения из половых путей на фоне менопаузы 2 лет. В анамнезе у пациентки 11 беременностей, 4 родов и 7 аборт. 22.02.05 выполнена операция – экстирпация матки с придатками. Гистологическое заключение: умереннодифференцированная аденокарцинома эндометрия на фоне железисто-фиброзного полипа без инвазии в миометрий. Активность стероид сульфатазы в опухоли составила 50 фмоль эстрон сульфата/мг белка в час. В опухоли выявлена высокая экспрессия ER и PR, Bcl-2, p53 и высокая плотность сосудов (рис. 1а–г). Таким образом, у больной выявлено сочетание прогностически благоприятных (наличие ER и PR), неблагоприятных факторов (экспрессия p53 и высокая плотность сосудов) и потенциально неблагоприятных факторов (экспрессия Bcl-2 и высокая активность стероид сульфатазы). Больная жива в течение 19 мес после проведения оперативного вмешательства без признаков рецидивов и метастазов.

Сочетание высокого уровня ангиогенеза в опухоли и экспрессии мутантного p53 является прогностически неблагоприятным сочетанием в отношении РЭ (Чумаков П.М., 2000; Захарцева Л.М., 2001; Suvridis E., 2001; Giatromanolaki A., 2001; Szymanski W., 2003; Saad R.S., 2003; Osmanagaoglu M.A., 2005). Однако такое сочетание в нашем исследовании наблюдалось достаточно редко, поскольку большинство опухолей эндометрия не экспрессировали мутантный p53. По данным ряда авторов, с высоким уровнем неоангиогенеза и низкой выживаемостью коррелировало отсутствие экспрессии Bcl-2 [14]. Представляем наиболее типичный клинический случай сочетания молекулярно-биологических маркеров и активности ферментов метаболизма эстрогенов в опухолях эндометрия.

Больная К., 69 лет. Поступила в НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН с диагнозом РЭ. По данным морфологического исследования соскоба эндометрия – умереннодифференцированная аденокарцинома. Из анамнеза выявлено, что в течение 6 мес беспокоят сукровичные выделения из половых путей на фоне менопаузы 19 лет. В анамнезе у пациентки 12 беременностей, 2 родов и 10 аборт. Из сопутствующей экстра-

генитальной патологии у пациентки выявлены ожирение III степени и гипертоническая болезнь II стадии. 12.01.05 выполнена операция – экстирпация матки с придатками. Гистологическое заключение: умереннодифференцированная аденокарцинома эндометрия с инвазией в миометрий до 5 мм. Активность стероид сульфатазы в опухоли составила 278 фмоль эстрон сульфата/мг белка в час, ароматазы – 4 фмоль андростендиона/мг белка в час, КОМТ – 245 нмоль гваякола/мг белка в час, ГТ – 343 мкмоль ХДНБ-SH/мг белка в минуту. В опухоли выявлена высокая экспрессия ER и PR, Bcl-2 и хорошо развитая сеть микрососудов (рис. 2а–в, д). Экспрессии мутантного p53 в опухоли не выявлено (рис. 2г). Больная жива в течение 19 мес после проведения хирургического этапа комбинированного лечения без признаков рецидивов и метастазов.

Хотя традиционно РЭ считают гормонозависимым заболеванием, и известно, что эстроген-индуцированная экспрессия фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и эндометриальной тимидинфосфорилазы выявляется с высокой частотой в высокодифференцированных опухолях эндометрия, а эстрогены в эндометрии индуцируют синтез специфического рецептора VEGF – flk-1 [3], однако в литературе практически отсутствуют данные об активности ферментов метаболизма эстрогенов в опухолях с различной интенсивностью ангиогенеза. По данным наших исследований, в злокачественных новообразованиях эндометрия существует четкая взаимосвязь между экспрессией антиапоптотического белка Bcl-2, ангиогенезом, экспрессией ER- и PR-рецепторов и активностью стероид сульфатазы.

Таким образом, в 31 опухоли эндометрия изучена экспрессия онкосупрессорного протеина p53, про- и антиапоптотических белков Bax и Bcl-2, а также рецепторов эстрогенов (ER) и прогестерона (PR) и плотность микрососудов в опухолях иммуногистохимическими методами. В этих же опухолях была оценена активность ферментов синтеза и метаболизма эстрогенов (ароматазы, стероид сульфатазы, суммарной эстроген 2/4-гидроксилазной активности, КОМТ и ГТ) радиометрическими, радиоферментативными и спектрофотометрическими методами. Проведенное исследование показало наличие взаимосвязи между экспрессией антиапоптотического протеина Bcl-2, интенсивностью неоангиогенеза, экспрессией ER и PR и активностью стероид сульфатазы в злокачественных новообразованиях эндометрия. Результаты являются основой для дальнейших исследований, посвященных индивидуальному прогнозированию течения РЭ и формированию группы повышенного риска на основании определения комплекса иммуно-

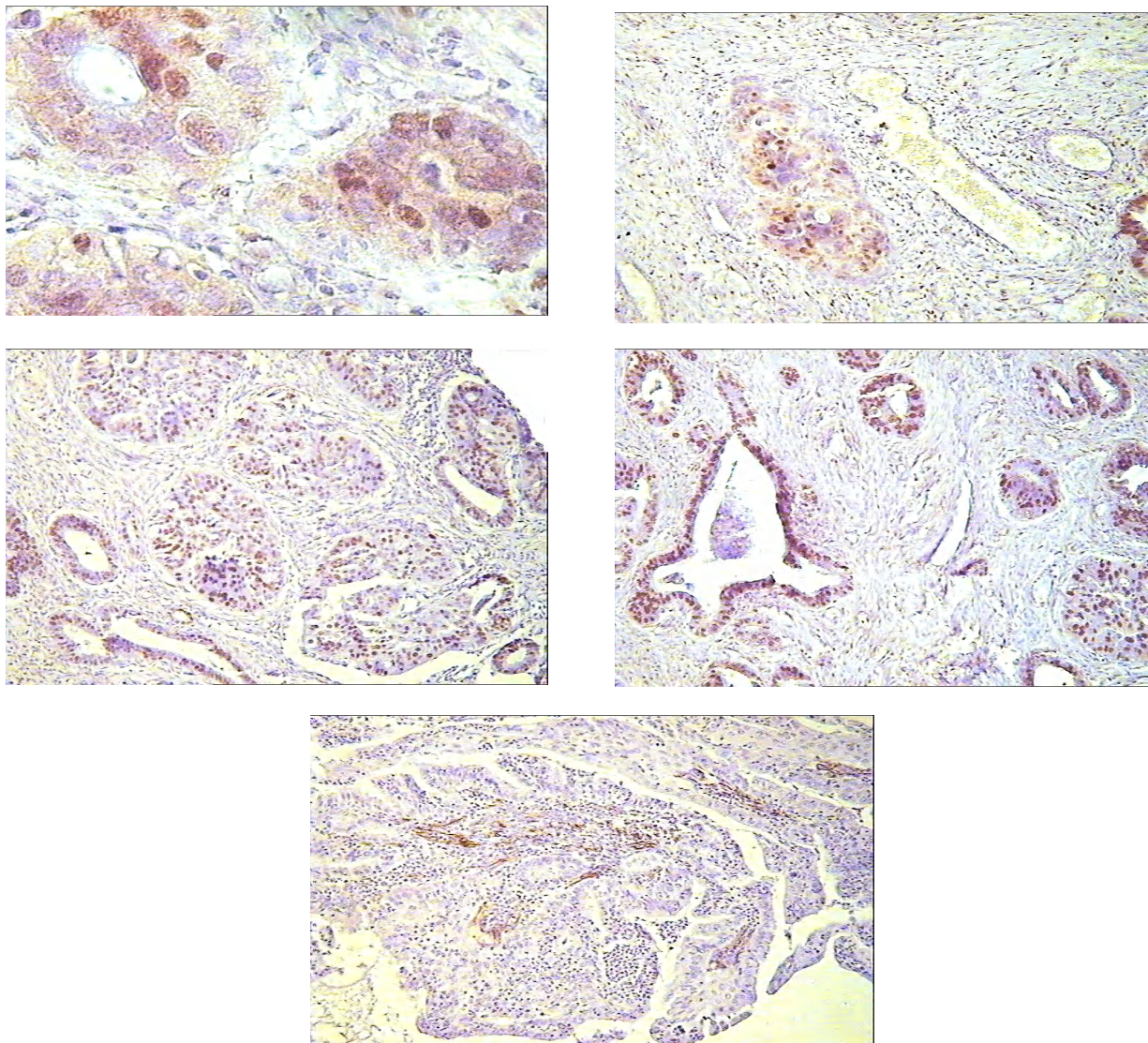


Рис. 2. Микрофото. Умереннодифференцированная аденокарцинома тела матки у больной К.: а) экспрессия ядрами опухолевых клеток рецепторов эстрогенов, x160; б) иммунореактивность опухоли к рецепторам прогестерона, x160; в) позитивная реакция клеток опухоли с антителами к Bcl-2, x160; г) отсутствие реакции к мутантному белку p53 в ядрах опухолевых клеток, x160

гистохимических маркеров и активности некоторых ферментов метаболизма эстрогенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берштейн Л.М. Гормональный канцерогенез. СПб.: Наука, 2000. 199 с.

2. Введение в молекулярную медицину / Под ред. М.А. Пальцева. М.: ОАО «Изд-во «Медицина», 2004. 496 с.

3. Киселев В.И., Лященко А.А. Молекулярные механизмы регуляции гиперпластических процессов. М.: Изд-во Димитрейд График Групп, 2005. 348 с.

4. Копнин Б. П. // Биохимия. 2000. Т. 65, вып. 1. С. 5–33.

5. Ланкин В.З., Тахадзе А.К., Ковальская А.Л. // Докл. АН

СССР. 1981. Т. 261, № 6. С. 1467–1470.

6. Ларионов А.А. Конверсия андростендиона в опухолевой и экстрагонадных тканях и ее связь с гормонально-метаболическими факторами у больных раком молочной железы: Автореф. дис. ...канд. мед. наук. СПб., 1997. 25 с.

7. Лукашина М.И. // Клиническая лабораторная диагностика. 2002. № 8. С. 37–41.

8. Самсонова Е.А., Урманчеева А.Ф., Пожарисский К.М. и др. // Вопросы онкологии. 2004. Т. 50, № 2. С. 196–201.

9. Barth A., Romer W., Oettel M. // Arch. Toxicol. 2000. Vol. 74. P. 366–371.

10. Giatromanolaki A., Survidis E., Brekken R. et al. // Cancer. 2001. Vol. 92, № 10. P. 2569–2577.

11. Peiro G., Diebold J., Baretton G.B. et al. // Int.

J. Gynecol. Pathol. 2001. Vol. 20, № 4. P. 359–367.

12. Saegusa M., Kamata Y., Isono M. et al. // J. Pathol. 1996. Vol. 180, № 3. P. 272–275.

13. Salvesen H.B., Iversen O.E., Akslen L. et al. // J. of Clin. Oncol. 1999. Vol. 17, № 5. P. 1382–1390.

14. Survidis E., Giatromanolaki A., Koukourakis M. et al. // Virchows Arch. 2001. Vol. 438, № 5. P. 470–477.

15. Theron C.N., Russel V.A., Taljard J.J. // Steroid Biochem. 1986. Vol. 25, № 4. P. 585–591.

16. Utsunomiya H., Ito K., Suzuki T. et al. // Clin. Cancer Res. 2004. Vol. 10, № 17. P. 5850–5856.

17. Veral A., Zekioglu O., Nart D. et al. // Annals of Saudi Medicine. 2002. Vol. 22, № 3–4. P. 242–244.

18. Zurcher G., Da Prada M. // J. of Neurochemistry. 1982. Vol. 38, № 1. P. 191–195.