

© Т.Е. Белокриницкая¹,
Ю.Н. Пономарева¹, Е.Н. Бунина²,
Г.М. Ломнева²

¹Государственная медицинская академия,
Чита;

²Областной диагностический центр,
Чита

НЕКОТОРЫЕ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ДИСПЛАЗИЙ

■ Изучены некоторые клиническо-морфологические особенности цервикальных эпителиальных дисплазий. Обнаружено, что тяжесть диспластических изменений эпителия шейки матки ассоциировалась с инфицированием вирусами папилломы человека и характеризовалась повышением уровня пролиферативной активности, торможением апоптоза и снижением экспрессии стероидных рецепторов. Результаты исследования позволяют прогнозировать развитие цервикальных дисплазий.

■ **Ключевые слова:** шейка матки; дисплазия; морфология

В литературе широко обсуждаются вопросы классификации, диагностики, критериев малигнизации, определения тактики лечения и прогноза предраковых поражений цервикального эпителия [2, 4, 5]. Дисплазия шейки матки не имеет патогномоничных клинических и кольпоскопических признаков, что заставляет искать новые, диагностически значимые критерии, отражающие морфологические и молекулярные особенности патологического процесса [2]. Использование современных иммунологических методов, в частности определение биологических маркеров PCNA, мутантного гена-супрессора p53mut, рецепторов половых стероидов, регулирующих и опосредующих процессы пролиферации и апоптоза клеток, позволяет охарактеризовать некоторые особенности биологических свойств предрака, определяющих, в конечном итоге, течение заболевания, эффективность терапии и прогноз [6].

Целью настоящего исследования было изучение клиническо-морфологических особенностей предраковых поражений шейки матки.

Материалы и методы

Проведено обследование 111 пациенток с цервикальными эпителиальными дисплазиями, находившихся на обследовании и лечении в Областном онкологическом диспансере Читы в 1998–2004 годах.

Диагностика предраковых поражений шейки матки включала клинические, кольпоскопические, цитогистологические и иммуногистохимические методы исследования. Определение патологических процессов цервикального эпителия проводилось в соответствии с общепринятой Международной статистической классификацией болезней (1992). В группу обследованных были включены 36 ($32,4 \pm 4,4$ %) больных со слабой дисплазией шейки матки, 34 ($30,6 \pm 4,4$ %) — с умеренной и 41 ($36,9 \pm 4,6$ %) пациентка с предраком тяжелой степени. Средний возраст обследованных составил $34,7 \pm 9,1$ года, варьируя от 17 до 49 лет.

Вирусы папиллом человека (Human Papilloma Virus, HPV) 6, 11, 16, 18, 31, 33 типов диагностировали при помощи ПЦР-исследования по общепринятой методике с применением тест-систем «АмплиСенс-100-R» (Москва) в лаборатории молекулярной диагностики Областного диагностического центра Читы [1]. Материалом для ПЦР-исследования служили соскобы эпителия цервикального канала и поражений шейки матки, взятые отдельными одноразовыми, стерильными зондами до проведения комплексного обследования и лечения заболеваний шейки матки. Контрольную группу при типировании HPV составили 20 здоровых женщин, сопоставимых по возрасту и данным анамнеза, и не имеющих в настоящее время патологических изменений на шейке матки.

Определение экспрессии PCNA, p53mut, рецепторов эстрогенов (ER) и прогестерона (PgR) проводили иммуногистохимическим ме-

тодом в лаборатории патоморфологии Областного диагностического центра Читы. Определение экспрессии PCNA, p53mut, ER и PgR проводили на серийных парафиновых срезах с использованием моноклональных антител к PCNA (клон PC-10, разведение 1:100, "Dako", Дания), p53mut (клон D07, разведение 1:100, "Dako", Дания) и рецепторов половых гормонов (предварительная высокотемпературная демаскировка антигена, "Dako", Дания). Для иммунного окрашивания использовали стрептавидин-биотин-пероксидазный метод ("Dako", Дания). Подсчет проводили в 20 произвольно выбранных полях зрения при увеличении $\times 400$. Индекс пролиферации (по PCNA) и апоптоза (по p53) рассчитывали как отношение числа позитивно окрашенных ядер к общему числу ядер. Экспрессию рецепторов эстрогенов и прогестерона оценивали количественным методом по системе H-score (McCarthy и соавт., 1985), включающей интенсивность окраски и процент окрашенных клеток. Степень экспрессии рецепторов соответствовала результату H-score: 0–50 — отрицательная, 51–100 — низкая, 101–200 — умеренная и 201 и более — высокая [6, 7]. Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием биоптатов шейки матки, полученных до проведения лечения цервикального предрака. Контрольную группу составили 20 образцов секционного материала неизмененных тканей шейки матки.

Данные представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое, m — ошибка среднего. Использовали метод расчета парных корреляций по Спирмену. Для оценки статистически значимых различий полученных данных использовали критерий Стьюдента, критический уровень значимости принимался менее или равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Значимым фактором возникновения цервикального предрака являются вирусы папилломы человека, среди которых принято выделять типы высокого онкогенного риска — 16, 18, 31 и типы низкого риска — 6, 11, 33 [2, 4, 5]. Частота инфицирования цервикального эпителия HPV при диспластических изменениях шейки матки представлена в таблице 1.

Превалирующим было поражение шейки матки 16, 18 и 31 типами HPV, вирусы низкого онкогенного риска 6 и 11 типов составили лишь $12,6 \pm 3,2$ %. При проведении корреляционного анализа была отмечена прямая связь между степенью тяжести предраковых изменений и инфицированием цервикального эпителия канцерогенными типами HPV. Коэффициент корреляции между HPV и тяжестью поражения эпителиального пласта при слабой дисплазии составил $r = 0,592$ ($p = 0,003$), при умеренной дисплазии — $r = 0,601$ ($p = 0,025$) и при тяжелой дисплазии — $r = 0,892$ ($p = 0,037$).

Одним из ключевых клинко-морфологических параметров патологических изменений, связанных с HPV-инфицированием, является пролиферативная активность клеток и интенсивность их гибели [5, 8, 9]. При определении PCNA было обнаружено увеличение экспрессии этого антигена при развитии предраковых изменений цервикального эпителия (рис. 1). В свою очередь, темпы клеточного роста при тяжелой дисплазии значительно превышали аналогичные показатели при умеренном и слабом предраке. Экспрессия p53mut была отмечена в $18,9 \pm 3,7$ % (21/111) случаев дисплазии шейки матки. В неизмененном цервикальном эпителии p53mut обнаружен не был. Количество p53mut-позитивных случаев и

Таблица 1

Частота выявления HPV при дисплазии шейки матки

Группы обследованных	n	Частота выявления типов HPV, %	
		16, 18, 31, 33	HPV 6, 11
Здоровые	20	0	$10,0 \pm 6,7$
Цервикальная дисплазия			
слабая	36	$13,9 \pm 5,8$	$16,7 \pm 6,2$ $p = 0,493$
умеренная	34	$35,3 \pm 8,2$ $p_1 = 0,035$	$11,8 \pm 5,5$ $p = 0,839$ $p_1 = 0,558$
тяжелая	41	$63,4 \pm 7,5$ $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,014$	$9,8 \pm 4,6$ $p = 0,980$ $p_1 = 0,367$ $p_2 = 0,779$
p — по сравнению с контролем; p_1 — по сравнению со слабой дисплазией; p_2 — по сравнению с умеренной дисплазией			

Таблица 2

Экспрессия PCNA и p53mut при предраке шейки матки

Группы обследованных	Экспрессия PCNA, %	Экспрессия p53mut	
		% позитивных случаев	% позитивных клеток
Здоровые, n = 20	5,5 ± 1,5	0	0
Цервикальная дисплазия			
слабая, n = 36	20,4 ± 5,2 p = 0,040 p ₁ = 0,747	5,6 ± 3,8 p ₁ = 0,957	3,1 ± 1,5 p ₁ = 0,716
умеренная, n = 34	22,7 ± 4,8 p = 0,010	5,9 ± 4,0	3,9 ± 1,6
тяжелая, n = 41	44,4 ± 9,0 p = 0,004 p ₁ = 0,049	22,0 ± 6,5 p ₁ = 0,048	10,1 ± 2,5 p ₁ = 0,050
p — по сравнению с контролем; p ₁ — по сравнению с умеренной дисплазией			

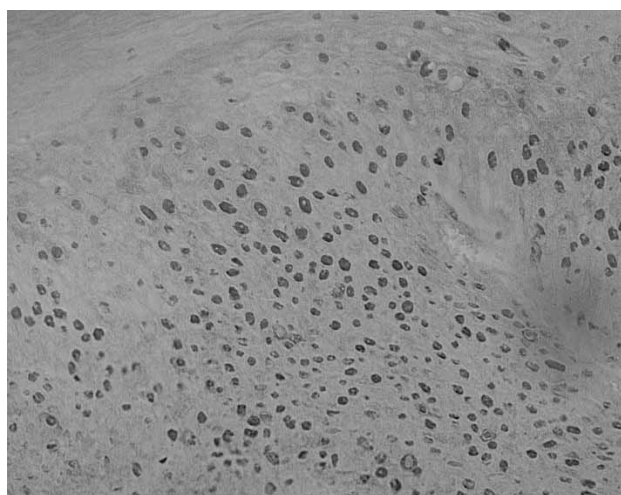


Рис. 1. Экспрессия PCNA при тяжелой цервикальной дисплазии. Стрептавидин-биотиновый метод, хромоген-диаминобензидин, ×400

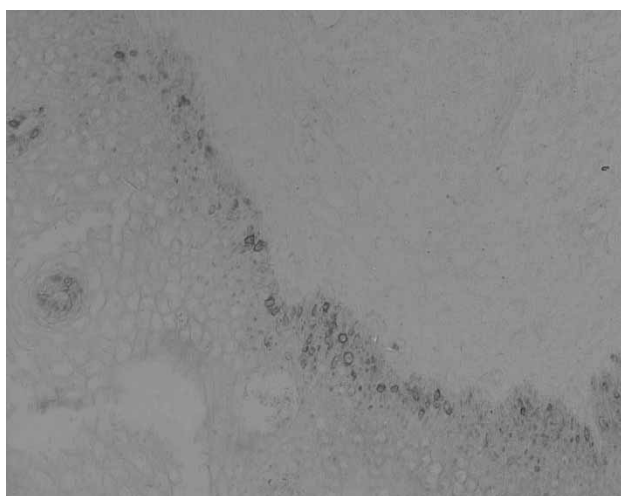


Рис. 2. Экспрессия p53mut при слабой дисплазии шейки матки. Стрептавидин-биотиновый метод, хромоген-диаминобензидин, ×400

средние значения экспрессии p53mut при слабой и умеренной дисплазии было практически одинаковым в отличие от тяжелой дисплазии, при которой экспрессия этого протоонкогена была отмечена более чем в 20 % наблюдений и превышала 10 % окрашенных ядер (табл. 2, рис. 2).

Наличие специфических рецепторов в цервикальном эпителии определяет чувствительность клеток к половым стероидам, участвующим в регуляции клеточного цикла [3]. При изучении рецепторного статуса предраковых поражений шейки матки было установлено, что частота выявления ER и PgR при слабой и умеренной дисплазии соответствовала показателям здоровых женщин (рис. 3). В то же время, в случае умеренного предрака было отмечено снижение степени экспрессии ER на фоне стабильных показателей экспрессии PgR. Предраковые поражения тяжелой степени характеризовались уменьшением

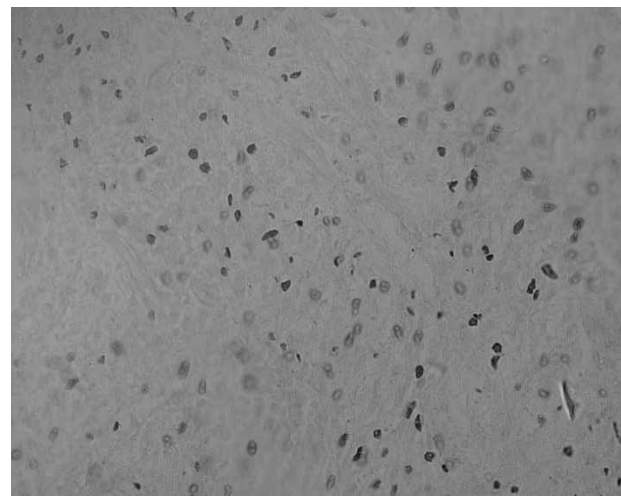


Рис. 3. Экспрессия рецепторов эстрогенов при умеренной дисплазии шейки матки. Стрептавидин-биотиновый метод, хромоген-диаминобензидин, ×400

Таблица 3

Частота выявления и степень экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона при дисплазии шейки матки

Группы обследованных	n	Рецепторы, %				Степень экспрессии рецепторов, H-score	
		E+Pg+	E+Pg-	E-Pg+	E-Pg-	ER	PgR
Здоровые	20	50,0 ± 11,2	30,0 ± 10,2	20,0 ± 8,9	0	51,0 ± 8,7	35,9 ± 8,4
Дисплазия шейки матки							
слабая	36	55,6 ± 8,3 p = 0,689	30,6 ± 7,7 p = 0,963	19,4 ± 6,6 p = 0,957	0	50,0 ± 7,5 p = 0,934	34,5 ± 11,0 p = 0,931
умеренная	34	50,0 ± 8,6 p = 1,000 p ₁ = 0,641	32,3 ± 8,0 p = 0,861 p ₁ = 0,879	17,6 ± 6,5 p = 0,826 p ₁ = 0,847	0	21,0 ± 6,2 p = 0,006 p ₁ = 0,004	30,9 ± 7,1 p = 0,660 p ₁ = 0,787
тяжелая	41	53,7 ± 7,8 p = 0,787 p ₁ = 0,868 p ₂ = 0,751	9,8 ± 4,6 p = 0,041 p ₁ = 0,020 p ₂ = 0,013	24,4 ± 6,7 p = 0,702 p ₁ = 0,598 p ₂ = 0,474	12,2 ± 5,1	31,3 ± 5,4 p = 0,050 p ₁ = 0,043 p ₂ = 0,212	20,1 ± 4,5 p = 0,074 p ₁ = 0,209 p ₂ = 0,188
p — по сравнению с контролем; p₁ — по сравнению со слабой дисплазией; p₂ — по сравнению с умеренной дисплазией							

частоты выявления и значительным снижением уровня экспрессии ER, уменьшением экспрессии PgR и появлением рецепторонегативных образцов (табл. 3).

Как показало наше исследование, развитие пренеопластических поражений цервикального эпителия связано с определенными высокоонкогенными типами HPV, участвующими в регуляции процессов пролиферации и апоптоза. Полученные нами данные о повышенной экспрессии PCNA подтверждают исследования других авторов, свидетельствующие о высокой пролиферативной активности клеток по мере нарастания патологических изменений цервикального эпителия [5, 8, 9]. В формировании последних важное значение имеет мутация гена p53, приводящая к инактивации функции этого белка в качестве супрессора опухолевого роста [5, 8]. Высокие значения экспрессии p53mut, обнаруженные при дисплазии тяжелой степени на фоне HPV, свидетельствуют о выраженной тенденции неопластической трансформации клеток.

В регуляции темпов клеточного роста значительная роль принадлежит стероидным гормонам посредством взаимодействия со специфическими рецепторами. При патологических изменениях цервикального эпителия количество и функциональная активность рецепторов половых гормонов может меняться, что, в свою очередь, приводит к изменению интенсивности пролиферативных процессов [3]. Показано, что эстрогены и их метаболиты способны активировать апоптоз инфицированных HPV эпителиальных клеток шейки матки [10]. Таким образом, снижение экспрессии рецепторов эстрогенов по мере нарастания пред-

раковых изменений цервикального эпителия и, тем более, появление рецепторонегативных поражений, может инициировать прогрессирование патологических изменений шейки матки.

Результаты проведенного нами исследования отражают клинко-морфологические особенности цервикальных эпителиальных дисплазий, что, на наш взгляд, может быть использовано для оценки потенциальной злокачественности и определения прогноза пренеоплазии.

Литература

1. Бауэр Х.М. Применение ПЦР для диагностики папиллома-вирусных инфекций гениталий / Хейди М. Бауэр, Грир Е., Мишель Мано М. // Молекулярная клиническая диагностика: методы. Пер. с англ. / Под ред. С. Херрингтон, Дж. Макги. — М.: Мир, 1999. — С. 258–331.
2. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии / Бохман Я. В. — Л.: Медицина, 1989. — 464 с.
3. Берштейн Л.М. Гормональный канцерогенез / Берштейн Л.М. — СПб.: Наука, 2000. — 199 с.
4. Козаченко В.П. Диагностика и лечение эпителиальных дисплазий и преинвазивной карциномы шейки матки / Козаченко В.П. // Заболевания шейки матки, влагалища и вульвы (Клинические лекции) / Под ред. В.Н. Прилепской. — М.: МЕДпресс, 2000. — С. 139–153.
5. Минкина Г.Н. Предрак шейки матки / Минкина Г.Н., Манухин И.Б., Франк Г.А. — М.: Аэрограф-медиа, 2001. — 112 с.
6. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. — Казань, 2004. — 456 с.
7. Эллиниди В.Н. Практическая иммуноцитохимия / Эллиниди В.Н., Аникеева Н.В., Максимова Н.А. — СПб.: ВЦЭРМ МЧС России, 2002. — 36 с.
8. Oncogene expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of cervix / Pinion S.B., Kennedy J.H., Miller R. W. [et al.] // Lancet. — 1991. — Vol. 6. — P. 819–820.
9. Proliferative activity in cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma / Xue Y., Feng Y., Zhu G. [et al.] // Chin. Med. Jour. — 1999. — Vol. 112, N 4. — P. 373–375.

10. *Webster K.* Estrogen and progesterone increase the levels of apoptosis induced by the human papillomavirus type 16 E2 and E7 proteins / Webster K., Taylor A., Gaston K.J. // J. Gen. Virol. — 2001. — Vol. 82, Pt. 1. — P. 201–213.

Статья представлена Е.И. Русиной
НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

SOME CLINICAL AND MORPHOLOGICAL FEATURES OF
CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA

Belokrinskaya T.E., Ponomaryova Y.N., Bunina E.N.,
Lomneva G.M.

■ **Summary:** There was an investigation of some clinical and morphological features of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). The degree of CIN was defined in combination with human papillomavirus infection and characterized with increased level of proliferative activity, inhibition of apoptosis and low sex-steroid receptors. The results of study allow prognosticating the development of CIN.

■ **Key words:** cervix uteri, cervical intraepithelial neoplasia, morphology