

Особенности иммуногистохимической экспрессии Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16 в цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки

В. А. Туманский, З. А. Пирогова

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

Ключевые слова: шейка матки, новообразования шейки матки, вирус папилломы человека, антиген Ki-7.

Патология. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 202–208

DOI: 10.14739/2310-1237.2017.2.109298

E-mail: tumanskiy@zsmu.zp.ua, zoya050390@gmail.com

Рак шейки матки (РШМ) является распространённой опухолью у женщин, её развитию предшествует ряд патологических процессов, среди которых ключевую роль играет цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN).

Цель работы – изучение особенностей иммуногистохимической (ИГХ) экспрессии Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16 в эпителии шейки матки (ШМ) с диспластическими изменениями различной степени тяжести (CIN I–III) и в опухолевых клетках плоскоклеточного РШМ.

Материалы и методы. Проведено патогистологическое и ИГХ исследование биопсий ШМ матки 53 больных 18–45 лет, из которых 34 женщины страдали CIN I–III, у 9 диагностирован плоскоклеточный РШМ, в 10 случаях изучена ШМ обычной структуры.

Результаты. Установлено, что при лёгкой CIN I дисплазии эпителий ШМ характеризуется низким уровнем пролиферации по экспрессии Ki-67 (Me = 17,87 % (13,76; 22,44)) и крайне низким уровнем экспрессии p16^{INK4a} (Me = 0,00 (0,00; 29,64)); доля HPV16-положительных пациенток с CIN I составляет 27,27 %. При средней CIN II дисплазии эпителиоциты ШМ характеризуется средним уровнем пролиферации (Me Ki-67 = 44,96 % (34,91; 55,41)) и умеренным уровнем экспрессии p16^{INK4a} (Me = 75,71 (51,24; 82,41)); доля HPV16-положительных пациенток с CIN II составляет 71,43 %. При тяжёлой CIN III дисплазии эпителий ШМ характеризуется высоким уровнем пролиферативной активности (Me Ki-67 = 74,62 % (68,50; 84,67)) и высоким уровнем экспрессии p16^{INK4a} (Me = 117,47 (95,38; 123,93)); доля HPV16-положительных пациенток с CIN III составляет 77,78 %. У всех больных РШМ в опухолевых клетках выявлена ядерно-цитоплазматическая экспрессия HPV16, а также высокий уровень экспрессии Ki-67 и p16^{INK4a}. Имеются прямые корреляционные связи между уровнями экспрессии Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16, а также показателями степени тяжести CIN.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, что с нарастанием тяжести диспластических изменений многослойного плоского эпителия ШМ возрастает и экспрессия эпителиоцитами Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16. Отсутствие статистически значимых различий между показателями экспрессии Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16 в эпителии ШМ с тяжёлой CIN III дисплазией и в опухолевых клетках РШМ свидетельствует о том, что эти маркеры не играют решающей роли в дифференциальной диагностике тяжёлой дисплазии и плоскоклеточного РШМ.

Ключові слова: шийка матки, новоутворення шийки матки, вірус папіломи людини, антиген Ki-67.

Патологія. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 202–208

Особливості імуногістохімічної експресії Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16 у цервікальній інтраепітеліальній неоплазії та карциномі шийки матки

В. О. Туманський, З. О. Пирогова

Рак шийки матки (РШМ) є поширеною пухлиною в жінок, її розвитку передують низка патологічних процесів, серед котрих ключову роль відіграє цервікальна інтраепітеліальна неоплазія (CIN).

Мета роботи – вивчення особливостей імуногістохімічної (ІГХ) експресії Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16 в епітелії шийки матки (ШМ) із диспластичними змінами різного ступеня тяжкості (CIN I–III) та в пухлинних клітинах плоскоклітинного РШМ.

Матеріали та методи. Здійснили патогістологічне та ІГХ дослідження біопсій ШМ матки 53 хворих 18–45 років. 34 жінки страждали CIN I–III, у 9 діагностований плоскоклітинний РШМ, у 10 випадках вивчена шийка матки звичайної структури.

Результати. Встановили, що при легкій CIN I дисплазії епітелій ШМ характеризується низьким рівнем проліферації за експресією Ki-67 (Me = 17,87 % (13,76; 22,44)) і вкрай низьким рівнем експресії p16^{INK4a} (Me = 0,00 (0,00; 29,64)); частка HPV16-положительних пацієнток із CIN I становить 27,27 %. При середній CIN II дисплазії епітеліоцити ШМ характеризуються середнім рівнем проліферації (Me Ki-67 = 44,96 % (34,91; 55,41)) і помірним рівнем експресії p16^{INK4a} (Me = 75,71 (51,24; 82,41)); частка HPV16-положительних пацієнток із CIN II становить 71,43 %. При важкій CIN III дисплазії епітелій ШМ характеризується високим рівнем проліферативної активності (Me Ki-67 = 74,62 % (68,50; 84,67)) і високим рівнем експресії p16^{INK4a} (Me = 117,47 (95,38; 123,93)); частка HPV16-положительних пацієнток із CIN III становить 77,78 %. У всіх хворих на РШМ у пухлинних клітинах виявлена ядерно-цитоплазматична експресія HPV16, а також високий рівень експресії Ki-67 і p16^{INK4a}. Наявні прямі кореляційні зв'язки між рівнями експресії Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16, а також показниками ступеня тяжкості CIN.

Висновки. Дані, що отримали, свідчать: із наростанням тяжкості диспластичних змін багатослоєвого плоского епітелію ШМ зростає й експресія епітеліоцитами Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16. Відсутність статистично значущих відмінностей між показниками експресії Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16 в епітелії ШМ із важкої CIN III дисплазією та в пухлинних клітинах РШМ свідчить про те, що ці маркери не відіграють вирішальної ролі в диференціальній діагностиці важкої дисплазії та плоскоклітинного РШМ.

Immunohistochemical characteristic of expression levels of Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer

V. A. Tumanskiy, Z. A. Pyrogova

Squamous cervical cancer (SCC) is a common tumor in women, which is preceded by the series of pathological processes, among which the key role is played by cervical intraepithelial neoplasia (CIN).

Aim. To study the characteristics of immunohistochemical (IHC) expression of Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16 in squamous cervical epithelium (SCE) with dysplastic changes of varying degree (CIN I–III) and also in the tumor cells of SCC.

Materials and methods. Pathohistological and IHC studies of uterine cervix biopsies from 53 patients (the age ranged from 18 to 45 years) were performed.

Results. It was found that SCE with CIN I is characterized by the low Ki-67 expression level (Me = 17.87 % (13.76, 22.44)) and the extremely low p16^{INK4a} expression level (Me = 0.00 CUOD (0.00; 29.64)). The proportion of HPV16-positive patients with CIN I is 27.27 %. CIN II is characterized by the average proliferation level in SCE (Me = 44.96 % (34.91, 55.41)) and the moderate p16^{INK4a} expression level (Me = 75.71 CUOD (51.24, 82, 41)). The proportion of HPV16-positive patients with CIN II is 71.43 %. CIN III is characterized by the high proliferation level (Me = 74.62 % (68.50, 84.67)) and by the high p16^{INK4a} expression level of in SCE (Me = 117.47 CUOD (95.38, 123, 93)); the proportion of HPV16-positive patients with CIN III is 77.78%. In all the patients with SCC, nuclear and cytoplasmic expression of HPV16 was detected in the tumor cells. High expression levels of Ki-67 and p16^{INK4a} were detected in the tumor cells. There are direct correlations between the expression levels of Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16 and CIN degree.

Conclusions. These data indicate that the expression levels of Ki-67, p16^{INK4a} and HPV16 increase with the increasing of CIN grade. The absence of statistically significant differences between the expression levels of Ki-67, p16^{INK4a} and HPV16 in CIN III and the same levels in the tumor cells of SCC indicates that these markers cannot be used for differential diagnosis between CIN III and SCC.

Рак шейки матки (РШМ) является одним из самых распространённых онкологических заболеваний в развитых странах мира [8]. По данным Национального канцер-реестра Украины, заболеваемость РШМ занимает 2 место в структуре онкозаболеваемости женщин в возрасте 30–54 лет, а также 2 место в структуре смертности от злокачественных новообразований женщин в возрасте 18–54 лет [1].

В настоящее время доказано, что основным этиологическим фактором РШМ является вирус папилломы человека (ВПЧ) [8, 10]. При этом способность индуцировать злокачественный рост имеют только онкогенные штаммы ВПЧ: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 и 70 типа [7]. Кроме того, известно, что ВПЧ 16 типа и филогенетически родственные 31, 33, 35, 52, 58 типы вируса индуцируют развитие плоскоклеточного РШМ, в то время как ВПЧ 18 типа и ВПЧ 39, 45, 59 и 68 типов индуцируют развитие аденокарциномы шейки матки (ШМ) [13].

С развитием РШМ тесно связана проблема предопухолевых патологических процессов ШМ. Ключевую роль среди них играет цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN), которая градуируется по степени тяжести на лёгкую (CIN I), средней степени (CIN II) и тяжёлую CIN III [5]. Своевременное выявление инфицирования онкогенными штаммами ВПЧ и наличия CIN разной степени тяжести важно для снижения заболеваемости и смертности от РШМ. Несмотря на известные микроскопические критерии, которые дают возможность определять степень тяжести CIN, в настоящее время углублённо изучаются иммуногистохимические (ИГХ) маркеры, позволяющие уточнить прогностическое значение CIN разной степени тяжести для развития РШМ. С этой целью определяются уровни экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67, применяющегося для отличия CIN от доброкачественных реактивных

изменений ШМ [11], а также белка p16, препятствующего образованию комплекса Cyclin D/Cdk4,6 и G₁-S переходу в клеточном цикле [3], повышенная экспрессия которого в многослойном плоском эпителии ШМ ассоциирована с инфицированием онкогенными штаммами ВПЧ [4, 14]. Кроме того, существуют моноклональные антитела к определённым типам ВПЧ, в том числе и к ВПЧ 16 типа (HPV16), который играет важную роль в трансформации CIN в плоскоклеточный РШМ. Однако данные об уровне экспрессии перечисленных маркеров в CIN различной степени тяжести и их взаимосвязи с вероятностью развития РШМ противоречивы.

Цель работы

Изучить особенности иммуногистохимической экспрессии Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16 в цервикальной интраэпителиальной неоплазии различной степени тяжести и в плоскоклеточном раке шейки матки у женщин, инфицированных вирусом папилломы человека.

Материалы и методы исследования

Проведено комплексное патоморфологическое исследование биопсийного материала ШМ 43 пациенток 18–45 лет, у которых при ПЦР исследовании было обнаружено инфицирование ВПЧ. По степени тяжести дисплазии эпителия ШМ (CIN) выделено 4 группы: 1 группа – 11 биоптатов ШМ со слабой CIN I дисплазией, 2 группа – 14 биоптатов ШМ с умеренной CIN II дисплазией, 3 группа – 9 биоптатов ШМ с тяжёлой CIN III дисплазией, 4 группа – 9 биоптатов плоскоклеточного РШМ. В контрольной группе исследован материал 10 биоптатов ШМ обычной гистоструктуры у женщин, не инфицированных ВПЧ.

Key words:
cervix uteri,
uterine cervical
neoplasms,
human papilloma
virus,
Ki-67 antigen.

Pathologia
2017; 14 (2), 202–208

В парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, оценивали структуру экзоцервикса, а также наличие и степень тяжести CIN в соответствии с гистологической классификацией опухолей женской половой системы [5]. ИГХ-исследование проводили по стандартной методике [9] с использованием моноклональных антител Mo a-Hu Ki-67 Antigen, *Clone MIB-1*, (DAKO, Дания), Mo Anti-p16(INK4) Antigen, *Clone G175-405* (BioGenex, США), Mo Antibody to Human Papilloma Virus type 16, *Clone Camvir-1* (Diagnostic BioSystems, США), а также системы визуализации DAKO EnVision+ System с диаминобензидином (DAKO, Дания).

Уровень экспрессии Ki-67 эпителием и опухолевыми клетками ШМ оценивали в баллах по B. Risberg et al. (2002) путём подсчёта процента клеток с иммунопозитивными (ИМПЗ) ядрами в 5 полях зрения микроскопа Axioplan 2 («Carl Zeiss», ФРГ) при увеличении $\times 200$. При этом 0–5 % клеток с ИМПЗ ядрами составляли 0 баллов, 6–25 % ИМПЗ клеток – 1 балл, 26–50 % ИМПЗ клеток – 2 балла, 51–75 % ИМПЗ клеток – 3 балла и 76–100 % ИМПЗ клеток – 4 балла. Ноль и 1 балл соответствовали низкому уровню экспрессии Ki-67, 2 и 3 балла – среднему уровню, 4 балла – высокому уровню экспрессии Ki-67.

Уровень экспрессии p16^{INK4a} эпителием и опухолевыми клетками ШМ измеряли методом фотоцифровой морфометрии [2]. ИГХ-микрорефераты фотографировали цифровой камерой «Olympus 3040» (Япония) в микроскопе Axioplan 2 («Carl Zeiss», ФРГ) при увеличении $\times 200$ в 5 полях зрения, интенсивность экспрессии оценивали в плагине Colour Deconvolution программы обработки цифровых изображений ImageJ в баллах (от 0 – белый до 255 – черный) и градуировали на 4 уровня: негативная реакция – 0–20 баллов; низкий уровень экспрессии – 21–50 баллов; умеренный – 51–100 баллов; высокий

уровень экспрессии – более 100 баллов.

При оценке результатов ИГХ-реакции на HPV16 учитывали наличие либо отсутствие позитивной реакции в эпителии и опухолевых клетках ШМ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере в программе «Statistica® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., лицензия № AXXR712D833214FAN5). Вычисляли медиану уровня экспрессии (Me), нижний и верхний квартили (Q₁; Q₃). Для анализа различий экспрессии ИГХ маркеров в биоптатах ШМ с диспластическими изменениями и в биоптатах ШМ нормальной гистологической структуры рассчитывали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Анализ различий экспрессии исследованных ИГХ маркеров в CIN различной степени тяжести проводили при помощи непараметрического однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса. Наличие связей между уровнями экспрессии исследуемых ИГХ маркеров и градацией CIN определяли с помощью расчёта коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В результате ИГХ-исследования установлено, что у женщин, не инфицированных ВПЧ, многослойный плоский эпителий ШМ имеет обычную структуру и характеризуется низким уровнем пролиферации: медиана экспрессии Ki-67 составляет 5,46 % (4,96; 6,03). Ядерная экспрессия Ki-67 имеет место в одиночных эпителиоцитах базального и парабазального слоев экзоцервикса. Экспрессия p16^{INK4a} и HPV16 в многослойном плоском эпителии ШМ обычной гистоструктуры не выявляется. Это соответствует данным современной научной литературы, по которым в многослойном плоском эпителии ШМ уровень экспрессии Ki-67 колеблется в пределах 3–10 %, а экспрессия маркеров p16^{INK4a} и HPV16 не определяется [6, 15, 16].

В биоптатах ШМ пациенток 1 группы с патологическим диагнозом CIN I многослойный плоский эпителий ШМ характеризуется низким уровнем пролиферации: медиана уровня экспрессии Ki-67 составляет 17,87 % (13,76; 22,44). Ядерная экспрессия Ki-67 имеет место в эпителиоцитах парабазального слоя и в единичных клетках промежуточного слоя. У 27 % пациенток 1 группы с CIN I в промежуточном и поверхностном слоях эпителиального пласта ШМ выявляется ядерно-цитоплазматическая экспрессия p16^{INK4a} крайне низкого уровня: медиана экспрессии p16^{INK4a} составляет 0,00 (0,00; 29,64). У 27,27 % пациенток с CIN I выявлена экспрессия HPV16 в ядрах одиночных койлоцитов (эпителиоцитов, подвергшихся койлоцитарной трансформации), локализованных преимущественно в парабазальном и промежуточном слоях экзоцервикса.

При ИГХ исследования биоптатов ШМ пациенток 2 группы с CIN II установлено, что Ki-67-иммунопозитивные клетки занимают от 1/3 до 2/3 толщи эпителиального пласта ШМ (рис. 1).

Многослойный плоский эпителий ШМ с диспластическими изменениями средней степени тяжести характеризуется средним уровнем пролиферативной

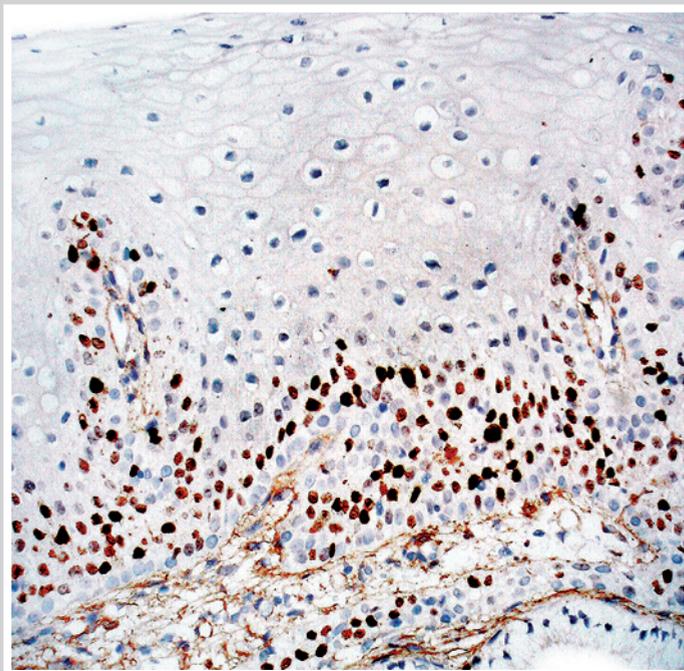


Рис. 1. Умеренный уровень экспрессии Ki-67 эпителием шейки матки при CIN II. $\times 200$.

активности: медиана уровня экспрессии Ki-67 составляет 44,96 % (34,91; 55,41). Разница между низким уровнем экспрессии Ki-67 в эпителиоцитах ШМ с лёгкой CIN I дисплазией и средним уровнем экспрессии Ki-67 в эпителии ШМ со средней CIN II дисплазией статистически значима ($p < 0,05$) (рис. 2).

У 12 (86 %) пациенток 2 группы с CIN II в эпителиоцитах парабазального и промежуточного слоёв экзоцервикса имеет место ядерно-цитоплазматическая экспрессия p16^{INK4a}, у 2 (14 %) пациенток – негативная ИГХ-реакция на белок p16^{INK4a} в эпителии шейки матки. Медиана уровня экспрессии p16^{INK4a} в эпителии ШМ с CIN II составляет 75,71 (51,24; 82,41), что соответствует умеренному уровню экспрессии данного маркера. Разница между уровнями экспрессии p16^{INK4a} в эпителии шейки матки с лёгкой CIN I и средней CIN II дисплазией статистически значима ($p < 0,05$) (рис. 3).

У 71,43 % пациенток 2 группы со средней CIN II дисплазией эпителия ШМ в койлоцитах, локализованных в парабазальном и промежуточном слоях экзоцервикса, определяется ядерная HPV16 (рис. 4). Разница между уровнями экспрессии данного маркера в эпителии ШМ с лёгкой CIN I и средней CIN II дисплазией статистически значима ($p < 0,05$).

При ИГХ исследовании биоптатов ШМ пациенток 3 группы с тяжёлой CIN III дисплазией эпителия Ki-67-иммунопозитивные эпителиоциты выявляются во всех слоях экзоцервикса. Многослойный плоский эпителий ШМ с тяжёлыми диспластическими изменениями CIN III характеризуется средним уровнем пролиферации: медиана уровня экспрессии Ki-67 составляет 74,62 % (68,50; 84,67). Разница между уровнями экспрессии Ki-67 в эпителии ШМ с лёгкой CIN I, средней CIN II и тяжёлой CIN III дисплазией статистически значима ($p < 0,05$) (рис. 1). В эпителиоцитах всех слоёв экзоцервикса ШМ с CIN III определяется высокий уровень ядерно-цитоплазматической экспрессии p16^{INK4a}, медиана которой составляет 117,47 (95,38; 123,93). Разница между уровнями экспрессии белка p16^{INK4a} в эпителии ШМ с лёгкой CIN I, средней CIN II и тяжёлой CIN III дисплазией статистически значима ($p < 0,05$) (рис. 3).

У 77,78 % пациенток 3 группы с CIN III в койлоцитах, локализованных во всех слоях экзоцервикса, определяется ядерная экспрессия HPV16. Разница между уровнями экспрессии данного маркера в эпителии ШМ с лёгкой CIN I, средней CIN II и тяжёлой CIN III дисплазией статистически значима ($p < 0,05$).

При ИГХ-исследовании биоптатов ШМ пациенток 4 группы с патогистологическим диагнозом РШМ установлено, что Ki-67-ИМП3 опухолевые клетки хаотично располагаются на протяжении всей толщи опухолевого пласта (рис. 5). Опухолевые клетки характеризуются средним уровнем пролиферации: медиана уровня экспрессии Ki-67 составляет 75,10 % (44,92; 80,36). Разница между уровнями экспрессии Ki-67 в эпителии ШМ с лёгкой CIN I и средней CIN II дисплазией, а также в опухолевых клетках РШМ статистически значима ($p < 0,05$), в то же время медианы экспрессии Ki-67 в эпителии ШМ с тяжёлой CIN III дисплазией и в опухолевых клетках РШМ статистически достоверно не отличаются ($p > 0,05$) (рис. 2).

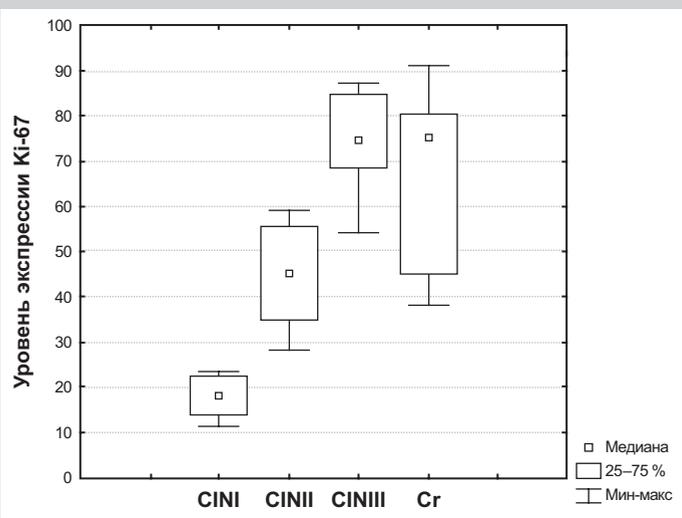


Рис. 2. Уровень экспрессии Ki-67 в многослойном плоском эпителии шейки матки с лёгкой CIN I, средней CIN II, тяжёлой CIN III дисплазией и в плоскоклеточном раке шейки матки (Cr colli uteri).

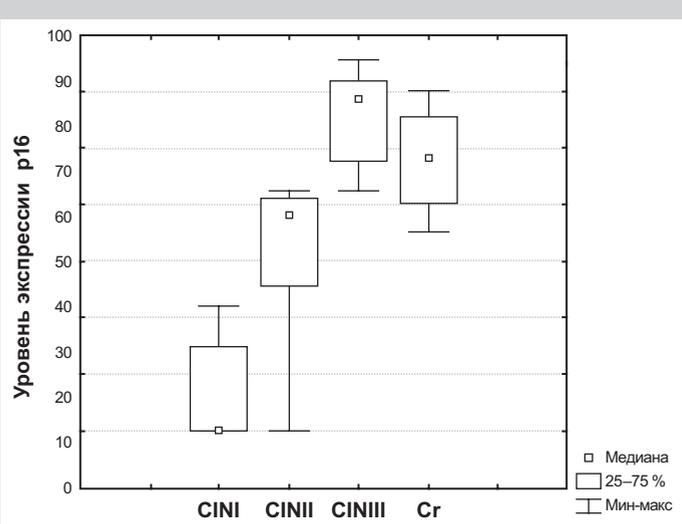


Рис. 3. Уровень экспрессии p16^{INK4a} в многослойном плоском эпителии шейки матки с лёгкой CIN I, средней CIN II, тяжёлой CIN III дисплазией и в плоскоклеточном раке шейки матки (Cr colli uteri).

В опухолевых клетках плоскоклеточного РШМ у всех пациенток 4 группы определяется ядерно-цитоплазматическая экспрессия p16^{INK4a} (рис. 6), медиана которой составляет 96,31 (80,32; 111,25), что соответствует умеренному уровню экспрессии данного маркера.

Разница между уровнями экспрессии p16^{INK4a} в эпителии ШМ с лёгкой CIN I и средней CIN II дисплазией, а также в опухолевых клетках РШМ статистически достоверна ($p < 0,05$), в то время как между медианами экспрессии p16^{INK4a} в эпителии ШМ с тяжёлой CIN III дисплазией и в опухолевых клетках РШМ статистически значимых различий не выявлено ($p > 0,05$) (рис. 3).

Кроме того, у всех больных РШМ в опухолевых клетках выявляется ядерная экспрессия HPV16. Разница между показателями экспрессии данного маркера в эпителии ШМ с лёгкой CIN I дисплазией

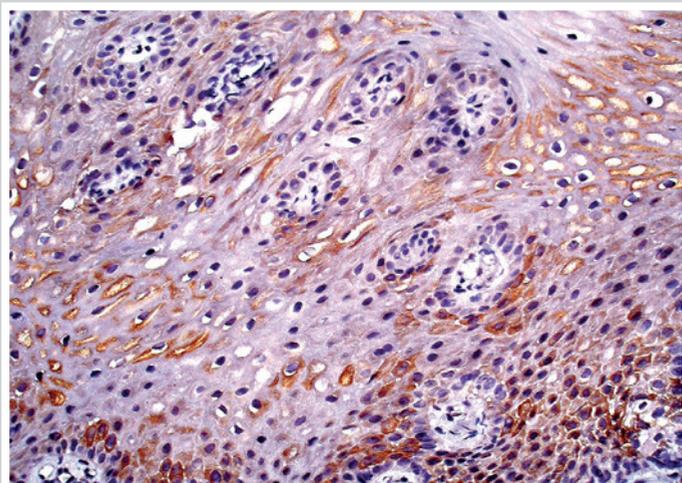


Рис. 4. Экспрессия HPV16 в койлоцитах и в эпителии экзоцервикса при CIN II. x200.

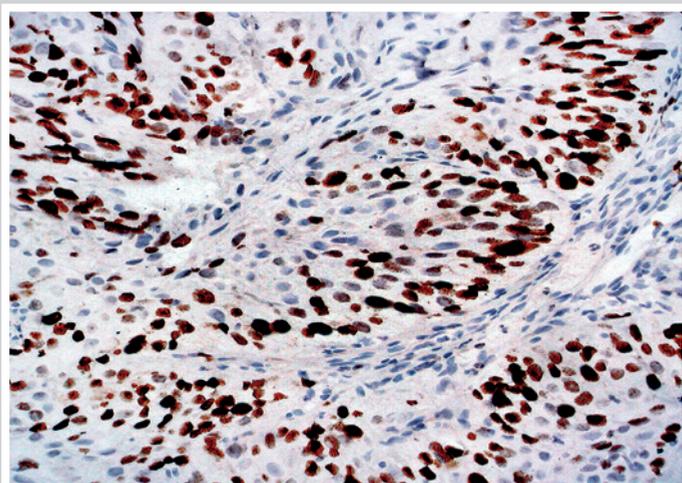


Рис. 5. Ki-67-иммунопозитивные опухолевые клетки в плоскоклеточном раке шейки матки. x250.

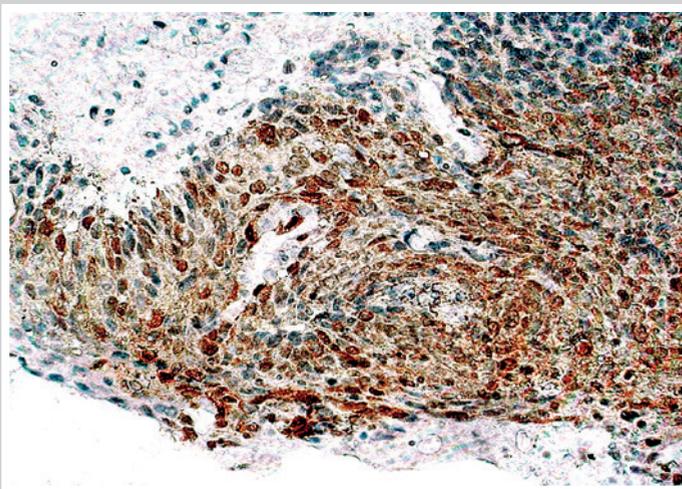


Рис. 6. Ядерно-цитоплазматическая экспрессия p16^{INK4a} в опухолевых клетках плоскоклеточного рака шейки матки. x200.

и в опухолевых клетках РШМ статистически значима ($p < 0,05$), в то время как медианы ядерной экспрессии HPV16 в эпителии ШМ со средней CIN II дисплазией и в опухолевых клетках РШМ достоверно не отличаются, также не выявлено статистически значимых различий в экспрессии этого маркера в эпителии ШМ с тяжелой CIN III дисплазией и в опухолевых клетках РШМ ($p > 0,05$).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии статистически значимых различий между возрастанием уровня клеточной пролиферации, определяемого по экспрессии Ki-67, и возрастанием степени тяжести дисплазии эпителия ШМ в последовательности CIN I – CIN II – CIN III. K. Gupta et al. [6] также обнаружили статистически значимые различия между уровнями экспрессии Ki-67 в эпителии ШМ при дисплазии разной степени: CIN I, CIN II и CIN III. В то же время M. Panjkoviæ, T. Ivkoviæ-Kapicl [15] нашли статистически значимые различия между уровнями экспрессии Ki-67 в эпителии ШМ при легкой CIN I и средней CIN II дисплазии, но не обнаружили статистически значимой разницы между уровнями экспрессии этого маркера в эпителии ШМ при средней CIN II и тяжелой CIN III дисплазии. Полученные нами данные о возрастании уровня экспрессии маркера p16^{INK4a} и частоты выявления положительной реакции с HPV16 при возрастании дисплазии эпителия в последовательности CIN I – CIN II – CIN III согласуются с результатами исследований A. Godoy, K. Bazzo, F. Pasqualotto [12] и M. G. Donà et al. [16]. Л. М. Захарцева и Е. А. Пекур (2013) возрастание экспрессии p16^{INK4a} в неоплазиях ШМ рассматривают как косвенный признак интеграции ВПЧ высокого риска в клеточный геном с последующей опухолевой трансформацией эпителиальных клеток [5].

При анализе полученных результатов был выявлен ряд корреляций между уровнями экспрессии маркеров Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16, а также показателем степени тяжести дисплазии эпителия ШМ (табл. 1).

Установлено, что в эпителии ШМ с легкой CIN I, средней CIN II и тяжелой CIN III дисплазией имеется прямая сильная корреляционная связь между уровнями экспрессии эпителиоцитами Ki-67 и белка p16^{INK4a} (коэффициент корреляции Спирмена = 0,95), а также между уровнем экспрессии эпителиоцитами Ki-67 и показателем степени тяжести дисплазии эпителия шейки матки CIN (коэффициент корреляции Спирмена = 0,92). M. Panjkoviæ, T. Ivkoviæ-Kapicl (2006) также нашли наличие корреляции между уровнем экспрессии эпителием ШМ Ki-67 и показателем степени тяжести дисплазии CIN [15]. Нами получены данные о тесной взаимосвязи между инфицированием клеток экзоцервикса HPV16 и возрастанием пролиферации эпителиоцитов ШМ, о чём свидетельствует прямая корреляционная связь средней силы между уровнями экспрессии Ki-67 и маркера HPV16 (коэффициент корреляции Спирмена = 0,63), что соответствует данным других исследователей [12]. Кроме того, была выявлена прямая корреляционная связь средней силы между уровнями экспрессии маркеров p16^{INK4a} и HPV16 (коэффициент корреляции Спирмена = 0,66), а также между уровнями экспрессии HPV16 и показате-

лем степени тяжести CIN (коэффициент корреляции Спирмена = 0,40). Между уровнем экспрессии p16^{INK4a} и показателем степени тяжести CIN была выявлена прямая сильная корреляционная связь (коэффициент корреляции Спирмена = 0,88).

Белок p16^{INK4a} представляет собой ингибитор циклин-зависимых киназ и играет важную роль в регуляции клеточного цикла, повышенная экспрессия p16^{INK4a} может запускать остановку клеточного деления [5]. Многие опухоли характеризуются инактивацией гена p16^{INK4a}, что приводит к нарушению регуляции клеточного цикла и к неконтролируемой пролиферации клеток. В опухолях, связанных с трансформирующим действием ВПЧ, отмечается возрастание экспрессии p16^{INK4a}, которое оказывается неэффективным для регуляции клеточного цикла [5]. Среди них A. Godoy et al. (2014) сообщали о наличии взаимосвязи между инфицированием HPV16 эпителия шейки матки, возрастанием уровня экспрессии им p16^{INK4a} и возрастанием степени тяжести дисплазии CIN [17]. Кроме того, ИГХ маркеры HPV16 и p16^{INK4a} были предложены рядом авторов в качестве биомаркеров, приемлемых для оценки степени тяжести диспластических изменений в ШМ [12, 18]. В то же время P. Zhong et al. (2015) не обнаружили корреляций между уровнями экспрессии HPV16 и p16^{INK4a} в эпителии шейки матки с CIN различной степени тяжести [16].

A. Godoy et al. (2008) получили данные о том, что экспрессия маркеров p16 и Ki-67 прогрессивно нарастает с возрастанием степени дисплазии и достигает максимума при тяжелой CIN III дисплазии и при РШМ [12]. Однако полученные нами данные об отсутствии статистически значимых различий между показателями экспрессии Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16 в эпителии шейки матки с тяжелой CIN III дисплазией и в опухолевых клетках рака шейки матки свидетельствуют о том, что эти маркеры не играют решающей роли в дифференциальной диагностике тяжелой дисплазии и плоскоклеточного рака шейки матки.

Выводы

1. При легкой CIN I дисплазии эпителий шейки матки характеризуется низким уровнем пролиферации по экспрессии Ki-67 (Me = 17,87 % (13,76; 22,44)) и крайне низким уровнем экспрессии p16^{INK4a} (Me = 0,00 (0,00; 29,64)); доля HPV16-положительных пациенток с CIN I составляет 27,27 %.

2. При средней CIN II дисплазии эпителиоциты шейки матки характеризуется средним уровнем пролиферации по экспрессии Ki-67 (Me = 44,96 % (34,91; 55,41)) и умеренным уровнем экспрессии p16^{INK4a} (Me = 75,71 (51,24; 82,41)); доля HPV16-положительных пациенток с CIN II составляет 71,43 %.

3. При тяжелой CIN III дисплазии эпителий шейки матки характеризуется высоким уровнем пролиферативной активности по экспрессии Ki-67 (Me = 74,62 % (68,50; 84,67)) и высоким уровнем экспрессии p16^{INK4a} (Me = 117,47 (95,38; 123,93)); доля HPV16-положительных пациенток с CIN III составляет 77,78 %.

4. У всех больных раком шейки матки в опухолевых клетках выявлена ядерная экспрессия HPV16. Опухо-

Таблица 1. Характеристика корреляционных связей между уровнями экспрессии Ki-67, p16^{INK4a}, HPV16 и показателем степени тяжести дисплазии эпителия шейки матки CIN

	Ki-67	p16 ^{INK4a}	HPV16	CIN
Ki-67	1,00	0,95*	0,63*	0,92*
p16 ^{INK4a}	0,95*	1,00	0,66*	0,88*
HPV16	0,63*	0,66*	1,00	0,40*
CIN	0,92*	0,88*	0,40*	1,00

*: наличие корреляционной связи.

левые клетки характеризуются высоким уровнем экспрессии Ki-67 (Me = 75,10 % (44,92; 80,36)) и высоким уровнем экспрессии p16^{INK4a} (Me = 96,31 (80,32; 111,25)).

Финансирование. Работа выполнена в рамках госбюджетной НИР «Дослідження інвазивно-метастатичних властивостей пухлин та їх раннє прогнозування в біоптатах хворих» (0114U000967) 2014–2016, которая финансировалась МЗ Украины.

Funding. The research was carried out within the state budget scientific-research work “Research of invasive-metastatic properties of tumors and their early prognosis in biopsies of patients” (0114U000967), 2014–2016, funded by the Ministry of Health of Ukraine.

Список литературы

- Захворюваність та смертність від злоякісних новоутворень. Стан онкологічної допомоги населенню / З. П. Федоренко, Л. О. Гулак, Ю. І. Михайлович та ін. // Рак в Україні, 2013–2014 : бюлетень Національного канцер-реєстру України. – 2015. – №16. – С. 1–6.
- Пат. 99314 Україна, МПК 2015.01 G01N 21/00 G06K 9/00 Спосіб фотоцифрової морфометрії імуногістохімічних препаратів / В. О. Туманський, А. В. Євсєєв, І. С. Коваленко, М. Д. Зубко ; заявник і патентовласник Запорізький держ. мед. ун-т; заявл. 29.12.14.; опубл. 25.05.15 // Бюлетень. – №10.
- Буртушкина Н. К. Структура неопухолевих захворювань шийки матки / Н. К. Буртушкина, А. Ф. Куперт, Е. Г. Кокунова // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 102. – №3. – С. 121–123.
- Должиков А. А. Иммуноморфологическое исследование метаболитических и пролиферативных маркеров при плоскоклеточном раке шейки матки / А. А. Должиков // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. – №1. – С. 233.
- Захарцева Л. М. Частота экспрессии белка p16INK4a и наличие вируса папилломы человека при дисплазии шейки матки / Л. М. Захарцева, Е. А. Пекур // Онкология. – 2013. – Т. 15. – №1. – С. 9–13.
- Apoptotic Index and Mib-1 Antibody Expression in Premalignant and Malignant Lesions of Uterine Cervix / K. Gupta, K. Alam, V. Maheshwari et al. // Gynecology & Obstetrics. – 2013. – Vol. 3. – P. 117–22.
- Albero G. Human Papillomavirus and Related Diseases Report / G. Albero, L. Barrionuevo-Rosas, F. X. Bosch. – ICO HPV Information Centre, 2016. – P. 245–255.
- Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases / X. F. Bosch, T. R. Broker, F. David et al. // Vaccine. – 2013. – №31. – H1–H31.
- Dabbs D. J. Diagnostic Immunohistochemistry / D. J. Dabbs. – 3rd ed. – New York: Ch. Livingstone, 2010. – 941 p.
- Developing role of HPV in cervical cancer prevention / H. C. Kitchener, K. Denton, K. Soldan, E. J. Crosbie // BMJ. – 2013. – №347. – P. 4781–4789.
- Ki-67 Quantitative Evaluation as a Marker of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Human Papillomavirus Infection / M. Marko, T. Sjeana, K. Goran, et al. // Int. J. Gynecol. Cancer. – 2010. – Vol. 20. – Issue 1. – P. 116–119.
- Godoy A. HPV pathogenesis and biomarkers of viral progression and cervical cancer: A literature review / A. Godoy, K. Bazzo, F. Pasqualotto // World Journ. of Biology and Biological Sc. – 2014. – Vol. 2. – №1. – P. 26–33.
- HPV genotypes in CIN 2-3 lesions and cervical cancer: A population-based study / K. Sigurdsson, F. J. Taddeo, K. R. Benediktsson et al. // Int. J. Cancer. – 2007. – №121. – P. 2682–2687.
- P16 and Ki-67 expression improves the diagnostic accuracy of cervical lesions but not predict persistent high risk human papillomavirus infection with CIN1 / P. Zhong, J. Li, Y. Gu et al. // Int. J. Clin. and Experim. Path. – 2015. – Vol. 8. – №3. – P. 2979–2986.

- [15] p16INK4 expression in precursor lesions of squamous cell cervical cancer related to the presence of HPV-DNA / A. E. Godoy, J. Mandelli, F. H. Oliveira et al. // *Braz. J. Med. and Biol. Res.* – 2008. – Vol. 41. – P. 583–588.
- [16] p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy / M. G. Donà, A. Vocaturo, M. Giuliani et al. // *Gynecologic Oncology*. – 2012. – №126. – Issue 2. – P. 198–202.
- [17] Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology / K. U. Petry, D. Schmidt, S. Scherbring et al. // *Gynecologic Oncology*. – 2011. – №121. – P. 505–509.
- [18] Comprehensive cervical cancer control / WHO // *A guide to essential practice*. Second edition, 2014. – P. 12–14.
- [17] Petry, K. U., Schmidt, D., Scherbring, S., Luyten, A., Reinecke-Lüthge, A., Bergeron, C., et al. (2011) Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecologic Oncology*, 121, 505–9. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.02.033.
- [18] WHO (2014). Comprehensive cervical cancer control. A guide to essential practice, 12–14.

Сведения об авторах:

Туманский В. А., д-р мед. наук, профессор каф. патологической анатомии и судебной медицины, проректор по научной работе, Запорожский государственный медицинский университет, заслуженный деятель науки и техники Украины.
ORCID ID 0000-0001-8267-2350.

Пирогова З. А., ассистент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Відомості про авторів:

Туманський В. О., д-р мед. наук, професор каф. патологічної анатомії і судової медицини, проректор із наукової роботи, Запорізький державний медичний університет, заслужений діяч науки і техніки України.
ORCID ID 0000-0001-8267-2350.

Пирогова З. О., асистент каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Information about authors:

Tumanskiy V. A., MD, PhD, DSc, Professor, Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Pro-rector for Scientific Work, Zaporizhzhia State Medical University, Honorary Science and Engineering Worker of Ukraine.
ORCID ID: 0000-0001-8267-2350.

Pirigova Z. A., Assistant, Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University.

Конфликт интересов: отсутствует.

Conflicts of Interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 19.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 23.05.2017

Прийнято до друку / Accepted: 26.05.2017