

Исследование показателей апоптоза у больных с преинвазивным и инвазивным раком шейки матки

П. И. Ковчур¹, Е. В. Бахидзе², О. В. Курмышкина¹, Т. О. Волкова¹

¹ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»;

Россия, 185910, Петрозаводск, проспект Ленина, 33;

²ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России;

Россия, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

Контакты: Павел Иванович Ковчур pkovchur@mail.ru

В статье дана оценка степени нарушения апоптотической программы у больных преинвазивным и инвазивным раком шейки матки (РШМ) с помощью определения экспрессии генов каспаз-3, -6, -8 и -9 в мононуклеарах периферической крови (МНПК) и опухолевой ткани на двух уровнях регуляции – мРНК (транскрипционный уровень) и протеолитической активности (посттрансляционный уровень). Обследованы 75 больных с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями (ЦИН) III степени тяжести (средний возраст $32,9 \pm 7,4$ года), 45 – с IA стадией ($31,3 \pm 6,0$ года), 21 – со II стадией ($43,6 \pm 13,2$ года), 15 – с III–IV стадиями ($46,9 \pm 11,1$ года) РШМ. Были выделены 2 контрольные группы: в 1-ю вошли 30 практически здоровых доноров без патологии шейки матки и вируса папилломы человека (ВПЧ), во 2-ю – 30 больных преинвазивным и микроинвазивным РШМ. Установлено, что по мере прогрессии РШМ происходит повышение мембранной экспрессии CD95 в МНПК-фракции при ЦИН III степени и ранних стадиях РШМ более чем в 2 раза и наблюдается положительная корреляция количества CD95+ лимфоцитов со стадией РШМ ($r = 0,91$; $R^2 = 0,82$; $p << 0,01$). Обнаружено усиление активности каспазы-8 ($r = 0,92$; $R^2 = 0,86$; $p << 0,01$), каспазы-6 ($r = 0,77$; $R^2 = 0,59$; $p << 0,01$) и подавление активности каспазы-9 ($r = -0,60$; $R^2 = 0,36$; $p < 0,01$) в МНПК, указывающие на повышение чувствительности к Fas-индуцированному апоптозу. Напротив, в ткани опухоли, начиная с ЦИН III степени, формируется апоптоз-резистентный фенотип, что определено с помощью экспрессии каспазы-3 ($r = -0,72$; $R^2 = 0,52$; $p < 0,01$), каспазы-6 ($r = -0,59$; $R^2 = 0,38$; $p < 0,01$) и каспазы-9 ($r = -0,67$; $R^2 = 0,45$; $p < 0,01$) по уровню мРНК и протеолитической активности. Показано, что развитие РШМ сопровождается многосторонними нарушениями апоптотических процессов, которые реализуются в подавлении функционирования каспаз и множественной резистентности опухолевых клеток к апоптотическим стимулам. Полученные результаты дают возможность рассматривать гены каспазы как возможные перспективные биомаркеры в комплексной диагностике ЦИН и ранних форм РШМ (в сочетании с морфологическими критериями и другими молекулярными маркерами вирусного происхождения).

Ключевые слова: рак шейки матки, ранняя диагностика, экспрессия активности каспаз-3, -6, -8, -9, апоптоз-резистентный фенотип, Fas-индуцированный апоптоз

DOI: 10.17650/1994-4098-2015-1-61-68

Analysis of apoptosis factors in patients with preinvasive and invasive cervical cancer

P. I. Kovchur¹, E. V. Bachidze², O. V. Kurmyshkina¹, T. O. Volkova¹

¹Petrozavodsk State University; 33 Lenina prospekt, Petrozavodsk, 185910, Russia;

²N. N. Petrov Oncology Research Institute, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochny, Saint Petersburg, 197758, Russia

This article assesses the disturbance degree of apoptotic program in patients with preinvasive and invasive cervical cancer by investigating the expression level of genes of caspases-3, -6, -8 and -9 in mononuclear cells of periphery blood and in tumor tissue on the two regulating levels – on mRNA level (transcriptional) and proteolytic activity (post transcriptional). 75 patients with stage III of cervical intraepithelial neoplasias (CIN) III (middle age of $32,9 \pm 7,4$), 45 patients with stage IA ($31,3 \pm 6,0$), 21 – with stage II ($43,6 \pm 13,2$), 15 – with stage III–IV ($46,9 \pm 11,1$) have been examined. The control group has been formed from 30 almost healthy donors without any cervical pathology and papilloma human virus (control 1) and 30 patients with a preinvasive and microinvasive cervical cancer (control 2). It has been found that in proportion of progress of cervix cancer, the membranous expression of CD95 increases in MPB – fraction (peripheral blood monocytes) when the a CIN and initial stages of cervix cancer, more than two times. Herewith number CD95+ lymphocytes is positively correlated with stage of cervical cancer ($r = 0,91$; $R^2 = 0,82$; $p << 0,01$). It has been found out that the activity gain of caspase-8 ($r = 0,92$; $R^2 = 0,86$; $p << 0,01$), caspase-6 ($r = 0,77$; $R^2 = 0,59$; $p << 0,01$) and reduction activity of caspase-9 ($r = -0,60$; $R^2 = 0,36$; $p < 0,01$) in mononuclear cells of peripheral blood pointed out on the sensitivity increase to Fas-induced apoptosis. Opposite, in tumor tissue, beginning from CIN stage III, apoptosis-resistant phenotype is formed, it were defined by the expression of caspase-3 ($r = -0,72$; $R^2 = 0,52$; $p < 0,01$), caspase-6 ($r = -0,59$; $R^2 = 0,38$; $p < 0,01$) and caspase-9 ($r = -0,67$; $R^2 = 0,45$; $p < 0,01$) by mRNA level and proteolytic activity. It has been shown, that the cervical cancer development is accompanied by multilateral disturbances of apoptotic processes, which are realized in decreased function of caspases and multilateral resistance of tumor cells in against signals of apoptosis. The obtained results give an opportunity to examine the genes of caspase as a probable prospective biomarkers in complex diagnostic of a CIN and early diagnosis of a cervical cancer (in combination with morphological criteria and other molecular markers of viral origin)

Key words: cervical cancer, early diagnoses, caspases-3, -6, -8, -9 expression activity, apoptosis-resistant phenotype, Fas-induced apoptosis

Введение

Рак шейки матки (РШМ) является уникальной *in vivo* моделью для изучения механизмов канцерогенеза, что связано с трансформирующим действием вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого риска [1]. Его развитие сопровождается нарушением апоптоз-индуцирующих механизмов, где существенную роль играют внутриклеточные белки и ферменты, функционально связанные с кластерами дифференцировки (CD) [2, 3]. Одни из таких ферментов – клеточные каспазы (caspase – cystein aspartate specific protease) [4, 5], которые являются центральными медиаторами и эффекторами апоптоза, отвечающими за внутриклеточное распространение апоптотического сигнала и за конечную реализацию апоптотической программы [6]. Изменения уровней мРНК и активности каспаз продемонстрированы для многих типов опухолей [7], а маркеры апоптоза в лимфоцитах периферической крови были исследованы у пациентов с гепатокарциномой [8], меланомой [9], раком яичников [10], опухолями головы и шеи [11], желудка [12], немелкоклеточным раком легкого [13].

Известно, что один из путей инициации апоптоза происходит через CD95 (APO-1, Fas, TNFRSF6, APT1) при связывании его лиганда (CD95L, CD178) или агонистических антител, входящих в состав суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей [14]. При этом в результате усиленной деградации адаптерного белка FADD (Fas-associated death domain protein) нарушается сборка DISC-комплекса (death-inducing signaling complex) [6]. С доменами данного комплекса взаимодействуют некоторые клеточные прокаспазы, в частности прокаспазы-8 и -10, с последующим образованием их активных форм. На следующих этапах апоптоза каспаза-8 активирует каспазы-3, -6 и -7, что влечет за собой расщепление большого количест-

ва клеточных белков, необходимых для нормального функционирования, что неизбежно приводит клетку к гибели [4, 5]. Для того чтобы подавить запуск терминальной дифференцировки в инфицированных кератиноцитах, ВПЧ-онкогены взаимодействуют не только с p53 и Rb, а также высокоаффинно связывают различные компоненты «внешнего» и «внутреннего» путей апоптоза и стимулируют их деградацию (рис. 1).

При этом в инфицированных клетках снижается мембранная экспрессия основного рецептора клеточной смерти CD95/Fas, в результате усиленной деградации адаптерного белка FADD нарушается сборка DISC-комплекса, передающая сигналы от Fas-R, TNF и т.д. [4, 5]. Происходит также деградация каспазы-8 и эндогенных активаторов митохондриального пути апоптоза Bid, Bad и Bax (антагонистов Bcl-2) [4, 5].

Сведения об экспрессии каспаз при развитии РШМ очень скудны или имеют отношение к искусственным системам [15–17], и практически нет данных, оценивающих уровни каспаз и их активности в клетках эпителия шейки матки и в лимфоцитах периферической крови на этапах развития РШМ.

Цель исследования – оценить степень нарушения апоптотической программы с помощью определения экспрессии каспаз-3, -6, -8 и -9 в мононуклеарах периферической крови (МНПК) при цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН) III степени и РШМ на двух уровнях регуляции – мРНК (транскрипционный уровень) и протеолитической активности (посттрансляционный уровень).

Материалы и методы

Всего обследована 231 пациентка: 75 больных с ЦИН III степени тяжести (средний возраст $32,9 \pm 7,4$ года), в том числе 32 – с дисплазией III степени, 43 – с преинвазивным раком (карцинома *in situ*); и 81 – с плоскоклеточным РШМ, в том числе 45 – со стадией IA (средний возраст $31,3 \pm 6,0$ года), 21 – со II стадией (средний возраст $43,6 \pm 13,2$ года), 15 – с III–IV стадиями (средний возраст $46,9 \pm 11,1$ года). Были выделены 2 контрольные группы, в 1-ю вошли 30 практически здоровых доноров без патологии шейки матки и ВПЧ, во 2-ю – 30 больных с преинвазивным и микроинвазивным РШМ.

Критерием отбора больных являлись морфологически подтвержденные диагнозы ЦИН III степени и РШМ. Материал забирали в день проведения операции диатермоконизации шейки матки (аппарат «Фотек») или гистерэктомии. От каждой пациентки было получено по 2 фрагмента ткани из патологической

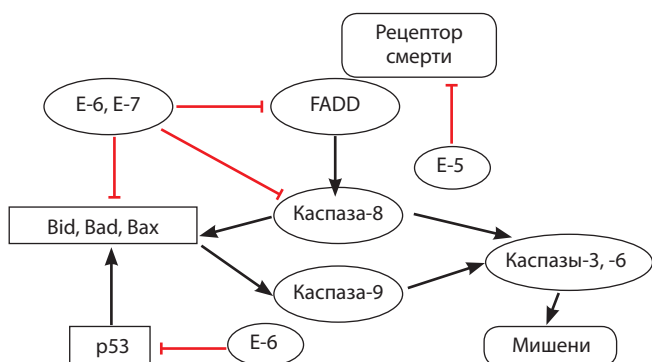


Рис. 1. Схема взаимодействия онкобелков ВПЧ и компонентов «внешнего» и «внутреннего» путей апоптоза [4, 5]

Таблица 1. Частота определения ВПЧ у больных с преинвазивным и инвазивным РШМ (абс., %)

Группы	Характеристика	ВПЧ (+)	ВПЧ (-)
1-я контрольная группа (n = 30)	Здоровые женщины без патологии шейки матки (n = 30)	8 (26,7)	22 (73,3)
Основная группа (n = 120)	ЦИН III (n = 75)	68 (90,7)*	7 (9,3)
	РШМ стадии IA1 (n = 45)	43 (95,6)*	2 (4,4)
2-я контрольная группа (n = 30)	ЦИН III + РШМ стадии IA1 (n = 30)	30 (100,0)	0

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к 1-й контрольной группе.

Таблица 2. Распределение вирусной нагрузки у пациентов

Группа пациентов	Средний логарифм вирусной нагрузки (lg ДНК ВПЧ/10 ⁵ клеток), абс., %		
	повышенная, > 5 lg	значимая, > 3 lg	малозначимая, > 2 lg
1-я контрольная группа (n = 30)	0	0	8 (26,7)
Основная группа (n = 111)	ЦИН III (n = 68)	33 (48,5 %)*	28 (41,2)*
	РШМ стадии IA1 (n = 43)	23 (53,5)*	16 (37,2)*
2-я контрольная группа, ЦИН III + РШМ стадии IA (n = 30)	13 (43,3)*	14 (46,7)*	3 (10,0)

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к 1-й контрольной группе.

зоны, которая определялась визуально и кольпоскопически, и по 1 фрагменту морфологически здоровой ткани шейки матки (2-я контрольная группа), находящейся за пределами патологической зоны (контралатеральное расположение от участка РШМ). Непосредственно перед операцией у пациенток производился забор венозной крови в пробирки VacuTube (5 или 10 мл), содержащие 3,8 % раствор цитрата, после чего пробирки помещались в лед.

ВПЧ-типирование и выявление вирус-специфических мРНК в исследуемых группах проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (табл. 1, 2).

Иммунофенотипирование МНПК осуществляли с помощью моноклональных антител, специфичных к дифференцировочным антигенам (CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, CD95) (Sigma, США). Полученные препараты анализировали методом флуоресцентной микроскопии (Nikon ECLIPSE TS100, Япония). Определение активности каспаз проводили спектрофлуориметрическим методом с использованием специфических субстратов, меченных 7-амино-4-трифторметилкумарином (Bio-Rad, США). Субстрат для каспазы-3 – DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), для каспазы-6 – VEID (Val-Glu-Ile-Asp), для каспазы-8 – LETD (Leu-Glu-Thr-Asp), для каспазы-9 – LEHD (Leu-Glu-His-Asp). Относительную активность каспаз вычисляли как $\Delta S/\Delta t$, где ΔS – изменение интенсивности

флуоресценции (оптической плотности) (отн. ед.) за промежуток времени Δt (мин); полученную величину умножали на 10⁴. Уровень экспрессии мРНК генов каспаз в ткани шейки матки или МНПК определяли методом ПЦР в режиме реального времени. Нативность препаратов РНК определяли методом капиллярного электрофореза на микрочипах RNA StdSens с помощью автоматической станции Experion (Bio-Rad, США). Эффективность амплификации при текущих условиях эксперимента определяли по графику зависимости порогового цикла от концентрации матрицы. Порядок изменения уровня экспрессии изучаемого гена в образце опухолевой ткани относительно уровня его экспрессии в образце здоровой ткани от одной и той же пациентки оценивали с помощью величины $\Delta = \lg 2^{Ct(\text{control})} - Ct(\text{tumor})$. Результаты ПЦР нормализовали по массе суммарной фракции РНК. Анализ относительного уровня экспрессии мРНК генов каспаз в МНПК проводили с использованием *Gapdh* в качестве референсного гена по методу $\Delta\Delta Ct$.

Все пациентки были проинформированы об участии в исследовании и дали добровольное письменное согласие. Используемые в работе методы исследования были одобрены Комитетом по медицинской этике ПетрГУ и Минздравом Республики Карелия. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы StatGraphics Plus 2.1. Для срав-

Таблица 3. Экспрессия CD95 (FasR) в МНПК больных ЦИН III и РШМ

Группы исследования	CD95 (FasR), %	CD95 (FasR), абс. × 10 ⁹ /л	p
1-я контрольная группа (n = 30)	6,73 ± 0,92	0,137 ± 0,01	—
ЦИН III (n = 53)	17,07 ± 0,41*	0,37 ± 0,03	0,0
РШМ IA стадии (n = 26)	22,72 ± 0,51*	0,48 ± 0,04	0,0
РШМ IB стадии (n = 4)	25,25 ± 0,58*	0,48 ± 0,01	0,0
РШМ II стадии (n = 20)	24,10 ± 0,41*	0,49 ± 0,06	0,0058
РШМ III–IV стадий (n = 15)	25,87 ± 0,59*	0,51 ± 0,05	0,0081

Примечание. * – группы, в которых активность каспаз достоверно отличается от 1-й контрольной группы (различия полагали достоверными при $p < 0,05$).

нения выборок были использованы параметрические и непараметрические критерии (t-критерий Стьюдента, U-критерий Уилкоксона–Манна–Уитни). Анализ корреляций осуществлялся с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA).

Результаты и обсуждение

Нами установлено, что по мере прогрессии РШМ происходит повышение мембранной экспрессии Fas-рецептора (CD95+) в МНПК-фракции при ЦИН III и ранних стадиях РШМ более чем в 2 раза, а также выявлена положительная корреляция количества CD95+-лимфоцитов со стадией РШМ, что может свидетельствовать об индукции Fas-опосредованной гибели клеток (табл. 3).

Увеличение количества клеток, экспрессирующих на поверхности мембраны маркер CD95 ($r = 0,91$; $R^2 = 0,82$; $p < 0,01$), послужило поводом для установле-

ния связи уровня экспрессии каспаз, ассоциированных с CD95-зависимым проведением сигнала, в двух уровнях регуляции – мРНК и протеолитической активности (см. табл. 3). Были исследованы уровни протеолитической активности рецептор-регулируемой каспазы-8, эффекторных каспаз-3 и -6 и каспазы-9, инициирующей «внутренний» путь апоптоза, в МНПК больных ЦИН III, РШМ и 1-й группы контроля (табл. 4).

Для каспазы-8 отмечено достоверное увеличение протеолитической активности в МНПК ($r = 0,92$; $R^2 = 0,86$; $p < 0,01$). При ЦИН III степени в 53 % случаев уровень активности каспазы-8 не отличался от уровня 1-й контрольной группы, для остальных был достоверно повышен (см. табл. 4). При инвазивном РШМ активность каспазы-8 в 100 % случаев значительно превышает уровень 1-й контрольной группы и отмечается рост активности по мере увеличения стадии заболевания ($r = 0,92$; $R^2 = 0,86$; $p < 0,01$).

Таблица 4. Изменение относительной активности каспаз в МНПК при развитии РШМ

Группы	Каспаза-3, М ± m	Каспаза-6, М ± m	Каспаза-8, М ± m	Каспаза-9, М ± m
1-я контрольная группа (n = 30)	1,20 ± 0,01 (1,07–1,40)	1,45 ± 0,02 (1,20–1,60)	1,47 ± 0,02 (1,33–1,67)	1,49 ± 0,03 (1,20–1,73)
ЦИН III (n = 53)	2,49 ± 0,03* (1,06–3,73) $p = 0,0367$	1,43 ± 0,02 (77 %); 4,22 ± 0,10 (23 %)* (1,13–4,67) $p \rightarrow 0$	1,53 ± 0,03 (53 %); 3,34 ± 0,03 (47 %)* (1,33–3,67) $p \rightarrow 0$	1,30 ± 0,05 (0,67–3,0) $p = 0,5492$
РШМ IA1 стадии (n = 30)	2,91 ± 0,02* (1,13–4,07) $p = 0,0011$	4,13 ± 0,20* (1,13–4,93) $p = 0,0009$	3,90 ± 0,04* (3,53–4,20) $p \rightarrow 0$	1,14 ± 0,05 (73 %)*; 2,23 ± 0,05 (27 %) (0,73–2,40) $p \rightarrow 0$
РШМ II стадии (n = 21)	2,09 ± 0,03* (1,0–3,60) $p = 0,0018$	4,73 ± 0,05* (4,20–5,0) $p \rightarrow 0$	4,26 ± 0,04* (3,67–4,53) $p \rightarrow 0$	0,73 ± 0,04* (0,53–1,46) $p = 0,0028$
РШМ III–IV стадий (n = 14)	0,84 ± 0,01 (0,0–1,53) $p \rightarrow 0$	4,14 ± 0,07* (3,87–4,87) $p \rightarrow 0$	4,76 ± 0,05* (4,46–5,13) $p \rightarrow 0$	0,47 ± 0,07* (0,0–0,80) $p \rightarrow 0$

Примечание. * – группы, в которых активность каспаз достоверно отличается от 1-й контрольной группы (различия полагали достоверными при $p < 0,05$). В таблице приведены значения p , полученные при сравнении последовательных стадий РШМ.

Таблица 5. Изменение уровня экспрессии мРНК каспаз в МНПК

Группа	Каспаза-3, М ± m	Каспаза-6, М ± m	Каспаза-9, М ± m
1-я контрольная группа (n = 30)	20,3 ± 1,9 (5–36)	11,8 ± 1,2 (2–24)	81,7 ± 5,5 (39–192)
ЦИН III (n = 35)	36,1 ± 3,8* (7–103) p = 0,048	15,3 ± 2,4 (2–73) p = 0,0232	61,6 ± 5,6 (6–135)
IA стадия РШМ (n = 27)	71,1 ± 10,9* (5–256) p = 0,7506	22,6 ± 2,9* (4–55) p = 0,7581	116,6 ± 8,5 (30–476)
II стадия РШМ (n = 16)	81,3 ± 14,3* (20–208) p = 0,0371	33,2 ± 9,5* (5–156) p = 0,0004	53,5 ± 10,8 (2–156)
III–IV стадия РШМ (n = 10)	35,9 ± 6,9* (11–90)	6,4 ± 2,7* (2–30)	95,5 ± 17 (30–192)

Примечание. Относительную экспрессию определяли в соответствии с методом $\Delta\Delta Ct$, мРНК *Gardh* использовали в качестве референсной. Оценка статистической достоверности изменений экспрессии мРНК каспаз проводилась в соответствии с критерием Уилкоксона–Манна–Уитни;

* – группы, в которых активность каспаз достоверно отличается от 1-й контрольной группы ($p < 0,05$). В таблице приведены значения p , полученные при сравнении последовательных стадий РШМ.

Схожая закономерность наблюдалась для каспазы-6 – в 100 % случаев инвазивного РШМ ее активность была существенно (в 4–5 раз) повышена относительно 1-й контрольной группы ($r = 0,77$; $R^2 = 0,59$; $p < 0,01$); однако в отличие от каспазы-8 в большинстве случаев ЦИН III (77 %) активность каспазы-6 была сопоставима с уровнем 1-й контрольной группы.

Для каспазы-3 взаимосвязь между ее активностью и стадией заболевания не была линейной – при ЦИН III и РШМ стадии IA активность повышается, а при II и IV стадиях РШМ постепенно снижается до контрольных значений. При этом у 35 % пациенток с ЦИН III, 30 % – со РШМ стадии IA и 38 % – со II стадией РШМ активность каспазы-3 не отличается от уровня 1-й контрольной группы. Напротив, активность каспазы-9 при прогрессии РШМ снижается относительно 1-й контрольной группы ($r = -0,60$; $R^2 = 0,36$; $p < 0,01$). Так, в группе ЦИН III снижение активности отмечается в 40 % образцов МНПК, а при РШМ стадии IA в 26 % случаев был зарегистрирован повышенный уровень активности каспазы-9.

Таким образом, проведенный анализ протеолитической активности рецептор-регулируемой каспазы-8, эффекторных каспаз-3, -6 и -9 в МНПК (на посттрансляционном уровне) показал, что развитие РШМ связано с изменениями профиля экспрессии инициаторных и эффекторных каспаз в МНПК. Выявлено усиление экспрессии каспаз-3, -6, -8, вовлеченных во «внешний» путь апоптоза, и снижение уровня экспрессии каспазы-9 «внутреннего» пути, что указывает на целостность многоуровневой системы.

Анализ активности экспрессии каспазы-8, эффекторных каспаз-3, -6 и -9 в МНПК на транскрипцион-

ном уровне показал также (табл. 5), что изменение относительного содержания мРНК каспазы-3 при развитии РШМ повторяет изменение ее активности. Выявлено увеличение экспрессии от ЦИН III до РШМ IA–II стадий в сравнении с 1-й контрольной группой и снижение экспрессии до значений данной группы при РШМ III–IV стадий.

Таким образом, развитие РШМ связано с разнообразными изменениями профиля экспрессии инициаторных и эффекторных каспаз в МНПК больных – усилением экспрессии каспаз-3, -6, -8 и снижением уровня экспрессии каспазы-9. При этом наиболее выраженные и закономерные изменения экспрессии выявлены на уровне протеолитической активности каспаз, что позволяет предположить относительную автономию между механизмами транскрипционной и посттрансляционной регуляции их экспрессии при развитии РШМ. При этом усиление экспрессии CD95 и активности каспаз-3, -6 и -8 в МНПК больных ЦИН III и РШМ указывает на повышение чувствительности к Fas-индуцированному апоптозу, может быть одним из способов противодействия опухоли реакциям иммунитета и согласуется с данными других исследователей [15, 18].

Нами изучена экспрессия генов каспаз-3, -6 и -9 в ткани ЦИН III и РШМ. При ЦИН III регистрировали в большинстве случаев (более 50 %) уровень 2-й контрольной группы экспрессии каспаз-3, -6 и -9. Снижение относительного содержания мРНК каспаз-3 и -9 наблюдалось для трети образцов ЦИН III, каспазы-6 – для 20 % образцов. В наименьшем количестве случаев (менее 20 %) количество мРНК каспаз-3, -6 и -9 было повышено относительно образцов нормального эпителия (табл. 6).

Таблица 6. Изменение уровня экспрессии мРНК каспаз в ткани ЦИН III и РШМ относительно нормального эпителия (2-я контрольная группа)

	ЦИН III (n = 25)	РШМ IA стадии (n = 12)	РШМ II–IV стадий (n = 10)
Каспаза-3	Уровень 2-й контрольной группы – 56 % (n = 14); ↑ 16 % (n = 4); ↓ 28 % (n = 7)	Уровень 2-й контрольной группы – 33 % (n = 4); ↑ 50 % (n = 6); ↓ 17 % (n = 2)	Уровень 2-й контрольной группы – 60 % (n = 6); ↑ 40 % (n = 4)
Каспаза-6	Уровень 2-й контрольной группы – 60 % (n = 15); ↑ 20 % (n = 5); ↓ 20 % (n = 5)	Уровень 2-й контрольной группы – 25 % (n = 3); ↑ 50 % (n = 6); ↓ 25 % (n = 3)	Уровень 2-й контрольной группы – 70 % (n = 7); ↑ 30 % (n = 3)
Каспаза-9	Уровень 2-й контрольной группы – 52 % (n = 13); ↑ 16 % (n = 4); ↓ 32 % (n = 8)	Уровень 2-й контрольной группы – 42 % (n = 5); ↑ 50 % (n = 6); ↓ 8 % (n = 1)	Уровень 2-й контрольной группы – 40 % (n = 4); ↑ 60 % (n = 6)

Примечание. ↑ – увеличение экспрессии относительно 2-й контрольной группы (образца нормального эпителия, полученного от той же пациентки, что и образец ЦИН III/РШМ); ↓ – уменьшение экспрессии относительно 2-й контрольной группы.

Таблица 7. Изменение относительной активности каспаз в клетках цервикального эпителия

Группа	Каспаза-3, M ± m	Каспаза-6, M ± m	Каспаза-9, M ± m
2-я контрольная группа (n = 30)	1,13 ± 0,02 (0,93–1,20)	0,97 ± 0,02 (0,73–1,27)	1,22 ± 0,03 (0,86–1,53)
ЦИН III (n = 53)	1,16 ± 0,05 (0,53–1,80)	0,92 ± 0,03 (60 %); 2,84 ± 0,04 (40 %)* (0,60–3,20)	1,25 ± 0,06 (0,67–2,53)
РШМ IA стадии (n = 30)	0,78 ± 0,04* (0,53–1,26) p = 10 ⁻⁶	0,78 ± 0,04 (77 %); 2,11 ± 0,09 (23 %)* (0,60–2,40) p = 0,0012	0,86 ± 0,05* (0,53–1,4) p = 10 ⁻⁵
РШМ II стадии (n = 21)	0,50 ± 0,04* (0,33–1,0) p = 10 ⁻⁵	0,64 ± 0,05* (0,4–1,13) p = 0,0009	0,63 ± 0,04* (0,33–1,33) p = 0,0001
РШМ III–IV стадий (n = 14)	0,13 ± 0,03* (0,0–0,20) p = 0,0003	0,22 ± 0,05* (0,07–0,33) p = 0,0003	0,25 ± 0,05* (0,07–0,40) p = 0,0005

Примечание. Относительную активность каспаз вычисляли как $\Delta S/\Delta t$, где ΔS – изменение интенсивности флуоресценции (оптической плотности) (отн. ед.) за промежуток времени Δt (мин). Для удобства полученную величину умножали на 10⁴. Оценка статистической достоверности изменений активности каспаз проводилась в соответствии с критерием Уилкоксона–Манна–Уитни; * – группы, в которых активность каспаз достоверно отличается от 2-й контрольной группы (различия полагаются достоверными при p < 0,05). В скобках приведены крайние значения в группе. В таблице приведены значения p, полученные при сравнении последовательных стадий РШМ.

При микроинвазивном РШМ экспрессия мРНК исследуемых каспаз была повышена в 50 % случаев, в остальных вариантах наблюдался уровень 2-й контрольной группы или уменьшение разной степени выраженности. При инвазивном РШМ (II–IV стадии) для каспаз-3, -6 и -9 был зафиксирован уровень 2-й контрольной группы или повышенный уровень экспрессии. При этом у значительной части пациентов с ЦИН III уровни мРНК каспаз-3, -6 и -9 не отличались от 2-й контрольной группы, а в образ-

цах инвазивного рака уровни были увеличены от 2 до 30 раз.

Напротив, при исследовании протеолитической активности каспаз в клетках цервикального эпителия при развитии РШМ получено подавление активности эффекторных каспаз-3, -6 и инициаторной каспазы-9 (табл. 7).

Так, в группе ЦИН III в 40 % случаев наблюдалось увеличение активности каспазы-6 по сравнению с уровнем 2-й контрольной группы, увеличение актив-

ности каспазы-9 было зафиксировано в единичных случаях (14 %). В остальных образцах ЦИН III было зафиксировано уменьшение активности или соответствие уровню 2-й контрольной группы. При этом активность каспазы-3 в большинстве случаев ЦИН III значимо отличалась от 2-й контрольной группы как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения. При РШМ IA стадии наблюдается достоверное снижение активности всех исследуемых каспаз, сохраняющееся при дальнейшей прогрессии РШМ. Однако в 23 % образцов РШМ IA стадии активность каспазы-6 оставалась значительно повышенной. Таким образом, при прогрессии инвазивного РШМ наблюдается постепенное подавление активности эффекторных каспаз-3, -6 и инциаторной каспазы-9, в то время как на этапе преинвазивного РШМ активность каспаз-3 и -6 может быть значительно повышена относительно нормального эпителия. Активность каспаз-3 и -9 достоверно коррелировала со стадией заболевания при ЦИН III и РШМ IA–IV стадий ($r = -0,72$; $R^2 = 0,52$; $p < 0,01$ для каспазы-3; $r = -0,67$; $R^2 = 0,45$; $p < 0,01$ для каспазы-9 при анализе линейной регрессии).

Нами показано, что при развитии РШМ изменения относительного содержания мРНК каспаз-3, -6 и -9 не соответствуют их протеолитической активности при инвазивном РШМ, т. е. на фоне контрольного или повышенного уровня мРНК каспаз регистрируется подавление их каталитической активности. В то же время в отношении ЦИН III данные по уровню мРНК и активности сопоставимы друг с другом. Следовательно, имеется разделение функциональных активностей каспаз в МНПК и опухолевой ткани при ЦИН III и на ранних стадиях РШМ. При этом, если на опухолевую клетку РШМ действует сигнал, активирующий транскрипцию каспазных генов, он эффективно гасится на посттранскрипционных уровнях за счет механизмов, требующих дальнейшего исследования.

Заключение

Рост и развитие РШМ сопровождаются многосторонними нарушениями апоптотических процессов, которые реализуются в подавлении функционирования каспаз и множественной резистентности опухоле-

вых клеток к апоптотическим стимулам. Результаты исследования показали, что ингибирование активности каспаз наблюдается в большинстве образцов IA стадии РШМ, и отражают становление агрессивного фенотипа клеток, что согласуется с данными некоторых исследований [17–20]. При этом усиление экспрессии CD95 и активности каспаз-3, -6 и -8 в МНПК больных ЦИН III и РШМ указывает на повышение чувствительности к Fas-индуцированному апоптозу, что может быть одним из способов противодействия опухоли реакциям иммунитета [15, 21–23].

Напротив, в ткани шейки матки формируется апоптоз-резистентный фенотип, начиная с ЦИН III, что определено с помощью экспрессии каспаз-3, -6 и -9 на уровне мРНК и протеолитической активности. Результаты исследования активности каспаз в образцах ЦИН III показали высокую степень гетерогенности группы по изучаемому параметру. Так, в 20–50 % случаев ЦИН III зарегистрировано достоверное повышение активности эффекторных каспаз-3 и -6 относительно нормального эпителия. Следовательно, преинвазивный рак представляет собой пограничное состояние, когда механизмы клеточного «суицида» еще не нарушены и, будучи активированы ускоренной пролиферацией, они в состоянии противостоять трансформирующим сигналам [24]. При этом на этапе малигнизации баланс с равной вероятностью может сместиться как в сторону пролиферации, так и апоптоза, в зависимости от сложившегося молекулярного контекста [16].

Результаты исследования позволяют предположить относительную автономию между механизмами транскрипционной и посттрансляционной регуляции экспрессии каспаз при развитии РШМ, что согласуется с данными других исследований [15], а также дает возможность дифференцировать ранние этапы развития РШМ (преинвазивный и микроинвазивный рак). Поэтому полученные данные могут быть использованы для рассмотрения генов каспаз в качестве возможных перспективных биомаркеров в комплексной диагностике ЦИН и ранних форм РШМ (в сочетании с морфологическими критериями и другими молекулярными маркерами вирусного происхождения).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бахидзе Е.В., Лавринович О.Е., Чепик О.Ф., Киселев О.И. Роль вируса папилломы человека в лимфогенном метастазировании плоскоклеточного рака шейки матки. Вопросы онкологии 2011;57(3):318–21. [Bakhidze E.V., Lavrinovich O.E., Chepik O.F., Kiselev O.I. The role of human papilloma virus in lymphatic cancer spread of squamous cell cancer of the cervix uteri. *Voprosy onkologii = Issues in Oncology* 2011;57(3):318–21. (In Russ.)].
2. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Славина Е.Г. и др. Фенотип иммунокомпетентных клеток и его значение в противоопухолевом иммунном ответе. Вестник РАМН 2011;12:20–5. [Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Slavina E.G. et al. Phenotype of immunocompetent cells and its importance in anti-tumor immune response. *Vestnik RAMN = Bulletin of Russian Academy of Medical Sciences* 2011;12:20–5. (In Russ.)].
3. Jayshree R.S., Sreenivas A., Tessa M., Krishna S. Cell intrinsic and extrinsic factors

- in cervical carcinogenesis. *Indian J Med Res* 2009;130(3):286–95.
4. Du J., Chen G.G., Vlantis A.C. et al. Resistance to apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression. *Cancer Lett* 2004;205(1):81–8.
 5. Tungteakkhun S.S., Filippova M., Fodor N., Duerksen-Hughes P.J. The full-length isoform of human papillomavirus 16 E6 and its splice variant E6* bind to different sites on the procaspase 8 death effector domain. *J Virol* 2010;84(3):1453–63.
 6. Krammer P.H., Arnold R., Lavrik I.N. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 2007;7(7):532–42.
 7. Olsson M., Zhivotovsky B. Caspases and cancer. *Cell Death Differ* 2011;18(9):1441–9.
 8. Yuen M.F., Hughes R.D., Heneghan M.A. et al. Expression of Fas antigen (CD95) in peripheral blood lymphocytes and in liver-infiltrating, cytotoxic lymphocytes in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2001;92(8):2136–41.
 9. Dworacki G., Meidenbauer N., Kuss I. et al. Decreased zeta chain expression and apoptosis in CD3+ peripheral blood T lymphocytes of patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2001;7(3 Suppl):947s–57s.
 10. Ma Y.X., Ye F., Chen H.Z. et al. Study of apoptosis and Fas expression of peritoneal fluid and peripheral blood T lymphocytes in patients with epithelial ovarian cancer and their relationship with CA125. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007;87(11):734–9.
 11. Hoffmann T.K., Dworacki G., Tsukihito T. et al. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 2002;8(8):2553–62.
 12. Yoshikawa T., Saito H., Osaki T. et al. Elevated Fas expression is related to increased apoptosis of circulating CD8+ T cell in patients with gastric cancer. *J Surg Res* 2008;148(2):143–51.
 13. Hoser G., Wasilewska D., Domagała-Kulawik J. Expression of Fas receptor on peripheral blood lymphocytes from patients with non-small cell lung cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2004;42(4):249–52.
 14. Reesink-Peters N., Hougardy B.M., van den Heuvel F.A. et al. Death receptors and ligands in cervical carcinogenesis: an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 2005;96(3):705–13.
 15. Aréchaga-Ocampo E., Pereira-Suárez A.L., del Moral-Hernández O. et al. HPV+ cervical carcinomas and cell lines display altered expression of caspases. *Gynecol Oncol* 2008;108(1):10–8.
 16. Ekonomopoulou M.T., Babas E., Mioglou-Kalouptsi E. et al. Changes in activities of caspase-8 and caspase-9 in human cervical malignancy. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21(3):435–8.
 17. Wang W., Fang Y., Sima N. et al. Triggering of death receptor apoptotic signaling by human papillomavirus 16 E2 protein in cervical cancer cell lines is mediated by interaction with c-FLIP. *Apoptosis* 2011;16(1):55–66.
 18. Jäger R., Zwacka R.M. The enigmatic roles of caspases in tumor development. *Cancers* 2010;2(4):1952–79.
 19. Ibrahim R., Frederickson H., Parr A. et al. Expression of FasL in squamous cell carcinomas of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia and its role in tumor escape mechanism. *Cancer* 2006;106(5):1065–77.
 20. Patel S., Chiplunkar S. Host immune responses to cervical cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009;21(1):54–9.
 21. de Wilde J., De-Castro Arce J., Snijders P.J. et al. Alterations in AP-1 and AP-1 regulatory genes during HPV-induced carcinogenesis. *Cell Oncol* 2008;30(1):77–87.
 22. Jacobs J.F., Idema A.J., Bol K.F. et al. Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors. *J Neuroimmunol* 2010;225(1–2):195–9.
 23. Würstle M.L., Laussmann M.A., Rehm M. The caspase-8 dimerization/dissociation balance is a highly potent regulator of caspase-8, -3, -6 signaling. *J Biol Chem* 2010;285(43):33209–18.
 24. Zhou J.H., Chen H.Z., Ye F. et al. Fas-mediated pathway and apoptosis in normal cervix, cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cancer. *Oncol Rep* 2006;16(2):307–11.