

Н.П. Юрченко
Н.М. Глущенко
Л.Г. Бучинська

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології
ім. Р.Є.Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: рак ендометрія, анеуплоїдія, індекс ДНК, індекс проліферації, експресія, циклін D1, циклін E, транскрипційний фактор E2F1.

ОЦІНКА ДНК-СТАТУСУ ТА ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ЦИКЛІНІВ D1, E І ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ФАКТОРА E2F1 У КЛІТИНАХ ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ ПУХЛИН ЕНДОМЕТРІЯ

Прогнозування перебігу пухлинного процесу — одне з загальних завдань клінічної онкології. Це повною мірою стосується і раку ендометрія (РЕ), захворюваність на який залишається високою. Важливою особливістю РЕ є його клінічний поліморфізм у межах одного гістологічного типу і стадії захворювання, що аргументує пошук біомаркерів, експресія яких дозволить визначити карциноми ендометрія, що асоціюється з більш агресивним перебігом захворювання. **Мета:** оцінка плоідності, експресії циклінів D1 і E і транскрипційного фактора E2F1 залежно від клініко-патологічних особливостей РЕ. **Об'єкт і методи:** операційний матеріал 68 хворих на РЕ I–II стадії віком від 36 до 72 років (середній вік — $59,3 \pm 3,2$ року), досліджено з використанням морфологічного, імуногістохімічного, цитофлуориметричного і статистичного методів. **Результати:** визначено, що серед досліджених зразків пухлин ендометрія, популяція анеуплоїдних клітин визначалась у 15,8% випадках РЕ, переважна більшість (88,9%) яких характеризувались індексом ДНК (іДНК) $> 1,0$, низьким ступенем диференціювання і глибокою інвазією в міометрій (77,8%), на відміну від диплоїдних новоутворень (54,2 і 35,4% відповідно). З'ясовано, що у новоутвореннях ендометрія з анеуплоїдією спостерігається зростання експресії цикліну D1 ($23,4 \pm 8,3\%$), вірогідно більша кількість клітин з експресією цикліну E ($25,8 \pm 7,6\%$) і транскрипційного фактора E2F1 ($14,1 \pm 1,8\%$) та вищим ($31,1 \pm 3,2\%$) індексом проліферації (ІП), порівняно з цими показниками у диплоїдних пухлинах (відповідно $11,8 \pm 1,6$; $12,2 \pm 6,9$; $5,2 \pm 1,7$; $22,7 \pm 1,4\%$; $p < 0,05$). **Висновок:** встановлено, що серед ендометріодних карцином ендометрія спостерігаються пухлини з анеуплоїдією, які характеризуються переважно глибокою інвазією в міометрій, вірогідно вищими ІП та експресією циклінів D1, E і транскрипційного фактора E2F1 порівняно з такими показниками у диплоїдних пухлинах. Виявлені фенотипові особливості РЕ поряд зі статусом ДНК можуть бути основою для визначення більш агресивних форм цієї патології.

На сьогодні відомо, що структурні й функціональні порушення в онкогенах та генах-супресорах асоціюються зі значними змінами вмісту ДНК у пухлинних клітинах, що призводить до дестабілізації геному та патологічної проліферації [1, 2]. Остання зумовлена складною послідовністю подій сигнальної трансдукції, спрямованої на регуляцію комплексів циклінів і циклінзалежних кіназ, які забезпечують перехід від однієї фази клітинного циклу до наступної. Перехід від G1- до S-фази клітинного циклу регулюється комплексами циклін D1/Cdk4,6 та циклін E/Cdk2. При мітогенних сигналах, що спричиняють фактори росту, комплекс циклін D1/Cdk46 фосфорилує пухлинний супресор pRb, внаслідок чого із комплексу Rb-E2F1 відокремлюється транс-

крипційний фактор E2F1, який індукує експресію генів, що контролюють клітинний цикл і відповідно проліферативну активність клітин. Циклін E зазвичай індукується E2F1 і швидко деградує в ранній S-фазі. Зазначений циклін також відіграє роль у реплікації ДНК та копіювання центросом [3–5]. Згідно з даними літератури у ряді злоякісних новоутворень часто виявляють пошкодження ключових регуляторів клітинного поділу циклінів E і D1, а їх гіперекспресія є показником пухлинної прогресії багатьох гормонозалежних пухлин [5–9].

Рак ендометрія (РЕ) — одна з найпоширеніших пухлин органів жіночої репродуктивної системи, для якої характерна молекулярна гетерогенність, що потенціює формування варіантів РЕ з різними біо-

логічними особливостями, які зумовлюють ступінь його агресивності та клінічний поліморфізм [10, 11].

Це дає підстави пошуку факторів, які дозволять об'єктивно оцінити ступінь злоякісності пухлинного процесу ендометріодної карциноми ендометрія і визначити пухлини з більш агресивним перебігом захворювання.

Враховуючи вищевикладене, мета дослідження полягала в оцінці плідності, експресії циклінів D1 та E і транскрипційного фактора E2F1 залежно від клініко-патологічних особливостей PE.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Робота виконана на операційному матеріалі 68 хворих на PE I–II стадії (класифікація за FIGO, 2009), які не отримували спеціального лікування до оперативного втручання, середній вік пацієнток становив $59,3 \pm 3,2$ року. Усі пацієнтки перебували на лікуванні у відділенні онкогінекології Національного інституту раку Міністерства охорони здоров'я України і дали інформовану згоду на використання їх операційного матеріалу для проведення наукових досліджень.

Морфологічну верифікацію характеру патологічного процесу в ендометрії та ступінь диференціювання пухлин проводили на препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозинном, згідно з критеріям Всесвітньої організації охорони здоров'я [12].

Методом проточної цитометрії у суспензії пухлинних клітин після їх фарбування флюорохромом (пропідіум йодид — PI) оцінювали плідність і вміст епітеліальних клітин PE у фазах мітотичного циклу, використовуючи метод проточної цитометрії [13]. Дослідження проводили на проточному цитофлуориметрі EPICS-XL («Beckman Coulter», США).

Враховуючи гетерогенність клітинного складу ендометріодних карцином ендометрія, перед початком дослідження за експресією маркера епітеліальних клітин — пан-цитокератину клон (C11), міченого вторинним антитілом FITC (Fluorescein isothiocyanate), було визначено ділянку, що містила епітеліальні клітини.

Отримані дані обробляли за допомогою комп'ютерної програми ModFit LT, що дає змогу аналізувати плідність і розподіл пухлинних клітин (ПК) за фазами мітотичного циклу. Частку клітин з різним вмістом ДНК на гістограмі обчислювали як відсоток від загального числа досліджених клітин. Частку клітин у різних фазах мітотичного циклу визначали у відсотках (%). Стандартом диплоїдного вмісту ДНК були лімфоцити периферичної крові умовно здорового донора. Індекс проліферації (ІП) ПК оцінювали за кількістю клітин у фазі S + G2/M (%). Значення ІП і кількості клітин у S-фазі вище медіани (Me) вважали високими, нижче за Me — низькими.

Для оцінки ступеня анеуплоїдії обчислювали індекс ДНК (іДНК) як співвідношення між значен-

ням каналу піку G0/G1 диплоїдного зразка. іДНК диплоїдних клітин відповідав 1,0. Якщо на ДНК-гістограмі був один пік, що відповідав нормальному вмісту ДНК у клітинах, пухлину вважали диплоїдною. Якщо був пік, що відрізнявся від диплоїдного, пухлину вважали анеуплоїдною, з іДНК, що не дорівнював 1,0.

Імуногістохімічне (ІГХ) виявлення циклінів D1, E і транскрипційного фактора E2F1 здійснювали на депарафінованих зрізах пухлин ендометрія, з використанням MkAT до циклінів D1 (AB2070433 Santa Cruz Biotechnology, USA) та E (13A3, Novocastra, UK), до транскрипційного фактора E2F1 (2E10, Sigma, USA). Експресію маркерів оцінювали шляхом підрахунку кількості позитивно забарвлених клітин — індекс мітки (ІМ, %). У кожному випадку аналізували 800–1000 ПК.

Позитивною експресією циклінів D1 і E вважали кількість позитивно забарвлених клітин $> 5\%$ [14, 15]. Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакета програм Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.) з використанням непараметричних критеріїв Манна — Уїтні. Достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що всі досліджені пухлини були ендометріодними карциномами ендометрія різного ступеня диференціювання: високого (G1) — (14 випадків), помірного (G2) — (25 випадків) та низького (G3) — (29 випадків), 57,9% пухлин характеризувалися неглибокою ($< \frac{1}{2}$) інвазією в міометрій і 42,1% пухлин інвазували $> \frac{1}{2}$ міометрія.

Згідно з результатами проточної цитометрії встановлено, що серед досліджених зразків пухлин ендометрія популяція анеуплоїдних клітин визначалась у 9 (15,8%) випадках PE. Пухлини ендометрія високого ступеня диференціювання за вмістом ДНК були диплоїдними. Зазначимо, що більшість карцином ендометрія з анеуплоїдією були низького ступеня диференціювання і глибоко інвазували міометрій (77,8%), на відміну від диплоїдних новоутворень, у яких кількість пухлин із такими характеристиками становили 54,2 і 35,4% відповідно (табл. 1).

Таблиця 1
Клініко-патологічна характеристика PE залежно від плідності новоутворення

| Досліджені параметри | Кількість випадків, абс. значення (%) | | |
|------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | Усього (n = 57) | Диплоїдні пухлини (n = 48) | Анеуплоїдні пухлини (n = 9) |
| Ступінь диференціювання: | | | |
| G1 | 3 (5,2) | 3 (6,2) | — |
| G2 | 23 (40,4) | 19 (36,6) | 4 (44,4) |
| G3 | 31 (54,4) | 26 (54,2) | 5 (55,6) |
| Глибина інвазії в міометрій: | | | |
| $< \frac{1}{2}$ | 33 (57,9) | 31 (64,6) | 2 (22,2) |
| $> \frac{1}{2}$ | 24 (42,1) | 17 (35,4) | 7 (77,8)* |

* $p < 0,05$ порівняно з диплоїдними пухлинами.

При дослідженні вмісту ПК ендометрія у різних фазах мітотичного циклу визначено гетерогенність індивідуальних показників як у диплоїдних пухлинах, так і у новоутвореннях з анеуплоїдією. В останніх спостерігалася варіабельність показника іДНК, який у середньому становив $1,6 \pm 1,1$ (табл. 2).

Таблиця 2

Розподіл клітин PE за вмістом ДНК і фазами мітотичного циклу

| Плоїдність PE | Частка (%) пухлинних клітин у різних фазах клітинного циклу | | | | іДНК |
|---------------------|---|------------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------|
| | G0/G1 | S | G2/M | S + G2/M (ІП) | |
| Диплоїдні (n = 48) | 76,6 ± 0,9 59,9–86,5 | 11,0 ± 0,8 1,7–24,1 | 12,3 ± 1,0 3,8–29,7 | 22,7 ± 1,4 5,9–40,1 | 1,0 ± 0,0 |
| Анеуплоїдні (n = 9) | 69,0 ± 2,2* 57,4–83,7 | 16,1 ± 3,1 4,3–30,7 | 14,8 ± 1,2 7,2–21,2 | 31,1 ± 3,2* 16,3–42,64 | 1,6 ± 1,1 0,63–2,7 |

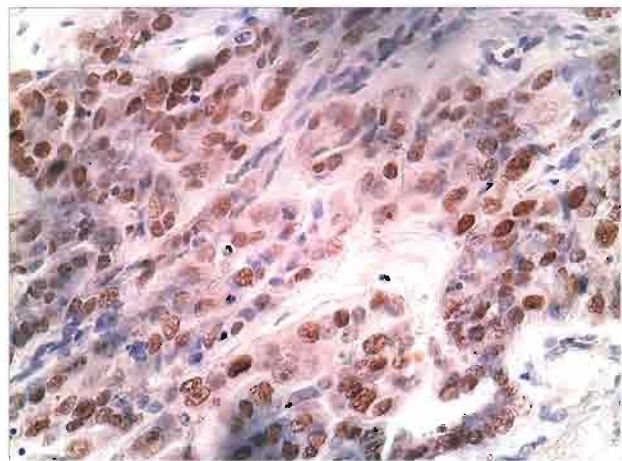
У чисельнику – $M \pm m$ (%), у знаменнику – індивідуальні коливання показника; *p < 0,05 порівняно з диплоїдними пухлинами.

Зазначимо, що іДНК $\geq 1,3$ спостерігався у 77,8% карцином ендометрія з анеуплоїдією, при цьому серед таких пухлин виявлено 57,1% випадків зі значеннями іДНК $\geq 1,5$.

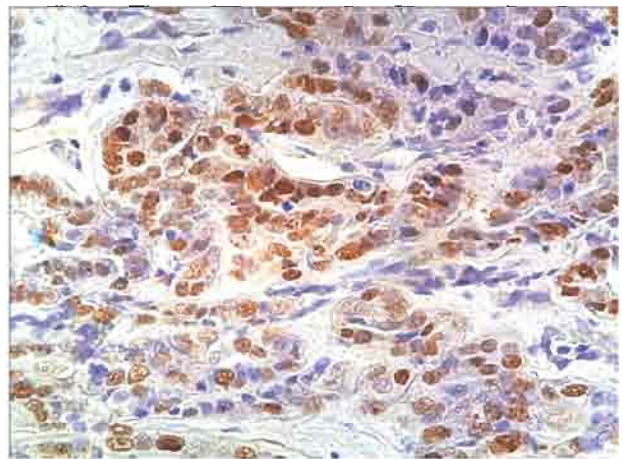
Поряд з цим встановлено, що в анеуплоїдних новоутвореннях ендометрія визначалася вірогідно менша кількість клітин у G0/G1 і зростає вміст клітин у S- і G2-/M-фазах порівняно з цими показниками у диплоїдних пухлинах (див. табл. 2). Для анеуплоїдних пухлин характерно значне підвищення ІП порівняно з диплоїдними пухлинами (31,1 проти 22,7%). Переважна більшість анеуплоїдних карцином ендометрія (88,9%) характеризувалась гіперплоїдією і у 11,1% випадків спостерігалась гіпоплоїдія.

Аналіз експресії циклінів D1 і E та транскрипційного фактора E2F1 залежно від клініко-патологічних характеристик PE. При аналізі експресії циклінів D1, E та фактора транскрипції E2F1 виявлена значна варіабельність кількості ПК ендометрія з експресією цих біомолекулярних маркерів (рис. 1). Так, кількість ПК ендометрія з експресією циклінів D1 і E коливалась у межах від 1,0 до 73,5% та від 1,7 до 51,5% відповідно. Середні значення експресії цих білків були майже однакові і становили: цикліну D1 – $14,6 \pm 2,2\%$, цикліну E – $14,0 \pm 2,1\%$. Кількість E2F1-позитивних ПК ендометрія коливалась від 0 до 49,2%, що у середньому становило $12,3 \pm 1,4\%$.

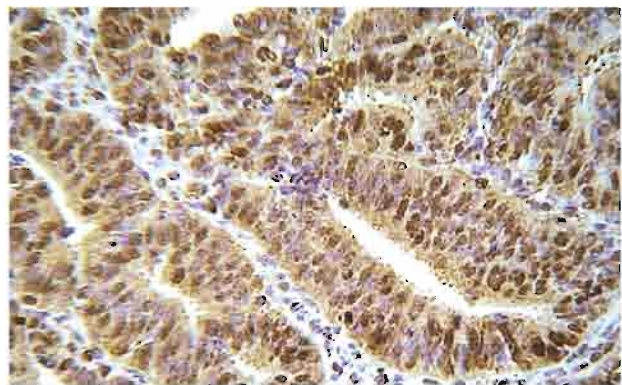
При оцінці експресії зазначених маркерів залежно від ступеня диференціювання PE встановлено тенденцію до збільшення кількості клітин, експресуючих білок циклін D1 у G2- і G3-пухлинах, порівняно з таким у G1-новоутвореннях. Експресія транскрипційного фактора E2F1 вірогідно зростала у низькодиференційованих пухлинах. Найвищий рівень експресії E2F1 визначався у G3-пухлинах ($18,1 \pm 1,5\%$), а у G1- і G2-пухлинах цей показник знижувався відповідно до $11,2 \pm 2,7$ і $13,2 \pm 2,0\%$ (табл. 3). Натомість експресія цикліну E у G3-



a



b



c

Рис. 1. Експресія цикліну D1 (a), цикліну E (б) та E2F1 (c) у карциномах ендометрія. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра. $\times 400$

новоутвореннях ендометрія майже не відрізнялася від такої у G1- і G2-пухлинах.

Зіставлення експресії біомолекулярних маркерів залежно від глибини інвазії пухлини в міометрій показало, що у пухлинах ендометрія, які глибоко інвазували міометрій ($> 1/2$), визначався вищий вміст E2F1 і цикліну E порівняно з карциномами, з інвазією $< 1/2$ міометрія (див. табл. 3). При цьому не виявлено відмінностей за рівнем експресії цикліну D1 залежно від глибини інвазії пухлини у міометрії (див. табл. 3).

Таблиця 3

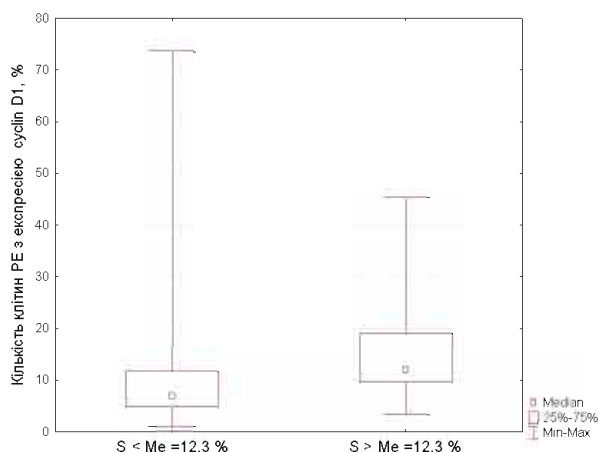
Зіставлення експресії циклінів D1, E і транскрипційного фактора E2F1 з клініко-патологічними характеристиками хворих на РЕ

| Клініко-патологічна характеристика РЕ | Експресія біомолекулярних маркерів (ІМ, %) | | |
|---------------------------------------|--|------------|--------------|
| | циклін D1 | циклін E | E2F1 |
| Ступінь диференціювання пухлин: | | | |
| G1 | 8,3 ± 4,2 | 14,3 ± 2,8 | 11,2 ± 2,7 |
| G2 | 14,3 ± 2,8 | 12,8 ± 2,1 | 13,2 ± 2,0 |
| G3 | 13,9 ± 3,8 | 15,9 ± 3,9 | 18,1 ± 1,5* |
| Глибина інвазії пухлини в міометрій: | | | |
| < ½ | 15,7 ± 3,4 | 10,1 ± 2,1 | 5,8 ± 1,6 |
| > ½ | 16,7 ± 3,2 | 16,8 ± 3,4 | 12,1 ± 1,7** |

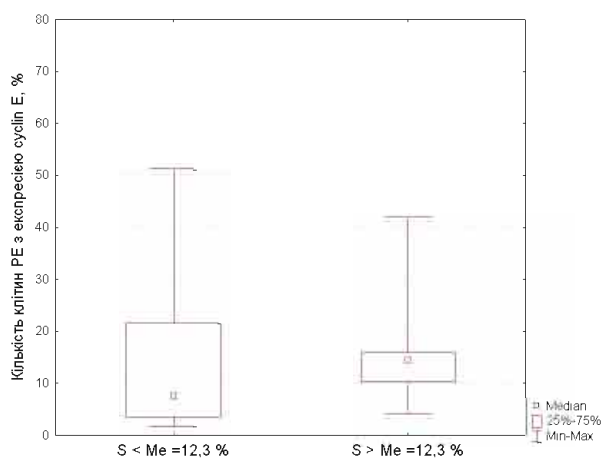
* $p < 0,05$ порівняно з G1; ** $p < 0,05$ з інвазією < ½ у міометрій.

Отже, проведене дослідження показало вірогідне зростання кількості ПК ендометрія з експресією транскрипційного фактора E2F1 у низькодиференційованих новоутвореннях і пухлинах, що глибоко інвазували міометрій.

Оцінка експресії циклінів D1 і E та транскрипційного фактора E2F1 залежно від плоідності та проліферативної активності клітин РЕ. Встановлено, що експресія цикліну D1 у карциномах ендометрія з більшим вмістом клітин у S-фазі (> Me) була вірогідно

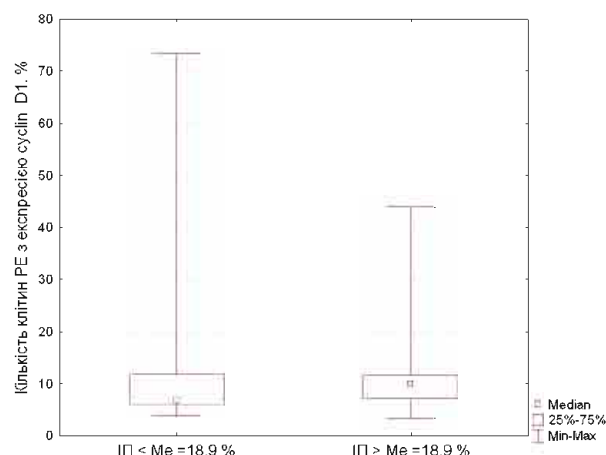


a

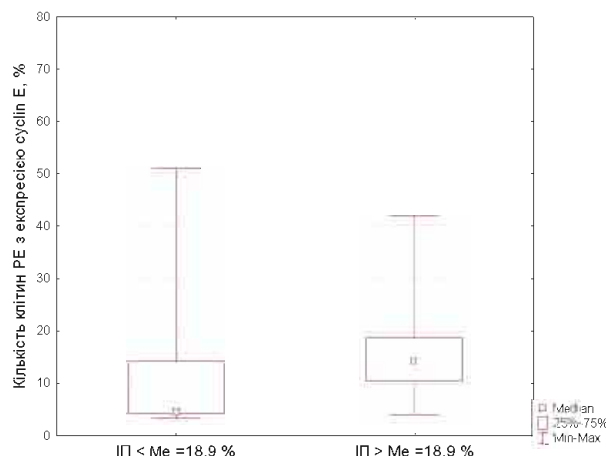


б

Рис. 2. Експресія цикліну D1 (а) і цикліну E (б) у клітинах РЕ залежно від кількості пухлинних клітин у S-фазі мітотичного циклу



a



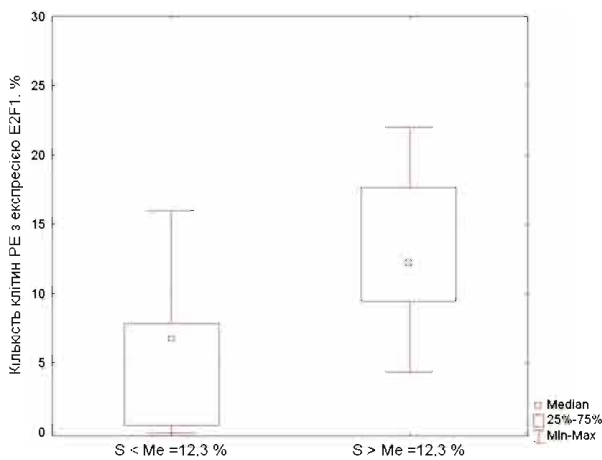
б

Рис. 3. Експресія цикліну D1 (а) і цикліну E (б) у пухлинних клітинах ендометрія залежно від ІП

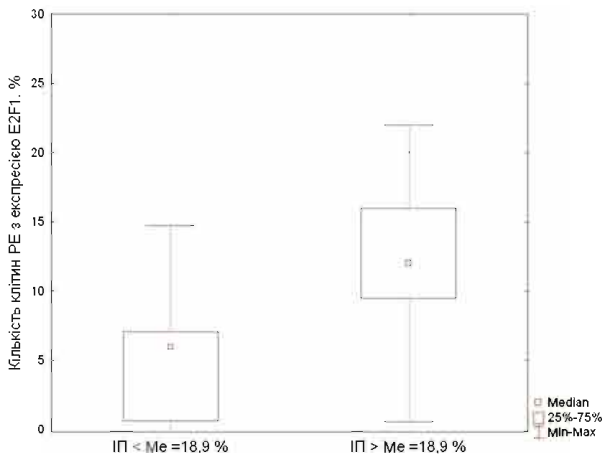
вищою за таку, що визначалась у карциномах ендометрія з меншим вмістом клітин у S-фазі клітинного циклу (рис. 2, а). Натомість, експресія білка цикліну E у пухлинах з великою і малою часткою пухлинних клітин у S-фазі була майже однаковою і відповідно становила $14,0 \pm 4,0$ і $15,3 \pm 2,5\%$ (рис. 2, б).

Оцінка вмісту циклінів D1 та E в карциномах ендометрія залежно від ІП показала відмінності в рівні експресії цих показників. Експресія цикліну D1 у новоутвореннях ендометрія з високим (> Me) і низьким (< Me) ІП була майже однаковою і становила відповідно $11,8 \pm 5,1$ і $13,4 \pm 2,5\%$; експресія цикліну E у пухлинах ендометрія з високим ІП була вірогідно вищою ($16,4 \pm 5,1\%$) порівняно з показником у пухлинах з низьким ІП ($9,3 \pm 1,1\%$; $p = 0,04$) (рис. 3).

Визначені вищі показники експресії цикліну E у клітинах високопроліферуючих пухлин супроводжувалися високою експресією білка E2F1 (рис. 4). Так, вірогідно ($p = 0,01$) більшу кількість клітин з експресією E2F1 виявляли у карциномах ендометрія з більшою кількістю ПК у S-фазі та високим ІП порівняно з експресією цього маркера у пухлинах з меншою кількістю клітин у S-фазі й нижчим ІП (див. рис. 4).



a

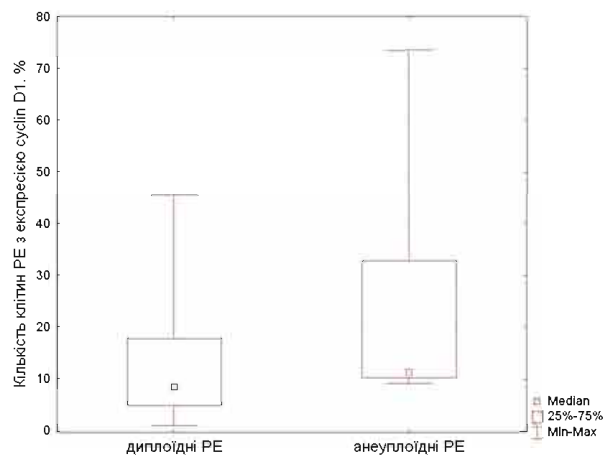


б

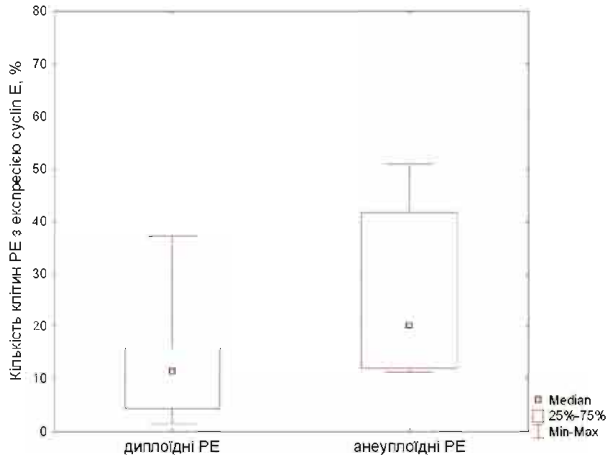
Рис. 4. Експресія транскрипційного фактора E2F1 у клітинах PE залежно від кількості клітин у S-фазі (*a*) та ІП (*б*)

При дослідженні кількості клітин з експресією цикліну D1 у пухлинах із різним ДНК-статусом встановлено більшу ($p = 0,06$) кількість клітин з експресією зазначеного маркера у карциномах ендометрія з анеуплоїдією ($23,4 \pm 8,3\%$), порівняно з такою у диплоїдних пухлинах — $11,8 \pm 1,6\%$ (рис. 5, *a*). Водночас у новоутвореннях ендометрія з анеуплоїдією спостерігалась і вірогідно більша кількість клітин з експресією цикліну E і фактора E2F1 ($25,8 \pm 7,6$ і $14,1 \pm 1,8\%$ відповідно) порівняно з цими показниками у диплоїдних пухлинах (відповідно $12,2 \pm 6,9$ і $5,2 \pm 1,7\%$, $p < 0,05$) (див. рис. 5). Отже, анеуплоїдія та висока проліферативна активність клітин PE пов'язані зі зростанням кількості ПК з експресією циклінів D1, E і транскрипційного фактора E2F1.

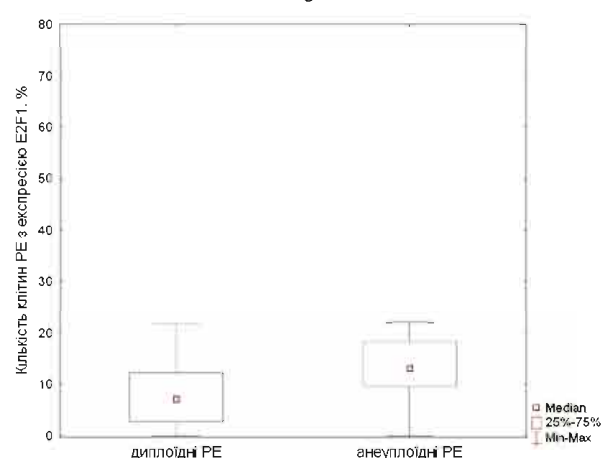
Таким чином, проведено дослідження дозволило встановити, що серед ендометріюїдних карцином ендометрія спостерігаються анеуплоїдні пухлини, які характеризуються переважно глибокою інвазією в міометрій і вірогідно меншою кількістю клітин у G0-/G1-фазі, більш високими ІП та експресією циклінів D1, E і транскрипційного фактора E2F1 порівняно з такими показниками у диплоїдних пухлинах.



a



б



в

Рис. 5. Експресія цикліну D1 (*a*), цикліну E (*б*) і транскрипційного фактора E2F1 (*в*) у диплоїдних і анеуплоїдних карциномах ендометрія

Вміст ДНК і показник проліферативної активності — важливі складові, які характеризують біологічні особливості злоякісних новоутворень та корелюють з їх агресивністю [16–18]. Це повною мірою стосується PE, для якого характерна варіабельність клінічного перебігу, що зумовлена гетерогенністю молекулярного фенотипу цієї форми раку [2, 11, 19, 20].

Серед ендометріюїдних карцином ендометрія анеуплоїдні пухлини виявляли у 15,8% випадках, що узгоджується з даними інших дослідників, які виявили анеуплоїдію у 17,0% ендометріюїдних карцином ендометрія [21]. Крім цього, результати проведеного дослідження свідчать про зв'язок між змінами вмісту ДНК у ПК і клініко-патологічними характеристикам PE. Так, переважна більшість карцином ендометрія з анеуплоїдією характеризувалися такими показниками агресивності пухлинного процесу, як висока проліферативна активність (ІП = $31,1 \pm 3,2\%$) і глибока інвазія пухлини в міометрій (77,8% випадків), що відрізняло їх від диплоїдних новоутворень, в яких зазначені показники становили відповідно $22,7 \pm 1,4$ і 35,4%.

Слід зазначити, що 66,7% анеуплоїдних карцином ендометрія зі значеннями іДНК $\geq 1,5$ характеризувалися низьким ступенем диференціювання і глибокою інвазією в міометрій. Отримані нами дані зіставні з результатами інших досліджень [2], які свідчать, що одним із найбільш значущих маркерів агресивності PE є не тільки плоїдність пухлинних клітин, а також показники іДНК. Автори зазначають, що у хворих з ендометріюїдними карциномами ендометрія з анеуплоїдією та значеннями іДНК $\geq 1,2$ відзначається несприятливий перебіг захворювання.

Отже, при іДНК $\geq 1,5$ анеуплоїдний ДНК-профіль асоціюється з вищим ступенем морфологічної злоякісності порівняно з анеуплоїдними пухлинами з іДНК $< 1,5$ та диплоїдними новоутвореннями.

Визначене у нашому дослідженні зростання експресії циклінів D1, E і E2F1 та ІП у карциномах ендометрія низького ступеня диференціювання, пухлинах із глибокою інвазією в міометрій та з анеуплоїдією може бути результатом мутаційних або епігенетичних змін їх генів. Не можна виключити, що зростання експресії фактора транскрипції E2F1 пов'язано з інактивацією білка pRb, який діє на промоторні елементи багатьох клітинних генів, зокрема онкогена *c-MYC*, експресія яких специфічна для S-фази клітинного поділу [3, 4]. У свою чергу, онкопротеїн *c-Myc* є безпосереднім позитивним регулятором E2F1. Тобто дисфункція *c-Myc* і E2F1 може відігравати одну з провідних ролей у регуляції проліферативної активності злоякісних новоутворень, у тому числі PE. Окрім взаємодії з *c-Myc*, E2F1 може спричиняти порушення репараційних процесів ДНК, що також призводить до набуття пухлиною більш агресивних фенотипів і прогресування захворювання [22, 23].

На зв'язок між підвищеною експресією циклінів D1 і E та зростанням злоякісності пухлин вказують також інші дослідники, які показали, що гіперекспресія цикліну D1 у помірно- і низькодиференційованих карциномах ендометрія призводить до втрати експресії PTEN і корелює з агресивністю новоутворень [24]. При дослідженні раку молочної

залози встановлено, що гіперекспресія цикліну E асоціюється з анеуплоїдією і пов'язана з агресивним фенотипом пухлини [25].

Іншими авторами показано, що мутації чи ампліфікація генів *CCND1* і *CCNE1* призводять до інактивації їхніх білкових продуктів циклінів D1 і E, що часто спостерігається при багатьох злоякісних новоутвореннях, включаючи рак молочної залози, легені, й корелює з більшою агресивністю пухлинного процесу [5, 6].

За даними S. Santala та співавторів [15], висока експресія цикліну E у карциномах ендометрія корелювала з меншим терміном життя хворих із цими пухлинами. Результати ряду досліджень свідчать, що ампліфікація *CCNE1* асоціюється з низьким ступенем диференціювання, глибокою інвазією пухлини в міометрій і є незалежним прогностичним фактором загальної виживаності хворих на PE [26, 27].

Враховуючи, що експресія циклінів D1 і E у злоякісно не трансформованій клітині знижується на початку S-фази [28], можна припустити, що визначена у нашому дослідженні однакова експресія цикліну D1 у ПК ендометрія з більшою і меншою S-фазою і вищий рівень експресії цикліну E у пухлинах із більшою S-фазою може бути результатом дерегульованої експресії зазначених маркерів.

Виявлений високий ІП у клітинах PE, особливо у новоутвореннях з анеуплоїдією та низького ступеня диференціювання, може бути пов'язаний не тільки з порушеннями роботи генів циклінів D1 і E, а і з інактивацією їх безпосередніх інгібіторів — p16^{INK4a} і p21^{WAF1/CIP1}, що характерно для пухлин ендометрія з високим ступенем злоякісності [29]. Порушення експресії p16^{INK4a} може індукуватись шляхом мутації чи гіперметилування промотора його гена, який стимулює надмірну активність комплексів циклін D1/Cdk4 і циклін D1/Cdk6 та фосфорилування pRb, що спостерігається у багатьох неоплазіях людини [30–32]. Слід зазначити, що білок p21^{WAF1/CIP1} запобігає фосфорилуванню pRb шляхом інгібування активації цикліну E/cdk2 комплексів [33]. Цей білок також є потужним негативним регулятором фактора транскрипції E2F1, онкогена *c-MYC* і STAT3 [33, 34]. Втрата експресії та/чи дисфункція p21^{WAF1/CIP1} корелює з прогресією багатьох солідних злоякісних новоутворень [34, 35].

Крім цього, більший ІП в анеуплоїдних пухлинах ендометрія порівняно з диплоїдними новоутвореннями може бути пов'язаний зі змінами експресії маркерів міжклітинної адгезії. Як виявлено нами раніше [36], прогресування ендометріюїдної карциноми ендометрія, у тому числі підвищення проліферативного потенціалу, асоціюється зі зростанням експресії E-кадгерину в цитоплазмі та β-катеніну в ядрі. Експресований у ядрі β-катенін може активувати експресію низки генів-мішеней, у тому числі онкоген *c-MYC*, цикліну D1 і VEGF, що призводить до зростання проліферативного і ангіогенного потенціалу злоякісного новоутворення [37].

ВИСНОВКИ

У результаті проведеного дослідження виявлено варіабельність ендометриїдної карциноми ендометрія за експресією маркерів проліферативної активності — циклінів D1, E та транскрипційного фактора E2F1, підвищена експресія яких асоціюється з низьким ступенем диференціювання, високими значеннями індексу проліферації та анеуплоїдією. Остання пов'язана з таким показником прогресії пухлинного процесу, як глибока інвазія пухлини в міометрій. Виявлені фенотипові особливості РЕ водночас зі статусом ДНК можуть бути основою для визначення більш агресивних форм цієї патології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Song T, Lee J-W, Kim H-J, *et al.* Prognostic significance of DNA ploidy in stage I endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2011; **122** (1): 79–82.
2. Pradhan M, Abeler VM, Danielsen HE, *et al.* Prognostic importance of DNA ploidy and DNA index in stage I and II endometrioid adenocarcinoma of the endometrium. *Annals Oncol* 2012; **23** (5): 1176–84.
3. Chang CN, Feng MJ, Chen YL, *et al.* p15(PAF) is an Rb/E2F-regulated S-phase protein essential for DNA synthesis and cell cycle progression. *PLoS One* 2013; **8** (4): e61196.
4. Dong P, Maddali MV, Srimani JK, *et al.* Author Correction: Division of labour between Myc and G1 cyclins in cell cycle commitment and pace control. *Nat Commun* 2018; **9** (1): 4766.
5. Huang LN, Wang DS, Chen YQ, *et al.* Meta-analysis for cyclin E in lung cancer survival. *Clin Chim Acta* 2012; **413** (7–8): 663–8.
6. Gao S, Ma JJ, Lu C. Prognostic value of cyclin E expression in breast cancer: A meta-analysis. *Tumour Biol* 2013; **34** (6): 3423–30.
7. Ramos-García P, Gil-Montoya JA, Scully C, *et al.* An update on the implications of cyclin D1 in oral carcinogenesis. *Oral Dis* 2017; **23** (7): 897–912.
8. Ortiz AB, Garcia D, Vicente Y, *et al.* Prognostic significance of cyclin D1 protein expression and gene amplification in invasive breast carcinoma. *PLoS One* 2017; **12** (11): e0188068.
9. Ramos-García P, González-Moles MÁ, Ayén Á, *et al.* Predictive value of CCND1/cyclin D1 alterations in the malignant transformation of potentially malignant head and neck disorders: Systematic review and meta-analysis. *Head Neck* 2019; **41** (9): 3395–407.
10. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, *et al.* A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer* 2015; **113**: 299–10.
11. Yusuda M. Immunohistochemical characterization of endometrial carcinomas: endometrioid, serous and clear cell adenocarcinomas in association with genetic analysis. *J Obstet Gynaecol Res* 2014; **40** (12): 2167–76.
12. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO classification of tumours of female reproductive organs. Lyon: IARC 2014: 307 p.
13. Nicoletti G, Migliorati M, Pagliacci C, *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; **139**: 271–79.
14. Khabaz MN, Abdelrahman AS, Butt NS, *et al.* Cyclin D1 is significantly associated with stage of tumor and predicts poor survival in endometrial carcinoma patients. *Ann Diagn Pathol* 2017; **30**: 47–51.
15. Santala S, Talvensaari-Mattila A, Soini Y, Santala M. Cyclin E expression correlates with cancer-specific survival in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2015; **35** (6): 3393–7.
16. Hveem TS, Merok MA, Pretorius ME, *et al.* Prognostic impact of genomic instability in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2014; **110** (8): 2159–64.
17. Pinto AE, Pereira T, Silva GL, André S. Prognostic relevance of DNA flow cytometry in breast cancer revisited: The 25-year experience of the Portuguese Institute of Oncology of Lisbon. *Oncol Lett* 2017; **13** (4): 2027–33.
18. Danielsen HE, Pradhan M, Novelli M. Revisiting tumour aneuploidy — the place of ploidy assessment in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; **13** (5): 291–304.
19. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, *et al.* A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer* 2015; **113** (2): 299–310.
20. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, *et al.* A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer. *Cancer* 2017; **123** (5): 802–13.
21. Green RW, Engblom S, Baldetorp B, *et al.* Cell proliferation, measured as flow cytometric S-phase fraction, is a strong prognostic indicator in FIGO stage I endometrioid endometrial carcinoma: a population-based study. *Acta Obstetrica et Gynecol Scand* 2015; **94**: 1064–73.
22. Murphy DG, Risbridger GP, Bristow RG, Sandhu S. The evolving narrative of DNA repair gene defects: distinguishing indolent from lethal prostate cancer. *Eur Urol* 2017; **71** (5): 748–49.
23. Mateo J, Boysen G, Barbieri CE, *et al.* DNA repair in prostate cancer: biology and clinical implications. *Eur Urol* 2017; **71** (3): 417–425.
24. Wu W, Slomovitz BM, Soliman PT, *et al.* Correlation of cyclin D1 and cyclin D3 overexpression with the loss of PTEN expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2006; **16**: 1668–72.
25. Lindahl T, Landberg G, Ahlgren J, *et al.* Overexpression of cyclin E protein is associated with specific mutation types in the p53 gene and poor survival in human breast cancer. *Carcinogenesis* 2004; **25** (3): 375–80.
26. Buchynska LG, Brieieva OV, Iurchenko NP. Assessment of HER-2/neu, c-MYC and CCNE1 gene copy number variations and protein expression in endometrial carcinomas. *Exp Oncol* 2019; **41** (2): 138–43.
27. Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, *et al.* CCNE1 amplification is associated with aggressive potential in endometrioid endometrial carcinomas. *Int J Oncol* 2016; **48** (2): 506–16.
28. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer* 2007; **6**: 24.
29. Buchynska LG, Nesina IP. Expression of the cell cycle regulators p53, p21(WAF1/CIP1) and p16(INK4a) in human endometrial adenocarcinoma. *Exp Oncol* 2006; **28** (2): 152–5.
30. Bhagat R, Kumar SS, Vaderhobli S, *et al.* Epigenetic alteration of p16 and retinoic acid receptor beta genes in the development of epithelial ovarian carcinoma. *Tumour Biol* 2014; **35**: 9069–78.
31. Salo-Mullen EE, O'Reilly EM, Kelsen DP, *et al.* Identification of germline genetic mutations in patients with pancreatic cancer. *Cancer* 2015; **121** (24): 4382–8.
32. Feng W, Han Z, Zhu R, *et al.* Association of p16 gene methylation with prostate cancer risk: a meta-analysis. *J BUON* 2015; **20**: 1074–80.
33. Felix AS, Sherman ME, Hewitt SM, *et al.* Cell-cycle protein expression in a population-based study of ovarian and endometrial cancers. *Front Oncol* 2015; **5**: 25.
34. Kreis NN, Sanhaji M, Rieger MA, *et al.* p21Waf1/Cip1 deficiency causes multiple mitotic defects in tumor cells. *Oncogene* 2014; **33** (50): 5716–28.
35. Buchynska LG, Iurchenko NP, Glushchenko NM, Nesina IP. Phenotypic features of endometrial tumors in patients with family history of cancer. *Exp Oncol* 2017; **39** (4): 312–18.
36. Nesina IP, Iurchenko NP, Buchynska LG. Markers of the epithelial-mesenchymal transition in the cells of endometrial carcinoma. *Exp Oncol* 2018; **40** (3): 218–22.

37. Isaeva AV, Zima AP, Shabalova IP, et al. β -Catenin: structure, function and role in malignant transformation of epithelial cells. Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk 2015; 70 (4): 475–83 (in Russian).

ASSESSMENT OF DNA STATUS AND PECULIARITIES OF EXPRESSION OF CYCLINS D1, E AND TRANSCRIPTION FACTOR E2F1 IN CELLS OF EPITHELIAL ENDOMETRIAL TUMORS

N.P. Iurchenko, N.M. Glushchenko, L.G. Buchynska
R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology
and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. Predicting the course of the tumor process is one of the urgent tasks of clinical oncology. This fully applies to endometrial cancer (EC), the incidence of which remains high. An important feature of EC is its clinical polymorphism within the same histological type and stage of the disease, which justifies the search for biomarkers, the expression of which will identify endometrial carcinomas associated with a more aggressive course of the disease. **Objective:** to evaluate ploidy, expression of D1 and E cyclins, and E2F1 transcription factor, depending on clinicopathologic features of EC. **Object and methods:** surgical material of 68 patients with EC of stages I–II, 36 to 72 years old (mean age 59.3 ± 3.2 years), was investigated using morphological, immunohistochemical, cytofluorimetric and statistical methods. **Results:** it was revealed that among the tested EC samples, the aneuploid cell population was determined in 15.8% of the EC cases, the vast majority (88.9%) of which were charac-

terized by DNA index (DNAi) > 1.0 , low differentiation grade and deep invasion in myometrium (77.8%), in contrast to diploid neoplasms (54.2% and 35.4% respectively). It has been found that in endometrial neoplasms with aneuploidy there is an increase in the expression of cyclin D1 ($23.4 \pm 8.3\%$), significantly larger number of cells with expression of cyclin E and transcription factor E2F1 ($25.8 \pm 7.6\%$ and $14.1 \pm 1.8\%$, respectively) and a higher ($31.1 \pm 3.2\%$) proliferation index (PI), compared to those in diploid tumors (respectively 11.8 ± 1.6 , 12.2 ± 6.9 , 5.2 ± 1.7 , $22.7 \pm 1.4\%$; $p < 0.05$). **Conclusion:** It is established that among endometrioid carcinomas of the endometrium, tumors with aneuploidy are observed, characterized by mainly deep invasion of the myometrium, significantly higher PI and expression of cyclins D1, E and transcription factor E2F1 in comparison with the corresponding indices in diploid tumors. Detected phenotypic features of EC, along with DNA status, may be the basis for identifying more aggressive forms of this pathology.

Key words: endometrial cancer, aneuploidy, DNA index, proliferation index, expression, cyclin D1, cyclin E, transcription factor E2F1.

Адреса для листування:

Юрченко Н.П.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: laboncogen@gmail.com

Одержано: 28.08.2019