

Казачкова Э.А., Гошгарлы А.В., Воропаева Е.Е., Казачков Е.Л., Рогозина А.А.

Экспрессия белка p16^{ink4a} при гиперплазии эндометрия, ассоциированной с хроническим эндометритом

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Челябинск

Kazachkova E.A., Goshgarly A.V., Voropaeva E.E., Kazachkov E.L., Rogozina A.A.

P16^{ink4a} protein expression in endometry hyperplasia associated with chronic endometritis

Резюме

Цель исследования – оценить экспрессию белка p16INK4a в гистологических препаратах слизистой оболочки матки у женщин с доброкачественными заболеваниями эндометрия (хронический эндометрит, гиперплазия эндометрия). Материалы и методы. Под наблюдением находились 60 человек, которые были разделены на 3 группы: I группу составили 20 женщин, у которых при гистологическом исследовании эндометрия диагностирована гиперплазия, ассоциированная с хроническим эндометритом; II группу (группу сравнения) – 20 пациенток с хроническим эндометритом; III группу (группу контроля) – 20 женщин с нормальным эндометрием. На нашем материале, у всех женщин гиперплазия эндометрия сочеталась с хроническим эндометритом низкой степени активности и различной степени выраженности. При этом у 90% данных женщин регистрируется экспрессия белка p16INK4a, чаще в виде диффузной формы. У пациенток с хроническим эндометритом p16INK4a выявляется в 85% наблюдений, но лишь в виде единичной экспрессии. У женщин, имеющих нормальную слизистую оболочку матки, в большинстве случаев (85%) экспрессия p16INK4a не отмечается. Вышеизложенное свидетельствует о необходимости обследования пациенток, имеющих гиперплазию эндометрия, ассоциированную с хроническим эндометритом, на наличие папилломавирусной инфекции для оптимизации терапии.

Ключевые слова: гиперплазия эндометрия, хронический эндометрит

Summary

The aim of the study was to evaluate the expression of p16ink4a protein in the histological preparations of the uterine mucosa by the method of immunohistochemistry in women with benign endometrial diseases (chronic endometrium, endometrial hyperplasia). Materials and methods. 60 people were observed, which were divided into 3 groups: I group consisted of 20 women with histological examination of endometrium diagnosed with hyperplasia associated with chronic endometritis, group II (comparison group) - 20 patients with chronic endometritis, group III (group control) - 20 women with normal endometrium. In our material, in all women, endometrial hyperplasia is combined with a chronic low-activity endometritis. At the same time, 90% of these women register p16 ink4a protein expression more often as a diffuse form. In patients with chronic endometritis, p16 ink4a is detected in 85% of the observations, but only as a single expression. In women with normal uterine mucosa, in most cases (85%), expression of p16 ink4a is not observed. The foregoing indicates the need to examine patients who have endometrial hyperplasia in combination with chronic endometritis, for the presence of papillomavirus infection to optimize therapy.

Key words: endometrium hyperplasia, chronic endometritis

Введение

В 2008 году Нобелевский комитет присудил доктору Харальду цур Хаузену (Harald zur Hausen) премию за открытие онкогенности вируса папилломы человека (ВПЧ). В его научных трудах рассматривалась роль ВПЧ в развитии рака шейки матки. В настоящее время установлено, что папилломавирусная инфекция лежит в основе развития карцином как органов репродуктивной системы (рак вульвы, влагалища, карцинома полового члена и рак предстательной железы), так и других систем

(рак небных миндалин, ротовой полости, гортани, пищевода, желудка, толстой кишки, печени, молочной железы, легких, кожи и мочевого пузыря) [1,2].

Многообразие органов-мишеней для вируса папилломы человека объясняется возможностью реализации развития плоскоклеточной метаплазии [3]: «превращение одной характерной ткани в другую характерную ткань, отличающуюся морфологически и функционально» [4]; стойкое изменение морфологических свойств клеток (ткани), сопровождающееся превращением их в

клетки (ткань) другого типа. Феномен «плоскоклеточная метаплазия» встречается при заболеваниях слизистой оболочки матки как злокачественных (аденокарцинома), так и доброкачественных (гиперплазия эндометрия, хронический эндометрит). В последнем случае при гистологическом исследовании плоскоклеточная метаплазия определяется как «морулы» - очаговые скопления плоских эпителиоцитов [5,6]. Наличие же антигенов ВПЧ в структуре аденокарциномы давно подтверждено иммуногистохимическим анализом, при этом характер изменений схож с перестройкой эпителия шейки матки под воздействием ВПЧ [7].

В настоящее время число работ, посвященных папилломавирусной инфекции, неуклонно растет, многие из них направлены на возможность выявления предикторов малигнизации, например, имеются данные о значении метилирования генов-супрессоров опухолевого роста, в том числе гена Р16, при патологических процессах эндометрия [8].

Однократное выявление ВПЧ в том или ином органе недостаточно информативно. Подавляющее большинство папилломавирусных инфекций являются скоротечными и существенно не влияют на механизмы роста эпителиальных клеток. По результатам отечественных исследований, среднее время элиминации ВПЧ составляет от 1,5 до 2 лет у каждой второй пациентки [9]. В то же время в результате интеграции ВПЧ в геном эпителиальных клеток в ядрах клеток происходит репликация вирусных онкобелков Е6 и Е7, которые могут вызвать неопластическую трансформацию с нарушением регуляции клеточного цикла [10].

В опухолях, связанных с трансформирующим действием ВПЧ, отмечается увеличение экспрессии белка р16INK4а, которая нарастает при повышении количества вирусных онкобелков ВПЧ Е6 и Е7. Повышение экспрессии р16INK4а рассматривают как косвенный признак интеграции ВПЧ высокого риска в геном и трансформации эпителиальных клеток под действием ВПЧ [10-14].

Гиперплазия эндометрия зачастую ассоциирована с хроническим эндометритом. При этом в эпителии шейки матки нередко выявляется ВПЧ [15].

Цель исследования – оценить экспрессию белка р16INK4а в гистологических препаратах слизистой оболочки матки у женщин с доброкачественными заболеваниями эндометрия (хронический эндометрит, гиперплазия эндометрия).

Материалы и методы

Под наблюдением находились 60 человек, которые были разделены на 3 группы: I группу составили 20 женщин, у которых при гистологическом исследовании эндометрия диагностирована гиперплазия, ассоциированная с хроническим эндометритом; II группу (группу сравнения) – 20 пациенток с хроническим эндометритом; III группу (группу контроля) - 20 женщин с нормальным эндометрием.

Обследование пациенток проводили по единой схеме, состоящей из оценки жалоб, анамнеза, клинико-ла-

бораторного и инструментального обследования, включающего гистологическое и иммуногистохимическое исследования эндометрия, полученного путем мануальной вакуум-аспирации под контролем гистероскопии или же пайпель-биопсии эндометрия.

Для определения микробного пейзажа влагалища и цервикального канала проводили микроскопическое, культуральное, молекулярно – биологическое исследование материала из этих областей генитального тракта, включая технологию «Фемофлор-16», основанную на проведении ПЦР «в режиме реального времени» с количественной и качественной характеристикой нормальной и условно – патогенной микрофлоры.

Эндометрий подвергали комплексному морфологическому исследованию. После депарафинизации срезов гистологическое исследование проводили с помощью окраски материала гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону, метиловым зеленым – пиронином по Браше. Иммуногистохимическое исследование проводили путем обработки образцов специфической сывороткой к белку р16INK4а. Для маркера р16INK4а использовали фирменный набор «CINtec histology kit» (производство «mtm laboratories AG», Германия), включающий мышиные, готовые к применению антитела. Изучение уровня иммуногистохимической экспрессии белка р16 INK4а в образцах было основано на оценке интенсивности реакции в ядрах клеток. Специфическое иммуногистохимическое окрашивание идентифицировали на основании коричневого окрашивания ядер пораженных клеток. Негативными считали образцы, в которых экспрессия р16INK4а отсутствовала; единичной обозначали экспрессию р16INK4а при наличии редких одиночных клеток с коричневым окрашиванием ядер; очаговую экспрессию р16INK4а характеризовали немногочисленные скопления клеток эндометриальных желёз и стромы с ядрами, имеющими коричневую окраску; при диффузной экспрессии р16INK4а клетки с коричневыми ядрами располагались во всей толще эндометрия в железах и строме.

Сравнение между группами проводили непараметрическими статистическими методами с использованием критерия Манна – Уитни. Пороговая величина вероятности ошибки устанавливалась традиционно на уровне, равном 0,05. Достоверность различий величин в группах по изучаемым факторам оценивали по критериям Стьюдента и Фишера. Расчеты выполнены с помощью персонального компьютера с использованием статистического пакета Statistica 10 фирмы StatSoft.

Результаты и обсуждение

Средний возраст женщин всех групп не имел статистически значимых отличий: $41,78 \pm 0,5$ года в I группе, $34,2 \pm 1,5$ года – в группе сравнения и $33,85 \pm 0,7$ года – в группе контроля ($p_{1,2} = 0,06$; $p_{1,3} = 0,058$). Группы обследованных женщин были сопоставимы по семейному положению, сексуальному поведению, уровню образования.

Причиной обращению к врачу среди женщин I группы стали клинические и/или ультразвуковые призна-

Таблица 1. Частота различных форм экспрессии белка p16^{INK4a} в образцах с нормальной слизистой оболочкой матки, при хроническом эндометрите, при гиперплазии эндометрия, ассоциированной с хроническим эндометритом

Форма экспрессии p16 ^{INK4a}	Гиперплазия эндометрия, ассоциированная с эндометритом (группа I)	Хронический эндометрит (группа II)	Нормальная слизистая оболочка матки (группа III)
Негативная	10%	5%	85% p 3,2 = 0,02; p 3,1 = 0,005
Единичная	0	95% p 2,1 = 0,00005; p 2,3 = 0,047	15%
Очаговая	10%	0	0
Диффузная	80% p 1,3 = 0,0002 p 1,2 = 0,0002	0	0

ки гиперплазии слизистой оболочки матки: нарушения менструального цикла, превышение М-ЭХО эндометрия больше 9 мм в первую фазу менструального цикла и больше 15 мм во вторую. В группе сравнения – обследование по поводу предполагаемого хронического эндометрита. В группу контроля вошли условно здоровые женщины, эндометрий у которых забирался на 18-22 день менструального цикла на этапе прегравидарной подготовки.

При оценке микробного пейзажа влагалища и цервикального канала обращает на себя внимание высокая частота бактериального вагиноза в I и II группах исследования (25% в I группе, 20% во II группе; p 1,3 = 0,002; p 2,3 = 0,004). При этом выявляются различные сочетания микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом: *Gardnerella vag.* + *Prevotella bivia* + *Porphyromonas spp.*; *Atopobium vaginae*; *Lachnobacterium* + *Clostridium*; *Megasphaera spp.* + *Leptotrichia spp.* + *Fusobacterium spp.* Неспецифический цервицит, ассоциированный с *Enterobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* также статистически значимо чаще встречался в I и II группах (15% и 15% соответственно), чем в III группе (0%), p 1,3 = 0,004; p 2,3 = 0,004.

После общепринятого обследования с лечебно-диагностической целью в I группе проводили мануальную вакуум-аспирацию под контролем гистероскопии (в отдельных случаях аспирационную биопсию эндометрия), во II и III группах – пайпель-биопсию эндометрия. При гистологическом исследовании полученного материала у 100% женщин I группы выявлена типичная гиперплазия эндометрия в сочетании с хроническим эндометритом низкой степени активности. Отмечено увеличение числа желез эндометрия и изменение их формы, повышение показателя железисто – стромального соотношения с истончением межжелезистых перегородок, вплоть до их исчезновения. Изменение структуры желез выявлено на фоне хронического эндометрита низкой степени активности и различной степени выраженности: полиморфно-клеточная инфильтрация различной интенсивности с преобладанием лимфоцитов, наличие немногочисленных плазмочитов и разновеликого представительства нейтрофильных гранулоцитов, фибробластическая трансформация клеток стромы и фиброз стромы.

Аналогичная картина хронического эндометрита

наблюдалась во II группе. Эндометрий женщин группы контроля соответствовал средней стадии фазы секреции.

Результаты проведенного иммуногистохимического анализа экспрессии белка p16^{INK4a} представлены в таблице 1. Установлено, что 85% образцов эндометрия, соответствующего варианту нормы, «негативны» в отношении белка p16^{INK4a} (рисунок 1 - рисунки к статье см. на специальной цветной вкладке журнала - прим. ред.), в 15% образцов мы зарегистрировали экспрессию данного маркера в единичных ядрах клеток исключительно поверхностного эпителия. В то же время в эпителии шейки матки этих пациенток на момент обследования ВПЧ не выявлялся. Возможно, единичная форма экспрессии p16^{INK4a} связана с транзитным характером папилломавирусной инфекции и её самостоятельным разрешением у большинства инфицированных [9].

Слизистая оболочка матки на фоне хронического эндометрита характеризовалась только единичной формой экспрессии белка p16^{INK4a} (95%), случаев очаговой и диффузной форм зафиксировано не было, обращали на себя внимание лишь одиночные ядра клеток стромы, покровного эпителия, окрашенные в коричневый цвет, а значит имеющие соответствующие антигены (рисунок 2).

В случаях гиперплазии эндометрия, ассоциированной с хроническим эндометритом, преобладала диффузная форма экспрессии (80%), имелось интенсивное окрашивание ядер как в железистом компоненте, так и в стромальном (рисунок 3). В 10% зарегистрирована очаговая форма экспрессии p16^{INK4a}, в 10% наблюдений образцы были «негативны» в отношении белка p16^{INK4a}.

Заключение

На нашем материале, у всех женщин гиперплазия эндометрия сочеталась с хроническим эндометритом низкой степени активности и различной степени выраженности. При этом у 90% данных женщин регистрируется экспрессия белка p16^{INK4a}, чаще в виде диффузной формы. У пациенток с хроническим эндометритом p16^{INK4a} выявляется в 85% наблюдений, но лишь в виде единичной экспрессии. У женщин, имеющих нормальную слизистую оболочку матки, в большинстве случаев (85%) экспрессия p16^{INK4a} не отмечается. Вышеизложенное свидетельствует о необходимости обследования

пациенток, имеющих гиперплазию эндометрия, ассоциированную с хроническим эндометритом, на наличие папилломавирусной инфекции для оптимизации терапии.

Казачкова Э.А., д.м.н., профессор, профессор кафедры Акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск. **Гошгарлы А.В.**, клинический ординатор кафедры Акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск. **Воропаева Е.Е.**, д.м.н., доцент, профессор кафедры Пато-

логической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск. **Казачков Е.Л.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой Патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск. **Рогозина А.А.**, аспирант кафедры Патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск. Ответственный за переписку: Гошгарлы Александра Владимовна, 454084 г. Челябинск, ул. Набережная, д.9, кв.1; +79194007535 monostyle@list.ru

Литература:

1. Petersen I., Klein F. HPV in non-gynecological tumors. *Pathologe*. 2008; 29: 118–122.
2. Whitaker N.J., Glenn W.K., Sahrudin A. et al. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in prostate cancer: koilocytes indicate potential oncogenic influences of human papillomavirus in prostate cancer. *Prostate*. 2012; 31: 225–230.
3. Сидорова И.С., Унанян А.Л., Власов Р.С. Клиническое значение аномального метилирования генов-супрессоров опухолевого роста при патологических процессах эндометрия и шейки матки. *Врач*. 2011; 1: 21–23.
4. Chinen K., Kamiyama K., Kinjo T. et al. Morules in endometrial carcinoma and benign endometrial lesions differ from squamous differentiation tissue and are not infected with human papillomavirus. *J. Clin. Pathol.* 2004; 57 (9): 918–926.
5. Parsons M.A. Disorders of growth, differentiation and morphogenesis. *General and systemic pathology*. 2000: 73–99.
6. Christopherson W.M. The significance of the pathologic findings in endometrial cancer. *Clinics in obstetrics and gynaecology*. Philadelphia. 1986: 679–682.
7. Власов Р.С. Клиническое значение метилирования генов-супрессоров опухолевого роста при патологических процессах эндометрия у женщин репродуктивного возраста: Автореф. дис. канд. мед. наук. Науч. центра акушерства, гинекологии и перинатологии Рос. академии мед. наук. - Москва, 2011.
8. Orth. *Ruckblicke. Virch. Arch*; 1910
9. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки. М: Гэотар-Медиа; 2008.
10. Киселев В.И., Киселев О.И. Этиологическая роль вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки: генетические и патогенетические механизмы. *Цитокины и воспаление*. 2003; 4: 31–38.
11. Захарцева Л.М., Пекур Е.А. Частота экспрессии белка p16 INK4a и наличие вирусов папилломы человека при дисплазии шейки матки. *Онкология*. 2013; 1.
12. Аляутдина О.С., Синицына О.В. Значение теста на онкобелок p16INK4a в алгоритме диагностики рака шейки матки. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016; 11-1: 58–60.
13. Котов В.А., Раскин Г.А., Протасова А.Э. Применение жидкостной цитологии и иммуноцитохимического определения онкомаркера p16INK4a для скрининга, диагностики и выбора тактики лечения заболеваний шейки матки: учебное пособие. СПб; 2009: 24.
14. Negri G., Egarter-Vigl E., Kasal A. et al. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors. *Am J Surg Pathol*. 2003; 27: 187–193.
15. Казачкова Э.А., Затворницкая А.В., Воропаева Е.Е., Казачков Е.Л., Рогозина А.А. Клинико-анамнестические особенности и структура эндометрия женщин с гиперплазией слизистой оболочки матки в различные возрастные периоды. *Уральский медицинский журнал*. 2017; 6: 18–22.

Экспрессия белка p16INK4a при гиперплазии эндометрия, ассоциированной с хроническим эндометритом

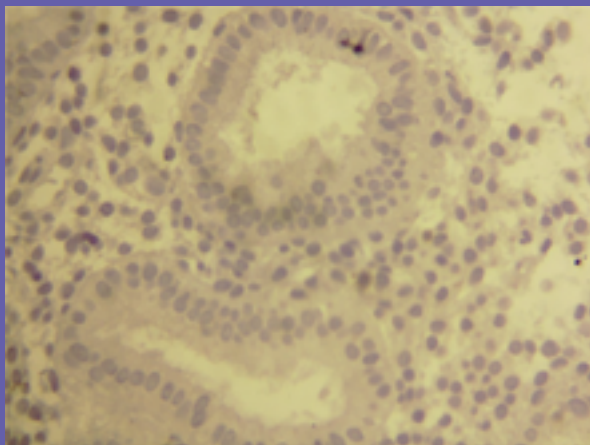


Рисунок 1 – Отсутствие экспрессия p16INK4a в структурных компонентах слизистой оболочки матки пациентки группы контроля. Иммуногистохимический метод с антителами против p16INK4a, полимерная тест-система, x400.

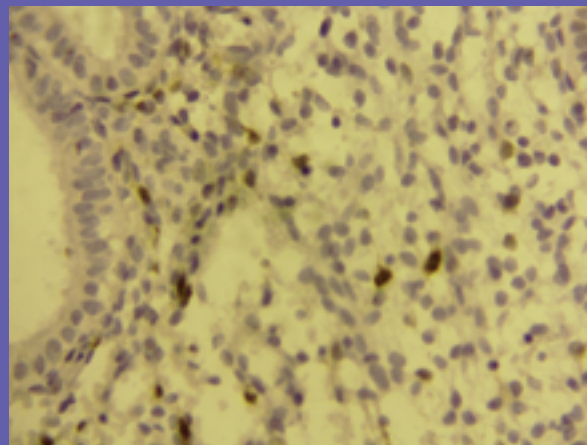


Рисунок 2 – Экспрессия p16INK4a в ядрах клеток стромы эндометрия пациентки с хроническим эндометритом низкой степени активности воспалительного процесса. Иммуногистохимический метод с антителами против p16INK4a, полимерная тест-система, x400.

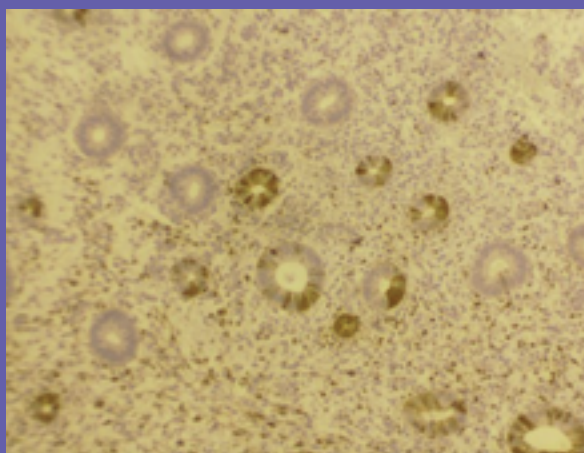


Рисунок 3 – Экспрессия p16INK4a в ядрах glandулоцитов желёз и клетках стромы слизистой оболочки матки у пациентки с гиперплазии эндометрия в сочетании с хроническим эндометритом низкой степени активности воспалительного процесса. Иммуногистохимический метод с антителами против p16INK4a, полимерная тест-система, x200.