

©О. А. Таран

## ЗНАЧЕННЯ БІОМАРКЕРІВ ПРОГРЕСІЇ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ У ГЕНЕЗІ ЦЕРВІКАЛЬНОЇ ІНТРАЕПІТЕЛІАЛЬНОЇ НЕОПЛАЗІЇ

*Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова*

ЗНАЧЕННЯ БІОМАРКЕРІВ ПРОГРЕСІЇ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ У ГЕНЕЗІ ЦЕРВІКАЛЬНОЇ ІНТРАЕПІТЕЛІАЛЬНОЇ НЕОПЛАЗІЇ. Інвазивному раку шийки матки протягом декількох років передують передракові ураження – цервікальні інтраепітеліальні неоплазії (ЦІН) 1, 2, 3, прогноз яких варіює від регресії до розвитку інвазивного раку. Представлені результати дослідження біомаркерів прогресії ендотеліальної дисфункції (ЕД) – кількості десквамованих ендотеліоцитів (ДЕЦ), судинно-ендотеліального фактора росту (СЕФР) і VE-кадгеріну, як маркеру міжклітинних адгезивних зв'язків, у сироватці крові, у пацієнтів при ЦІН. Проаналізовано значення динаміки біомаркерів ЕД у хворих на ЦІН 1 (n = 25), ЦІН 2 (n = 17) і ЦІН 3 (n = 10), а також пацієток без ЦІН (n = 12). Відзначено статистично значуще збільшення кількості ДЕЦ, різке динамічне зростання концентрації СЕФР (ЦІН 1>ЦІН 3) і зниження VE-кадгеріну при ЦІН 3 порівняно з ЦІН 1 і 2. Доцільно використання цих маркерів для уточнення тяжкості ушкоджень та індивідуального прогнозу перебігу ЦІН.

ЗНАЧЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ ПРОГРЕССИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ГЕНЕЗЕ ЦЕРВИКАЛЬНОЙ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ НЕОПЛАЗИИ. Инвазивному раку шейки матки в течение нескольких лет предшествуют предраковые повреждения – цервикальные интраэпителиальные неоплазии (ЦИН) 1, 2, 3, прогноз которых варьирует от регрессии до развития инвазивного рака. Представлены результаты исследования биомаркеров прогрессии эндотелиальной дисфункции (ЭД) – количество десквамированных эндотелиоцитов (ДЭЦ), сосудистоэндотелиального фактора роста (СЭФР) и VE-кадгерина, как маркера межклеточных адгезионных связей, в сыворотке крови, у пациентов при ЦИН. Проанализированы значения динамики биомаркеров ЭД у больных ЦИН 1 (n = 25), ЦИН 2 (n = 17) и ЦИН 3 (n = 10), а также пациенток без ЦИН (n = 12). Отмечено статистически значимое увеличение количества ДЭЦ, резкое динамический рост концентрации СЭФР (ЦИН 1>ЦИН 3) и снижение VE-кадгерина при ЦИН 3 по сравнению с ЦИН 1 и 2. Целесообразно использование этих маркеров для уточнения тяжести повреждений и индивидуального прогноза течения ЦИН.

THE SIGNIFICANCE OF BIOMARKER PROGRESSION ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN THE GENESIS OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA. 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. The original paper contains the results of biomarkers progression of endothelial dysfunction (ED) – the number of desquamated endothelial cells (DEC), vascular endothelial growth factor (VEGF) and VE-cadherin as a marker of cell-cell adhesive bonds in serum among patients with CIN. The significance biomarkers of ED was tested in patients with CIN 1 (n = 25), CIN 2 (n = 17) and CIN 3 (n = 10) and patients without CIN (n = 12). There was a statistically significant increase in the number of DEC, a severe increase in the concentration of VEGF (CIN 1>CIN 3) and VE-cadherin down-regulation was revealed in CIN3 samples in compare to CIN 1-2. The markers, that we analyzed, should be considered as a useful tool in CIN grade assessment and individual outcome prognosis.

**Ключові слова:** ендотеліальна дисфункція, ЦІН, ДЕЦ, СЕФР, VE-кадгерін.

**Ключевые слова:** эндотелиальная дисфункция, ЦИН, ДЭЦ, СЭФР, VE-кадгерин.

**Key words:** endothelial dysfunction, CIN, DEC, VEGF, VE-cadherin.

**ВСТУП.** Преінвазивні пошкодження епітелію шийки матки – дисплазії або цервікальні інтраепітеліальні неоплазії – ініціюються і підтримуються вірусами папіломи людини (ВПЛ) високого канцерогенного ризику. Вони часто зустрічаються у жінок в віці від 25 до 40 років [1]. Останнім етапом перед виникненням інвазивного процесу є ЦІН 3, до якої відносять важку дисплазію і преінвазивний рак. ЦІН 3 прогресує до інвазивного раку в 12,0–37,5 % випадків [2].

Існує проблема розпізнавання ранньої стромальної інвазії при передракових змінах залозистого епітелію шийки матки, тому що розрізнити між собою залучення в неопластичний процес залозистих крипт і комплекси високодиференційованої аденокарциноми в стромі за формальними морфологічними ознаками часом неможливо [3].

Для уточнення ступеня тяжкості епітеліальних пошкоджень і складання індивідуального прогнозу необхідна розробка адекватного клінічного менеджменту ведення ЦІН на основі введення в діагностичний процес біомаркерів, визначення яких окремо або в

сукупності дозволить передбачити найближчий результат ЦІН.

В даний час як для підвищення якості діагностичної роботи і визначення індивідуального прогнозу перебігу ураження шийки матки, так і проведення необхідних лікувальних заходів велика увага приділяється біомаркерам альтерації ендотелію, таким, як десквамовані ендотеліоцити (ДЕЦ), E-кадгерин і судинно-ендотеліальний фактор росту (СЕФР) [4, 5].

Ендотелій являється одночасно мішенню і медіатором при онкологічній патології, зміни його функції спостерігаються вже на ранніх стадіях захворювання. Посилення десквамації ендотеліальних клітин в кров спостерігається при пошкодженні ендотелію. Автор методу J.Hladovec пов'язував збільшення кількості ДЕЦ з тенденцією до тромбозу і підвищеною проникністю судинної стінки [8].

Формування нових судин є обов'язковим для зростання, прогресування та розповсюдження епітеліальних пухлин. Сімейство СЕФР, як відомо, бере участь у процесі пухлинного неангіогенезу. Є повідомлен-

ня про стимулюючий вплив онкопротеїнами E6 ВПЛ на експресію СЕФР [9], а також про порушення експресії E-кадгерину при інактивації Rb онкопротеїнами E7 [10]. Зокрема, передбачається, що зниження експресії E-кадгерину є показовим маркером для оцінки потенційної злоякісності цервікального раку. E-кадгерин може бути маркером агресивності пухлини і потенційної прогресії ЦІН, а також служити мішенню для призначення ад'ювантної терапії на ранніх стадіях хвороби. Використання специфічних маркерів ендотеліальної дисфункції допоможе значно поліпшити точність, чутливість і специфічність традиційних програм скринінгу неоплазії шийки матки, а надалі також побудувати індивідуальний прогноз результату ЦІН.

Мета дослідження полягала у вивченні функціонального стану ендотелію при інтраепітеліальних ураженнях шийки матки, з використанням сучасних методів молекулярної біології, виділення біомаркерів, що сприяють діагностиці проліферативних змін епітелію і визначенню перебігу передракових станів шийки матки.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** У дослідження були задіяні 52 хворі з ЦІН різного ступеня, що лікувалися і спостерігалися на базі кафедри акушерства та гінекології № 1 Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова з 2010 по 2012 рік. Пацієнти мали патологію шийки матки, не були вагітні і не приймали імуносупресивне лікування або лікування вірусу папіломи людини (ВПЛ). Також, критеріями відбору служили відсутність запальних і реактивних змін на шийці матки.

Серед пацієнток з неоплазією шийки матки, ЦІН 1 було діагностовано у 25 хворих, ЦІН 2 у 17 жінок і ЦІН 3 – у 10. Вік жінок варіював в межах 29–40 років. Середній вік у пацієнток з ЦІН 1 становив 25,4±2,6 років, ЦІН 2 – 27,8±3,2 року і для ЦІН 3 – 27,5±3,8 років.

Всі пацієнтки були обстежені по стандартному протоколу: розширена кольпоскопія, цитологічне дослідження мазків за класифікацією Bethesda, 2001, вірусологічне дослідження двома методами (ПЛР з типунням). Гістологічну верифікацію проводили за матеріалами біопсії. Контрольну групу, отриману методом випадкової вибірки, склали 12 жінок (середній вік 25,6±2,3 років), у яких були відсутні клініко-морфологічні зміни епітелію шийки матки.

У ході роботи підраховувалися десквамовані ендотеліоцити методом J. Naidovec (1978). Метод заснований на ізоляції клітин разом з тромбоцитами з подальшим осадженням тромбоцитів за допомогою ЛДФ. З цією метою використовували свіжу цитровану кров.

Вміст VE-кадгерінів і СЕФР в сироватці крові визначали за допомогою кількісного визначення, методом імуноферментного аналізу тест-системами eBioscience виробництва Bender Med Systems (Австрія).

Статистична обробка цифрових даних проводилася за допомогою ліцензійного пакету програм Statistica (версія 5,1 «Statsoft Inc»). Однорідність дисперсій перевіряли за критерієм Фішера. Достовірність відмінностей між порівнюваними показниками визначали за критерієм Стьюдента і його аналогу для непараметричних розподілів – критерієм Манна-Уїтні. Статистично значущими вважали відмінності при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ ТА ОБГОВОРЕННЯ.

При морфологічному дослідженні було виявлено, що SIL низького ступеня тяжкості (плоска кондилома, ЦІН 1) властиво розташування незрілих клітин базального типу в нижній третині епітелію, в проміжному шарі визначався койлоцитоз. При SIL високого ступеня тяжкості (ЦІН 2, ЦІН 3) атипові клітини займали більше 1/3 епітелію, при цьому відзначалася підвищена щільність клітин, останні розташовувалися хаотично. Мітотична активність відповідала тяжкості враження: в ЦІН 1 мітози визначалися рідко, лише в нижній третині епітелію, ЦІН 2 – в 2 / 3 епітелію, в ЦІН 3 – у всій товщині епітелію.

При дослідженні маркерів альтерації ендотелію, було виявлено, що значення ДЕЦ, як скринінгового тесту на ендотеліальну дисфункцію, при ЦІН, значно відрізнялися від аналогічних параметрів у практично здорових осіб. Так, у пацієнток з діагностованою ЦІН 1 ДЕЦ визначалися в кількості 5,4±0,9\* 104/л, при ЦІН 2 показник ДЕЦ становив 6,9±0,9\* 104/л, а у хворих з ЦІН 3 – 2±0,8\* 104/л, відповідно. Значення перерахованих вище показників, були статистично достовірні ( $p \leq 0,05$ ) по відношенню до жінок з контрольної групи (2,7±0,7\* 104/л).

При аналізі показників СЕФР спостерігалася динаміка, яка була тотожна значенням десквамованих ендотеліоцитів. У здорових жінок репродуктивного віку рівень СЕФР визначався в межах 148,2±14,7 пг/мл. Рівень СЕФР при ЦІН 1 досягав 190,8±17,6 пг/мл ( $p < 0,05$ ), у пацієнток з ЦІН 2 – 304,3±22,6 пг/мл ( $p < 0,05$ ), серед хворих з ЦІН 3 – 423,6±31,1 пг/мл ( $p < 0,05$ ). Однак, на відміну від показників ДЕЦ, статистична достовірність зберігалася не тільки по відношенню до значень контрольної групи, а й між підгрупами (ЦІН 1, ЦІН 2, ЦІН 3) у основної групи жінок з патологією шийки матки.

Під час проведення дослідження концентрації E-кадгерину, звернув на себе увагу той факт, що, при ЦІН 1 (0,697±0,07 нг/мл) і ЦІН 2 (1,113±1,13 нг/мл), зберігаючи статистичну достовірність відносно здорових жінок ( $p < 0,05$ ), показники досліджуваного біомаркера, збільшувалися, а, при ЦІН 3 – знижувалися до 0,394±0,03 нг/мл, в той час, як значення E-кадгерину в контрольній групі становили 0,298±0,02 нг/мл.

Отримані результати, свідчили про наявність факторів, пов'язаних з ендотеліальною дисфункцією в генезі неопластичних процесів в шийці матки. Можливо, даний синдром пов'язаний з розвитком оксидативного стресу – стан клітин, пов'язаний з порушенням нормальної регуляції вільнорадикальних реакцій, який є індуктором клітинних пошкоджень, які призводять до розвитку різноманітних патологічних станів, включаючи цервікальний канцерогенез [1,3,8].

СЕФР бере участь у ангиогенезі та прогресуванні ЦІН. Висока експресія СЕФР при ЦІН 1-3 дозволяє використовувати його, як ранній маркер процесів неоангіогенезу і ймовірність виникнення раку. У ряді досліджень СЕФР має вплив на проникність судин, забезпечуючи вихід із судин плазмових білків і активуючи експресію тканинного фактора (клітинний ініціатор коагуляції крові), що веде до формування місць контакту для мігруючих ендотеліальних, гладком'язових і запальних клітин. СЕФР діє як ключовий медіа-

тор пухлинного ангиогенезу, стимулюючи зростання нових кровососних судин з довколишніх капілярів і даючи пухлині доступ до кисню і поживних речовин. SEФР відіграє важливу роль у підтримці судинного забезпечення пухлини, перешкоджаючи апоптозу незрілих клітин ендотелію. Він необхідний також для утворення нових лімфатичних судин, які представляють собою шлях для метастазування пухлини [6].

Наші дослідження підтверджуються даними літератури, де було показано зниження експресії VE-кадгеринів при прогресії неоплазій [4]. Особливо низький рівень VE-кадгеринів знаходять при ЦІН 3, осередках мікроінвазії і інвазивному раку. При цьому спостерігається послідовне зниження рівня VE-кадгеринів від ЦІН 1 і ЦІН 2 до ЦІН 3. У нашому дослідженні рівень експресії E-кадгерину при ЦІН 1 і ЦІН 2 був статистично вище, ніж у нормальному епітелію. Проте у ряді клінічних досліджень, при ЦІН 2, спостерігалося різке зниження експресії маркера, що ймовірно асоційоване з підвищеним ризиком прогресування хвороби у цих хворих [7,9].

Відсутність зниження експресії VE-кадгеринів при ЦІН 1 і ЦІН 2 в нашому дослідженні можна пояснити

наступним чином. ЦІН 1 і ЦІН 2 асоційовані з папіломовірусною інфекцією з високою ймовірністю регресії. Інфекція найчастіше елімінується протягом 18–24 місяців з регресією легкого ступеня неоплазії.

**ВИСНОВКИ.** 1. Цервікальна інтраепітеліальна неоплазія ініціює процеси оксидативного стресу, який у свою чергу, призводить до дисфункції ендотелію, яка прямо-пропорційна стадії розвитку ЦІН.

2. При збільшенні ступеня пошкодження ендотелію концентрація SEФР, незалежного фактора ангиогенезу, статистично достовірно, зростає від ЦІН 1 ( $190,8 \pm 17,6$  пг/мл) до ЦІН 3 ( $423,6 \pm 31,1$  пг/мл).

3. Експресію VE-кадгерінов слід вважати перспективним маркером для прогнозування перебігу інтраепітеліальних неоплазій шийки матки.

**ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.** Впровадження результатів дослідження, в клінічну практику, потенційно дозволить перейти до більш ефективного клінічного менеджменту ЦІН, з метою попередження подальшої прогресії і адекватного лікування передракової патології шийки матки.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Антонеева И. И. Оксидативный стресс на разных стадиях развития рака шейки матки / И. И. Антонеева, Е. Г. Сидоренко, Т. П. Генинг // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 10. – С. 33–36.
2. Данилова Н. В. Дифференциальная диагностика предопухолевых и регенераторных изменений эпителия шейки матки с использованием иммуногистохимического метода / Н. В. Данилова, Ю. Ю. Андреева, П. Г. Мальков // Архив патологии. – 2011. – № 2. – С. 10–14.
3. Сравнительная характеристика оксидативного стресса на разных стадиях рака шейки матки / И. И. Антонеева, Т. П. Генинг, Д. Р. Арсланова Е. Г. Сидоренко // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2011. – № 4. – С. 55–58.
4. Экспрессия е-кадгерина – биохимический маркер прогрессии заболевания при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях / Л. И. Короленкова, Е. В. Степанова, В. Д. Ермилова и др. // Вестник Московского Университета. – 2012. – Т. 53. – № 2. – С. 272–277.
5. Bodily J., Laimins L. A. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression / J. Bodily, L. A. Laimins // Trends Microbiol. – 2011. – N 19(1). – P. 33–39.
6. Down-regulation of E-cadherin is closely associated with progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but not with high-risk human papillomavirus (HPV) or disease outcome in cervical cancer / M. Branca, C. Giorgi, M. Ciotti et al. // Eur J Gynaecol Oncol. – 2006. – Vol. 27. – № 3. – P. 215–223.
7. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGFD, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis / PO. Van Trappen, D. Steele, DG. Lowe et al. // J Pathol. – 2003. – Vol. 201. – P. 544–554.
8. Increased vascular endothelial growth factor expression, CD3-positive cell infiltration, and oxidative stress in premalignant lesions of the cervix / Carrero Y, Callejas D, Alaca F // Cancer. – 2009. – Vol. 15. – № 115(16). – P. 3680–3688.
9. Markers of angiogenesis in high-risk, early-stage cervical cancer: a Gynecologic Oncology Group study / LM. Randall, BJ. Monk, KM. Darcy // Gynecol Oncol. – 2009. – № 112(3). – P. 583–589.
10. p16<sup>INK4A</sup> expression is related to grade of CIN and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome / M. Branca, M. Ciotti, D. Santini, et al. // Int J Gynecol Pathol – 2004 – Vol. 23 – P. 354–65.

Отримано 09.12.13