

УДК 618.146:618.1-022.7:578.827.1]-073(043.3)

©В.Г. Марічереда, Н.М. Рожковська, В.І. Гладчук

**АНАЛІЗ КОНСТИТУТИВНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ПРООНКОГЕНУ STAT-3
В КЛІТИНАХ ЕНДОЦЕРВИКСУ***Одеський національний медичний університет*

АНАЛІЗ КОНСТИТУТИВНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ПРООНКОГЕНУ STAT-3 В КЛІТИНАХ ЕНДОЦЕРВИКСУ. У статті наведено аналіз даних останніх досліджень ролі сигнального трансдуктора і активатора транскрипції 3 (STAT3), який є посередником транскрипційної відповіді, що сприяє виживанню та швидкому росту клітин і ангиогенезу. Надлишок цитокінів, які активізують STAT3 в межах мікросередовища пухлини, таких як, інтерлейкіни, створює основу сигнальної мережі, яка одночасно просуває ріст неопластичного епітелію, ініціює запалення і пригнічує анти-пухлинну імунну відповідь організму. Відповідно, аномальна і постійна активація STAT3 часто спостерігається в злоякісних пухлинах епітеліального походження таких як рак шийки матки.

АНАЛИЗ КОНСТИТУТИВНОЙ ЕКСПРЕССИИ ПРООНКОГЕНА STAT-3 В КЛЕТКАХ ЕНДОЦЕРВИКСА. В статье приведен анализ данных последних исследований роли сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 3 (STAT3), который является посредником транскрипционного ответа, что способствует выживанию и быстрому росту клеток и ангиогенеза. Избыток цитокинов, активизирующих STAT3 в пределах микросреды опухоли, таких как, интерлейкины, создает основу сигнальной сети, одновременно продвигает рост неопластического эпителия, инициирует воспаление и подавляет анти-опухолевый иммунный ответ организма. Соответственно, аномальная и постоянная активация STAT3 часто наблюдается в злокачественных опухолях эпителиального происхождения таких как рак шейки матки.

ANALYSIS OF CONSTITUTIONAL EXPRESSION PROONCOGENE STAT-3 IN ENDOCERVIX CELLS. The article gives analysis of recent studies on the role the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), which mediates the transcriptional response that promotes survival and rapid cell growth and angiogenesis. An excess of cytokines that activate STAT3 within the tumor microenvironment, such as interleukin, provides a framework signaling network at the same time promotes the growth of neoplastic epithelium, initiates inflammation and suppress anti-tumor immune response. Accordingly, the abnormal constant activation of STAT3 is often observed in malignant tumors of epithelial origin such as cervical cancer.

Ключові слова: аберантна експресія, проонкоген STAT-3, ВПЛ, медіатори запалення, захворювання шийки матки.

Ключевые слова: аберантная экспрессия, проонкоген STAT-3, ВПЧ, медиаторы воспаления, заболевания шейки матки.

Key words: aberrant expression, prooncogen STAT-3, HPV, mediators of inflammation, diseases of cervix uteri.

ВСТУП. aberrant expression, prooncogen STAT-3, HPV, mediators of inflammation, diseases of cervix uteri.

Надзвичайно важливою проблемою сучасного акушерства та гінекології залишаються патології шийки матки. У структурі гінекологічної захворюваності серед патологічних змін епітелію шийки матки доброякісні та фонові процеси складають до 85 %, передпухлинні (насамперед, дисплазії) – до 20 % [1].

За даними Національного канцер-реєстру (2009), щороку в Україні від раку шийки матки (РШМ) помирають близько 2 242 жінок, з них близько 500 – працездатного віку. За статистичними даними, РШМ нині посідає друге місце за частотою серед онкологічних причин смертності після раку молочної залози [2, 3].

Багаторічними комплексними клінічними і морфологічними дослідженнями встановлено, що на незміненому епітелії РШМ виникає рідко. Як правило, йому передують ряд змін, серед яких основними є диспластичні процеси багатоядерного плоского епітелію. Диспластичні процеси епітелію слизової оболонки шийки матки характеризуються порушенням нормального диференціювання і нормальної стратифікації через гіперплазію базальних і парабазальних клітин, порушенням подальшої диференціації гіперплазованих базальних і парабазальних клітин, зростанням ядерно-цитоплазматичного відношення, поліморфізмом ядер, появою мітозів у середніх прошарках епітелію, та анеуплоїдією [4, 5].

Про етіопатогенетичний зв'язок генітальної папіломавірусної інфекції (ГПВІ) та дисплазії шийки матки відомо давно [6]. При розвитку папіломавірусної інфекції (ПВІ) порушення в імунній системі супроводжуються зміною показників інтерферонового статусу, фенотипових і функціональних показників лімфоцитів крові, що залежить від серотипу вірусу. Імунітет до вірусу папіломи людини (ВПЛ) є типоспецифічним і не запобігає наступному інфікуванню іншими широко розповсюдженими серотипами ВПЛ. У хворих із ПВІ визначається зниження вмісту в крові лімфоцитів, пригнічення здатності лейкоцитів продукувати лейкоцитарний та імунний інтерферони, зміни в гуморальних факторах місцевого захисту. Різде зниження місцевого імунітету у хворих ПВІ виражається в зниженні в цервікальному слизу рівня IgA і IgG при підвищеній концентрації IgM. Результати досліджень переконують у тім, що ВПЛ не володіє цитопатичними властивостями: не реплікується й не інфікує антиген-презентуючі клітки й не руйнує кератиноцити. Існування хронічної інфекції свідчить про те, що протягом тривалого часу немає ефективної імунної відповіді, тому що відсутня фаза розмноження ВПЛ під час життєвого циклу, що дозволяє вірусу обійти імунну систему. При вивченні фенотипу лімфоцитів крові при ПВІ виявлені зміни (зниження змісту Т-келерів і збільшення Т-хелперів), що відрізняються від інших вірусних інфекцій: герпесвірусної, ВІЛ, гострої інфекції, викликаной віру-

сом Епштейна-Барр. За даними літератури, значимим фактором, але мало вивченим дотеперішнього часу, є мікстинфікування різними серотипами ВПЛ.

Фактори ризику неопластичної прогресії можуть бути імунними (стан місцевого імунітету), генетичними (мутації в деяких генах, що беруть участь у клітинній регуляції), гормональними і вірусними (зв'язок між ступенем дисплазії епітелію шийки матки з вірусним навантаженням і статусом ДНК ВПЛ). Дотепер немає чіткої визначеності відносно факторів, що обумовлюють різні темпи персистенції ПВІ, не виявлені достовірні прогностичні ознаки, що визначають можливість персистенції вірусу [7, 8].

Особливу роль в реалізації протипухлинного захисту на етапі канцерогенезу відіграє стан місцевого імунітету. Цитокини, виконуючи функції медіаторів, регулюють ступінь імунної відповіді при захворюваннях пухлинної природи. Визначення концентрації цитокінів в крові дає інформацію про функціональну активність різних типів імунікомпетентних клітин, тяжкість запального процесу, його перехід на системний рівень і про прогноз захворювання. Патологічні стани, а саме, запалення та інфекційне ушкодження ВПЛ, стимулюють імунну клітинну відповідь шляхом вивільнення медіаторів, які забезпечують виживання пухлинних клітин і швидке збільшення осередків пухлин паракринним шляхом. Крім того, епігенетичні мутації онкогенів та хромосомні аберації пухлино-супресорних генів стимулюють продукцію пухлинних медіаторів в межах мікрооточення пухлин, що сприяє розвитку неопластичних процесів аутокринним шляхом. Ці два шляхи концентруються в осередках пухлини і призводять до активації латентного сигнального трансдуктора і активатора транскрипції 3 (STAT-3), який є посередником транскрипційної відповіді, що сприяє виживанню та швидкому росту клітин і ангіогенезу. Надлишок цитокінів, які активізують STAT-3 в межах мікросередовища пухлини, таких як, інтерлейкіни (ІЛ) ІЛ 6, ІЛ 10 і ІЛ 17/23, створює основу сигнальної мережі, яка одночасно просуває ріст неопластичного епітелію, ініціює запалення і пригнічує антипухлинну імунну відповідь організму. Відповідно, аномальна і постійна активація STAT-3 часто спостерігається в злоякісних пухлинах епітеліального походження і асоціюється із негативним результатом. Сигнальний трансдуктор і активатор транскрипції-3 є одним з шести членів сімейства транскрипційних факторів. STAT-3 було відкрито майже 15 років тому, як білок «гострої фази» запалення. Цей фактор був пов'язаний із запаленням, клітинною трансформацією, проліферацією, інвазією, регенерацією тканин, і метастазуванням ракових утворень. Різні види канцерогенів, радіації, вірусів, факторів росту, онкогенів і запальних цитокінів, як з'ясувалося, активізували STAT-3. STAT-3 є активним у багатьох пухлинних клітинах, але не в нормальних клітинах. Коли білки системи STAT-3 активовані, вони потрапляють в ядро і впливають на певні ділянки ДНК. Зв'язуючись з регуляторними ділянками ДНК, білки системи STAT-3 можуть впливати на гени включаючи або вимикаючи їх [9, 10].

Дослідники вважають, що надактивність білків системи STAT-3 змушує клітини продовжувати рости і ді-

литися, і попереджує самознищення клітини (апоптозу). Через свою ключову роль в онкогенезі, в даний час досліджуються інгібітори активації цього фактора для профілактики і лікування раку. Це призвело до ідентифікації малих пептидів, олігонуклеотидів, і малих молекул, як потенційних інгібіторів STAT-3 [11].

Велике значення у своєчасному розпізнаванні передпухлинних і пухлинних процесів надається цитологічній діагностиці патологічних процесів шийки матки. В нашій країні широке упровадження цитологічного скринінгу РШМ почалось тільки в 1978-1979 роках. Цитологічні дослідження використовуються при проведенні скринінгу на РШМ для диференційної діагностики пухлинних і непухлинних захворювань, для оцінки гормонального статусу, радикальності і абласитичності операцій, а також для оцінки прогнозу захворювання. Цитологічний метод має лише одну негативну рису – неможливість встановити глибину інфільтративного росту карцином у зв'язку з відсутністю у дослідженому матеріалі тканинного субстрату [12].

Незважаючи на суттєвий прогрес у вирішенні проблеми лікування пацієнок з доброякісними, фоновими та передраковими захворюваннями шийки матки, її не можна вважати вирішеною, оскільки жоден з запропонованих методів (включаючи радикальні) не має 100 % ефективності, яка б повністю виключала виникнення рецидивів та подальше прогресування захворювання. Певною мірою це пов'язано с складним зі складним патогенезом раку шийки матки та передуючих йому процесів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Першим етапом дослідження було визначення експресії STAT-3 у жінок контрольної групи, без патології шийки матки. Обстежено 17 жінок віком від 35 до 40 років (середній вік $36 \pm 1,2$). Всі пацієнтки проходили загальноприйняте клінічне, гінекологічне, інструментальне та лабораторне обстеження. Стан шийки матки оцінювали за допомогою цитологічного, кольпоскопічного досліджень, з подальшим патогістологічним дослідженням біопсійного матеріалу, який був взятий з піхвової частини шийки матки після проведення кольпоскопічного дослідження та виконання гістеректомії. Зберігання матеріалу здійснювалось згідно з вимогами – температура зберігання -20°C . Наявність генітальної папіломавірусної інфекції та визначення типу вірусу проводилось методом Real time полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Наявність експресії STAT-3 визначали з допомогою методу Western Blotting згідно з протоколом фірм Amersham Biotech. Для детекції STAT-3 на мембрані використовували прямі антитіла фірми GeneScript і набори для візуалізації ESL Plex Western Blotting. (GE Healthcare). Аналіз зображення проводили на системі Versa DOC MP4000 з допомогою програми Quantity One 1D software (BIO-RAD).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. При дослідженні зразків тканин піхвової частини шийки матки методом Western Blotting у всіх 17 жінок контрольної групи експресія STAT-3 була відсутня. Позитивним контролем проведення Western Blotting аналізу був екстракт клітин Hela, в якій експресію STAT-3 було виявлено.

Клітинна лінія Hela є найстарішою стандартною культурою пухлинної тканини, вона була одержана 8 лютого 1951 року у Генрієтти Лакс (Henrietta Lacks), яка невдовзі, 4 лютого 1951 року, померла від раку шийки матки. Дана клітинна лінія демонструє добрі властивості зберігати сталі антигенні властивості й характеризується високою активністю теломери під час мітозу, що запобігає скороченню теломерів хромосом та обумовлює «безсмертя» клітин пухлини, які таким чином уникають ліміту Гейфліка. Позитивна експресія протоонкогену STAT-3 у клітинах цієї лінії є важливим доказом валідності проведених досліджень.

В результаті проведеного дослідження встановлено, що відсутність запальних змін в клітинах ендодерміксу корелює з активністю експресії STAT-3, який є посередником транскрипційної відповіді, що сприяє виживанню та швидкому росту клітин і ангиогенезу. Це підтверджено наявністю експресії STAT-3 в позитивному контролі екстракту клітин Hela.



Рис. 1. Експресія STAT-3 в зразках тканин.

- 1 - Експресія STAT-3 в позитивному контролі;
- 2 - Відсутність експресії STAT-3 у жінок контрольної групи.

Слід зазначити, що імуноблотинг надає у певній мірі «усереднені» дані про експресію фактору, тому що біологічні зразки можуть містити клітини суміжних тканин, в тому числі стромальні та запально змінені клітини, що зрештою впливає на експресію STAT3 або pSTAT3. Таким чином, одержаний негативний резуль-

тат є дуже цінним, тому що він свідчить по-перше про коректність відбору пацієнток для участі у дослідженні, а по друге про дотримання технологічних стандартів використаного діагностичного методу.

На сьогодні відомий феномен мікрогетерогенності у експресії та розподілі STAT3 у клітинах при передракових фонових процесах та раку *in situ*, таким чином удосконалення існуючих протоколів імуногістохімічних досліджень стає невідкладним завданням для сучасної медичної науки й практики. Зокрема, підвищення діагностичної точності аналізу STAT3 та його фосфорильованих форм (pSTAT3(Y705) та pSTAT3(S727)) у зразках біологічної тканини може дозволити покращити ранню діагностику неопластичної патології шийки матки.

На нашу думку, відсутність експресії як фосфорильованих (Y705 або S727) так й нефосфорильованих форм STAT3 у тестованій тканині є цінним маркером діагнозу й прогнозу, який спростовує припущення про наявність активного пухлинного процесу. Втім, зважаючи на те, що в окремих випадках передракові ураження (low grade precancer lesions (LSIL) відповідно до даних літератури можуть мати негативну експресію STAT3 та/або pSTAT3, необхідний подальше вдосконалення діагностичного алгоритму й пошук додаткових маркерів непластичної прогресії. З іншого боку, більша частина передракових захворювань шийки матки, так звані high grade precancer lesions (HSIL) відрізняються позитивною експресією STAT3 та pSTAT3.

Подальший розвиток обраного наукового напрямку вимагає поглиблення дослідження репрезентації експресії STAT3, pSTAT3(Y705) й pSTAT3(S727) у цитоплазмі та ядрах клітин епітелію шийки матки та цервікального каналу. Значний інтерес являє також асоціація папіломавірусної інфекції, в тому числі викликаною високо онкогенними штамми, з експресією STAT3/pSTAT3 при захворюваннях шийки матки.

ВИСНОВКИ.

1. При дослідженні зразків тканин піхвової частини шийки матки методом Western Blotting у всіх 17 жінок експресія STAT-3 була відсутня

2. Проведення контрольних аналізів з культурою клітин Hela підтверджує валідність отриманих результатів.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. Отримані дані дають підстави проводити подальші дослідження аберантності експресії проонкогену STAT-3 у жінок із доброякісними та передраковими захворюваннями шийки матки з позиції активації STAT-3 сигнального каскаду, що дозволить відкрити шляхи до нових методів профілактики пухлинної прогресії на тлі ГПВІ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Воробьева Л.И., Винницкая Д.Б., Доценко Ю.С., Евтушенко Г.В. Опухоли женских половых органов. В: Справочник по онкологии. Киев: Здоров'я, 2000: 499–553.
2. Національний канцер-реєстр України БЮЛЕТЕНЬ НАЦІОНАЛЬНОГО КАНЦЕР-РЕЕСТРУ УКРАЇНИ Видання № 12 КИЇВ – 2011 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.ucr.gs.com.ua/dovida9/PDF/57-58-shm.pdf>
3. Zaporozhan V., Peresunko A., Oliynyk E. The role of

clinico-genetic monitoring of risk groups for early diagnostics of female reproductive system tumors. EJC Supplements Controversies in Tumor Prevention and Genetics, 2004, Vol №2, No.1. p-45.

4. Полонская Н.Ю., Юрасова И.В., Сокольская Т.Ю. Преимущество и эффективность стандартизации цитологических исследований в гинекологии // Клин. лаб. диагностика. – 2004. – № 11. – С. 47–50.

5. Туганова Т.Н., Болгова Л.С., Смолянка И.И. и др. Внеядрышковые аргентофильные гранулы в дифференциальной цитологической диагностике фиброаденом и рака молочной железы // Злоякісні новоутворення. – Зб. наук. робіт, вип. 9. – Київ, 2004. – С. 74–75.

6. Walboomers JMM, et al. Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12–9.

7. Human papillomavirus types by age in cervical cancer precursors: predominance of human papillomavirus 16 in young women / [Porras C., Rodriguez A.C., Hildesheim A. et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2009. – Vol. 18, № 3. – P. 863–865.

8. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки / С.И. Роговская. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. – 141 с.

9. Shirish Shukla, Gauri Shishodia, Sutapa Mahata, Suresh Hedau, Arvind Pandey, Suresh Bhambhani, Swaraj Batra,

Seemi F. Basir, Bhudev C. Das, and Alok C. Bharti Aberrant expression and constitutive activation of STAT3 in cervical carcinogenesis: implications in high-risk human papillomavirus infection [Электронний ресурс] Режим доступу: <http://www.molecular-cancer.com/content/9/1/282>.

10. Запорожан В.М., Пішак В.П., Пересунько О.П. Генетика пухлин жіночих репродуктивних органів Одеса, ОДМУ, 2004. – 232 с.

11. Bharat B. Aggarwal, Ajaikumar B. Kunnumakkara, Kuzhuvilil B. Harikumar, Shan R. Gupta, Sheeja T. Tharakan, Cemile Koca, Sanjit Dey, Bokyoung Sung Signal Transducer and Activator of Transcription-3, Inflammation, and Cancer [Электронний ресурс] Режим доступу: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2009.04911.x/full>

12. Новик В.И., Урманчеева А.Ф. Принципы организации цитологического скрининга рака шейки матки // Матер. III съезда онкологов и радиологов СНГ. Часть 1. – Минск: ОДО "Тонпик", 2004. – С. 241.

Отримано 04.02.12 р.