

Селякова М.С., Агеева Т.А., Савченко С.В., Якимова А.В.

Особенности иммуногистохимических характеристик диспластичного многослойного плоского эпителия шейки матки у женщин разных возрастных групп

ФГБОУ ВО Минздрава России Новосибирский государственный медицинский университет, г. Новосибирск.

Seliakova M. S., Ageeva T.A., Savchenko S.V., Yakimova A.V.

Features and immunohistochemical characteristics displastic squamous epithelium of the cervix in women of different age groups

Резюме

Проведено сравнительное морфологическое, морфометрическое и иммуногистохимическое исследование биоптатов шейки матки с диспластическими изменениями (цервикальная интраэпителиальная неоплазия – LSIL, HSIL) у женщин двух возрастных групп: 1 группа - пациентки репродуктивного возраста; 2 группа – женщины пострепродуктивного (перименопаузального и менопаузального) возраста. Показано, что позитивная иммуногистохимическая окраска на наличие ВПЧ чаще встречалась у пациенток репродуктивного возраста. Выявлено, что у пациенток обеих групп индекс мечения p16 достигал максимального значения при HSIL, вне зависимости от негативной или позитивной реакции с ВПЧ. Количество позитивно окрашенных клеток к ER и PR было выше у молодых женщин при LSIL и HSIL в сравнении со старшей возрастной группой, однако их количество снижалось при нарастании степени дисплазии в обеих группах. Отмечено, самый высокий индекс мечения белка p53 выявлен у женщин 2 возрастной группы при HSIL. Не установлено четкой взаимосвязи между экспрессией белка p53 и положительной окраской на ВПЧ. Наиболее высокий индекс мечения Ki67 отмечен у женщин репродуктивного возраста при всех степенях SIL.

Ключевые слова: шейка матки, цервикальная интраэпителиальная неоплазия, вирус папилломы человека, иммуногистохимическое исследование

Summary

A comparative morphological, morphometric and immunohistochemical study of cervical biopsy specimens with dysplastic changes (cervical intraepithelial neoplasia - LSIL, HSIL) in women of two age groups: 1 group - patients of reproductive age; 2 group - women postreproductive (perimenopausal and menopausal) age. It was shown that a positive immunohistochemical staining for the presence of HPV was found in patients of reproductive age. It was revealed that in the patients of both groups the index of labeling p16 reached the maximum value at HSIL, regardless of the negative or positive reaction with HPV. The number of positively stained cells for ER and PR was higher in young women with LSIL and HSIL in comparison with the older age group, but their number decreased with the increase in the degree of dysplasia in both groups. It was noted that the highest index of protein labeling of p53 was found in women of the 2 age group with HSIL. There is no clear relationship between the expression of the p53 protein and the positive HPV coloration. The highest marking index of Ki67 is noted in women of reproductive age at all degrees of SIL.

Keywords: cervix, cervical intraepithelial neoplasia, human papillomavirus, immunohistochemical examination

Введение

Заболееваемость раком шейки матки (РШМ) в России среди женщин детородного возраста составляет 11,2 случая на 100 000 населения и занимает 2-е место после рака молочной железы [1], определяя социальную значимость данной онкопатологии. Примерно 84% всех случаев смерти от РШМ происходят в условиях ограниченных ресурсов обследования пациенток [2]. Известно, что дис-

пластические изменения шейки матки (ШМ) чаще всего развиваются и протекают на фоне гормональных нарушений либо при инфицировании вирусом папилломы человека (ВПЧ) [3, 4, 5, 6] и приводят к развитию РШМ [7, 8, 9].

Известно, что пролиферативная активность многослойного плоского эпителия (МПЭ) ШМ зависит от уровня секреции стероидных гормонов и рецепторов к ним

(ER, PR) [10, 11, 12, 13]. В частности эстрогеновые гормоны в организме женщины проявляют свою активность при наличии специализированных рецепторов в ядрах базального и парабазального слоев МПЭ [13, 14, 15]. Эстрогены обладают антиапоптотическим действием к эпителиальным клеткам ШМ, стимулируют экспрессию онкогенов ВПЧ [10, 12, 13]. Существуют литературные данные о том, что с развитием интраэпителиальных поражений в МПЭ ШМ снижается количество рецепторов к эстрогенам [11, 14, 15]. Напротив, прогестерон является существенным регулятором действия эстрогенов, обладая способностью снижать количество ER во всех отделах матки. Таким образом, прогестерон ингибирует рост и пролиферацию клеток. Существует ряд исследований, указывающих на то, что уровень в неопластических клетках рецепторов к прогестерону является критерием прогноза заболевания и показана положительная корреляция между уровнем PR и продолжительностью ремиссии [10, 13].

Крайне важным в предупреждении развития РШМ является ранняя диагностика предопухолевых изменений в МПЭ и их точная и правильная градация для выбора адекватного подхода к лечению пациенток разных возрастных групп. При этом абсолютные критерии градации интраэпителиальных поражений не разработаны и они осуществляются по совокупности морфологических изменений в каждом случае индивидуально, что ставит задачу поиска дополнительных объективных критериев оценки диспластических изменений, в том числе с использованием ряда молекулярных показателей [16, 17]. Так с этой целью было предложено оценивать уровень экспрессии белка p16 в эпителии ШМ, регулирующего пролиферативную активность и уровень экспрессии маркера апоптоза – белка p53 [18].

В литературе приведены неоднозначные данные о влиянии на развитие патологических состояний ШМ гормональной стимуляции МПЭ, как регулятора процессов регенерации, поскольку данный эпителий, как известно, является гормонозависимой тканью [11, 15, 19, 20, 21]. В настоящее время недостаточно работ, в которых проводится сравнительное комплексное морфологическое исследование, а так же оценка молекулярно-биологических показателей в разных возрастных группах пациенток, в том числе в ассоциации с ВПЧ-инфекцией, что важно, учитывая условия различного гормонального гомеостаза в разные возрастные периоды, а так же наличие потенциально более высокого риска заражения ВПЧ у женщин репродуктивного возраста [11, 22].

Выше сказанное определяет целесообразность рассмотрения патогенетических особенностей формирования диспластических изменений в МПЭ у женщин разных возрастных групп.

Цель исследования. Оценить молекулярные характеристики многослойного плоского эпителия шейки матки с диспластическими изменениями у пациенток репродуктивного и пострепродуктивного возраста.

Материалы и методы

Проведено морфологическое, морфометрическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследование биоптатов

ШМ с диспластическими изменениями пациенток двух возрастных групп: 1 группа – пациентки репродуктивного возраста от 20 до 35 лет (n=69) (средний возраст 28,5 ± 0,58 лет), 2 группа – женщины пострепродуктивного (перименопаузального и менопаузального) возраста – от 49 до 65 лет (n=57) (средний возраст 55,4 ± 0,98 лет). Каждая из вышеуказанных возрастных групп была разделена на подгруппы: пациентки с LSIL – Low-grade squamous intraepithelial lesion (CIN1) и HSIL – High-grade squamous intraepithelial lesion (CIN2 и 3). Проводили микроскопическую оценку изменений и сравнительную оценку морфометрических показателей в МПЭ и в строме ШМ у женщин указанных групп. Диагноз SIL шейки матки разной степени выраженности выставляли в соответствии с общепринятыми морфологическими критериями оценки МПЭ и стромы [3, 6]. Методом иммуногистохимии оценивали уровень экспрессии белков-регуляторов клеточного цикла: p16 - ассоциированного с ВПЧ (CINtec: mouse anti-Human p16 INK4a Antibody, «mtm laboratories AG» Германия); p53 - ассоциированного с апоптозом (клон DO-7, mouse monoclonal, «ДАКО» Дания); маркера пролиферативной активности Ki-67 (клон MIB1, mouse monoclonal, «ДАКО» Дания); Estrogen Receptor (клон SP1, rabbit monoclonal antibody, «Thermo scientific» USA); Progesterone Receptor (клон PgR 636, mouse monoclonal antibody, «ДАКО» Дания). Так же иммуногистохимическим методом оценивали наличие ВПЧ в эпителии шейки матки с использованием HPV Cocktail Broad Spectrum (HPV – 1, 6, 11, 16, 18, 31 типов; «BIOCARE MEDICAL», USA). Иммуноморфологическое исследование выполняли в соответствии с рекомендациями, изложенными в руководствах по иммуногистохимическим исследованиям в аппарате Autostainer Link 48, для иммунного окрашивания использовали полимерную систему детекции с пероксидазной меткой (EnVision FLEX, «ДАКО» Дания). Последним этапом докрашивали ядра клеток гематоксилином [23]. При исследовании препаратов, окрашенных антителами, рассчитывали индекс мечения (ИМ) – отношение числа позитивно окрашенных соответствующих клеточных структур на 100 клеток (%). Достоверность сравниваемых величин оценивали по критерию Стьюдента (p≤0,05).

Результаты и обсуждение

Оценивая экспрессию ВПЧ в МПЭ ШМ выявлено, что позитивная окраска HPV-коктейлем получена примерно в 1,5 раза чаще у женщин репродуктивного возраста (1 возрастная группа): в 50% исследуемых случаев как при LSIL так и при HSIL, тогда как у женщин перименопаузального периода данный показатель был меньшим – 33% и 22% соответственно.

Выявлено, что с нарастанием степени SIL, как у женщин репродуктивного возраста, так и у женщин старшей возрастной группы, нарастал уровень экспрессии белка p16, достигая максимальных значений при интраэпителиальном поражении высокой степени, вне зависимости от позитивной или негативной реакции с ВПЧ (табл. 1). Установлено, что при LSIL и HSIL количество

Таблица 1. Результаты иммуногистохимического исследования диспластичного многослойного плоского эпителия шейки матки у женщин разных возрастных групп

SIL	Женщины моложе 35 лет (1 группа)		Женщины старше 49 лет (2 группа)	
	Low-grade	High-grade	Low-grade	High-grade
p16	1,9±0,4 [^]	40,9±2,4 ^{^*}	0,4±0,1 [#]	32,4±2,7 [#]
p53	1,5±0,3 ^{^*}	0,9±0,1 [^]	0,5±0,2 [#]	1,9±0,4 [#]
Ki67	17,4±1,1 ^{^*}	43,8±2,1 ^{^*}	12,5±0,5 [#]	33,7±2,1 [#]
ER	8,9±0,6 [^]	4,0±0,5 ^{^*}	10,4±1,01 [#]	1,5±0,3 [#]
PR	6,4±0,7 ^{^*}	1,7±0,2 ^{^*}	0,1±0,05 [#]	0,5±0,2 [#]

Примечания: достоверные отличия средних величин рассматриваемых параметров ($p \leq 0,05$): * между сравниваемыми соответствующими значениями 1 и 2 группы
^ между сравниваемыми значениями LSIL и HSIL в 1 группе
между сравниваемыми значениями LSIL и HSIL во 2 группе

p16-позитивных клеток было выше у женщин 1 возрастной группы (в 4,5 и 1,2 раза соответственно), что вероятно связано с более частым инфицированием молодых женщин ВПЧ.

В МПЭ ШМ пациенток обеих групп экспрессия ER снижалась от LSIL к HSIL в 2 раза в первой группе и 7 раз во второй группе соответственно. Однако выявлено, что у женщин молодого возраста при интраэпителиальном поражении тяжелой степени количество ER – позитивных клеток было больше примерно в 2 раза, чем у женщин 2 группы. Сравнивая результаты окраски PR выявлено следующее: у женщин репродуктивного и постменопаузального возраста экспрессия PR также снижалась с нарастанием степени тяжести дисплазии, примерно в 6 и 5 раз соответственно. И проводя сравнение между возрастными группами, установлено, что количество PR – позитивных клеток в группе молодых женщин было больше при LSIL и при HSIL в 2,5 и 2 раза соответственно. При этом выявлено у пациенток обеих групп как при интраэпителиальном поражении низкой, так и высокой степени, экспрессия ER была достоверно выше, чем PR (табл. 1).

Экспрессия белка p53 чаще встречалась у пациенток 1 возрастной группы - у 80% женщин при интраэпителиальном поражении низкой и у 65% женщин с высокой степенью дисплазии, против 10% и 22% пациенток 2 возрастной группы. По значению ИМ p53 установлено, что у пациенток репродуктивного возраста при LSIL это число было выше в 3 раза, чем у женщин 2 возрастной группы с аналогичными изменениями в МПЭ. У пациенток перименопаузального периода количество p53 - позитивно окрашенных клеток при дисплазии тяжелой степени было самым высоким (1,9±0,4) как внутри группы, так и в сравнении с женщинами молодого возраста, что, вероятно, отражает имеющиеся у них более значимые нарушения регуляции клеточного цикла эпителиальных клеток с экспрессией не только «дикого», но и мутантного белка p53 (табл. 1).

При этом у молодых женщин с интраэпителиальным поражением низкой степени, имевших экспрессию p53, примерно в 40% случаев выявлено наличие ВПЧ при ИГХ-окрашивании, а при HSIL - в 54% случаев. У пациенток старшего возраста, имеющих p53 – позитивные клетки при LSIL во всех случаях выявлено наличие ВПЧ

(100%), а при интраэпителиальном поражении высокой степени его наличие определялось у 37% женщин.

В МПЭ ШМ женщин обеих возрастных групп экспрессия Ki-67 увеличивалась с нарастанием степени поражения эпителия, что указывает на прогрессивное увеличение пролиферативного потенциала клеток МПЭ в условиях нарастания SIL (табл. 1). Так у молодых пациенток ИМ Ki67 составил 17,4±1,1% при LSIL, существенно увеличившись при поражении эпителия высокой степени до 43,8±2,1% позитивно окрашенных клеточных ядер. У женщин 2 возрастной группы ИМ данного маркера был ниже в сравнении с молодыми женщинами примерно в 1,5 раза при всех степенях SIL.

Заключение

Как известно высокий уровень экспрессии белка p16 в клетках диспластичного эпителия позволяет выявить случаи с повышенным риском возникновения РШМ у женщин с различными патологическими процессами в ШМ [24]. В настоящем исследовании выявлено, что частота встречаемости экспрессии белка p16, а так же доля окрашенных клеток в пласте МПЭ при LSIL и HSIL была выше у женщин молодого возраста в сравнении со старшей возрастной группой. Однако при дисплазии тяжелой степени выявлен максимально высокий показатель индекса мечения белка p16 у женщин обеих возрастных групп.

В ряде исследований отмечена корреляция между уровнем гиперэкспрессии белка p16 и положительной реакцией на ВПЧ [25]. Однако в настоящем исследовании у пациенток обеих возрастных групп связь между наличием ВПЧ и экспрессией белка p16, выявляемого иммуногистохимическим методом, чаще отмечена при интраэпителиальном поражении низкой степени. Это может быть связано с тем, что ИГХ-метод обладает невысокой чувствительностью к антигену ВПЧ и это может зависеть от качества предшествующей обработки исследуемого гистологического материала. Таким образом, предпочтительным является выявление данного агента методом полимеразной цепной реакции или в сочетании с иммуногистохимией.

Известно, что в канцерогенезе РШМ ВПЧ оказывают преимущественную роль через онкогены E6 и E7, ко-

торые нарушают регуляцию клеточного цикла и апоптоза в частности, вмешиваясь в деятельность гена p53 [26]. Однако имеются работы, в которых не выявили корреляции между уровнем апоптоза и наличием ВПЧ [27]. В настоящем исследовании установлено, что с нарастанием степени дисплазии у пациенток молодого возраста снижается количество клеток в МПЭ, экспрессирующих p53, тогда как у женщин старшего возраста отмечена противоположная картина. Вероятно, это может быть связано с тем, что в течение жизни, женщины накапливают различные мутации, влияющие на процессы апоптоза, даже вне зависимости от персистенции ВПЧ. И в настоящем исследовании взаимосвязи между уровнем апоптоза и наличием ВПЧ, выявляемым ИГХ методом с использованием антител HPV-cocktail, в обеих группах пациенток выявлено не было.

Установленные различия в состоянии рецепторного аппарата МПЭ ШМ к стероидным гормонам при диспластических процессах разной степени выраженности в исследуемых возрастных группах свидетельствуют о том, что у молодых пациенток вне зависимости от степени тяжести дисплазии рецепторная активность клеток МПЭ достоверно выше. Наряду с этим показано, что как у женщин молодого так и постменопаузального возраста при интраэпителиальном поражении низкой и высокой степени в клетках МПЭ экспрессия ER значительно выше, чем PR, что свидетельствует о потенциально высокой пролиферативной способности этих клеток даже у возрастных пациенток и более худшем прогнозе с точки зрения дальнейшей прогрессии интраэпителиальных поражений.

Установлено, что экспрессия маркера пролиферативной активности Ki67 была несколько выше у женщин репродуктивного возраста при всех степенях SIL, что вероятно связано с соответствующей возрасту гормональной стимуляцией МПЭ ШМ, и соответственно с более активными процессами пролиферации на этом фоне у молодых пациенток не только в условиях нормы, но и при дисплазии.

Установленные возрастные различия в структурно-морфологических и иммуногистохимических характеристиках МПЭ ШМ в условиях патологии необходимо учитывать в оценке стадий диспластических изменений и определении тактики лечения пациенток разных возрастных групп. 

Агеева Татьяна Августовна, доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России, Новосибирск. Савченко Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России, Новосибирск. Якимова Анна Валентиновна, доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России, Новосибирск, Селякова Мария Сергеевна, очный аспирант кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России, Новосибирск. Автор, ответственный за переписку - Селякова Мария Сергеевна, 630108 г. Новосибирск ул Пархоменко 8 кв 114, Тел. 8(953)7626686, E-mail: mari.selyakova@mail.ru.

Литература:

1. Франк Г.А., Андреева Ю.Ю. Опухоли шейки матки. Руководство для врачей. – М.: Практическая медицина, 2014. – 116с.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
3. Минкина Г.Н., Манухин И.Б., Франк Г.А. Предрак шейки матки. – М.: Аэрографмедиа, 2001. 112 с.
4. Хансон К.П., Имянитов Е.Н. // *Практическая онкология*. 2002. Т3. №3. С. 145.
5. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003) *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. *N Engl J Med* 348: 518–527.
6. *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. Edited by Robert J. Kurman, Maria Luisa Carcangiu, C. Simon Herrington, Robert H. Young. International Agency for Research on Cancer. Lyon.: 2014. P. 176-181.
7. Гайворонская А.Г., Галицкая М.Г. Новая вакцина для профилактики рака шейки матки. *Союз педиатров России* 2008; 6: 2-3.
8. Киселев В.И., Муйжнек Е.Л. Молекулярные механизмы развития дисплазии шейки матки: новые знания – новые возможности. М. 2011. 19 с.
9. Paunovic V1, Konevic S, Paunovic T. *J BUON*. 2016 May-Jun;21(3):659-65
10. Чуруксаев О.Н., Асадчикова О.Н., Коломиец Л.А. и др. Гормональные факторы вирус-ассоциированного рака шейки матки. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2010; 4: 54-7.
11. Антонова И.Б. Гинекологические и онкологические аспекты постменопаузы: Дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2010. 260 с.
12. Слонов А.В. Роль вирусной инфекции и метаболитов эстрогенов в этиопатогенезе рака молочной железы: Дис. ... канд. мед. наук. М.; 2011. 119 с.
13. Бабаева Н.А. Гормональный и инфекционный факторы канцерогенеза органов женской репродуктивной системы: Дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2013. 294 с.
14. Комарова Е.Ф., Франциянц Е.М., Моисеенко Т.И., Бандовкина В.А., Никитина В.П., Черярина Н.Д., Спиридонова Д.А., Пустовалова А.В., Бойко К.П. Влияние экспрессии белка e7 на локальный гормональный статус при различных формах роста рака шейки матки. // *Фундаментальные исследования*.

2014. №10, С. 679-682.
15. Liehr J. G. Mechanism of metabolic activation and inactivation of catechol estrogens: a basis of genotoxicity. // *Polycycl. Arom. Compounds*. – 1994. – V.6, P. 229-239.
 16. Peirson L., Fitzpatrick – Lewis D. et al. Screening for cervical cancer. Hamilton, ON: Mc Master Evidence Review and Synthesis Centre, 2012.
 17. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., ред. Состояние онкологической помощи населению России в 2012 году. М.; 2013. 230 с.
 18. Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma // *Virology*, 2009. v. 384. P. 375-379.
 19. Бохман Я. В. Руководство по онкогинекологии. – СПб.: «ООО Издательство Фолиант», 2002. – С. 195-229.
 20. Заболевания шейки матки, влагалища и вульвы (Клин. лекции) - 2-е изд. Под ред. проф. В.Н. Прилепской. М.: МЕДпресс. 2000. 432 с.
 21. Роговская С.И., Липова Е.В. (под ред.) Шейка матки, влагалище и вульва. Физиология, патология, кольпоскопия, эстетическая коррекция. М.: Издательство журнала *Status Praesens*. 2014. 832с.
 22. Уварова Е.В. Проблемы и последствия папилломавирусной инфекции у девочек. Матер. VIII Конгресса детских инфекционистов 2009.
 23. Dabbs, D.G. Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications. – 3rd ed. – 2010. – Vol. 941. – P. 167-169.
 24. Redman R, Rufforny I, Liu C, et al. The utility of p16 in discriminating between cervical intraepithelial neoplasia I and nonneoplastic equivocal lesions of the cervix. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 759-9.
 25. Omori M, Hashi A, Nakazawa K, et al. Estimation of prognoses for cervical intraepithelial neoplasia 2 by p16 immunoeexpression and high-risk HPV in situ hybridization signal types. *Am J Clin Pathol* 2007; 128 (2): 208-17.
 26. Barbosa LC, da Silva ID, Corea JS, Ribalta JS. Survivin and telomerase expression in the uterine cervix of women with human papilloma virus – induced lesions. *Int J Gynecol Cancer*. 2011; 21(1) 15-21.
 27. Shoji Y, Saegusa M., Takano Y, Ohbu M., Okayasu I. Correlation of apoptosis with tumor cell differentiation, progression, and HPV infection in cervical carcinoma. // *J Clin Pathol* 1996; 49 (2): 134-8).