

ПРОЦЕССЫ КЛЕТОЧНОГО ОБНОВЛЕНИЯ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ГЕРПЕТИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕРВИКАЛЬНОЙ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ НЕОПЛАЗИИ И РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ

ЛЕСНИЧАЯ О.В.,* КРЫЛОВ Ю.В.,**
СЕМЕНОВ Д.М.,* ГРИБ А.К.***

УО «Витебский государственный медицинский университет»,
Витебское областное клиническое патологоанатомическое бюро**,
УО «Гродненский государственный медицинский университет»****

Резюме. Статья посвящена изучению влияния герпетической инфекции на процессы апоптоза и пролиферации при цервикальной интраэпителиальной неоплазии тяжелой степени и раке шейки матки. В работе представлен комплексный клинико-морфологический анализ экспрессии фактора пролиферации Ki-67, ингибитора апоптоза Bcl-2 и мутантного онкопротеина p53 с использованием иммуногистохимического и морфометрического методов исследования. Установлены благоприятные и неблагоприятные прогностические маркеры предракового состояния и опухолевого роста в шейке матки.

Ключевые слова: Ki-67, Bcl-2, p53, цервикальная интраэпителиальная неоплазия, рак шейки матки, вирус простого герпеса.

Abstract. Article is devoted to studying of herpetic infection influence on apoptosis and proliferation processes at heavy degree cervical intraepithelial neoplasia and uterus neck cancer. In the work the complex clinicomorphological analysis of proliferation factor Ki-67, inhibitor of apoptosis Bcl-2 and mutant oncoprotein p53 expression with the usage of immunohistochemical and morphometric research methods is presented. Favorable and unfavorable prognostic markers of precancerous condition and tumor growth in uterus neck were determined.

Keywords: herpes simplex virus, cervical intraepithelial neoplasia, cervical carcinoma.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, тел. раб. 22-41-82, тел. домашний 53-58-61, тел. моб. +375-29-511-45-28. – Лесничая О.В.

Актуальность.

Рак шейки матки (РШМ) является одной из наиболее серьезных медицинских и социальных проблем женского репродуктивного здоровья. По данным Белорусского канцер-регистра, в республике наблюдается рост заболеваемости раком шейки матки с 15,2 в 1999-2003 году, до 15,8 в 2004-2008 году на 100 тыс. женского населения [1]. Максимальные уровни заболеваемости раком шейки матки фиксируются в группе женщин 45-55 лет. В то же время анализ повозрастных показателей заболеваемости указывает на увеличение числа больных младших возрастных групп [2].

В настоящее время имеется достаточно данных, подтверждающих причинную связь папилломавирусной инфекции с предопухолевыми заболеваниями и раком шейки матки. Доказано, что при папилломавирусной инфекции риск прогрессии цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН) II степени в рак *in situ* равен 1% за год наблюдения, а риск прогрессии ЦИН II в ЦИН III за два года равен 16% [3]. Многочисленные исследования свидетельствуют также о наличии связи между герпетической инфекцией гениталий и онкологическими заболеваниями шейки матки [4]. Однако прямых доказательств этиологической роли ВПГ в развитии рака шейки матки нет.

Несмотря на то, что существуют различные мнения о продолжительности латентного периода озлокачествления (от 2 до 12 лет и более), в настоящее время надежные морфологические критерии, которые позволяли бы судить о прогнозе ЦИН разной степени тяжести, отсутствуют.

Для прогнозирования течения предопухолевого и опухолевого процесса имеет большое значение определение баланса пролиферативной активности и апоптоза. В основе иммуногистохимической оценки пролиферации лежит использование антител к Ki-67 [5]. Нарушения механизма развития апоптоза могут наступать тогда, когда ключевой ген этого процесса *wt p53* теряет свою функцию. Это может наступить в результате мутации гена *wt p53* с образованием мутантного онкопротеина – *mt p53*, что наблюдается в условиях патологии или в результате блокады *wt p53* другими протеинами, к которым, в первую очередь, относится Bcl-2. Установлено, что онкопротеин Bcl-2 является одним из главных ингибиторов апоптоза [5]. Нарушение генетически запрограммированных процессов клеточной гибели может привести к неуправляемому со стороны гормональной системы организма клеточному росту и развитию в шейке матки неоплазии либо рака, в связи с чем, исследования, направленные на изучение экспрессии факторов апоптоза в эпителиальных клетках эктоцервикса, считаются весьма перспективными [6]. Выраженность процессов пролиферации и апоптоза при дисплазиях многослойного плоского эпителия (МПЭ) и РШМ (с учетом экспрессии Ki-67, p53, Bcl-2) активно обсуждается в литературе, но характеризуется отсутствием цифровых данных или их большим разбросом и даже противоречивостью [7].

Цель исследования – установить влияние герпетической инфекции на экспрессию Ki-67, Bcl-2, p53 при раке шейки матки и тяжелой цервикальной интраэпителиальной неоплазии.

Методы

Исследовано 45 биоптатов шейки матки женщин, состоявших на учете в Витебском областном клиническом онкодиспансере по поводу ЦИН III и рака шейки матки. Средний возраст женщин составил $46,2 \pm 1,88$ года. Для клинической характеристики пациенток с раком шейки матки были использованы данные канцер-регистра и данные амбулаторных карт Витебского областного онкологического диспансера.

Основой для анализа предраковых и опухолевых состояний шейки матки служила Гистологическая классификация опухолей женского полового тракта Всемирной организации здравоохранения [8]. Гистологический диагноз ЦИН устанавливался на основании следующих морфологических критериев: изменение размеров и формы клеток и ядер, появление гиперхромных ядер, увеличение числа митозов, нарушение ядерно-цитоплазматического соотношения [9]. Учитывая, что ЦИН III является собирательным понятием, объединяющим дисплазию III степени и *cancer in situ*, к цервикальной интраэпителиальной неоплазии III степени (тяжелой дисплазии многослойного плоского эпителия) были отнесены случаи, когда патологический процесс локализовался в верхней трети эпителия, но не поражал всю толщину эпителиального пласта [9]. Критерием для постановки диагноза карцинома *in situ* являлось поражение всего пласта с наличием выраженной атипии клеток и ядер, митозов, в том числе патологических, на разных уровнях эпителия [10]. Заключение о поражении вирусом простого герпеса (ВПГ) ставилось на основании внутриядерных включений I и II типа, наличия феноменов «тутовой ягоды», и «пустых ядер» [11].

Для морфологической характеристики из архивных парафиновых блоков делались срезы толщиной 5 мкм, которые депарафинировались в ксилоле, спиртах и окрашивались гематоксилином и эозином.

Оценка морфологических параметров проводилась с использованием светового оптического микроскопа «Carl Zeiss» Axiostar 40 при увеличении 100, 200 и 400. При исследовании срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, оценивались такие морфологические параметры, как степень ЦИН и степень дифференцировки рака, наличие герпетических включений.

Для выявления пролиферативной активности клеток использовалось иммуногистохимическое окрашивание гистологических срезов с применением моноклональных антител к ядерному протеину Ki-67, который экспрессируется при активных фазах клеточного цикла. Для выявления мутантного p53 протеина (являющегося продуктом мутации опухолевого гена-супрессора p53, блокирующего прохождение клеток по митотическому циклу и индуцирующего апоптоз) использовали моноклональные мышиные антитела. Для выявления подавления апоптоза использовали антитела к Bcl-2 онкопротеину. Антигены ВПГ II типа выявлялись с помощью поликлональных кроличьих антител (фирма «ДАКО»). Из парафиновых блоков готовились срезы толщиной 5 микрон, переносились на предметные стекла, покрытые L-полилизинном. Срезы в вертикальном положении высушивали 18 часов при комнатной температуре, помещали в термостат на 30 мин. при температуре 60°C [12]. После депарафинации

предметные стекла со срезами переносились в цитратный буфер pH 6.0, и помещались в водяную баню при температуре 98°C на 30 мин. С первичными антителами в стандартном разведении срезы инкубировались в течение 30 минут при комнатной температуре. В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител LSAB фирмы «ДАКО» с диаминобензидином (ДАБ). Ставились положительные контроли.

Для морфометрического исследования микропрепараты фотографировали в 5 полях зрения (объектив 40) с разрешением 2592 на 1944 пикселей при помощи микроскопа AxioStar 40 и цифровой камеры Canon Power Shot A95. Снимки конвертировали в бинарный вид и проводили морфометрический подсчет ДАБ-положительных клеток при помощи анализатора изображений WCIIF ImageJ и Aperio Image Scope [13].

Результаты и обсуждение

В исследованных нами 23 биоптатах шейки матки у женщин с верифицированным раком шейки матки преобладали случаи со степенью злокачественности Грейд II (18 женщин (78±0,09%)), у 16 пациенток (70±0,1%) имело место вовлечение в патологический процесс более одной локализации, у 8 женщин (35±0,1%) наблюдались лимфогенные и гематогенные метастазы. Анализ структуры онкологической патологии свидетельствует о достаточно агрессивном течении рака шейки матки. Только у 5 пациенток (22±0,09%) имела место высокая степень дифференцировки (Грейд I) и у 7 (30±0,1%) – поражение ограничивалось только экзоцервиксом.

С целью определения особенностей апоптоза и клеточной пролиферации при опухолях шейки матки была проанализирована связь экспрессии исследуемых маркеров со степенью дифференцировки плоскоклеточного рака (таблица 1).

Таблица 1

Среднее количество позитивных клеток при раке шейки матки различной степени дифференцировки

Степень дифференцировки опухоли	Ki-67	Bcl-2	p53
Плоскоклеточный рак шейки матки, Грейд I	240,20±34,09	56,60±42,54	20,40±10,23
Плоскоклеточный рак шейки матки, Грейд II	405,56±45,06	63,39±22,45	107,11±21,70

На основании проведенных исследований, установлено, что средняя экспрессия Ki-67 при плоскоклеточном раке, Грейд I, была 240,20±34,09 на 1000 клеток, при степени злокачественности Грейд II плоскоклеточного рака этот показатель составил 405,56±45,06. Средний уровень экспрессии Bcl-2 и p53 при Грейд I был 56,60±42,54 и 90,00±25,34 соответственно, а при плоскоклеточном раке, Грейд II – 63,39±22,45 и 87,78±23,06 на 1000 клеток.

Полученные данные были проанализированы с помощью U-критерия Манна-Уитни. Экспрессия фактора пролиферации Ki-67 в плоскоклеточном ра-

ке шейки матки высокой степени дифференцировки (Грейд I) была статистически значимо ниже, чем в биоптатах с умеренно дифференцированной опухолью (Грейд II), $p=0,037$. Статистически значимо более высокий уровень накопления мутантного p53 наблюдался при Грейде II степени злокачественности плоскоклеточного рака шейки матки ($p=0,006$). Не было статистически значимых различий в экспрессии ингибитора апоптоза Bcl-2 ($p=0,29$).

Таким образом, нами установлено, что при снижении степени дифференцировки рака шейки матки, имеет место увеличение пролиферативной активности и накопления мутантного p53, что позволяет отнести гиперэкспрессию Ki-67 и p53 к неблагоприятным прогностическим маркерам.

При проведении анализа связи экспрессии исследуемых маркеров с распространенностью опухолевого процесса было установлено, что средний уровень экспрессии фактора пролиферации, Ki-67, был выше при раке шейки матки, занимающем более одной локализации, и составил $379,00 \pm 45,22$ на 1000 клеток (Таблица 2).

Таблица 2

Среднее количество позитивных клеток при раке шейки матки с различной распространенностью опухолевого процесса

Клинико-морфологические критерии	Ki-67	Bcl-2	p53
Поражение только экзоцервикса	$307,29 \pm 57,95$	$122,29 \pm 49,95$	$63,00 \pm 18,11$
Поражение, занимающее более одной локализации	$379,00 \pm 45,22$	$29,05 \pm 13,30$	$90,25 \pm 23,96$

При поражении, не выходящем за пределы экзоцервикса, средний показатель пролиферативной активности составил $307,29 \pm 57,95$. Наблюдалась та же тенденция к повышению накопления мутантного типа p53 в плоскоклеточном раке, выходящем за пределы экзоцервикса ($90,25 \pm 23,96$), по сравнению с нераспространенным опухолевым ростом ($63,00 \pm 18,11$). Экспрессия ингибитора апоптоза bcl-2 была выше при раке шейки матки, ограниченном экзоцервиксом ($122,29 \pm 49,95$). При опухоли, занимающей более одной локализации, среднее количество bcl-2 положительных клеток составило $29,05 \pm 13,30$.

Сравнение связи экспрессии маркеров с распространенностью опухолевого процесса проводилось также с помощью U-критерия Манна-Уитни. В исследуемых группах не было выявлено статистически значимых различий в степени пролиферативной активности ($p=0,193$) и в уровне накопления мутантного p53 ($p=0,789$).

При анализе экспрессии ингибитора апоптоза была обнаружено, что при раке шейки матки, не выходящем за пределы экзоцервикса, уровень Bcl-2 был статистически значимо выше, чем при распространенных опухолях ($p=0,007$). Это позволяет предположить, что высокий и средний уровень экспрессии ингибитора апоптоза (более 50 на 1000 клеток при увеличении $\times 400$) является относительно благоприятным прогностическим маркером, который может свидетельствовать об ограниченном процессе.

При исследовании пролиферативной активности клеток с определением Ki-67, мутантного p53 протеина и Bcl-2 онкопротеина при раке шейки матки с различным метастатическим потенциалом опухоли установлены следующие закономерности (Таблица 3).

Таблица 3

Среднее количество позитивных клеток при раке шейки матки с различным метастатическим потенциалом опухоли

Клинико-морфологические критерии	Ki-67	Bcl-2	p53
Рак шейки матки с метастазами	345,11±64,62	14,33±4,43	61,82±16,25
Рак шейки матки без метастазов	443,43±47,57	85,13±29,72	97,54±26,42

При сопоставлении двух групп по морфометрическим показателям экспрессии Ki-67 и уровня накопления мутантного p53 с помощью U-критерия Манна-Уитни, не было обнаружено статистически значимых различий ($p=0,243$ и $p=0,361$ соответственно) в биоптатах рака шейки матки с метастазами и без метастазов. Экспрессия ингибитора апоптоза Bcl-2 была статистически значимо выше в группе пациентов с раком шейки матки без метастазов ($p=0,018$). Полученные данные позволяют предположить, что высокий и средний уровень экспрессии ингибитора апоптоза (более 50 на 1000 клеток при увеличении $\times 400$) является относительно благоприятным прогностическим маркером, который предполагает отсутствие метастазов опухоли.

При исследовании 23 биоптатов шейки матки у женщин с верифицированным раком шейки матки установлена высокая частота герпетической инфекции. Светооптические признаки герпетического поражения были установлены в 11 биоптатах, что составило $48\pm 0,11\%$ случаев, в 12 ($52\pm 0,11\%$) биоптатах включения вируса простого герпеса отсутствовали.

При исследовании пролиферативной активности клеток с определением Ki-67, мутантного p53 протеина и Bcl-2 онкопротеина установлены следующие закономерности.

При проведении корреляционного анализа с использованием непараметрического критерия Спирмена имеет место обратная корреляция между степенью экспрессии Ki-67 и Bcl-2 при раке шейки матки без светооптических признаков герпеса, коэффициент корреляции, r_s , при этом составил $-0,6$, $p=0,04$. При раке шейки матки без светооптических признаков герпетического поражения уровень экспрессии Ki-67 коррелировал с p53: $r_s=0,88$, $p=0,0003$ (таблица 4).

Корреляционная связь экспрессии Ki-67, Vcl-2 и p53 при раке шейки матки

Показатель	n	Spearman	t(N-2)	Уровень р
Ki-67 и Vcl-2 при раке шейки матки без светооптических признаков герпеса	12	-0,609458	-2,43092	0,035395
Ki-67 и p53 при раке шейки матки с наличием светооптических признаков герпеса	11	0,880665	5,576895	0,000344

Полученные данные подтверждают связь возрастания пролиферативной активности клеток при раке шейки матки с увеличением содержания мутантного p53 протеина.

Обращает на себя внимание наличие корреляционной зависимости между увеличением пролиферативной активности и нарастанием экспрессии мутантного p53 ($p=0,003$) у пациенток с раком шейки матки в биоптатах у которых выявлены светооптические признаки ВПГ II. Выявленная корреляционная зависимость свидетельствует, что наличие герпетической инфекции у пациенток с раком шейки матки способствует увеличению пролиферативной активности, и блокированию апоптоза, что способствует прогрессированию опухолевого процесса.

В исследованных нами 22 биоптатах шейки матки у женщин с верифицированным диагнозом цервикальная интраэпителиальная неоплазия III степени, у 14 ($64\pm 0,11\%$) пациенток была выявлена тяжелая дисплазия многослойного плоского эпителия и у 8 ($36\pm 0,11\%$) – cancer in situ.

При микроскопическом исследовании биоптатов женщин с тяжелой ЦИН установлен высокий уровень инфицированности вирусом простого герпеса. Так, герпетические включения имелись в 9 образцах шейки матки с тяжелой дисплазией и в 5 биоптатах с cancer in situ, что составило $64\pm 0,13\%$ и $63\pm 0,18\%$ соответственно. В 5 ($36\pm 0,13\%$) случаях с дисплазией МПЭ и в 3 ($38\pm 0,18\%$) – с раком in situ морфологических признаков герпетического поражения обнаружено не было.

Для выявления корреляционных зависимостей между экспрессией Ki-67, Vcl-2, p53 и ВПГ II при ЦИН III (тяжелой дисплазии и cancer in situ шейки матки) использовался непараметрический критерий Гамма. Было установлено, что при дисплазии тяжелой степени уровень экспрессии Vcl-2 коррелировал с экспрессией антигенов вируса простого герпеса II типа: $r_G=0,63$, $p=0,03$. Обратная корреляция наблюдалась при раке in situ при оценке связи экспрессии Vcl-2 и p53: $r_G=-0,57$, $p=0,04$.

Наличие прямой корреляционной зависимости между экспрессией антигенов вируса простого герпеса II типа и Vcl-2 при дисплазии III степени шейки матки свидетельствует об активации антиапоптозных программ при герпетиче-

ском инфицировании на данном этапе предраковой трансформации. По мере прогрессирования неопластических изменений, влияние фактора, блокирующего апоптоз снижается, в то время как приобретает значение мутация wt p53 гена-онкосупрессора с накоплением мутантного онкопротеина p53.

Заключение

1. При снижении степени дифференцировки рака шейки матки, имеет место увеличение пролиферативной активности ($p=0,037$) и накопления мутантного p53 ($p=0,006$), что позволяет отнести гиперэкспрессию Ki-67 и p53 к неблагоприятным прогностическим маркерам.

2. Более высокая экспрессия Bcl-2 наблюдалась при раке шейки матки без метастазов ($p=0,018$) и при опухолевом процессе, не выходящем за пределы эктоцервикса ($p=0,007$) по сравнению с метастатически агрессивным и распространенным злокачественным процессом. Полученные данные позволяют предположить, что высокий и средний уровень экспрессии ингибитора апоптоза (более 50 на 1000 клеток при увеличении $\times 400$) является относительно благоприятным прогностическим маркером, который предполагает отсутствие метастазов и может свидетельствовать об ограниченном опухолевом процессе.

3. Наличие корреляция между увеличением пролиферативной активности и нарастанием экспрессии мутантного p53 ($p=0,003$) при раке шейки матки с наличием светооптических признаков ВПГ II, а также обратная корреляционная связь между увеличением экспрессии Ki-67 и снижением уровня ингибитора апоптоза Bcl-2 ($p=0,03$) при карциноме без герпетических включений свидетельствует о том, что наличие герпетической инфекции эктоцервикса у пациентов с раком шейки матки утяжеляет течение онкологического заболевания и приводит к нарастанию пролиферативной активности раковых клеток.

4. При тяжелой дисплазии шейки матки, которая сопровождается герпетическим поражением многослойного плоского эпителия, наблюдается активация антиапоптозных программ, что подтверждается прямой корреляционной зависимостью между экспрессией антигенов вируса простого герпеса II типа и Bcl-2 ($p=0,03$).

Литература

1. Злокачественные новообразования в Беларуси / С.М. Поляков [и др.]; под ред. И.В. Малаховой, И.В. Залуцкого. – Минск: РНПЦ М.Т., 2009. – 205 с.
2. Максимов, С.Я. Комбинированное лечение рака шейки матки / С.Я. Максимов, К.Д. Гусейнов // Практическая онкология. – 2002. – Т. 3, № 3. – С 200-210.
3. Natural history of dysplasia of the uterine cervix / P. Holowaty [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. – 1999. – Vol. 3, N 91(3). – P. 252-358.
4. Малярская, М.М. Проблема генитального герпеса в гинекологии и акушерстве / М.М. Малярская // Литобзор. Москва 1997 [Электронный ресурс]. - 1997 - Режим доступа: <http://www.med2000.ru/perevod/article261.htm>. – Дата доступа: 13.07.2007.
5. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / под ред. С.В. Петрова, Н.Г. Райхмана.– Казань, 2000. – 287 с.
6. Sheets E.E., Crum C.P., Yeh J. Association between cervical neoplasia and apoptosis as detected by in situ nuclear labeling. // Gynecol.Oncol. – 1996. – Vol. 63, N 1. – P. 94-100.
7. Роговская, С.И. Апоптоз при патологии шейки матки ассоциированный с вирусом папилломы человека // Гинекология. – 2005. – № 4. – С. 48-53.
8. Histological typing of female genital tract tumors / R.E. Scally [et al.]. – 2nd ed. – Berlin: Heidelberg, 1994.
9. Кондриков, Н.И. Патология матки: иллюстрир. рук-во / Н.И. Кондриков. – Москва: Практическая медицина, 2008. – 334 с.
10. Железнов, Б.И. Ультраструктура эпителия шейки матки при дисплазии / Б.И. Железнов, Л.С. Ежова, Л.А. Беляева // Арх. патологии. 1989. – Вып. 6. – С. 56-62.
11. Недзьведь, М.К. Морфологическая характеристика герпетической инфекции у человека / М.К. Недзьведь, С.А. Гузов // Актуальные проблемы биологии и медицины: сборник тр. сотр. МГМИ. – Минск, 1996. – С. 107-108.
12. Гуревич, Л.Е. Использование в иммуногистохимических исследованиях метода восстановления антигенной специфичности, воздействием на ткани, фиксированные формалином. / Л.Е. Гуревич, В.А. Исаков // Архив патологии. – 1999. – № 2. – С. 48-50.
13. Гриб, А.К. Оценка прогностического значения ангиогенеза в раке предстательной железы по данным иммуногистохимического и морфометрического исследования / А.К. Гриб, В.А. Басинский, А. В. Проворов // Журнал ГрГМУ. – 2007. – № 2. – С. 59-62.