

menova S. K. Comparative immunochemical study of soluble leukocyte antigens in women with chronic salpingo-oophoritis in remission. *Akusherstvo i ginekologiya. – Obstetrics and gynecology*. 1987;3:44-46. (In Russ.)).

11. Стрижова Н. В., Петрунина Ю. А., Машаева Л. Л. Иммунохимическое изучение системы растворимых антигенов лейкоцитов при нормальной и осложнен-

ной поздним токсикозом беременности. *Акушерство и гинекология*. 1985;4:45-47. [Strizhova N. V., Petrulina Yu. A., Mashaeva L. L. Immunochemical study of the system of soluble antigens of leukocytes during normal and complicated by late toxicosis of pregnancy. *Akusherstvo i ginekologiya. – Obstetrics and Gynecology*. 1985;4:45-47. (In Russ.)].

Сведения об авторах:

Посисеева Любовь Валентиновна, заслуженный деятель науки РФ, заслуженный врач РФ, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии; тел.: 89051052929; e-mail: lvposiseeva@mail.ru

Чаша Татьяна Валентиновна, заслуженный врач РФ, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделом неонатологии и клинической неврологии детского возраста и отделения патологии новорожденных и недоношенных детей; тел.: (4932)337153; e-mail: tchascha@yandex.ru

Харламова Наталья Валерьевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела неонатологии и клинической неврологии детского возраста; тел.: (4932)337153; 89109815705; e-mail: nataliakhar13@yandex.ru

Ананьева Мария Александровна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник; тел.: (4932)337153; 89807352480; e-mail: mariya_r37@mail.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 618.146:616-006.5:616-006.6:616-091.8

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15094>

ISSN – 2073-8137

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ДИСПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ

Т. А. Димитриади¹, Д. В. Бурцев^{1, 2}, Е. А. Дженкова², Т. Н. Гудцкова², К. В. Двадненко¹

¹ Областной консультативно-диагностический центр, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

² Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE EXPRESSION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS OF PROLIFERATION AT VARIOUS DEGREES OF CERVICAL DYSPLASIA

Dimitriadi T. A.¹, Burtsev D. V.¹, Dzhenkova E. A.², Gudtskova T. N.², Dvadnenko K. V.¹

¹ Regional Consulting Diagnostic Center, Rostov-on-Don, Russian Federation

² Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

У 110 позитивных по ВПЧ женщин иммуногистохимически изучена экспрессия маркеров пролиферации (Ki-67, CyclinD1, p16^{INK4a}) в здоровой ткани шейки матки, цервикальных интраэпителиальных неоплазиях 1–3 степеней и карциноме *in situ*. Отмечено, что выраженность экспрессии маркеров пролиферации была ассоциирована с тяжестью диспластических изменений в ткани шейки матки. Установленные количественные значения маркеров, характеризующие каждый вариант неоплазии, являются дополнительным инструментом скрининга и уточнения диагноза в этой группе больных.

Ключевые слова: шейка матки, дисплазия, иммуногистохимия, маркер пролиферации, Ki-67, p16^{INK4a}, Cyclin D1

The expression of proliferation markers (Ki-67, CyclinD1, p16^{INK4a}) in healthy tissue of the cervix, cervical intraepithelial neoplasias of grades 1–3 and carcinoma *in situ* in 110 HPV-positive women was studied immunohistochemically. It was noted that the severity of expression of proliferation markers was associated with the severity of dysplastic changes in the cervical tissue. The established quantitative values of markers for each variant of neoplasia are an additional tool for screening and clarifying the diagnosis in this group of patients.

Keywords: cervix, dysplasia, immunohistochemical analysis, proliferation marker, Ki-67, p16^{INK4a}, Cyclin D1

Для цитирования: Димитриади Т. А., Бурцев Д. В., Дженкова Е. А., Гудцкова Т. Н., Дваденко К. В. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ДИСПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2020;15(3):396-399. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15094>

For citation: Dimitriadi T. A., Burtsev D. V., Dzhenkova E. A., Gudtskova T. N., Dvadenko K. V. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE EXPRESSION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS OF PROLIFERATION AT VARIOUS DEGREES OF CERVICAL DYSPLASIA. *Medical News of North Caucasus*. 2020;15(3):396-399. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15094> (In Russ.)

ВПЧ – вирус папилломы человека

РШМ – рак шейки матки

ШМ – шейка матки

CIN – цервикальная интраэпителиальная неоплазия (Cervical Intraepithelial Neoplasia)

CIS – карцинома *in situ* (Cancer In Situ)

C.V. – коэффициент вариации

Max – наибольшее значение в ряду данных

Me – медиана

Min – наименьшее значение в ряду данных

За последние 10 лет частота выявленных случаев рака шейки матки (РШМ) в России возросла на 30,78 %, а количество смертей от этой патологии увеличилось в полтора раза. Ежегодно от рака шейки матки умирают около 6,5 тысяч женщин [1]. Дисплазия, или цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN), является промежуточным состоянием между нормальным эпителием шейки матки (ШМ) и раком *in situ* (CIS) и относится к предраковым состояниям, предшествующим развитию инвазивного РШМ. Выделяют 3 степени неоплазий: CIN 1 трансформируется в рак в 1 % случаев, а в 10 % случаев перерождается в CIN 2. CIN 2 модифицируется в опухоль у 12–45 % больных, в 10 % случаев переходит на другую стадию. CIN 3 часто называют 0-й стадией рака [2].

Программы скрининга рака шейки матки основаны на выявлении и лечении предраковых заболеваний. Раннее лечение дисплазии позволяет предотвратить до 80 % случаев РШМ в развитых странах [3].

Текущее гистопатологическое исследование не всегда позволяет четко разграничить тяжесть поражения ШМ и, соответственно, дать клиницисту необходимую информацию о тактике ведения больных. Использование иммуногистохимических маркеров открывает дополнительные возможности для улучшения дифференциальной диагностики степени дисплазии ШМ.

Пролиферация является основным фактором и наиболее ранним проявлением опухолевой трансформации, поэтому изучение динамики пролиферативного режима в тканях ШМ имеет важное значение. Ki-67 – ядерный белок, который связан с клеточной пролиферацией и экспрессируется во всех активных фазах митотического цикла (S, G1, G2, M), кроме G0 (фаза покоя). Для многих опухолевых процессов характерна гиперэкспрессия Ki-67.

Cyclin D1 относится к регуляторам клеточного деления, экспрессируется только в клетках, входящих в синтетическую фазу, после чего в норме происходят дифференцировка и функциональное вызревание клетки. Данные о роли Cyclin D1 в диспластических изменениях шейки матки носят противоречивый характер [4, 5].

Белок p16^{INK4a} является ингибитором Cyclin-зависимой киназы и играет важную роль в развитии клеточного цикла и дифференцировке клеток. p16^{INK4a} контролирует переход клетки из фазы G1 в фазу S, инициирует задержку клеточного цикла в процессе дифференцировки. В здоровых, дифференцированных клетках p16^{INK4a} экспрессируется в небольшом количестве и обычно не обнаруживается методами

ИГХ. Имеется мнение, что гиперэкспрессия p16^{INK4a} в раковых и предраковых тканях тесно связана с экспрессией онкогенного белка E7 вируса папилломы человека (ВПЧ) [6]. Согласно данным D. Lowy, 70 % случаев РШМ обусловлено 16- и 18-м, а 20 % – 31, 33, 45, 52, 58-м типами ВПЧ [7].

Цель исследования: выявить закономерности экспрессии маркеров пролиферации и определить их дифференциально-диагностическую значимость при различной степени дисплазии ШМ, ассоциированной с ВПЧ.

Материал и методы. Обследовано 65 больных с дисплазией ШМ, лечившихся в государственном автономном учреждении Ростовской области «Областной консультативно-диагностический центр» (ГАУ РО «ОКДЦ») в 2018–2019 гг. Степень диспластических изменений в ШМ была предварительно установлена по данным цитологического исследования, а затем уточнена после проведения гистологического исследования. Разделение на группы с соответствующей степенью дисплазии (CIN 1, CIN 2, CIN 3, CIS) проводили на основании данных гистологического исследования.

Контрольную группу составили 45 пациенток, у которых диагноз CIN гистологически не подтвердился.

Все пациентки являлись ВПЧ-позитивными, у них типировались 14 типов ВПЧ высокого онкогенного риска в клинически значимой концентрации.

Для иммуногистохимического исследования с парафиновых блоков биопсийного материала, фиксированного в 10 % нейтральном формалине, готовили срезы толщиной 3–4 мкм и проводили окрашивание в иммуногистостейнере Bench Mark ULTRA с термической демаскировкой антигенов в Трис-буфере (pH=8,0–8,5). Использовались следующие антитела: Ki-67 (SP6) Spring Bioscience – 1:200; p16^{INK4a} (E6H4) Ventana Medical System – RTU; Cyclin D1 (Bcl-1/SP4) Thermo Scientific – 1:50.

Экспрессию маркеров оценивали в покровном эпителии и железах нормальных (контроль) и дисплазированных участков (больные) ШМ. Вычисляли долю окрашенных клеток в процентах от их общего количества.

Для статистической обработки результатов использовали среднюю арифметическую величину (M), ошибку средней (m), медиану (Me), коэффициент вариации (C.V.). Достоверность разницы между средними определяли по значению t-критерия Стьюдента для несвязанных совокупностей. Достоверной считали разницу при P<0,05.

Результаты и обсуждение. В зависимости от результатов гистологического исследования наблюдалось следующее распределение пациенток: контроль (45 больных), CIN 1 (14), CIN 2 (31), CIN 3 (12), CIS (8 случаев). В контрольной группе средний воз-

раст обследованных составил $39,6 \pm 1,2$ лет; в группах больных он равнялся $36,7 \pm 7,8$ лет, $37,4 \pm 1,5$ лет, $38,8 \pm 4,1$ лет, $41,5 \pm 3,01$ год соответственно ($p > 0,05$).

Данные об экспрессии маркера пролиферации Ki-67 представлены в таблице 1. В контроле экспрессия Ki-67 в покровном эпителии и железах была практически одинаковой и находилась на низком уровне, не превышая 15 % (в среднем $6,3 \pm 0,5$ и $6,5 \pm 1,02$ % соответственно). При CIN 1 наблюдалось достоверное увеличение показателя Ki-67: в 4,2 раза в зонах дисплазии эпителия ($p < 0,0003$) и в 6 раз в эпидермизированных железах ($p < 0,0005$). Экспрессия Ki-67 в покровном эпителии и железах у больных с CIN 2 была выше соответственно в 2,5 и 2 раза, чем в случаях CIN 1. У пациентов с CIN 3 отмечался дальнейший рост экспрессии Ki-67 по сравнению с CIN 2 ($p = 0,022$ и $p = 0,012$ соответственно). Средние величины экспрессии Ki-67 при CIN 3 и CIS достоверно различались только в дисплазированном эпителии ($p = 0,014$).

Таблица 1

Экспрессия Ki-67 при дисплазии шейки матки

Структурный компонент	Стат. показатель	Контроль, n=45	Степень дисплазии			
			CIN 1, n=14	CIN 2, n=31	CIN 3, n=12	CIS, n=8
Покровный эпителий	M±m (%)	$6,3 \pm 0,5$	$26,8 \pm 5,2$	$67,2 \pm 4,5$	$83 \pm 4,9$	$96,9 \pm 1,4$
	Min-max	1-15	5-35	10-80	65-98	90-100
	Me	5	15	75	85	98
	C.V.	53,4	65,6	37,2	19,4	4,4
Железы	M±m (%)	$6,5 \pm 1,02$	$39,2 \pm 8,4$	$81,2 \pm 3,9$	$95,4 \pm 3,7$ *	$97,9 \pm 1,3$ *
	Min-max	0-20	5-45	30-90	90-98	90-100
	Me	5	27	80	95	100
	C.V.	85,7	34,4	22,3	15,2	4,6

Примечание: M±m – средняя арифметическая±ошибка средней. Различия показателей, отмеченных *, не достоверны.

Нами была проанализирована динамика изменений коэффициента вариации, отражающего степень однородности рядов данных. Известно, что при высоких значениях коэффициента вариации наблюдаются относительно больший разброс и меньшая выравненность исследуемых показателей. В случаях коэффициента вариации менее 10 % изменчивость вариационного ряда считается незначительной, при показателях от 10 до 20 % изменчивость относится к средней, а более 20 % – к значительной [8]. Наиболее однородная экспрессия Ki-67 отмечалась при CIN 3 (C.V.<20 %) и CIS (C.V.<5 %).

Данные об экспрессии белка p16^{INK4a} представлены в таблице 2. В неизменной ткани шейки матки группы контроля экспрессия p16^{INK4a} практически отсутствовала в обоих структурных компонентах. При CIN 1 происходило достоверное увеличение этого показателя до $14,3 \pm 2,2$ % в покровном эпителии и $8,3 \pm 3,4$ % в железах ($p < 0,0001$). Однако большие значения коэффициента вариации указывают на выраженный разброс данных (величины параметра колебались от 5 до 25 %).

Скачкообразный рост экспрессии p16^{INK4a} наблюдался у пациенток с CIN 2 (по сравнению с CIN 1): в 4 раза в дисплазированном эпителии и в 10 раз в эпидермизированных железах ($p < 0,0001$). Одновременно отмечалось «выравнивание» значений коэффициента

вариации в этой группе больных. При CIN 3 величины экспрессии p16^{INK4a} были выше на 36 % в диспластическом эпителии ($p = 0,027$) и на 11,2 % в железах ($p < 0,05$), чем в случаях CIN 2. Коэффициент вариации при CIN 3 составил 20 %. Экспрессия p16^{INK4a} у больных с CIN 3 и CIS практически не различалась. Коэффициент вариации при CIS был менее 10 %.

Таблица 2

Экспрессия белка p16^{INK4a} при дисплазии шейки матки

Структурный компонент	Стат. показатель	Контроль, n=45	Степень дисплазии			
			CIN 1, n=14	CIN 2, n=31	CIN 3, n=12	CIS, n=8
Покровный эпителий	M±m (%)	$0,8 \pm 0,03$	$14,3 \pm 2,2$	$55,8 \pm 4,4$	$91,8 \pm 4$ *	$96,9 \pm 2,1$ *
	Min-max	0-5	5-25	15-80	75-100	85-100
	Me	0	12,5	60	95,5	100
	C.V.	115,4	111,3	47,7	22,3	6,79
Железы	M±m (%)	0	$8,3 \pm 3,4$	$84,42 \pm 1,6$	$95,6 \pm 1,7$ •	$99,9 \pm 1,1$ •
	Min-max	0	5-25	80-100	90-100	98-100
	Me	0	5,6	95	98	100
	C.V.	0	120,5	27,93	22,3	2,3

Примечание: M±m – средняя арифметическая±ее ошибка. Различия показателей, отмеченных одинаковыми символами, не достоверны.

Наиболее стремительно изменялась экспрессия Cyclin D1 в тканях шейки матки, что явилось основой для ее изучения не только в области CIN, но и в прилегающих морфологически здоровых тканях. Результаты экспрессии Cyclin D1 представлены в таблице 3. В контрольной группе экспрессия Cyclin D1 наблюдалась в $13,5 \pm 2,1$ % клеток покровного эпителия. При CIN 1 отмечено резкое снижение показателя до $2,3 \pm 0,1$ %, при этом у части больных экспрессия Cyclin D1 полностью отсутствовала (Me=0). На стадии CIN 2 эпителиальная экспрессия Cyclin D1 определялась в единичных случаях ($0,2 \pm 0,01$, Me=0), а при CIN 3 и CIS она совсем отсутствовала. В эпидермизированных железах у пациентов с CIN 1 Cyclin D1 экспрессировали единичные клетки, при более значительных степенях дисплазии его экспрессия не определялась.

Таблица 3

Экспрессия Cyclin D1 при дисплазии шейки матки (M±m)

Структурный компонент	Контроль, n=45	Степень дисплазии			
		CIN 1, n=14	CIN 2, n=31	CIN 3, n=12	CIS, n=8
Эпителий норма	$13,5 \pm 2,1$ * Me=10	$11,2 \pm 1,4$ * Me=10	$9,4 \pm 0,6$ Me=6	$5,8 \pm 0,4$ • Me=4	$4,8 \pm 0,3$ • Me=3
Покровный эпителий с CIN	-	$2,3 \pm 0,1$ Me=0	$0,2 \pm 0,01$ Me=0	0	0
Железы с CIN	-	ед. клетки	0	0	0

Примечание: M±m – средняя арифметическая±ее ошибка. Различия показателей, отмеченных одинаковыми символами, не достоверны.

В гистологически неизменном эпителии, окружающем очаги CIN, по мере нарастания дисплазии шейки матки происходило постепенное уменьшение экспрессии Cyclin D1. Значения экспрессии Cyclin D1 у больных были достоверно ниже по сравнению с контролем начиная со стадии CIN 2 ($13,5 \pm 2,1$ и $9,4 \pm 0,6$ соответственно, $p < 0,03$). Показатели экспрессии в группе с CIN 3 были ниже, чем в случаях CIN 2 ($p < 0,001$), и не различались с таковыми у женщин, имеющих CIS.

Таким образом, при нарастании и трансформации метаплазии даже в морфологически неизменном эпителии регистрируется нарушение процессов клеточной дифференцировки, а в диспластических очагах происходит полное ингибирование процессов вызревания клеток. Определение экспрессии Cyclin D1 может служить ранним маркером предопухолевых процессов, а также перехода от CIN 2 к CIN 3.

По нашему мнению, градация поражений шейки матки на основании стандартного гистологического исследования не отражает полной картины предопу-

холевых изменений, что требует проведения дополнительного иммуногистохимического исследования с изучением экспрессии маркеров пролиферации. Выявление значительных отклонений количественных показателей от усредненного профиля морфологически установленной стадии должно настораживать клинициста в плане модификации тактики ведения больной.

Заключение. Таким образом, выраженность экспрессии маркеров пролиферации (Ki-67, Cyclin D1, p16^{INK4a}) связана с тяжестью диспластических изменений в тканях шейки матки. Дополнительное определение иммуногистохимических маркеров является перспективным инструментом в разграничении степени дисплазии, что позволит выделять группу больных с высоким риском развития тяжелых повреждений и проводить своевременное лечение с целью предотвращения формирования CIS и инвазивного рака.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. М.: МНИОИ им. П. А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. [Karpin A. D., Starinskiy V. V., Petrova G. V. Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2018 godu. M.: MNIOI im. P. A. Gercena filial FGBU «NMIC radiologii» Minzdrava Rossii, 2019. (In Russ.)].
2. Данилова Н. В., Андреева Ю. Ю., Завалишина Л. Э., Кекеева Т. В., Мальков П. Г., Франк Г. А. Опухоли шейки матки. Морфологическая диагностика и генетика: руководство для врачей. М.: Практическая медицина, 2012. [Danilova N. V., Andreeva Yu. Yu., Zavalishina L. E., Kekeeva T. V., Mal'kov P. G., Frank G. A. Opuholi shejki matki. Morfologicheskaya diagnostika i genetika: rukovodstvo dlya vrachej. M.: Prakticheskaja medicina, 2012. (In Russ.)].
3. Wyber R., Vaillancourt S., Perry W., Mannava P., Folaranic T., Celid L. A. Big data in global health: improving health in low- and middle-income countries. *Bull. World Health Organ.* 2015;93:203-208. <https://doi.org/10.2471/BLT.14.139022>
4. Colin J. R. Stewart, Maxine L. Crook. Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 3-like squamous cell carcinoma of the

- cervix: a review of 14 cases with comparison of E-cadherin and cyclin D1 expression in the CIN 3-like and infiltrative tumour elements. *Hystopathology.* 2017;70:367-374. <https://doi.org/10.1111/his.13094>
5. Casimiro M. C., Crosariol M., Loro E., Li Z., Pestell R. G. Cyclins and cell cycle control in cancer and disease. *Genes Cancer.* 2012;3(11-12):649-657. <https://doi.org/10.1177/1947601913479022>
6. Branca M., Ciotti M., Giorgi C., Santini D., Di Bonito L. [et al.]. HPV-Pathogen ISS Study Group. Predicting high-risk human papillomavirus infection, progression of cervical intraepithelial neoplasia, and prognosis of cervical cancer with a panel of 13 biomarkers tested in multivariate modeling. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2008;27(2):265-273. <https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e318159cbc0>
7. Lowy D. R. HPV vaccination to prevent cervical cancer and other HPV-associated disease: from basic science to effective interventions. *J. Clin. Invest.* 2016;126(1):511. <https://doi.org/10.1172/JCI85446>
8. Трухачёва Н. В. Медицинская статистика: учеб. пособие. Ростов-на-Дону: Феникс, 2017. [Truhachyova N. V. Medicinskaya statistika: ucheb. posobie. Rostov-na-Donu: Feniks, 2017. (In Russ.)].

Сведения об авторах:

Димитриади Татьяна Александровна, кандидат медицинских наук, руководитель областного центра патологии шейки матки; тел.: 89185545886; e-mail: tdimitriadi@yandex.ru

Бурцев Дмитрий Владимирович, доктор медицинских наук, главный врач, доцент кафедры онкологии; тел.: 88632404296; e-mail: dr-burtsev@mail.ru

Дженкова Елена Алексеевна, доктор биологических наук, доцент, ученый секретарь; тел.: 88632955362; e-mail: rnioi@list.ru

Гудцова Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, врач-лаборант патолого-анатомического отделения; тел.: 89515310529; e-mail: tochka63@mail.ru

Дваденко Константин Владимирович, кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом лаборатории клинической патоморфологии и молекулярно-биологических исследований; тел.: 89054252622; e-mail: dvadnenkov@gmail.com