

Pliten O. N. Степень экспрессии белка пролиферации Ki-67 и онкопротеина p16^{INK4A} в дифференциальной диагностике плоскоклеточных интраэпителиальных поражений и рака шейки матки = The degree of expression OF Ki-67 protein and oncoprotein p16^{INK4A} in differential diagnosis of squamous intraepithelial lesions and cancer of cervix uteri. Journal of Education, Health and Sport. 2015;5(7):71-90. ISSN 2391-8306. DOI [10.5281/zenodo.19213](https://doi.org/10.5281/zenodo.19213)
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/2015%3B5%287%29%3A71-90>
<https://pbn.nauka.gov.pl/works/577071>
<http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.19213>
Formerly Journal of Health Sciences. ISSN 1429-9623 / 2300-665X. Archives 2011 – 2014
<http://journal.rsw.edu.pl/index.php/JHS/issue/archive>

Deklaracja.
Specyfika i zawartość merytoryczna czasopisma nie ulega zmianie.
Zgodnie z informacją MNiSW z dnia 2 czerwca 2014 r., że w roku 2014 nie będzie przeprowadzana ocena czasopism naukowych; czasopismo o zmienionym tytule otrzymuje tyle samo punktów co na wykazie czasopism naukowych z dnia 31 grudnia 2014 r.
The journal has had 5 points in Ministry of Science and Higher Education of Poland parametric evaluation. Part B item 1089. (31.12.2014).
© The Author (s) 2015;
This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland and Radom University in Radom, Poland
Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.
Received: 21.04.2015. Revised 28.05.2015. Accepted: 30.06.2015.

СТЕПЕНЬ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА ПРОЛИФЕРАЦИИ KI-67 И ОНКОПРОТЕИНА P16^{INK4A} В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ И РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

THE DEGREE OF EXPRESSION OF KI-67 PROTEIN AND ONCOPROTEIN P16^{INK4A} IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS AND CANCER OF CERVIX UTERI

О. Н. Плитень
O. N. Pliten

Харьковский национальный медицинский университет
Kharkiv National Medical University

Abstract. This research of expression of proliferation protein Ki-67, index of proliferative potential of the cells, and oncoprotein p16^{INK4a}, index of malignant transformation of the cells, reveals a direct correlation between the indicators of their level of activity and the degree of cellular and tissue atypism of stratified squamous epithelium of the uterine cervix. The revealed indicators can serve as pathomorphological criteria of differential diagnosis of epithelial dysplasia of cervix uteri, intraepithelial carcinoma and invasive cancer.

Key words: uterine cervix, squamous intraepithelial neoplasias, cancer, proliferation protein Ki-67, oncoprotein p16^{INK4a}.

Резюме. Исследование экспрессии белка пролиферации Ki-67, показателя пролиферативного потенциала клеток, и онкопротеина p16^{INK4a}, маркера злокачественного превращения клеток, выявляет прямую зависимость между показателями их уровня активности и степенью клеточной и тканевой атипии многослойного плоского эпителия шейки матки. Обнаруженные показатели могут служить патоморфологическими критериями в дифференциальной диагностике эпителиальных дисплазий шейки матки, интраэпителиальной карциномы и инвазивного рака.

Ключевые слова: шейка матки, плоскоклеточные интраэпителиальные неоплазии, рак, белок пролиферации Ki-67, онкопротеин p16^{INK4a}.

Вступление. Рак шейки матки (РШМ) является одной из наиболее распространенных злокачественных опухолей женских половых органов и продолжает занимать одно из первых мест в структуре онкологической заболеваемости женского населения. По данным ВОЗ на смертность от РШМ приходится около 2% всех случаев смерти от рака в европейском регионе, и ее можно сократить примерно в 2 раза за счет проведения регулярного скрининга. На величину показателя летальности от рака влияет выявление больных с запущенными формами данного заболевания. Причинами запущенности РШМ являются врачебные ошибки, скрытое течение и несвоевременное обращение больных к врачу [3, 11].

Хотя микроскопическое исследование биопсийного и операционного материала считается одним из наиболее точных и информативных методов обследования больных, ошибки гистологической диагностики – столь же распространенное явление, как и ошибки клинической диагностики. В силу субъективности интерпретации микропрепаратов ошибки микроскопической диагностики неизбежны, но их частоту и клиническую значимость можно существенно уменьшить организационными мерами [10].

Важной тенденцией заболеваемости РШМ, отмечаемой в последние десятилетия, является истинное ее снижение, а также увеличение удельного веса начальных форм опухоли, благодаря активному ее выявлению. Вместе с тем в последние годы отмечено некоторое уменьшение темпа снижения заболеваемости злокачественными опухолями шейки матки (ШМ). Для предотвращения этой неблагоприятной тенденции представляется целесообразным наряду с повсеместным внедрением полноценного скрининга и адекватного лечения предопухолевых заболеваний развернуть поиск методов профилактики РШМ в свете современных концепций возникновения и развития этого заболевания [2, 3, 6, 9].

Научно обоснованное определение факторов риска РШМ и формирование на их основе групп, нуждающихся в более тщательном обследовании и наблюдении, во многом определяют эффективность профилактических мероприятий, направленных на борьбу с этим заболеванием. Результаты исследований последних лет позволили выделить, охарактеризовать, а также наметить пути диагностики и лечения таких начальных этапов развития злокачественной опухоли, как внутриэпителиальный рак (*in situ*) и микроинвазивный рак. Наряду с этим в последние годы продолжало

развиваться учение об истинном морфологическом предраке ШМ, к которому относят эпителиальную дисплазию, особенно тяжелую ее форму [9].

Целью настоящей работы является улучшение диагностики патологических состояний ШМ (дисплазий различной степени тяжести и интраэпителиального рака) с последующей разработкой критериев для их дифференциальной диагностики. Для достижения указанной цели изучили пролиферативную активность эпителиальных клеток и степень выраженности онкогенной трансформации при предопухолевых и опухолевых процессах эпителия ШМ.

Материал и методы исследования. Материалом для исследования послужили 120 образцов ткани ШМ с различной патологией эктоцервикса. Весь материал был разделен на 6 исследуемых групп. I-я группа – неизменный многослойный плоский эпителий (НМПЭ ШМ) – представлена 20 образцами ткани ШМ с нормальным строением эпителия, II-я – 16 образцами ткани ШМ с цервикальной интраэпителиальной неоплазией I степени тяжести (CIN I), III-я – 15 образцами ткани ШМ с CIN II, IV-я – 17 образцами ткани ШМ с CIN III – тяжелая дисплазия, V-я – 18 образцами ткани ШМ с CIN III – преинвазивная карцинома (CIS), VI-я группа представлена 24 образцами ткани ШМ с инвазивным плоскоклеточным раком (invCa).

Диагноз устанавливался на основании результатов клинических и патоморфологических исследований. Степени CIN ШМ классифицированы в соответствии с гистологической классификацией опухолей женской половой системы, 2-я редакция (1994) [5], в которой диспластические изменения различных степеней тяжести и преинвазивная карцинома ШМ, в отношении которых широко используется наименование цервикальная интраэпителиальная неоплазия (cervical intraepithelial neoplasia – CIN), объединены под названием плоскоклеточные интраэпителиальные поражения (squamous intraepithelial lesions – SIL). CIN I степени тяжести является синонимом слабой дисплазии, CIN II степени – умеренной, CIN III степени тяжести используется для обозначения как тяжелой дисплазии, так и преинвазивной карциномы. Плоскоклеточные карциномы подразделяют на ороговевающий и неороговевающий рак.

В представленной работе использовались следующие иммуногистохимические (ИГХ) исследования с моноклональными антителами (МКАТ): к белку пролиферации Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation) и к онкопротеину p16^{INK4a} (kit для гистологических препаратов (hystological), №K5334, DakoCytomation).

С помощью МКАТ к белку Ki-67 (универсальному маркеру для оценки

клеточного цикла) исследовали пролиферативную активность эпителиальных клеток ШМ. Экспрессия Ki-67 активно исследуется в нормальной ткани ШМ и при ее патологии. В НМПЭ экспрессия Ki-67 ограничена базальным и парабазальным слоями экзоцервикса, метапластичным эпителием и базальным слоем эндоцервикса. Степень экспрессии белка Ki-67 по данным ряда авторов при CIN II-III по сравнению с CIN I, дискератозом ШМ и неизменным эпителием увеличивается по мере нарастания неопластических изменений эпителия в ШМ и достигает максимума при цервикальной плоскоклеточной карциноме [14, 15, 19, 23, 26, 28]. Таким образом, чрезмерная экспрессия Ki-67 может служить индикатором гиперпролиферативного состояния, связанного с неопластической трансформацией.

Белок p16^{INK4a} представляет собой ингибитор циклинзависимых киназ Cdk 4,6 [7, 11, 21, 32, 34]. В нормальных, недиспластичных клетках белок p16^{INK4a} экспрессируется на очень низком уровне, и не определяется ИГХ методом [7, 17, 24, 33, 36]. Чрезмерная экспрессия p16^{INK4a} свойственна только преобразованным клеткам, которые реплицируют ВПЧ, и характеризуются разрегулированной экспрессией гена. Поэтому некоторыми исследователями именно этот маркер был предложен как определяющий для идентификации диспластических клеток в гистологических образцах для значительного укорочения вариабельности в толковании гистологических изменений, а также для улучшения диагностической чувствительности и специфичности цитологических исследований [13, 22, 25, 27, 30, 31].

Для проведения ИГХ реакции срезы толщиной 4–5 мкм наносили на предметные стекла, предварительно обработанные адгезивной жидкостью (poly-L-lysine), вслед за чем депарафинировали согласно принятым стандартам. Важным условием качественного ИГХ исследования являются правильно подобранный титр антител, а также время и температура инкубации. Оптимальной является инкубация при температуре 24°C в течение от 10 до 30 мин, в зависимости от типа и разведения антител [1]. МКАТ разводились согласно стандартным рекомендациям: p16^{INK4a} – 1:30, Ki-67 – 1:350. В качестве растворителя антител использовали раствор ANTIBODY DILUENT (DakoCytomation) [16].

Дальнейшую обработку проводили с использованием систем визуализации LSAB2 и EnVision (DakoCytomation) в течение 10 мин с каждым реагентом с промежуточным промыванием в ТРИС-буферном растворе. После этого проводили реакцию с хромогеном (DAB (DakoCytomation)), оценивая качество взаимодействия под контролем микроскопа в течение от 20 сек до 3 мин.

Для дифференцировки структур ткани срезы дополнительно окрашивались гематоксилином Майера в течение 3 мин. Дегидратация и включение в бальзам производили согласно общепринятым принципам [8, 17]. Результат оценивали как положительный при выпадении солей хромогена именно в опухолевых клетках, причем в виде специфической реакции (цитоплазматическая или мембранная реакция).

Клетки, положительные в отношении экспрессии маркеров, изучали в 4–6 случайно выбранных полях зрения. После подсчета 300 гистологически идентифицированных объектов (ядер или клеток), вычисляли показатели экспрессии по результатам всех изученных участков. Как положительную считали реакцию в нормальных клетках эпителиального пласта, а также диспластически и неопластически измененных.

При оценке ИГХ окрашивания положительная реакция с МКАТ к Ki-67 выявлялась коричневой окраской ядер клеток различной степени интенсивности. Наиболее распространенной формой положительной реакции на p16^{INK4a} было одновременное окрашивание ядер и цитоплазмы – так называемая смешанная положительная реакция.

Оценка ИГХ реакции основывалась на интенсивности окрашивания и распределении иммуноположительных клеток согласно рекомендациям других авторов [1, 16]. Шкала интенсивности окраски: «–» – экспрессия отсутствует, «+» – слабая экспрессия, «++» – умеренная экспрессия, «+++» – интенсивное окрашивание. Интенсивность окрашивания также оценивали методом цитофотометрии путем определения оптической плотности в зеленой части спектра.

Для оценки экспрессии p16^{INK4a} использовали следующую шкалу: негативная реакция – до 5% положительно окрашенных клеток; фокальная – до 80% клеток с положительным окрашиванием; диффузная – более 80% клеток с ИГХ меткой [1, 8, 30].

Комплекс гистологических, морфометрических, стереометрических и цитофотометрических исследований проводился на микроскопе Olympus BX-41 с использованием программ Olympus DP-Soft (Version 3:1) и Microsoft Excel [4].

Весь полученный в результате проведенного морфометрического, стереометрического и цитофотометрического исследований цифровой массив данных обрабатывался методами математической статистики с использованием вариационного, альтернативного и корреляционного анализов.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенного ИГХ исследования обнаружено, что в НМПЭ ШМ положительная реакция Ki-67 выявилась только в

отдельных ядрах клеток базального и парабазального слоя, интенсивность реакции была низкой или умеренной (рис. 1). Удельный вес клеток с положительной ИГХ реакцией с Ki-67 составляет $3,6 \pm 0,27\%$ (количество Ki-67-положительных ядер колебалась в пределах от 2,4% до 7,2%).

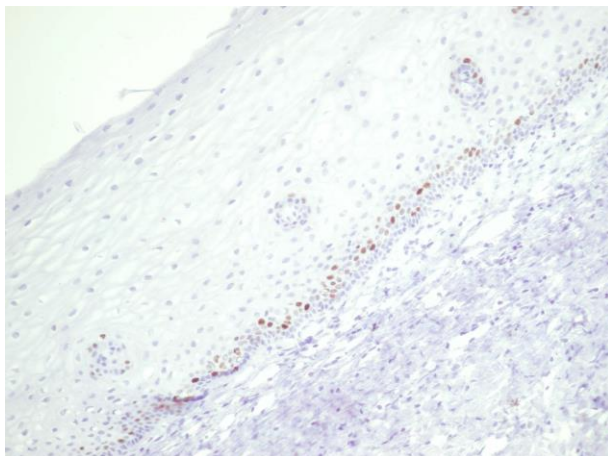


Рис. 1. Неизменный многослойный плоский эпителий слизистой оболочки влагалищной части шейки матки: интрануклеарная реакция к Ki-67 умеренной и низкой интенсивности в отдельных клетках базального и парабазального слоев. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, $\times 200$.

ИГХ исследование НМПЭ ШМ с $p16^{INK4a}$ показало, что во всех случаях положительная реакция с этим антителом отсутствует (рис. 2).

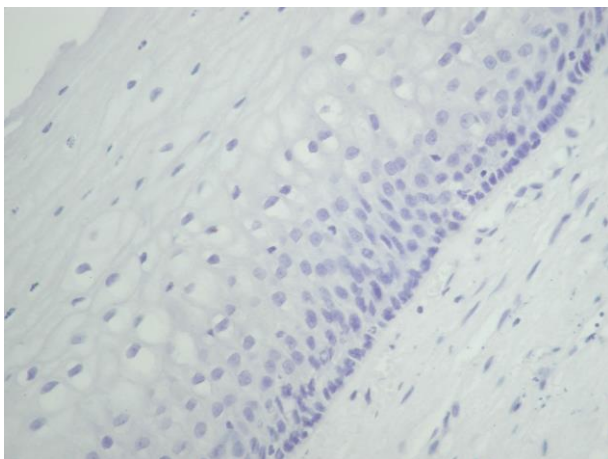


Рис. 2. Неизменный многослойный плоский эпителий слизистой оболочки влагалищной части шейки матки: отрицательная реакция с $p16^{INK4a}$. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, $\times 400$.

При CIN I ИГХ исследование с помощью МКАТ к белку Ki-67 выявило: клетки с положительной реакцией располагались преимущественно в парабазальном слое. В

некоторых случаях встречались одиночные клетки с более слабо окрашенными ядрами в среднем и поверхностном слоях эпителия (рис. 3). Удельный вес клеток с положительной ИГХ реакцией с Ki-67 составляет $13,3 \pm 0,93\%$ (колебания в пределах от 7,1% до 18,7%).

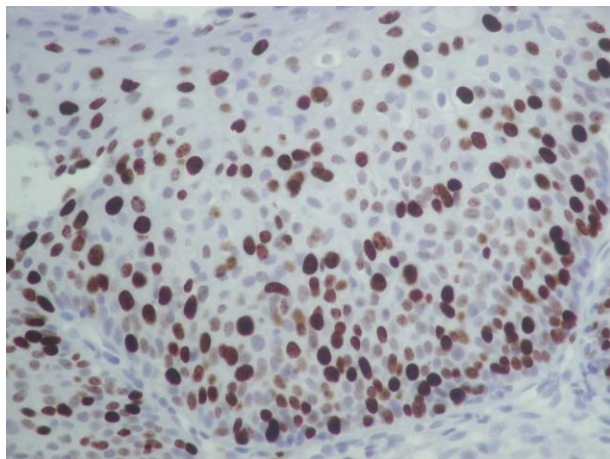


Рис. 3. CIN I: интрануклеарная реакция к Ki-67 преимущественно в клетках базального и парабазального слоев, одиночные клетки и группы клеток с более слабо окрашенными ядрами в среднем и поверхностном слоях эпителия. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, $\times 400$.

При ИГХ исследовании с $p16^{INK4a}$ при CIN I выявлялись два варианта реакции – отрицательный и фокальный (5–80% клеток с положительным окрашиванием). При этом наиболее часто (11 случаев – 68,75%) имела место отрицательная реакция, в которой наряду с наблюдениями со слабой реакцией менее 5% клеток базального слоя встречаются наблюдения с отсутствием окрашивания. Характерно, что в случаях с фокальным типом окрашивания (5 случаев – 31,25%) наблюдалась реакция чаще слабой интенсивности, преимущественно в клетках базального и парабазального слоев МПЭ, однако, наряду с этим отмечалась реакция и с умеренной интенсивностью и с положительной реакцией клеток в среднем и поверхностном слоях эпителия (рис. 4). Необходимо отметить, что во всех случаях положительной окраски наблюдалась смешанная реакция, то есть окрашивание и в ядрах, и в цитоплазме. Удельный вес клеток с положительной ИГХ реакцией $p16^{INK4a}$ в среднем составляет $16,7 \pm 2,05\%$, количество $p16^{INK4a}$ -положительных клеток колебалось в пределах от 3,7% до 78,4%.

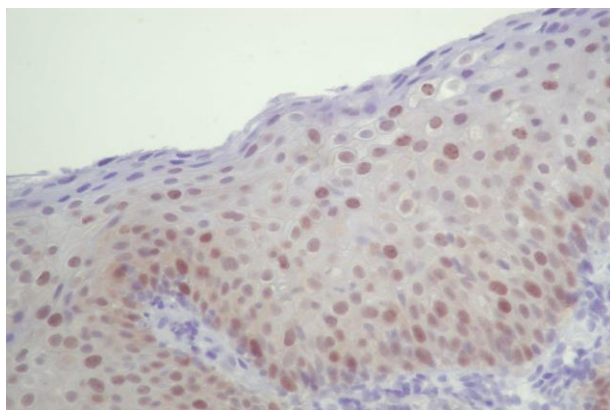


Рис. 4. CIN I: фокальная ИГХ реакция с p16^{INK4a}, преимущественно в клетках базального и парабазального слоев, одиночные клетки и группы клеток с более слабо окрашенными ядрами и цитоплазмой в среднем и поверхностном слоях эпителия. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, $\times 400$.

При CIN II клетки с положительной ядерной реакцией к Ki-67 занимали от 1/3 до 2/3 толщи эпителиального пласта ШМ. Удельный вес клеток с положительной ИГХ реакцией Ki-67 составляет $29,5 \pm 1,27\%$ (количество Ki-67-положительных ядер колебалась в пределах от 8,4% до 57,3%). Для данной степени CIN характерным было увеличение числа Ki-67-положительных ядер в различных пластах эпителия (рис. 5), при этом основная масса клеток, содержащих ИГХ метку, локализовалась в центральных отделах эпителиального пласта. В большинстве случаев интенсивность реакции была умеренной и высокой. Встречались отдельные случаи, в которых были низкими показатели интенсивности реакции и удельного веса клеток с положительной ИГХ реакцией Ki-67 (рис. 6).

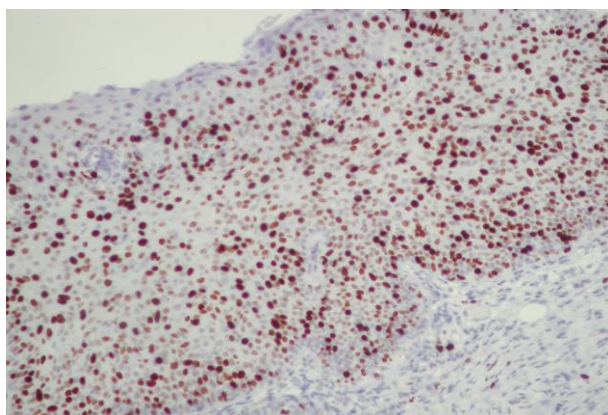


Рис. 5. CIN II: интрануклеарная реакция к Ki-67 во всех слоях покровного эпителия шейки матки. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, $\times 200$.

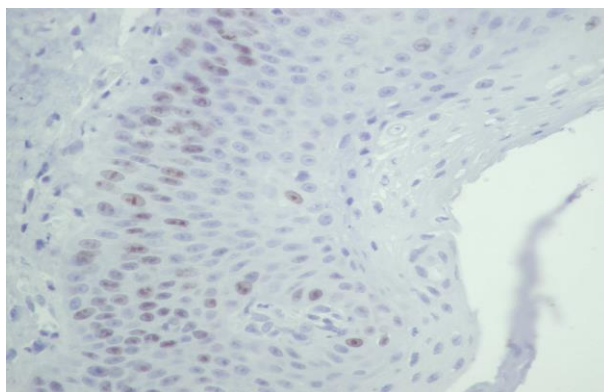


Рис. 6. CIN II: слабая интрануклеарная реакция к Ki-67 в клетках базального и парабазального слоев, одиночные клетки в среднем и поверхностном слоях эпителия покровного эпителия шейки матки. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, $\times 400$.

Данная группа достаточно разнородна в отношении p16^{INK4a}-положительных клеток, мы обнаруживали все три возможных варианта окрашивания – отрицательное (2 случая – 13,3%), фокальное (5 случаев – 33,3%) и диффузное (8 случаев – 53,4%). В большинстве случаев мы наблюдали преимущественно смешанный тип реакции. В наблюдениях с диффузным и фокальным типом окрашивания реакция выявлялась в основном в нижних 2/3 или нижней половине эпителия (рис. 7), интенсивность окраски большей частью была умеренной, хотя в отдельных случаях наблюдалась реакция как слабой, так и высокой интенсивности. В случаях с отрицательным окрашиванием клетки базального слоя были слабо окрашены, в одном случае встретилась полное отсутствие реакции с p16^{INK4a} (рис. 8). Удельный вес клеток с положительной ИГХ реакцией p16^{INK4a} в среднем составляет $60,42 \pm 4,11\%$, количество p16^{INK4a}-положительных клеток колебалось в пределах от 0% до 97,8%.

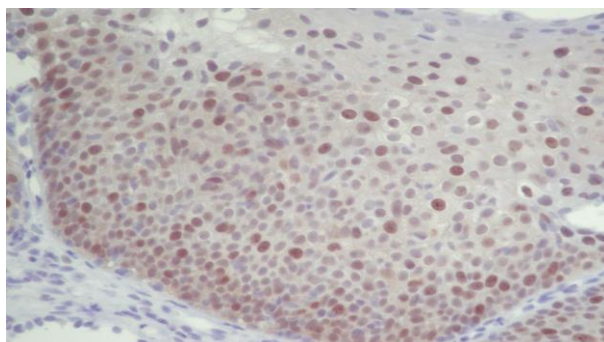


Рис. 7. CIN II: диффузная смешанная реакция с p16^{INK4a} умеренной интенсивности. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, $\times 400$.

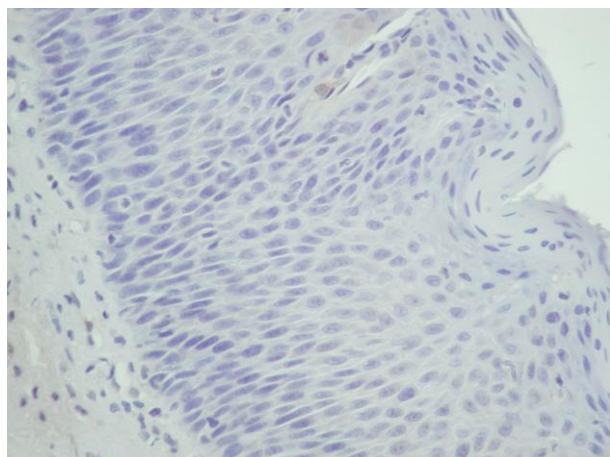


Рис. 8. CIN II: отрицательная реакция с p16^{INK4a}. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, ×400.

При CIN III диспластически измененные клетки с ядрами, положительно реагирующими на Ki-67, выявлялись во всех, преимущественно наружных, слоях эпителия, интенсивность реакции была умеренной и высокой. В некоторых случаях клетки базального слоя были Ki-67-отрицательными (рис. 9). Удельный вес клеток с положительной ИГХ реакцией Ki-67 составляет 54,3±7,05% (колебания в пределах от 42,3% до 78,2%).

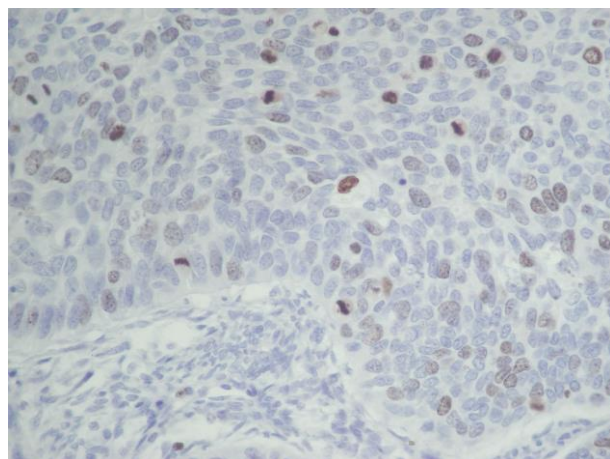


Рис. 9. CIN III: интрануклеарная реакция к Ki-67 во слоях эпителия покровного эпителия шейки матки, более слабая в клетках базального слоя. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, ×400.

В случаях тяжелой дисплазии при проведении ИГХ исследования с p16^{INK4a} преобладал диффузный вариант реакции (14 случаев – 82,4%), фокальная реакция встретилась в 17,6% случаев. В подавляющем большинстве случаев с диффузным типом преобладала интенсивная смешанная реакция в клетках всей толщи эпителия,

значительно реже наблюдалась смешанная реакция умеренной и высокой интенсивности преимущественно в нижней половине эпителиального пласта (рис. 10). В отдельных случаях наряду с интенсивной реакцией большинства клеток мы наблюдали отсутствие окрашивания в участках поверхностного слоя. В случаях с фокальным типом окрашивания интенсивность реакции была преимущественно умеренной и выраженной. В среднем удельный вес клеток с положительной ИГХ реакцией с p16^{INK4a} составляет 82,21±13,15%, количество p16^{INK4a}-положительных клеток колебалось в пределах от 62,3% до 89,6%.

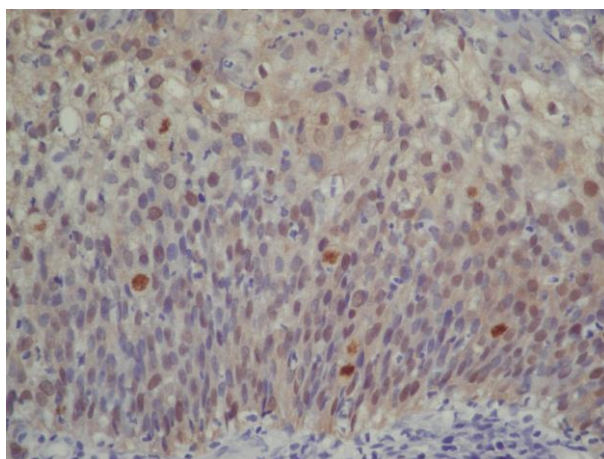


Рис. 10. CIN III: диффузный вариант окрашивания с p16^{INK4a} с умеренной и высокой интенсивностью окрашивания. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, ×400.

В случаях с преинвазивной карциномой клетки с положительной ядерной реакцией к Ki-67 преимущественно высокой интенсивности выявлялись во всех слоях эпителиального пласта ШМ. Удельный вес клеток с положительной ИГХ реакцией с Ki-67 составляет 73,8±8,17% (количество Ki-67-положительных ядер колебалась в пределах от 76,4% до 91,7%). В зонах, подозрительных на наличие микроинвазии, почти все ядра клеток были Ki-67-положительными с высокой интенсивностью реакции (рис. 11).

При ИГХ исследовании с p16^{INK4a} во всех случаях CIS встретился диффузный вариант окрашивания с интенсивной смешанной реакцией в клетках всей толщи эпителия (рис. 12). Обращает на себя внимание тот факт, что при исследовании реакции в зонах с тенденцией или подозрением на инвазию наблюдалось усиление интенсивности цитоплазматической реакции и увеличение количества положительно окрашенных клеток. В среднем удельный вес клеток с положительной ИГХ реакцией с

p16^{INK4a} составляет $91,8 \pm 6,54\%$, количество p16^{INK4a}-положительных клеток колебалось в пределах от 90,2% до 96,3%.

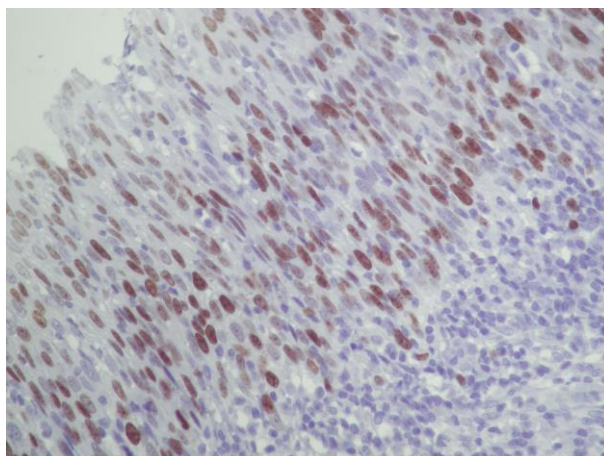


Рис. 11. CIS: интрануклеарная реакция к Ki-67 во слоях эпителия, более выраженная в зонах, подозрительных на наличие микроинвазии. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, $\times 400$.

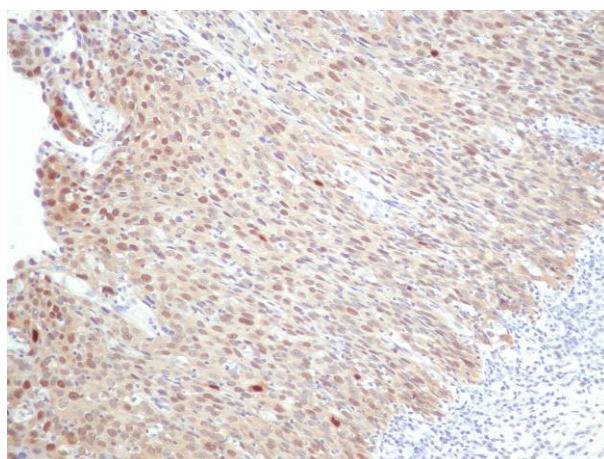


Рис. 12. CIS с подозрением на стромальную инвазию: диффузный вариант окрашивания с p16^{INK4a} с умеренной и высокой интенсивностью окрашивания. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, $\times 400$.

Локализация и интенсивность ИГХ реакции к Ki-67 при инвазивных плоскоклеточных раках варьирует в зависимости от степени дифференцировки. Так, в неороговевающем раке положительная ядерная реакция к Ki-67 выявлялась в большинстве клеток без определенной закономерности (рис. 13), тогда как в ороговевающем раке, в центральных отделах ороговевания Ki-67-положительные клетки чередовались с Ki-67-отрицательными (рис. 14). Удельный вес клеток с положительной ИГХ реакцией Ki-67 в раках составляет $76,4 \pm 10,69\%$ (колебания в пределах от 46,7% до 93,8%), причем в неороговевающих он выше, чем в

ороговевающих, и составляет $81,2 \pm 6,91\%$ и $69,7 \pm 6,76\%$ соответственно. Интенсивность реакции, оцененная методом цитофотометрии путем определения средней оптической плотности, составила $119,99 \pm 5,22$ усл. ед. в зеленой части спектра: в неороговевающем в свою очередь она равна $140,20 \pm 5,75$ усл. ед., а в ороговевающем – $99,79 \pm 3,86$ усл. ед.

ИГХ исследование с $p16^{INK4a}$ в инвазивных плоскоклеточных раках показало, что локализация и интенсивность реакции разнообразны. Во всех случаях неороговевающего рака наблюдался диффузный тип окрашивания с высокой интенсивностью реакции (рис. 15). Удельный вес клеток с положительной ИГХ реакцией $p16^{INK4a}$ составляет $93,3 \pm 8,19\%$ (колебания в пределах от $90,5\%$ до $96,7\%$).

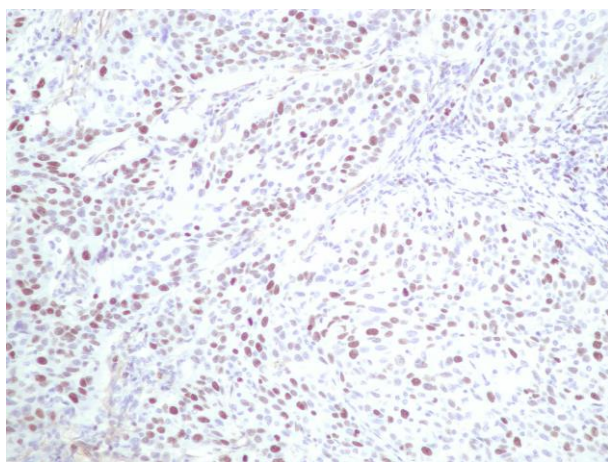


Рис. 13. Плоскоклеточный неороговевающий рак: интрануклеарная реакция к Ki-67 в большинстве клеток. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, $\times 200$.

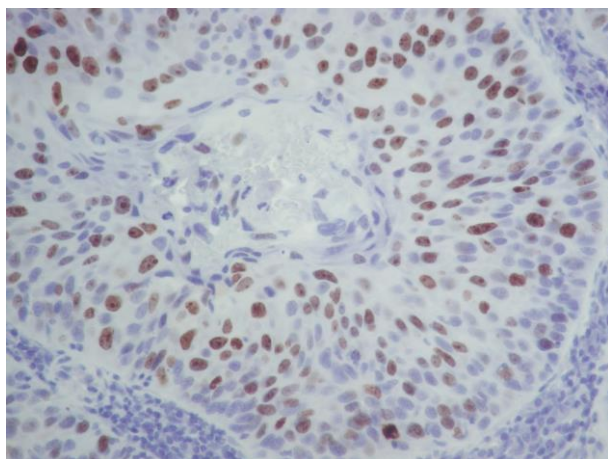


Рис. 14. Плоскоклеточный ороговевающий рак: интенсивно окрашенные Ki-67-положительные клетки чередуются с Ki-67-отрицательными участками. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, $\times 400$.

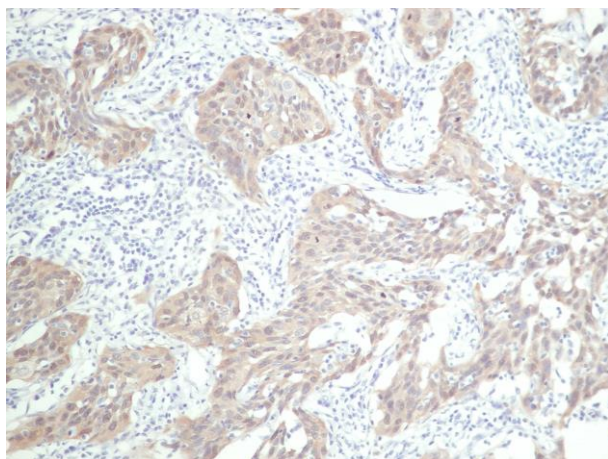


Рис. 15. Плоскоклеточный неороговевающий рак: диффузный тип окрашивания с $p16^{INK4a}$ с высокой интенсивностью реакции ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, $\times 200$.

В ороговевающих раках отмечались два варианта окрашивания: фокальный и диффузный (преимущественно) с различной степенью интенсивности. Характерно, что в зонах с повышенным образованием рогового вещества, реакции были слабой интенсивности (рис. 16) или негативными. Удельный вес клеток с положительной ИГХ реакцией $p16^{INK4a}$ составляет $88,7 \pm 5,86\%$ (колебания в пределах от 72,6% до 93,6%).

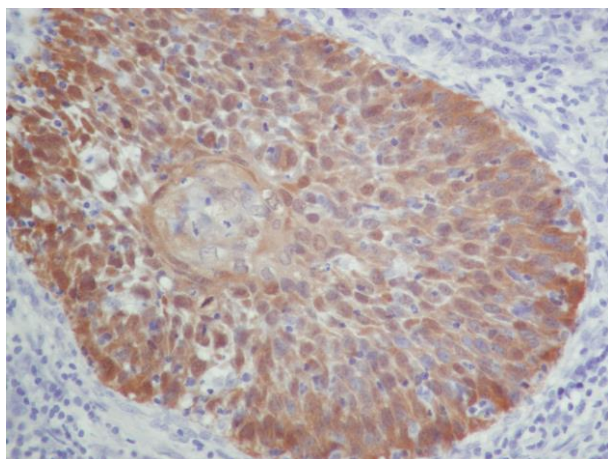


Рис. 16. Плоскоклеточный ороговевающий рак: диффузная ИГХ реакция с $p16^{INK4a}$ с ослаблением реакции в зонах с повышенным образованием рогового вещества. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, $\times 400$.

Средний удельный вес клеток с положительной ИГХ реакцией $p16^{INK4a}$ в инвазивных в раках составляет $92,61 \pm 12,54\%$.

Таким образом, в нашем исследовании при изучении показателей пролиферативного потенциала по уровню экспрессии Ki-67 было установлено

стабильное повышение среднего значения удельного веса клеток с положительной реакцией к данному белку при увеличении степени поражения эпителия ШМ. Особенно существенной и статистически достоверной ($p \leq 0,05$) была разница между НМПЭ ШМ и CIN I, CIN I и CIN II и между CIN II и CIN III. В то же время уровень этого показателя в группах CIN III, CIS и invCa не имел достоверных отличий. Наше исследование показало, что более высокие значения удельного веса клеток с положительной реакцией к Ki-67 среди инвазивных плоскоклеточных раков имеет неороговевающий рак, то есть опухоль с более низкой степенью дифференцировки (рис. 17).

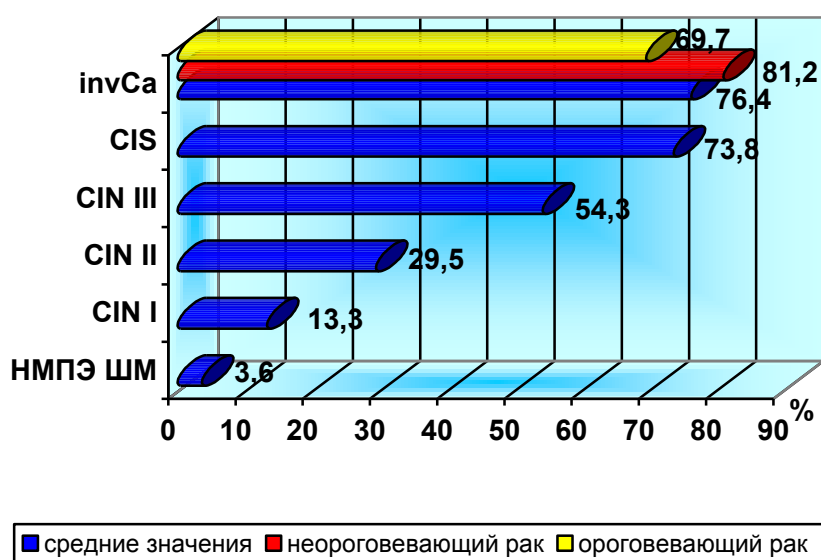


Рис. 17. Степень экспрессии Ki-67 в неизменном многослойном эпителии и при различных стадиях канцерогенеза шейки матки (удельный вес клеток с положительной реакцией к Ki-67).

При анализе распределения Ki-67-положительных клеток нами выявлено стойкое увеличение количества клеток в среднем и поверхностном отделах эпителия ШМ при прогрессии дисплазии от легкой до тяжелой степени, что, вероятно, является отображением степени нарушения процессов как пролиферации эпителиальных клеток, так и дифференцировки, что обусловлено нарушением регуляции клеточного цикла. Подобное мнение относительно повышения экспрессии Ki-67 при прогрессии диспластических поражений высказывали ряд авторов [28, 34], хотя в исследованиях этих авторов разница между экспрессией CIN II и CIN III была статистически несущественной [12, 14], что противоречит нашим результатам и данным подобного

исследования, проведенным в Днепропетровской государственной медицинской академии Дороховой Е.В. (2007) [1].

Данные литературы также сообщают о наличии прямой корреляционной связи между экспрессией Ki-67 и выявлением ДНК ВПЧ, что может указывать на непосредственное нарушение механизма клеточного деления ВПЧ высокого канцерогенного риска путем митоза [1, 15, 18, 20, 29].

Одним из индикаторов злокачественной трансформации клеток МПЭ ШМ, пораженных ВПЧ высокой степени риска, является накопление онкопротеина p16^{INK4a} [7, 11, 21, 21, 35]. По нашим данным уровень экспрессии белка p16^{INK4a} повышается наряду с увеличением клеточной и тканевой атипии эпителия ШМ (рис. 18). В НМПЭ ШМ мы определяли отсутствие реакции с p16^{INK4a}, тогда как при CIN I выявлялись два варианта ИГХ реакции – отрицательный и фокальный. Группа CIN II наиболее разнообразна в отношении количества p16^{INK4a}-положительных клеток, в которой отмечались все три возможных варианта окрашивания – отрицательное, фокальное и диффузное. При CIN III в нашем исследовании встретились фокальный и диффузный тип реакции, при CIS и в неороговевающих раках – только диффузный, в ороговевающих раках – фокальный и диффузный.

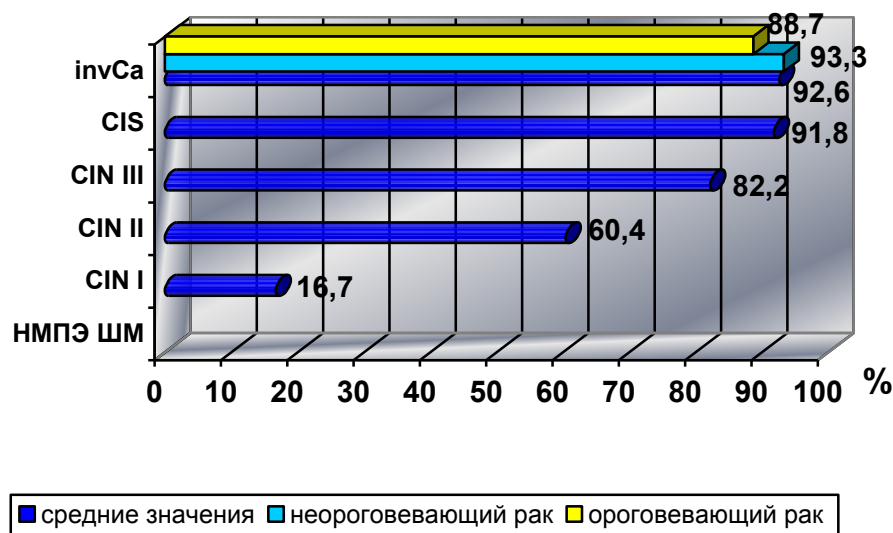


Рис. 18. Степень экспрессии p16^{INK4a} в неизменном многослойном эпителии и при различных стадиях канцерогенеза шейки матки (удельный вес клеток с положительной реакцией к p16^{INK4a}).

Учитывая определенную разнородность экспрессии p16^{INK4a} в исследуемых

группах представляется возможным сделать вывод о существовании наиболее характерного варианта ИГХ окрашивания для каждой степени диспластических и неопластических поражений эпителия ШМ, таких как, например, отрицательное окрашивание при CIN I и диффузное окрашивание для CIN III, CIS и invCa. Последнее, по всей видимости, отображает завершенность процесса онкотрансформации, который непосредственно происходит на более ранних стадиях, вероятно на этапе CIN II, учитывая наибольшее разнообразие экспрессии маркера онкотрансформации p16^{INK4a} при дисплазиях умеренной степени. Другими словами, CIN II, вероятно, и является той переходной зоной, которая отображает обратимость или необратимость изменений, происходящих в диспластически измененном эпителии.

В нашем исследовании выявлено некоторое снижение экспрессии маркера p16^{INK4a} в ороговевающих плоскоклеточных раках, что подтверждает предположение относительно ослабления интенсивности ИГХ реакции в клетках с признаками усиления орогования, что и наблюдается в раковых «жемчужинах».

Выводы. Нашим исследованием установлено, что умеренная экспрессия Ki-67 является специфическим индикатором CIN, тогда как высокая экспрессия является специфичным тестом для выявления CIS и invCa. Использование ИГХ исследования экспрессии Ki-67 в качестве подтверждающего теста позволяет подтвердить наличие диспластических процессов, выявить поражения ШМ с высоким риском дальнейшей прогрессии и может служить скрининговым показателем опухолей с «агрессивным поведением».

Диффузное окрашивание с p16^{INK4a}, удельный вес клеток с положительной ИГХ реакцией с данным белком и высокая интенсивность реакции могут использоваться как специфический и чувствительный метод выявления CIS и invCa и как скрининговый тест наличия в материале ШМ ВПЧ высокого канцерогенного риска, тогда как положительная экспрессия p16^{INK4a} является специфичным тестом для определения CIN, CIS, invCa и ВПЧ высокого канцерогенного риска.

Литературные источники:

1. Дорохова Е.В. Діагностичне та прогностичне значення експресії маркерів при диспластичних та непластичних процесах шийки матки (імуноморфологічні аспекти): Автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Дніпропетровськ, 2007.
2. Кайструкова Д.С., Томич М.В. Ефективність цитологічного скринінгу у виявленні передпухлинних станів і ранніх форм раку шийки матки // Acta medica Leopoliensia. Український медичний часопис. – 1996. – Т. II, №2. – С. 48–49.

3. Королев В.С., Горбунов В.Я., Слюсарь Н.Н. Особенности заболеваемости и смертности женщин трудоспособного возраста от рака шейки матки // *Здравоохранение Российской Федерации*. – 1999. – №1. – С. 29–31.
4. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: МОРИОН, 2001. – 408 с.
5. Международная гистологическая классификация опухолей. Гистологическая классификация опухолей женского полового тракта. – Женева, 1994.
6. Новик В.И., Михайлова Н.А. и др. Анализ результатов цитологического скрининга предрака и рака шейки матки // *Скрининг в раннем выявлении опухолей репродуктивной системы и проведение органосохраняющего лечения: Мат. всесоюз. симпозиума*. – Кострома, 1991. – С.67–68.
7. Новик В.И., Сафронникова Н.Р., Урманчеева А.Ф., Кутуева Ф.Р. Пути повышения эффективности цитологического скрининга рака шейки матки // *Новые информационные технологии в онкологической статистике: Мат. всерос. симпозиума*. – СПб., 2001. – С. 195–197.
8. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. – Казань, 2004. – 288 с.
9. Посевая Т.А., Цукерман В.Г., Шуваева Н.И. и др. Роль герпетической инфекции при эпителиальных дисплазиях шейки матки и опыт их лечения противогерпетическими препаратами // *Вопросы вирусологии*. – 1991. – №1. – С. 78–80.
10. Рыбакова М.Г., Ковальский Г.Б., Чибисов В.Н. и др. Сопоставление показателей встречаемости диагнозов как метод оценки качества гистологической диагностики (на примере внутриэпителиальных и инвазивных новообразований матки) // *Архив патологии*. – 2003. – №5. – С.40–43.
11. Фролова И.И., Местергази Г.М., Радзинский В.Е. и др. Иммуногистохимические исследования дискератоза и неопластических изменений экзоцервикса при гинекологической патологии // *Архив патологии*. – 2002. – №6. – С. 23–26.
12. Al-Saleh W., Delvenne P., Greimers R. et al. Assessment of Ki-67 antigen immunostaining in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: Correlation with the histological grade and human papillomavirus type // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1995. – Vol. 104. – P. 154–160.
13. Agoff S.N., Lin P., Morihara J. et al. p16^{INK4a} expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types // *Mod. Pathol.* – 2003. – Vol. 16. – P. 665–673.
14. Brown D.C., Gatter K.C. Ki-67 protein: the immaculate deception? // *Histopathology*. – 2002. – Vol. 40. – P. 2–11.
15. Carrilho C., Gouveia P., Cantel M. et al. Characterization of human papillomavirus infection, P53 and Ki-67 expression in cervix cancer of Mozambican women // *Pathol. Res. Pract.* – 2003. – Vol. 199. – P. 303–311.
16. Dabbs D.J. *Diagnostic immunohistochemistry*. – Churchill Livingstone, 2006. – 828p.
17. Danielle W., Samir K., Hanlin L. Expression of p16, Rb, and p53 proteins in squamous cell carcinomas of the anorectal region harboring human papillomavirus DNA //

Mod. Pathol. – 2003. – Vol.16. – P. 692–699.

18. Dunton C.J., Van Hoesen K.H., Kovatich A.J. et al. Ki-67 antigen staining as an adjunct to identifying cervical intraepithelial neoplasia // *Gynecol. Oncol.* – 1997. – Vol. 64. – P. 451–455.

19. Ho D.M., Hsu C.Y., Chiang H. MIB-1 labeling index as a prognostic indicator for survival in patients with FIGO stage IB squamous cell carcinoma of the cervix // *Gynecol. Oncol.* – 2000. – Vol.76. – P. 97–102

20. Ikuo K., Shingo F., Hirofumi N. et al. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors, progesterone receptors, Ki-67 antigen, and human papillomavirus DNA in normal and neoplastic epithelium of the uterine cervix // *Cancer.* – 2006. – Vol. 68, №6. – P. 1340–1350.

21. Kanao H., Enomoto T., Ueda Y. et al. Correlation between p14(ARF)/p16 (INK4A) expression and HPV infection in uterine cervical cancer // *Cancer Lett.* – 2004. – Vol. 213. – P. 31–37.

22. Klaes R., Friedrich T., Spitkovsky D. et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri // *Int. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 92, №2. – P. 276–284.

23. Koyamatsu Y., Yokoyama M., Nakao Y. et al. A comparative analysis of human papillomavirus type 16 and 18 and expression of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal and vulvar carcinomas // *Gynecol. Oncol.* – 2003. – Vol. 90. – P. 547–551.

24. Milde-Langosch K., Riethdorf S., Kraus-Poppinghaus A. et al. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16^{INK4A}, p21^{WAF1}, and p27^{KIP1} in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas // *Virchows Arch.* – 2001. – Vol. 439. – P. 55–61.

25. Murphy N., Ring M., Killalea A.G. et al. p16^{INK4a} as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and Thin Prep smears // *J. Clin. Pathol.* – 2003. – Vol. 56. – P. 56–63.

26. Nakano T., Oka K. Differential values of Ki-67 index and mitotic index of proliferating cell population. An assessment of cell cycle and prognosis in radiation therapy for cervical cancer // *Cancer.* – 1993. – Vol. 72. – P. 2401–2408.

27. Negri G., Egarter-Vigl E., Kasal A. et al. P16^{INK4a} is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2003. – Vol. 27. – P. 187–193.

28. Panjkovic M., Ivkovic-Kapic T. Ki-67 expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix // *Arch. Oncol.* – 2006. – Vol. 14. – P. 23–25.

29. Sahebali S., Depuydt C.E., Segers K. et al. Ki-67 immunocytochemistry in liquid based cervical cytology: useful as an adjunctive tool? // *Journal of Clinical Pathology.* – 2003. – Vol. 56. – P. 681–686.

30. Sano T., Oyama T., Kashiwabara K. et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions // *Am. J. Pathol.* – 1998. – Vol. 153. – P. 1741–1748.

31. Sophia S., Marcus T., Mark S. et al. Validation of p16^{INK4a} as a Marker of Oncogenic Human Papillomavirus Infection in Cervical Biopsies from a Population-Based Cohort in Costa Rica // *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* – 2004. – Vol. 13. – P. 1355–1360.

32. Tringler B., Gup C.J., Singh M. et al. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia // *Hum. Pathol.* – 2004. – Vol. 35, №6. – P. 689–696.
33. Van de Putte G., Holm R., Lie A.K. et al. Corrigendum to "Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis" // *Gynecol. Oncol.* – 2004. – Vol. 92. – P.723–730.
34. Volgareva G., Zavalishina L., Andreeva Y. et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells // *BMC Cancer.* – 2004. – Vol. 4, №1. – P. 51–58.
35. Volgareva G.M., Zavalishina L.E., Frank G.A. et al. Expression of protein marker p16^{INK4a} in uterine cervical cancer // *Arkh. Patol.* – 2002. – Vol. 64, №1. – P. 22–24.
36. Wong Y.F., Cheung T.K., Chung T.K.H. et al. Expression of p16^{INK4a} and Rb genes in cervical neoplasm // *J. Lower Genital Tract Dis.* – 1997. – Vol. 1. – P. 240–244.