

На правах рукописи

СИДОРЕНКО Екатерина Геннадьевна

**ОБОСНОВАНИЕ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ**

14.01.12 – онкология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Уфа – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Ульяновский государственный университет».

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Антонеева Инна Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Урманчеева Адилия Феттяховна,

доктор медицинских наук

Батталова Гузель Юрьевна

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Защита состоится «_____» _____ 2012 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д208.006.04 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации по адресу: 450000, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации по адресу: 450000, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3.

Автореферат разослан «_____» _____ 2012 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

И.Р. Рахматуллина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Рак шейки матки (РШМ) занимает второе место по заболеваемости среди всех злокачественных опухолей гениталий, а в возрасте 15–39 лет РШМ занимает 1-е место по частоте встречаемости (19,2%). Отмечен рост заболеваемости РШМ среди женщин до 40 лет, особенно заметный у женщин моложе 29 лет (Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2009; Урманчеева А.Ф., Мерабишвили В.М. и соавт., 2001). Четко прослеживается рост показателей запущенности. В РФ местнораспространенные формы встречаются в половине случаев впервые выявленного РШМ (Чиссов В.И., Старинский В.В., 2004). Смертность от РШМ составляет 4,6% (Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2007). В РФ среди пациенток моложе 30 лет РШМ как причина смерти регистрируется в 8,4% случаев, в возрастной группе 30–39 лет – в 21%, у женщин в возрасте 40–49 лет РШМ находится на 2-м месте после рака молочной железы и составляет 11,2% (Чиссов В.И., Старинский В.В., 2010). По данным FIGO не менее 25% молодых женщин умирают от прогрессирования заболевания в первый же год после установления диагноза РШМ (Важенин А.В. и соавт., 2010).

До настоящего времени одной из главных проблем в диагностике РШМ является отсутствие достоверных критериев, позволяющих объективизировать полученные клиничко-патоморфологические данные и использовать их в качестве прогностических факторов при оценке течения РШМ (Козаченко А.В., 2006; Копнин Б.П., 2004; Пожарисский К.М., Леенман Е.Е., 2000).

По современным представлениям, состояние системы «Перекисное окисление липидов – антиоксиданты» (ПОЛ-АО) в организме играет важную роль в развитии опухолевого процесса. В настоящее время имеется большой экспериментальный и теоретический материал, на основании которого можно утверждать, что свободные радикалы являются важнейшими участниками большинства реакций, происходящих в живых клетках (Владимиров Ю.А., 2000; Зенков Н.К. и соавт., 2001). Именно свободным радикалам в последние годы отведена важная роль в развитии онкогенной трансформации клеток и опухолевой прогрессии (Cho JM., Manandhar S., 2008; Huang C, Yang S., 2008; Горожанская Э.Г., 2002). Накапливающиеся в литературе данные о молекулярных механизмах действия различных свободнорадикальных молекул свидетельствуют об их участии в регуляции роста и дифференцировки клеток (Лю Б.Н. и соавт.,

2006; Vijg J., 2000). Преобладание продукции активированных кислородных метаболитов в результате повышения их образования или истощения антиоксидантов, сопровождающееся активацией деструктивных процессов, получило название «оксидативный стресс» (Горожанская Э.Г., 2010). Процессы ПОЛ и антиокислительной защиты определенным образом изменяются при образовании и росте злокачественных опухолей, и представляется перспективным использование параметров этих процессов для определения направленности патологического процесса, прогноза и течения заболевания. Между тем, нет цельного представления о том, являются ли найденные нарушения причиной или следствием роста злокачественной опухоли, а явная стадийность изменений в системе ПОЛ-АО в динамике канцерогенеза создает трудности для эффективного применения антиоксидантов в качестве противоопухолевых средств. На сегодняшний день нет единого мнения об уровне ПОЛ в самих злокачественных опухолях.

Цель исследования. Выявление факторов прогноза рака шейки матки на основании исследования показателей системы «Перекисное окисление липидов – антиоксиданты».

Задачи исследования:

1. Оценить заболеваемость и смертность от рака шейки матки, провести сравнительный анализ показателей в зависимости от возраста больной, стадии, гистотипа и степени дифференцировки жительниц Ульяновской области за период 2005–2009 гг.

2. Изучить экспрессию p53, Bcl-2, Ki67 и ЭФР в опухолевой ткани шейки матки в динамике прогрессии опухоли.

3. Изучить уровень перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты в плазме крови, эритроцитах и опухолевой ткани больных РШМ на различных клинических стадиях заболевания.

4. Выявить в плазме крови, эритроцитах и опухолевой ткани прогностически значимые параметры оксидативных процессов на различных клинических стадиях рака шейки матки.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное клинимоρφологическое, иммуногистохимическое и биохимическое исследование соценкой состояния системы перекисного окисления липидов и антиоксидантов

в плазме крови, эритроцитах и опухолевой ткани при раке шейки матки на различных стадиях заболевания.

Выявлено, что динамика компонентов системы ПОЛ-АО в плазме крови, эритроцитах и опухолевой ткани свидетельствует о возникновении оксидативного стресса у больных раком шейки матки.

Установлено значение активности каталазы и малонового диальдегида в эритроцитах при начальном раке, активности каталазы в плазме крови при местноограниченном процессе и активности глутатионредуктазы в опухолевой ткани при распространенном процессе для прогнозирования безрецидивной выживаемости больных раком шейки матки.

Практическая значимость работы. Данное исследование имеет практическую направленность, так как посвящено вопросам совершенствования прогнозирования течения РШМ на основании оценки параметров системы «Перекисное окисление липидов-антиоксиданты». На основании установленных критериев получены показатели, использование которых оправдано с точки зрения доказательной медицины при прогнозировании безрецидивной выживаемости у больных раком шейки матки на различных клинических стадиях заболевания. Совершенствование прогноза определяет тактику лечения, что непосредственно влияет на снижение смертности больных от РШМ.

Внедрение результатов работы. Результаты исследования внедрены и используются в клинической практике Ульяновского областного клинического онкологического диспансера (УОКОД), учебном процессе кафедры онкологии и лучевой диагностики ИМЭиФК УлГУ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Статистический анализ заболеваемости и смертности от рака шейки матки у жительниц Ульяновской области позволяет предполагать, что значимость гистологического типа, степени дифференцировки опухоли и возраста пациентки для прогноза срока жизни с момента установки диагноза низкая.

2. На начальных стадиях и при местноограниченном раке шейки матки в опухолевых клетках имеет место максимальный уровень экспрессии Ki-67 и Vcl-2. При прогрессировании опухолевого процессе при раке шейки матки растет количество клеток, экспрессирующих мутантный p53 при одновременном снижении в них уровня экспрессии ЭФР.

3. В эритроцитах и опухолевой ткани рака шейки матки на всех клинических стадиях заболевания имеет место повышение уровня малонового диальдегида и активности глутатион-зависимых ферментов при одновременном снижении активности каталазы и супероксиддисмутазы, что может свидетельствовать о возникновении и нарастании оксидативного стресса.

4. Прогностическую значимость при оценке безрецидивной выживаемости при начальном раке шейки матки имеет уровень малонового диальдегида и активность каталазы в эритроцитах, при местноограниченном процессе – активность каталазы в плазме крови, при распространенном процессе – уровень глутатионредуктазы в опухолевой ткани.

Апробация работы. Результаты диссертации доложены на III общероссийской научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине» (Сочи, 2010); на V региональной конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева (Томск, 2010); на VI региональной конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева (Томск, 2011); на 75-й итоговой научно-практической конференции с международным участием, посвященной 80-летию со дня рождения академика Б.С. Гракова (Красноярск, 2011); на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы современной науки и образования» (Ульяновск, 2011); на международной научно-практической конференции «Молодежь и наука: модернизация и инновационное развитие страны» (Пенза, 2011); на Российской VII научно-практической конференции с элементами научной школы для молодежи «Модниковские чтения» (Ульяновск, 2011); на межкафедральном заседании кафедр ГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет» (Ульяновск, 2011); на расширенном заседании кафедры хирургии и онкологии с курсами ИПО ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» (Уфа, 2011).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них в журналах, рекомендованных ВАК – 6.

Личный вклад автора. Личное участие автора заключается в формулировании цели и задач исследования, разработки плана и методики исследования, клинико-инструментальном обследовании больных, заборе и подготовке материала для исследования, обработке результатов исследования и подготовке публикаций по материалам работы.

Соответствие диссертации паспорту специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.12 – «Онкология (медицинские науки)». Результаты проведенного исследования соответствуют области данной специальности, конкретно пункту 2 паспорта научной специальности.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на **136** страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов, 2 глав собственных исследований, заключения, содержащего основные положения диссертации, выводы, библиографический указатель из 261 работ (115 отечественных и 146 зарубежных источников). Работа иллюстрирована таблицами, рисунками, микрофотографиями.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Было обследовано 109 первичных больных РШМ, 20 больных с доброкачественными новообразованиями половых органов (миома матки, киста яичника). Контрольную группу, 20 человек, составили практически здоровые доноры со станции переливания крови. Изучение заболеваемости РШМ в Ульяновской области проведено за 5 лет (2005–2009 гг.) на основании анализа медицинских документов и данных ракового регистра УОКОД. В работу включена информация о 530 случаях впервые зарегистрированных опухолей шейки матки.

Средний возраст больных в основной группе составил $46 \pm 3,7$ лет (от 23 до 85 лет). Распределение больных по возрасту представлено в табл. 1.

Таблица 1

Распределение больных РШМ по возрасту

Возраст	Число больных	
	абс.	%
До 35 лет	22	20,2
36–48 лет	41	37,6
Старше 48 лет	46	42,2
Всего ...	109	100

Все больные имели морфологическую верификацию процесса: плоскоклеточный рак имел место у 88,9% больных, аденокарцинома – у 8,3%, железисто-плоскоклеточный рак – у 2,8%. Распределение больных в зависимости от степени дифференцировки представлено в табл. 2.

Распределение больных раком шейки матки по степени дифференцировки

Гистотип	Всего больных	Степень дифференцировки опухоли					
		высокая		умеренная		низкая	
		абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
Все рассмотренные градации	109	29	26,6	67	61,5	13	11,9
Из них: плоскоклеточный ороговевающий	41	13	31,7	22	53,7	6	14,6
плоскоклеточный неороговевающий	56	11	19,6	40	71,5	5	8,9
аденокарцинома	6	4	44,4	4	44,4	1	11,2
железисто- плоскоклеточный	3	1	33,3	1	33,3	1	33,3

Среди больных РШМ (n=109) экзофитная форма роста встречалась в 20,2% случаев, эндофитная – в 53,2%, смешанная – в 26,6% случаев. Больные были распределены на три группы в зависимости от распространенности процесса. В первую группу (n=37) вошли пациентки с начальным опухолевым процессом (Ia1–Ia2 стадии по FIGO), во вторую группу (n=36) – пациентки с местноограниченным процессом (Ib–IIa стадии), третью группу (n=36) составили больные с распространенным опухолевым процессом (IIb–IV стадии).

Для биохимического исследования использовалась опухолевая ткань шейки матки и стабилизированная кровь, которая после центрифугирования 10 мин при 3000 оборотов разделялась на плазму и эритроцитарную массу. Гомогенат опухоли готовился на сахарозе, рН=7,4. Определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА) по Л.И. Андреевой (1988), активность каталазы по А.И. Карпищенко (1999), активность глутатионредуктазы (ГР) по В.С. Асатиани (1969), активность супероксиддисмутазы (СОД) по Nishikimi (1972). Активность глутатион-S-трансферазы определяли по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом

(ДХНБ) по А.И. Карпищенко (1999) . Увеличение концентрации конъюгатов в ходе реакции регистрировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм (максимум поглощения глутатион-S-ДХНБ). Активность антиоксидантных ферментов и уровень МДА оценивалась спектрофотометрическим методом и пересчитывалась на 1 мг белка для ткани, для эритроцитов – с учетом разведения (1:100). Белок определяли по методу Брэдфорда.

Методика морфологического исследования препаратов заключалась в одновременном исследовании опухоли и пограничных тканей. Материал фиксировали в нейтральном забуференном формалине с обычной стандартной проводкой и последующей заливкой в парафин. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином и проводили ШИК-реакцию. При просмотре гистологических препаратов выбирался блок с периферической тканью шейки матки, из которого изготавливали гистологические срезы для иммуногистохимического (ИГХ) исследования.

Иммуногистохимическое исследование было выполнено с использованием моно- и поликлональных антител для выявления онкобелков Bcl-2, Ki67, ЭФР, p53 (фирма «Дакко»). Критерием положительной реакции для экспрессии p53 считалась окраска 10% и более ядер опухолевых клеток. Для определения ЭФР использовались поликлональные мышинные антитела к EGFR (BioGenex, prediluted antibody). Bcl-2 обнаруживался с помощью моноклональных антител к Bcl-2, клон Bcl-2/100/D5, IgG1 (NCL-bcl-2 Novocastra) в разведении 1:80 при инкубации 60 мин. Положительной считалась реакция при цитоплазматической и мембранной окраске более 10% опухолевых клеток. Проллиферативная 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/D5, IgG1 (NCL-bcl-2 Novocastra) в разведении 1:80 при инкубации 60 мин. Положительной считалась реакция при цитоплазматической и мембранной окраске более 10% опухолевых клеток.

Статистический анализ данных производился с помощью компьютерной программы электронных таблиц Microsoft®Excel 2002 корпорации Microsoft, 1985–2002 гг., серийный номер 54185-640-0000025-17443 и пакета прикладных программ STATISTICA®6 фирмы StatSoft Inc. (2001) STATISTICA. Для сравнения категориальных переменных в двух группах использовался непараметри-

ческий критерий Манна-Уитни и для сравнения количественных переменных, соответствующих нормальному распределению, критерий Стьюдента. Построение кривых выживаемости выполнялось методом Каплана-Мейера, для сравнения кривых выживаемости применялся логранговый критерий. Анализ корреляций между признаками осуществлялся с помощью метода Пирсона.

Результаты исследования. Анализируемый нами период (2005–2009 гг.) характеризуется ростом показателей заболеваемости РШМ (рис. 1). Средний возраст больных на момент установки диагноза колебался от 40 до 58 лет. Распределение по возрасту при этом нормальное. Срок жизни с момента установки диагноза у больных РШМ варьировал от 1 до 43 месяцев, составляя в среднем 11,7 месяца. При этом срок жизни с момента установки диагноза слабо коррелировал с возрастом ($r=-0,13$; $p=0,11$).

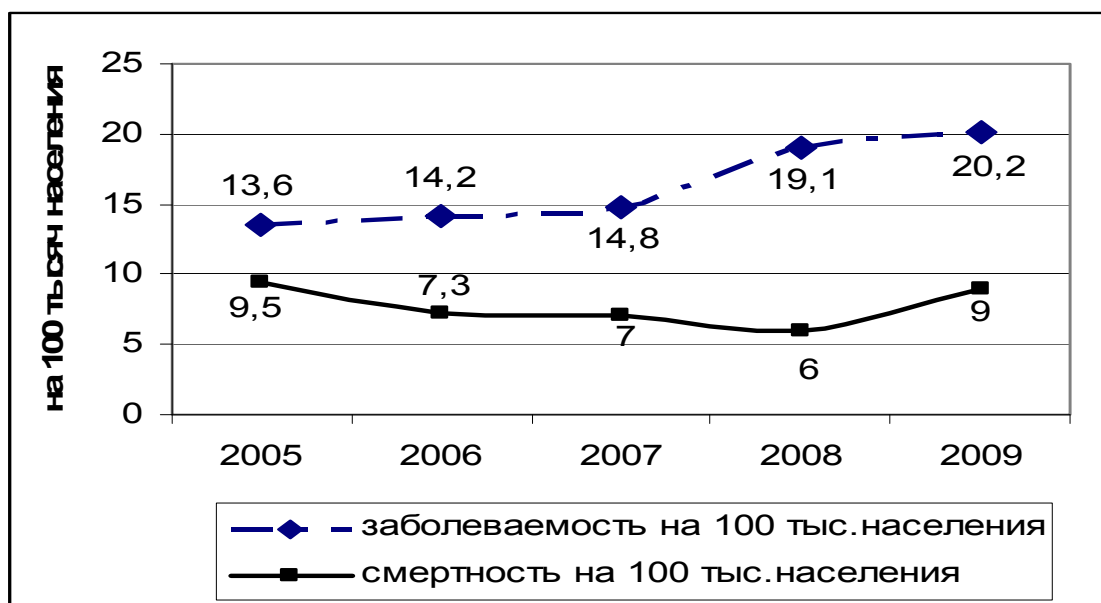


Рис. 1. Показатели заболеваемости и смертности от РШМ (на 100 тыс. населения) в Ульяновской области в период 2005–2009 гг.

Больные с плоскоклеточным ороговевающим раком составили 36,9%, с плоскоклеточным неороговевающим – 50%, с аденокарциномой – 7,3%, редкие формы РШМ составили 5,5%. Значимость гистотипа опухоли для прогноза жизни с момента установки диагноза низкая. Сравнительный анализ сроков жизни с момента установки диагноза при различных стадиях по FIGO показал статистически достоверно меньшую продолжительность жизни у больных IV стадии заболевания по сравнению с больными, имевшими I, II и III стадии по FIGO. По степени дифференцировки опухоли больные были разделены на 3 группы (табл. 3).

Зависимость срока жизни с момента установки диагноза от степени дифференцировки не значима.

Таблица 3

Распределение больных раком шейки матки по степени дифференцировки эпителиальных гистоструктур

Гистотип	Всего больных	Степень дифференцировки опухоли					
		высокая		умеренная		низкая	
		абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
Все рассмотренные градации	530	125	23,6	345	65,1	60	11,3
Из них: плоскоклеточный ороговевающий	207	54	26,1	136	65,7	17	8,2
плоскоклеточный неороговевающий	282	50	17,7	196	69,5	36	12,8
аденокарцинома	41	21	51,2	13	31,7	7	17,1

Таким образом, РШМ в Ульяновской области за период 2005–2009 гг. имел выраженную тенденцию к увеличению заболеваемости и смертности. При этом гистологический тип, степень дифференцировки опухоли и возраст пациентки слабо коррелировали со сроком жизни с момента установки диагноза.

При иммуногистохимическом исследовании в группе пациенток с начальным процессом p53 экспрессировали 73,3±3,7% клеток в эпителии и 46,0±2,4% клеток в строме; у пациенток с местноограниченным процессом 40,0±1,8% и 53,3±3,2% соответственно.

В группе больных с распространенным РШМ экспрессия p53 составила в эпителиальных клетках 53,3±3,1% и в клетках стромы – 88,9±4,7%. В ткани внешне неизменной шейки матки экспрессия p53 не выявлена.

Во внешне неизменной шейке матки Ki-67+ клетки в эпителии составили 7,6±3,2%, в строме – 3,0±0,4%. В 1-ой группе пациенток Ki-67 экспрессировали 93,3±3,2% клеток в эпителии и 66,7±1,7% клеток в строме. У пациенток 2-й группы в 91,6±4,8% и 40,0±1,4% соответственно. В 3-ей группе больных экспрессия Ki-67 в клетках эпителия составила 88,9±4,5%, в клетках стромы – 66,7±3,1%.

Положительная реакция с антителами к ЭФР в эпителиальных клетках была выявлена в группе пациенток с начальным РШМ в $6,7 \pm 1,6\%$, в строме – в $33,4 \pm 3,2\%$. У пациенток во 2- и 3-й группах положительной реакции с антителами к ЭФР в эпителии выявлено не было, а в клетках стромы – в $13,3 \pm 1,6$ и $20,0 \pm 2,1\%$ соответственно. В ткани внешне неизменной шейки матки экспрессия ЭФР не выявлена.

Во внешне неизменной шейке матки Vcl-2 экспрессировали $23,4 \pm 2,7\%$ в эпителии и $9,6 \pm 2,8\%$ клеток в строме. Наблюдается 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 экспрессии при распространенном процессе до $33,3 \pm 3,1\%$. Динамика экспрессии Vcl-2 в строме аналогичная. При начальном РШМ Vcl-2+ клетки составили $7,4 \pm 2,1\%$, при местноразличенном процессе – $12,6 \pm 4,2\%$, при распространенном опухолевом процессе – $8,0 \pm 2,6\%$.

Таким образом, прогрессирующее РШМ сопровождается повышением пролиферативной активности раковых клеток, наиболее выраженной при местноразличенном процессе. Так же отмечено увеличение уровня Vcl-2, что говорит об увеличении антиапоптозического фактора. Подобные находки в сочетании с высоким уровнем p53 объясняют высокий злокачественный потенциал этих новообразований.

При изучении параметров системы ПОЛ-АО в плазме крови больных РШМ установлено, что уровень МДА статистически значимо ($p < 0,05$) снижен на всех стадиях заболевания. В 1-й группе МДА составила $5,40 \pm 0,371$ мкмоль/л, во второй – $4,23 \pm 0,274$ мкмоль/л, в третьей – $3,66 \pm 0,183$ мкмоль/л против $7,99 \pm 0,544$ мкмоль/л в группе контроля.

При изучении ферментов антиоксидантной системы в плазме крови, нами было выявлено значительное ($p < 0,05$) повышение активности ГР у больных с начальным РШМ ($0,082 \pm 0,0087$ мкмоль/мин/л против $0,018 \pm 0,0008$ мкмоль/мин/л в контроле) (рис. 2).

По мере прогрессирования опухолевого процесса активность ГР статистически значимо снижается до $0,023 \pm 0,0024$ мкмоль/мин/л во 2-й группе, в 3-й группе составила $0,025 \pm 0,0019$ мкмоль/мин/л. Активность ГТ при Ia1–Ia2 стадиях составила $0,051 \pm 0,0047$ мкмоль/мин/л, при Ib–IIa – $0,059 \pm 0,0056$ мкмоль/мин/л

против $0,031 \pm 0,0008$ мкмоль/мин/л в контроле. При II-IV стадиях РШМ активность ГТ снижается до $0,045 \pm 0,0045$ мкмоль/мин/л, оставаясь, тем не менее, достоверно высокой ($p < 0,05$) по отношению к контрольным значениям.

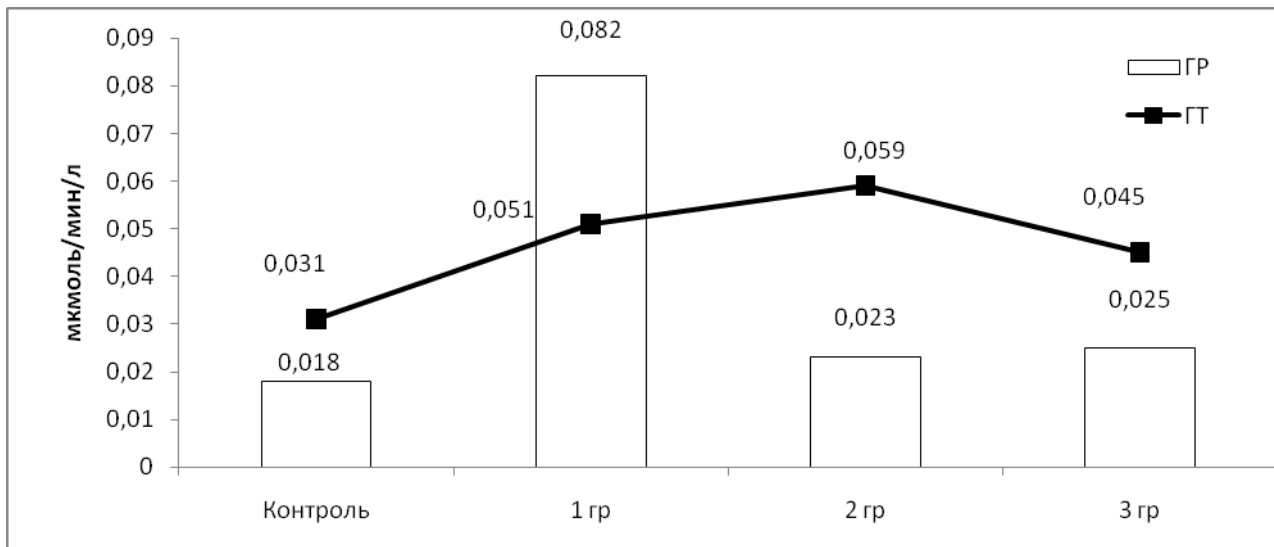


Рис. 2. Диаграмма изменения уровня ГР и ГТ в плазме крови больных на разных стадиях РШМ

Активность каталазы у больных 1-ой группы составила $0,13 \pm 0,008$ ммоль/мин/л против $0,23 \pm 0,046$ ммоль/мин/л в контроле, во 2- и 3-ей группах – $0,04 \pm 0,005$ ммоль/мин/л и $0,03 \pm 0,002$ ммоль/мин/л соответственно (рис. 3).

Таким образом, динамика компонентов системы ПОЛ-АО в плазме крови при прогрессировании РШМ позволяет предполагать возникновение оксидативного стресса, особенно у больных местноограниченном РШМ.

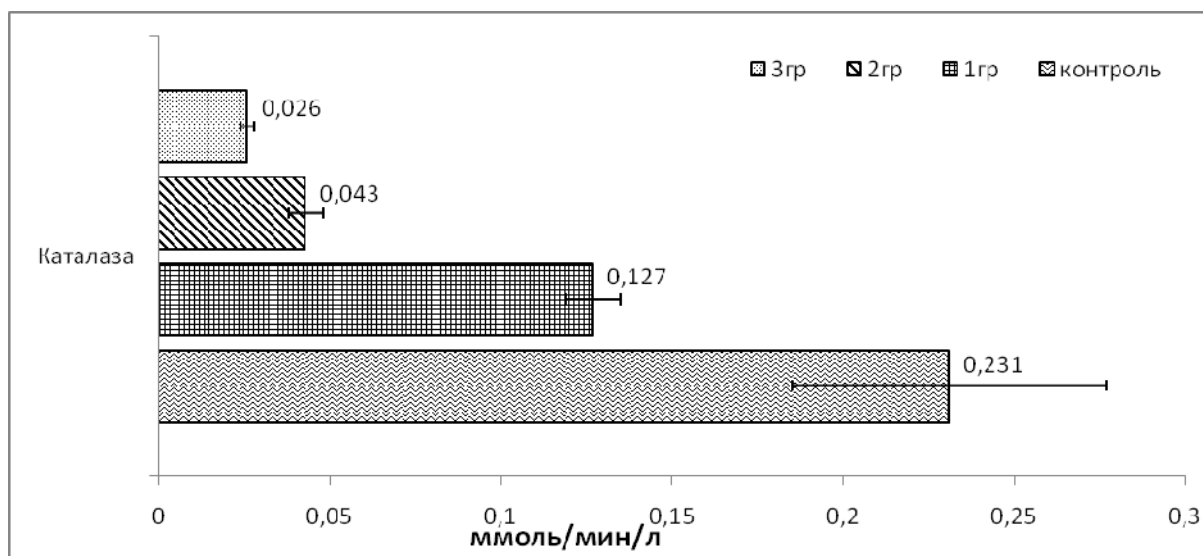


Рис. 3. Диаграмма изменения активности каталазы в плазме крови больных на разных стадиях РШМ

Интенсивность ПОЛ в эритроцитах значительно ($p<0,05$) нарастает по мере прогрессирования опухолевого процесса. В 1-й группе концентрация МДА составила $416,60\pm 22,782$ мкмоль/л, во 2-й – $484,80\pm 12,707$ мкмоль/л и в 3-й – $436,70\pm 17,170$ мкмоль/л против $305,43\pm 10,360$ мкмоль/л в контрольной группе (рис. 4). Изучая активность глутатион-зависимых ферментов, была выявлена аналогичная динамика активности ГТ.

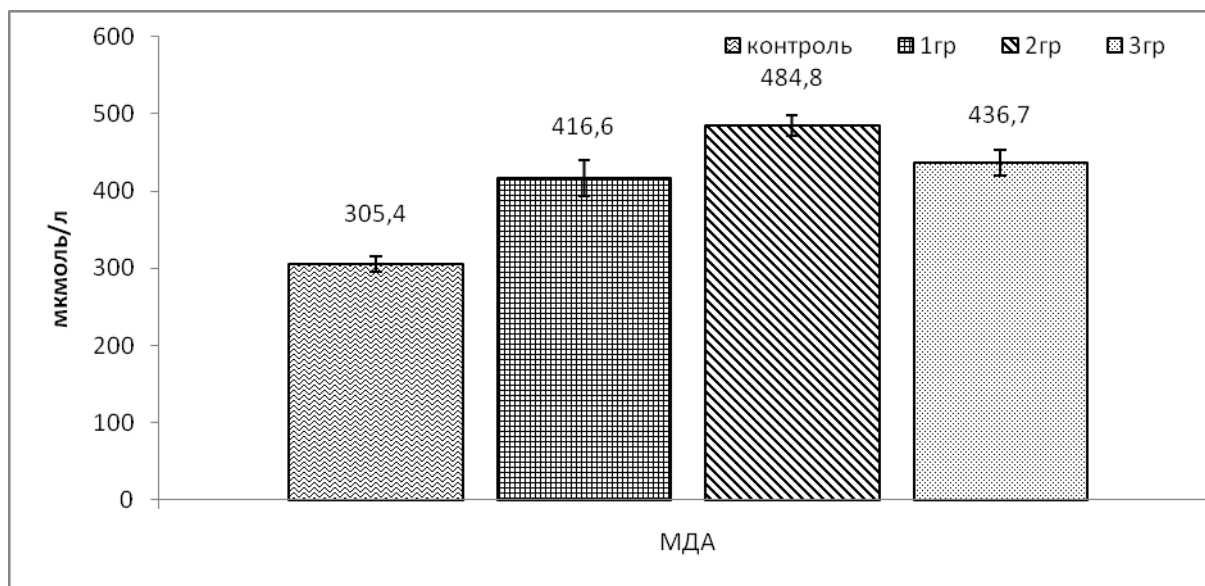


Рис. 4. Диаграмма изменения уровня МДА в эритроцитах больных на разных стадиях РШМ

Значимо повышенная ($p<0,05$) по сравнению с контролем активность ГТ при Ia стадии РШМ ($0,31\pm 0,022$ мкмоль/мин/л против $0,20\pm 0,025$ мкмоль/мин/л), продолжает расти при Ib-IIa стадиях заболевания ($0,38\pm 0,018$ мкмоль/мин/л). При Ib–IV стадиях РШМ отмечается снижение активности фермента по сравнению с предыдущей стадией ($p=0,03$), оставаясь статистически значимо высокой по сравнению с контрольной группой ($0,32\pm 0,017$ мкмоль/мин/л). Активность ГР в эритроцитах достоверно ($p<0,05$) снижалась при начальном РШМ ($0,06\pm 0,005$ мкмоль/мин/л против $0,07\pm 0,006$ мкмоль/мин/л в контроле). По мере прогрессирования заболевания прослеживается рост активности данного фермента ($p>0,05$), и при местноограниченном процессе составляет $0,08\pm 0,009$ мкмоль/мин/л, при распространенном процессе – $0,09\pm 0,0068$ мкмоль/мин/л.

Более чем в 4 раза снижена активность каталазы при начальном РШМ – $10,71\pm 0,980$ ммоль/мин/л по сравнению с контрольной группой ($41,83\pm 2,800$

ммоль/мин/л). По мере прогрессирования заболевания отмечается достоверный рост ($p < 0,05$) активности каталазы и при местноограниченном, и при распространенном процессе по сравнению с предыдущей стадией ($14,49 \pm 0,340$ ммоль/мин/л и $27,70 \pm 1,194$ ммоль/мин/л соответственно), тем не менее, оставаясь достоверно ниже ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис.5). При изучении СОД в эритроцитах при РШМ не было выявлено статистически значимых отличий от значений в контрольной группе на всех стадиях РШМ ($p > 0,05$). Наблюдаемая динамика МДА и каталазы свидетельствует о диспропорции образования O_2 и H_2O_2 , усиливаемой повышением содержания глутатионзависимых ферментов (ГР и ГТ), участвующих в разложении перекисей.

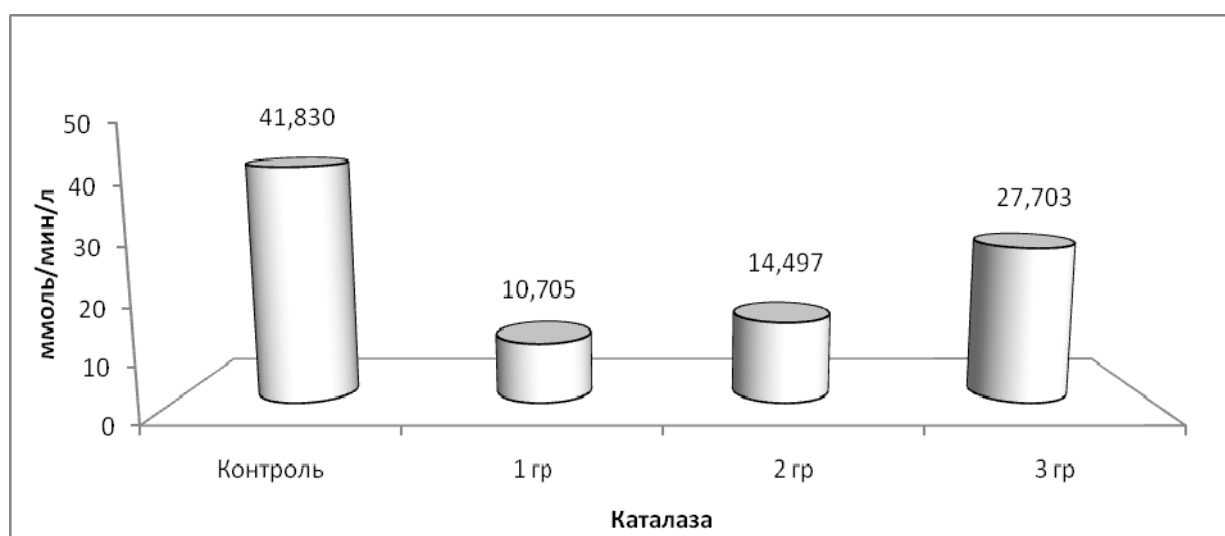


Рис. 5. Диаграмма изменения активности каталазы в эритроцитах крови больных на разных стадиях РШМ

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 значимо ($p < 0,05$) отличалось от уровня МДА в ткани внешне неизменной шейки матки ($2,11 \pm 0,131$ мкмоль/мг белка).

Ключевым ферментом антиперекисной защиты клеток считают СОД, инактивирующую супероксиданион радикал и работающую в клетке в каскаде с ферментами, способными разлагать перекись водорода – каталазой и пероксидазой. Активность СОД в опухолевой ткани, значимо повышенная ($p < 0,05$) по отношению к группе сравнения у пациенток 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 IIb–IV

($1,52 \pm 0,567$ усл. ед/мг белка). Сходная динамика активности имела место и для каталазы 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 значимо ($p < 0,05$) снижалась на последующих стадиях заболевания ($0,09 \pm 0,003$ ммоль/мг белка и $0,07 \pm 0,003$ ммоль/мг белка при местноограниченном и распространенном опухолевом процессах соответственно).

Нами было установлено существенное и значимое ($p < 0,05$) возрастание активности ферментов глутатионовой группы при прогрессировании РШМ (рис. 6).

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 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).

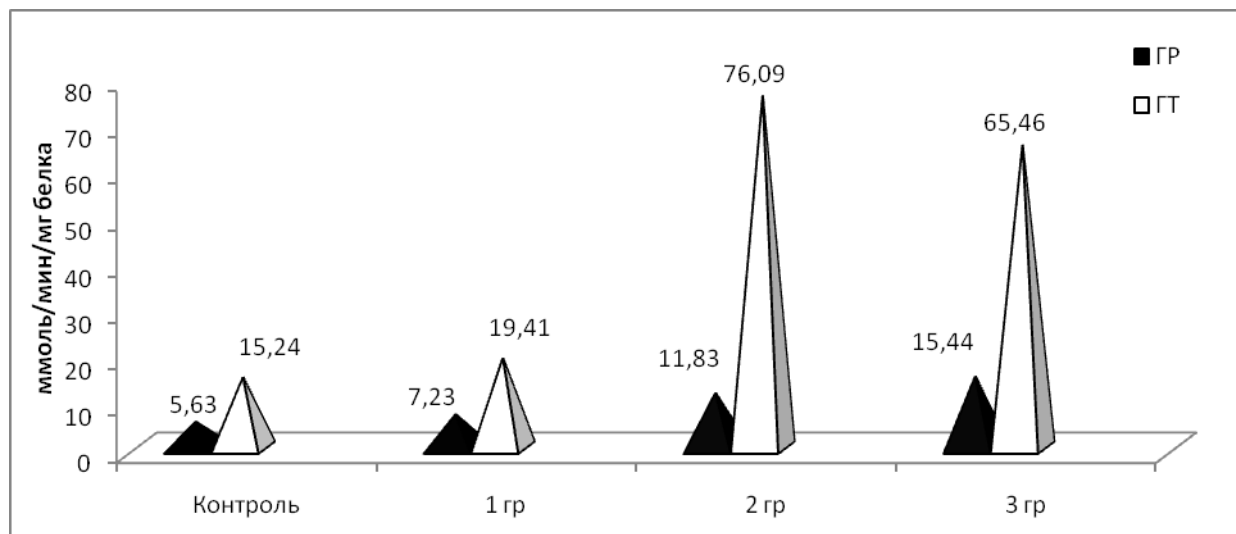


Рис. 6. Диаграмма изменения активности ГР и ГТ в опухолевой ткани больных на разных стадиях РШМ

Таким образом, по мере прогрессирования опухолевого процесса, при снижении активности СОД и каталазы имело место увеличение активности глутатион-зависимых ферментов ГР и ГТ. Существует мнение, что подобная динамика ферментативного звена антиоксидантной системы в злокачественных клетках указывает на ведущую роль ГТ и ГР в инактивации пероксидов (Мор-

гоев А.Э. с соавт., 2011). 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 .

При анализе связей между сроком безрецидивной выживаемости больных РШМ и параметрами компонентов системы ПОЛ-АО установлено следующее. При значениях активности каталазы в эритроцитах больных начальных стадий РШМ от 2,2 до 9,5 ммоль/мин/л период безрецидивной выживаемости составил 18 месяцев у $65,7 \pm 1,4\%$, а при значениях 10,5–19,4 ммоль/мин/л – у $82,0 \pm 1,0\%$ больных ($p=0,046$). При анализе уровня активности каталазы в эритроцитах у больных 2- и 3-й групп достоверных различий между этими показателями, зависимости от сроков безрецидивной выживаемости не выявлено.

При активности каталазы в плазме крови у больных с местноограниченным РШМ от 0,008 до 0,035 ммоль/мин/л 18-месячный период безрецидивной выживаемости имел место у $76,4 \pm 1,2\%$ больных, при значениях 0,041–0,113 ммоль/мин/л – у $56,3 \pm 1,4\%$ больных ($p=0,006$). У пациенток 1- и 3-й групп не выявлено значимых различий между показателями активности каталазы в плазме крови и периодом безрецидивной выживаемости. При анализе зависимости периода безрецидивной выживаемости от активности каталазы в опухолевой ткани у пациенток всех 3-х групп статистически значимых различий также не выявлено.

При уровне МДА в эритроцитах у больных с Ia стадией РШМ от 215,8 до 397,1 мкмоль/л 18-месячный период безрецидивной выживаемости имел место у $60,2 \pm 1,6\%$ больных, при уровне 405,0–621,5 мкмоль/л – у $83,8 \pm 0,9\%$ ($p=0,04$). У пациентов 2- и 3-й групп значимых различий между показателем концентрации МДА в эритроцитах крови и периодом безрецидивной выживаемости не выявлено. При анализе зависимости периода безрецидивной выживаемости от уровня МДА в плазме крови и опухолевой ткани у пациентов всех 3-х групп статистически значимых различий также не выявлено.

При значениях ГР в опухолевой ткани у больных с распространенным РШМ от 10,9 до 14,9 ммоль/мин/мг белка период безрецидивной выживаемости составил 18 месяцев у $19,2 \pm 0,7\%$ больных, а при значениях 15,2–

18,5 ммоль/мин/мг – у 56,7%±1,2% больных. При анализе активности ГР в опухолевой ткани у больных 1- и 2-ой групп, а также уровня ГР в плазме крови и эритроцитах у пациенток всех 3-х групп достоверных различий между этими показателями, зависимости от сроков безрецидивной выживаемости не выявлено. При анализе зависимости безрецидивной выживаемости от активности ГТ в эритроцитах, плазме крови и опухолевой ткани, а также СОД в эритроцитах и опухолевой ткани у пациенток всех 3-х групп статистически значимых различий не выявлено ($p>0,05$).

Таким образом, на основании результатов диссертационного исследования предлагается алгоритм дополнительных лабораторных исследований, необходимых для прогноза безрецидивной выживаемости больных РШМ (рис. 7).



Кат – каталаза, МДА – малоновый диальдегид, ГР – глутатионредуктаза, РШМ – рак шейки матки, ПБВ – период безрецидивной выживаемости.

Рис. 7. Схема алгоритма дополнительных лабораторных исследований для прогноза безрецидивной выживаемости больных РШМ

ВЫВОДЫ:

1. Анализ данных заболеваемости и смертности от рака шейки матки жительниц Ульяновской области за период 2005–2009 гг. выявил рост заболеваемости (от 13,6 до 20,2 на 100 тыс.); имевшаяся тенденция к постепенному снижению смертности от рака шейки матки в 2005–2008 гг., сменяется выраженным ростом к 2009г (с 6 до 9 на 100 тыс.) При этом гистологический тип, степень дифференцировки опухоли и возраст пациентки слабо коррелировали со сроком жизни с момента установки диагноза.

2. По мере прогрессирования рака шейки матки растет количество опухолевых клеток, экспрессирующих мутантный p53 (от 46% при начальном раке до 88% при распространенном процессе). Высокий уровень экспрессии Ki-67 в опухолевых клетках имеется на всех стадиях заболевания, наибольший – при Ia стадии (93%). При Ib–IIa стадиях рака шейки матки отмечается усиление экспрессии Vcl-2 более чем в два раза по сравнению с начальным и распространенным процессами. По мере прогрессирования опухолевого процесса наблюдается снижение экспрессии ЭФР в опухолевых клетках.

3. Уровень малонового диальдегида у больных раком шейки матки в плазме крови понижен, а в эритроцитах повышен на всех клинических стадиях заболевания. Активность глутатион-зависимых ферментов значительно повышена на начальных стадиях заболевания. Активность каталазы снижена на всех стадиях заболевания, как в плазме, так и в эритроцитах.

4. В опухолевой ткани рака шейки матки на всех клинических стадиях заболевания отмечается высокий уровень малонового диальдегида при одновременном снижении активности каталазы и супероксиддисмутазы, что может свидетельствовать о нарастании в опухолевой ткани оксидативного стресса.

5. Прогностическую значимость при оценке безрецидивной выживаемости при начальном раке шейки матки имеет активность каталазы и уровень малонового диальдегида в эритроцитах; при местноограниченном процессе – активность каталазы в плазме; при распространенном процессе – уровень глутатионредуктазы в опухолевой ткани.

Практические рекомендации:

1. У пациенток с РШМ на всех клинических стадиях не целесообразно учитывать уровень экспрессии ЭФР в эпителии опухолевой ткани. Рекоменду-

ется оценка уровня экспрессии ЭФР в строме опухоли при местнораспространенном и распространенном процессах.

2. В процессе прогрессирования рака шейки матки опухоль гиперэкспрессирует белок мутантного гена p53, что следует учитывать при разработке схем молекулярно-направленной терапии, имеющей специфическую мишенью рецепторы и сигнальные пути трансдукции, контролируемые клеточную пролиферацию и апоптоз в раковых опухолях шейки матки.

3. Антиоксидантная терапия с целью коррекции паранеопластических процессов в эритроцитах и опухолевой ткани целесообразна на всех стадиях РШМ, поскольку имеет место активация свободнорадикальных процессов, не компенсируемая увеличением АО активности.

4. В комплексе обследования женщин, имеющих злокачественную опухоль шейки матки, для прогноза течения безрецидивного периода рекомендовано определение:

- у пациенток с начальным РШМ уровня МДА и активность каталазы в эритроцитах крови;
- у пациенток с местнораспространенном РШМ активность каталазы в плазме;
- у пациенток с распространенным РШМ активность глутатионредуктазы в опухолевой ткани.

5. Предложен алгоритм по использованию показателей системы «Перекисное окисление липидов-антиоксиданты» для совершенствования прогноза безрецидивной выживаемости больных РШМ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Уровень ПОЛ-АО в плазме крови больных на разных стадиях развития рака шейки матки / Сидоренко Е.Г., Антонеева И.И. // Медицинский академический журнал. – 2010. – № 5, том 10. – С. 31–32.**

2. Оксидативный стресс на разных стадиях развития рака шейки матки / Антонеева И.И., Сидоренко Е.Г., Генинг Т.П. // Материалы III общероссийской научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине», Сочи. – 2010. – С. 33–36.

3. Срок жизни с момента установки диагноза больных раком шейки матки в Ульяновской области / Антонеева И.И., Сидоренко Е.Г., Генинг Т.П. // Поволжский онкологический вестник. – 2010. – № 4. – С. 29–33.

4. Уровень перекисного окисления липидов и ферментативное звено антиоксидантной системы эритроцитов при раке шейки матки / Антонеева И.И., Генинг Т.П., Сидоренко Е.Г. // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – Прил. № 1 – С. 17.

5. Анализ заболеваемости раком шейки матки в Ульяновской области / Антонеева И.И., Сидоренко Е.Г., Генинг Т.П. // Креативная хирургия и онкология. – 2011. – № 2. С. 33–35.

6. Нейтрофилы периферической крови при прогрессировании рака шейки матки / Абакумова Т.В., Сидоренко Е.Г., Антонеева И.И., Генинг Т.П. // Иммунология репродукции. – 2011. – № 4–5, том 13. – С. 416.

7. Особенности ферментативного звена антиоксидантной системы опухолевых клеток в динамике рака шейки матки / Сидоренко Е.Г. // Аспирантский вестник Поволжья. – 2011. – № 5–6. – С. 166–168.

8. Цитотоксический потенциал нейтрофилов периферической крови при раке шейки матки / Абакумова Т.В., Сидоренко Е.Г., Генинг С.О., Барышева Т.С. // Медицинский альманах. – Спецвыпуск «Сборник материалов X-й научной сессии молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем в медицине». – Н. Новгород. – март 2011. – С. 47–48.

9. Ферменты антиоксидантной защиты в опухолевой ткани при раке шейки матки / Арсланова Д.Р., Антонеева И.И., Абакумова Т.В., Сидоренко Е.Г., Воронова О.С. // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – Прил. № 1. – 2011. – С. 13.

10. Состояние прооксидантной и антиоксидантной систем в опухолевой ткани в динамике рака шейки матки / Генинг С.О., Арсланова Д.Р., Абакумова Т.В., Сидоренко Е.Г. // Материалы 75-ой итоговой научно-практической конференции с международным участием, посвященная 80-летию со дня рождения академика Б.С. Гракова, Красноярск. – 2011. – С. 123–124.

11. Экспрессия маркеров апоптоза в паренхиме опухолевой ткани при раке шейки матки / Сидоренко Е.Г., Антонеева И.И., Генинг С.О., Емелькин Н.В., Долгов П.Г. // Материалы международной научно-практической конференции «Молодежь и наука: модернизация и инновационное развитие страны», Пенза. – 2011. – С. 71–73.

12. Антиоксидантная активность опухолевой ткани как фактор защиты неоплазмы при раке шейки матки / Сидоренко Е.Г., Арсланова Д.Р., Генинг С.О., Воронова О.С. // Бюллетень Северного государственного медицинского университета. – 2011. – № 1, вып. XXVI. – С. 63–64.

13. Сравнительная характеристика оксидативного стресса на разных стадиях рака шейки матки/ Антонеева И.И., Генинг Т.П., Арсланова Д.Р. Сидоренко Е.Г. // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2011. – № 4. – С. 55–58.

Список сокращений:

ИМЭиФК УлГУ – институт медицины, экологии и физической культуры
Ульяновского государственного университета

ГР – глутатионредуктаза

ГТ – глутатионтрансфераза

МДА – малоновый диальдегид

СОД – супероксиддисмутаза

УОКОД – Ульяновский областной клинический онкологический диспансер

ЭФР – эпидермальный фактор роста

СИДОРЕНКО Екатерина Геннадьевна

**ОБОСНОВАНИЕ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Издательская лицензия № 06788 от 01.11.2001 г.
ООО «Издательство «Здравоохранение Башкортостана»
450000, РБ, г. Уфа, а/я 1293; тел.: (347) 250-81-20; тел./факс (347) 250-13-82.

Подписано в печать 14.02.2012 г.
Формат 60×84/16. Гарнитура Times New Roman.
Бумага офсетная. Отпечатано на ризографе.
Усл. печ. л. 1,4. Уч.-изд. л.
Тираж 100. Заказ № 682.

