

Наумова Л.А.¹, Стародумова В.А.¹

УДК 618.12

DOI 10.25694/URMJ.2020.02.31

Сравнительное исследование плотности фибробластов при неопухолевой патологии шейки матки на фоне дисплазии соединительной ткани

¹ Медицинский институт БУВО ХМАО-Югры «Сургутский государственный университет», г. Сургут

Naumova L.A., Starodumova V.A.

Comparative study of density of fibroblasts at the non-tumor pathology of the cervix uteri on the background of connective tissue dysplasia

Резюме

Компоненты стромы, представленные экстрацеллюлярным матриксом (ЭЦМ) и различными клетками соединительной ткани играют ведущую роль в эпителио-стромальных отношениях, характер которых изменяется при дисплазии соединительной ткани (ДСТ), отражаясь в многочисленных стигмах дисформогенеза и особенно-стях течения разных видов патологии. Фибробласты (ФБ) относятся к важнейшим клеткам стромы, отвечают за самообновление и ремоделирование ЭЦМ и оказывают мощный морфогенетический эффект на ткани. Цель исследования - выявить особенно-сти состояния подэпителиальной стромы при фоновых и предопухолевых процессах в шейке матки, ассоциированных с системной недифференцированной дисплазией со-единительной ткани. Проведен анализ клинических данных и морфологическое исследование (световая микроскопия и морфометрия) биоптатов шейки матки при фоновых и предопухолевых процессах при наличии (1-я группа) и отсутствии (2-я группа) со-путствующей ДСТ. Результаты исследования показали, что статистически значимые различия в плотности фибробластов (по группам соответственно $Me=36,4$; $Q25=25,8$; $Q75=45,0$ и $Me=18,0$; $Q25=15,0$; $Q75=21,8$; $p=0,05$) и относительной поверхностной площади сосудов (по группам $Me=8,0$; $Q25=4,5$; $Q75=10,1$ и $Me=3,1$; $Q25=1,7$; $Q75=4,9$; $p<0,05$) при наличии ДСТ ассоциируются с высокой частотой дисплазии эпителия (ЦИН) в этой группе (72,9%, во 2-й группе – 16,4%, $p=0,0000$), во второй группе преобладала частота лейкоплакии (41,8%, в 1-й – 16,2%, $p=0,0000$). Отмеченные особенности сочетались с разнонаправленными изменениями гормонального статуса - высокой частотой гормональных нарушений по типу гипотиреоза (28,3%) и гиперпролактинемии (39,2%) в группе с ДСТ и преобладанием частоты гиперэстрогемии (36,3%) и гиперандрогемии (30,9%) во второй группе (во всех случаях $p<0,05$). Нельзя исключить, что наличие ДСТ определяет иной характер эпигеномных влияний и обуславливает особенно-сти течения патологии на ее фоне

Ключевые слова: фоновые и предопухолевые процессы в шейке матки; системная недифференцированная дисплазия соединительной ткани; плотность фибробластов; гормональный статус

Summary

The components of stroma represented by the extracellular matrix (ECM) and various cells of connective tissue play a leading role in epithelial-stromal relations, the nature of which changes at connective tissue dysplasia (DCT), reflecting in the numerous stigmas of dysmorphogenesis and features of the course of various types of pathology. Fibroblasts belong to the most important stromal cells; they are responsible for self-renewal and remodeling of ECM and have a powerful morphogenetic effect on tissues. Aim - to identify the features of the state of the subepithelial stroma at the background and pre-tumor processes in the cervix associated with systemic non-differentiated dysplasia of the connective tissue. The analysis of clinical data and morphological study (light microscopy and morphometry) of cervical biopsy at the background and pre-tumor processes in the presence (group 1) and absence (group 2) of concomitant DCT were fulfilled. The results of the study showed that statistically significant differences in the density of fibroblasts (in the groups, respectively, $Me = 36.4$; $Q25 = 25.8$; $Q75 = 45.0$ and $Me = 18.0$; $Q25 = 15.0$; $Q75 = 21.8$, $p = 0.05$) and the relative surface area of blood vessels (for groups $Me = 8.0$; $Q25 = 4.5$; $Q75 = 10.1$ and $Me = 3.1$; $Q25 = 1.7$; $Q75 = 4.9$; $p < 0.05$) at the presence of DCT are associated with a high frequency of epithelial dysplasia (CIN) in this group (72.9%, in the 2nd group - 16.4%, $p = 0.0000$), the second group was dominated by the frequency of leukoplakia (41.8%, in the 1st - 16.2%, $p = 0.0000$). The noted features were combined with differently directed changes in the hormonal

status - a high frequency of hormonal disorders according to the type of hypothyroidism (28.3%) and hyperprolactinemia (39.2%) in the group with DCT and the predominance of hypererestro-genemia (36.3%) and hyperandrogenemia (30.9%) in the second group (in all cases $p < 0.05$). It cannot be ruled out that the presence of DCT determines a different nature of epigenomic influences and features of the course of pathology on its background

Key words: background and pre-tumor processes in the cervix uteri; systemic non-differentiated connective tissue dysplasia; density of fibroblast; hormonal status

Введение

Компоненты стромы, представленные экстрацеллюлярным матриксом (ЭЦМ) и различными клеточными элементами соединительной ткани (фибробласты, эндотелий микрососудов, перититы, макрофаги, лимфоциты и другие), играют ведущую роль в эпителио-стромальных отношениях, формируют микроокружение эпителиальных клеток и отвечают за важнейшие процессы в их жизни (пролиферацию, формирование клеточной полярности, дифференцировку, миграцию и апоптоз), оказывая прямое влияние и через моделирование эффектов различных сигнальных молекул – цитокинов, факторов роста, гормонов и т.д. [1 – 4].

Среди клеток стромы важнейшая роль принадлежит фибробластам (ФБ), отвечающим за самообновление и ремоделирование ЭЦМ, сохранение ниш стволовых клеток и тканевой гомеостаз в целом [1, 3, 5, 6]. ФБ оказывают мощный морфогенетический эффект на ткани благодаря широкому спектру межклеточных взаимодействий (регуляция воспалительных и иммунных процессов) и синтезу большого количества биологически активных веществ – различных цитокинов и хемокинов (IL-1; IL-6; TNF α), факторов роста (TGF β ; EGF), в том числе ангиогенных (VEGFs, FGFs, HGF/SF, ангиопоэтин-1), а также гормонов и нейропептидов, идентичных таковым в центральной нервной и эндокринной системах [2, 4, 7].

Сами ФБ проявляют выраженную фенотипическую пластичность, трансформируясь в очаге хронического воспаления или опухолевого роста под влиянием различных стимулов (TGF, EGF, PDGF, FGF2) в миофибробласты (МФБ) [3, 8]. Ремоделирование последними ЭЦМ имеет большое значение в развитии фиброобразования и формировании «твердого стресса» в процессе опухолевого роста [3]. ФБ, приобретая фенотип МФБ, или опухоль-ассоциированных ФБ, начинают проявлять свой морфогенетический эффект в таких феноменах как формирование опухолевого поля, отражающегося в развитии предопухолевых изменений [9, 10], формирование преметастатических ниш [3, 11, 12] и осуществление эпителио-мезенхимального перехода [13, 14].

При дисплазии соединительной ткани (ДСТ), ассоциирующейся с генетически детерминированными, врожденными или приобретенными аномалиями структуры (дефекты структурных белков соединительной ткани, ферментов синтеза и распада ЭЦМ, многочисленных факторов роста, их рецепторов и антагонистов), меняется характер эпителио-стромальных отношений, что находит отражение не только в различных стигмах дисморфогенеза, но и особенностях течения на фоне ДСТ

различных видов патологии, включая акушерско-гинекологические заболевания [2, 4, 15 – 19]. Реорганизация ЭЦМ в тканях женского полового тракта и, в частности, так называемое цервикальное ремоделирование, имеет большое значение как в процессе выполнения репродуктивной функции, так и в патологии – развитии процессов фиброобразования и опухолевого роста [2].

Цель работы – выявить особенности состояния подэпителиальной стромы при фоновых и предопухолевых процессах в шейке матки, ассоциированных с системной недифференцированной дисплазией соединительной ткани.

Материалы и методы

Проведен сравнительный анализ результатов клинического обследования (осмотр, кольпоскопия, исследование микробной флоры методом ПЦР, исследование уровня половых гормонов, гормонов щитовидной железы, соответствующих тропных гормонов гипофиза) и изучение биопсийного материала 129 женщин в возрасте от 22 до 51 года с фоновыми и предопухолевыми процессами в шейке матки, наблюдавшихся в женской консультации БУ «Сургутская городская клиническая поликлиника №2», из числа которых 74 пациентки, имеющие также висцеральные признаки системной недифференцированной ДСТ, составили 1-ю группу; 55 больных без признаков ДСТ – 2-ю группу. Группы были сопоставимы по возрасту больных (средний возраст по группам соответственно - 39,±4,6 и 37,7±5,1 лет), частоте выявления цервикальной эктопии (по группам - 74,3 и 67,3%), половых инфекций (47,3 и 63,6%), в том числе инфицированности онкогенными штаммами HPV - вируса папилломы человека (60,8 и 60,0%). Во всех случаях получено добровольное информированное согласие больных на использование в работе результатов их обследования, также получено разрешение этического комитета БУ ВО ХМАО-Югры «Сургутский государственный университет» (протокол №15 от 15.05. 2019).

По принципу формирования групп исследование ретроспективное. Критериями включения в исследование были клинико-морфологическая верификация фоновых и предопухолевых изменений в шейке матки, для 1-й группы – также наличие у больных внешних и/или висцеральных признаков ДСТ (вовлечение в процесс трех и более органов разных систем), документированных данными инструментальных методов исследования (фиброгастроскопия, ультразвуковое исследование внутренних органов, эхокардиография, компьютерная томография и др.) и результатами осмотра больных различными специалистами (в частности, частота стигматизации органов

мочеполовой системы составила 68,9%), для второй – напротив, их отсутствие; критерием исключения из исследования для обеих групп было наличие признаков активного воспаления в биоптатах шейки матки (выраженная воспалительная клеточная инфильтрация, отек и т.д.).

Световая микроскопия и морфометрия парафиновых срезов биоптатов шейки матки толщиной 3-4 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином, проводились с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ni M570E (Япония) и компьютерного программного обеспечения NIS-Elements BR после получения цифрового изображения с помощью видеокамеры Nikon DS-Fi2 (Япония). При морфометрическом исследовании проводился счет всех клеток подэпителиальной стромы, соответствующих фенотипу ФБ (МФБ) на светооптическом уровне, с использованием морфометрической сетки с площадью квадратов 10 тыс. мкм² при увеличении 200. Относительную поверхностную площадь сосудов рассчитывали как долю суммарной площади поперечных срезов сосудов от суммарной площади стромального компартмента среза в каждом случае во всех полях зрения.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием пакета компьютерных программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 10.0. После проверки типа распределения полученных данных методом Шапиро-Уилка для оценки различий сравнимых показателей (данные морфометрии) в исследуемых группах использован непараметрический критерий Манна-Уитни с определением медианы (Me), первого (Q1) и третьего (Q3) квартилей. Для сравнительного анализа качественных показателей (частота выявленных гормональных нарушений) представленных в виде доли (%) от общего числа наблюдений в каждой группе использовали χ^2 -критерий с поправкой Йетса и точный критерий Фишера (F). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез был принят равным 0,05.

Результаты и обсуждение

При стереотипности морфологических изменений в обеих группах биоптаты 1-й группы отличало наличие выраженной тенденции к гиперплазии желез и железисто-го эпителия с появлением его псевдомногогорядности и нередко сосочковых разрастаний (рис. 1 а) (Примечание редактора: этот и другие рисунки находятся на цветной вкладке), также тенденции к формированию кист с эпителиальной выстилкой различного фенотипа – от призматического до уплощенного эпителия и появлению очагов акантоза. Во второй группе отмечены умеренные гиперпластические процессы в покровном эпителии с формированием многочисленных васкуляризованных соединительнотканых сосочков, врастающих в эпителиальный пласт, и редкие железы (рис. 1 г).

При сопоставимости групп по частоте инфицированности онкогенными штаммами HPV в биоптатах шейки матки в группе с ДСТ чаще выявлялась цервикальная интраэпителиальная неоплазия (ЦИН) I-III степени (в одном случае диагностирован инвазивный

плоскоклеточный рак шейки матки) – по группам соответственно – 72,9 и 16,4%, $p_{1-2}=0,0000$, в биоптатах 2-й группы преобладала частота лейкоплакии – 41,8% (в 1-й – 16,2%, $p_{1-2}=0,0001$). Высокая частота ЦИН в 1-й группе ассоциировалась с большей плотностью фибробластов (количество клеток на 10000 мкм²) подэпителиальной стромы (по группам соответственно $Me=36,4$; $Q_{25}=25,8$; $Q_{75}=45,0$ и $Me=18,0$; $Q_{25}=15,0$; $Q_{75}=21,8$, $p=0,05$) и относительной поверхностной площадью сосудов (по группам соответственно $Me=8,0$; $Q_{25}=4,5$; $Q_{75}=10,1$ и $Me=3,1$; $Q_{25}=1,7$; $Q_{75}=4,9$, $p<0,05$). Подэпителиальную строму чаще характеризовали выраженная плотность коллагеновых волокон, в отдельных случаях очаги гиалиноза и высокая плотность фибробластов, среди которых отчетливо дифференцировались два фенотипа – узкие веретенообразные зажатые между волокон соединительной ткани клетки с темной цитоплазмой и гиперхромным ядром и более крупные веретенообразные клетки с относительно светлой цитоплазмой и ядром с хорошо выраженным ядрышком, залегающие в более рыхлой строме (рис. 1б, в, д).

Более мелкие темные ФБ описываются как незрелые ФБ, или фиброциты, трансформирующиеся под влиянием различных факторов роста в МФБ, характеризующиеся высокой функциональной активностью с продукцией большого количества фибронектина и различных изоформ коллагена [3], а также наличием рецепторов к различным гормонам и способностью синтезировать гормоны (в частности, тироглобулин) [20, 21]. Такой фенотип характерен и для опухоль-ассоциированных ФБ (CAFs), появляющихся в ткани еще до опухолевой трансформации эпителиальных клеток [1]. Отмечается, что содержание в тканях более 50% незрелых фибробластов коррелирует с повышенной плотностью сосудов, появлением опухоль-ассоциированных макрофагов и эпителио-мезенхимальным переходом [1].

Важным следствием высокой плотности ФБ может быть накопление в ткани фактора роста фибробластов (FGFs), который является не только мощным ангиогенным фактором, но и независимо от наличия соответствующих лигандов, может приводить к активации стероидных рецепторов (в частности, замещать эстрогены, действуя на ER – рецепторы к эстрогенам) и ассоциированными с ними сигнальными клеточными путями, ведущими к увеличению пролиферативной активности клеток. Так, при раке молочной железы FGFs рассматривается как наиболее мощный медиатор опухолевой трансформации [4].

Отмеченные особенности реагирования экзоцервикса сочетались с разнонаправленными изменениями гормонального статуса в исследуемых группах – значительной частотой у пациенток 1-й группы гипотиреоза (29,7%, во второй группе – 12,7%, $p=0,0220$) и гиперпролактинемии (37,8%, во второй группе – 3,6%, $p=0,0000$), у женщин 2-й группы – гиперэстрогемии (36,4%, в первой – 1,4%, $p=0,0000$) и гиперандрогемии (23,6%, в первой – 4,1, $p=0,0010$).

Заключение

Таким образом, при фоновых и предопухолевых процессах в шейке матки, ассоциированных с системной недифференцированной ДСТ, в сравнении с той же патологией при отсутствии ДСТ отмечены статистически значимо более высокая плотность ФБ в строме экзоцервикса в сочетании с высокой относительной поверхностью площадью сосудов и большей частотой ЦИН I-III степени, а также иной характер гормональных нарушений (гипотиреоз, гиперпролактинемия), что теоретически, может приводить к различным эффектам, в частности формированию «опухолевого поля», по современным представлениям [9, 10], ассоциирующимся с фоновыми и предопухолевыми изменениями в тканях, которые и проявляются в таких феноменах как гиперплазия, дисплазия, ангиогенез, нарушения эпителио-стромальных отношений. Нельзя исключить, что ДСТ с ха-

рактерными для нее нарушениями ЭЦМ, гормонального и иммунного гомеостаза оказывается важным фактором эпигеномного влияния, определяющим особенности течения патологии на ее фоне. ■

Наумова Людмила Алексеевна – доктор медицинских наук, профессор кафедры патофизиологии и общей патологии медицинского института БУ ВО ХМАО-Югры «Сургутский государственный университет»; ул. Ленина 1, г. Сургут, Ханты-Мансийский автономный округ – Югра; **Стародумова Валентина Анатольевна** – аспирант кафедры патофизиологии и общей патологии медицинского института БУ ВО ХМАО-Югры «Сургутский государственный университет». Автор, ответственный за переписку: Наумова Л.А. 628412, Российская Федерация; e-mail: naumoval@yandex.ru, мобильный телефон +7 982 516 31 70;

Литература:

1. Gascard Ph., Tlsty Th. D. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev.* 2016; 30(9): 1002–1019. DOI: 10.1101/gad.279737.116.
2. Nallasamy S., Yoshida K., Akins M., Myers K. Myers, Iozzo R., Mahendroo M. Steroid Hormones are key modulators of tissue mechanical function via regulation of collagen and elastic fibers. *Endocrinology.* 2017; 158(4): 950–962. doi: 10.1210/en.2016-1930.
3. Walker C., Mojares E., A Del Rio H. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(10). DOI: 10.3390/ijms19103028.
4. Piasecka D., Braun M., Kitowska K., Mieczkowski K., Kordek R., Sadej R., Romanska H. FGFs/FGFRs-dependent signalling in regulation of steroid hormone receptors – implications for therapy of luminal breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2019; 38: 230. doi.org/10.1186/s13046-019-1236-6.
5. Chacón-Martínez C.A., Koester J., Wickström S.A. Signaling in the stem cell niche: regulating cell fate, function and plasticity. *The Company of Biologists.* 2018; 145(15). DOI: 10.1242/dev.165399.
6. Pennings S., Liu K.J., Qian H. The stem cell niche: interactions between stem cells and their environment. *Stem Cells Int.* 2018; 1-2. DOI: 10.1155/2018/4879379.
7. Зорина А.И., Зорин В.Л., Черкасов В.Р. Дермальные фибробласты: разнообразие фенотипов, физиологических функций, возможности терапевтического применения. *Эстетическая медицина.* 2012; 11(1): 15–31.
8. Сандбо Н., Смольянинова Л. В., Орлов С. Н., Дулин Н. О. Регуляция дифференцировки и функционирования миофибробластов сигнальной системой цитоскелета. *Успехи биологической химии.* 2016; 56(13): 259–282. www.fbras.ru/wp-content/uploads/2017/10/Sandbo_et_al-2016.pdf.
9. Christensen S.R. Recent advances in field cancerization and management of multiple cutaneous squamous cell carcinomas. *Journal List. F1000Research.* 2018; 7(F1000 Faculty Rev): 690. DOI: 10.12688/f1000research.12837.1.
10. Curtius K., Wright N.A., Graham T.A. An evolutionary perspective on field cancerization. *Nat Rev Cancer.* 2017; 18(1): 19–32. DOI:10.1038/nrc.2017.102.
11. Doglioni G., Parik S., Fendt S.M. Interactions in the (pre)metastatic niche support metastasis formation. *Frontiers in Oncology.* 2019; 9 (219). DOI: 10.3389/fonc.2019.00219.
12. Guo Ya., Ji X., Liu J., Fan D., Zhou Q., Chen Ch., Wang W., Wang G., Wang H., Yuan W., Ji Zh., Sun Zh. Effects of exosomes on pre-metastatic niche formation in tumors. *Mol Cancer.* 2019; 18(39): 39 https://doi.org/10.1186/s12943-019-0995-1.
13. Gonzalez D.M., Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signaling.* 2014; 7(344). re8. DOI: 10.1126/scisignal.2005189.
14. Ye X., Weinberg R.A. Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends Cell Biol.* 2015; 25(11): 675–686. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.07.012.
15. Керемкулова Н. В., Серов В. Н., Никифоров Н. В., Торшин И. Ю., Громова О. А., Перетятко Л. П., Кузнецов Р. А. Влияние недифференцированной дисплазии соединительной ткани на исходы беременности и родов: клинические аспекты, морфологические и иммуногистохимические особенности плаценты. *Земский врач.* 2013; 3 (20): 28–32.
16. Гаспаров А. С., Дубинская Е. Д., Бабичева И. А., Лантева Н. В., Дорфман М. Ф. Роль дисплазии соединительной ткани в акушерско-гинекологической практике. *Ка-занский медицинский журнал.* 2014; 6 (95): 897–905. УДК 616.714.1-007.241: 616.126.32: 616.62-008.222: 618.14-007.44: 611.018.28: 618.2: 616-056.

17. Фролов А. Л., Кулаковский В. А., Никифоров М. В. Роль маркеров дисплазии соединительной ткани в развитии истмико-цервикальной недостаточности при беременности. *Мать и дитя в Кузбассе*. 2014; 3 (58): 54–56.
18. Игнатко И.В., Стрижаков Л.А., Мартиросова А.Л., Польшина Н.И. Роль недифференцированной дисплазии соединительной ткани в развитии акушерских осложнений. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2016; 5: 45 – 53. DOI: 10.20953/1726-1678-2016-5-44-52.
19. Kerkhof M. H., Hendriks L., Brölmann H. A. M. *Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse – a review of the current literature*. *Int Urogynecol J*. 2009; 20: 461–474. DOI 10.1007/s00192-008-0737-1.
20. Fernandoa R., Atkinsa S., Raychaudhuria N. Raychaudhuria, Lua Y., Lia B., Douglasa R. S., Smith T. J. *Human fibrocytes coexpress thyroglobulin and thyrotropin receptor*. *PNAS*. | 2012; 19 (109): 7427–7432. doi/10.1073/pnas.1202064109.
21. Mukudai S., Matsuda K. I., Nishio T., Sugiyama Y., Bando H., Hirota R., Sakaguchi H., Hisa Y., Kawata M. *Differential responses to steroid hormones in fibroblasts from the vocal fold, trachea, and esophagus*. *Endocrinology*. 2015; 156(3): 1000–1009. doi: 10.1210/en.2014-1605.
22. ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ МОЛОЧНЫХ ЖЕЛЕЗ И ШЕЙКИ МАТКИ ПО ОЦЕНКЕ ЖЕНЩИН ФЕРТИЛЬНОГО ВОЗРАСТА. Ворошина Н.В., Важенин А.В., Тюков Ю.А. *Уральский медицинский журнал*. 2019. № 4 (172). С. 91-95.

Наумова Л.А., Стародумова В.А.

Сравнительное исследование плотности фибробластов при неопухоловой патологии шейки матки на фоне дисплазии соединительной ткани

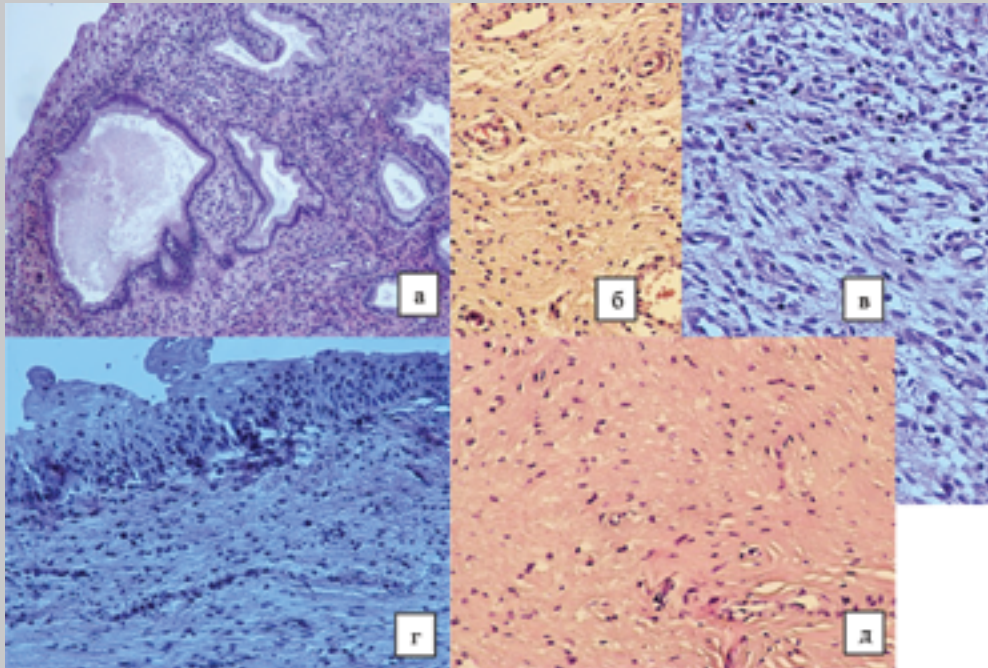


Рисунок.1. Сравнительная морфология зоны трансформации шейки матки в исследуемых группах

Примечание: 1-я группа: а - гиперплазия железистого эпителия, формирование кист, высокая плотность фибробластов; б и в – различный фенотип фибробластов; 2-я группа: г - плоско-клеточная метаплазия в зоне трансформации; д - меньшая плотность фибробластов стромы экзоцервикса. Окраска гематоксилином и эозином; а – ув. 100; б, в, г, д – ув. 200.