

ЭКСПРЕССИЯ OCT-4, P53, P16 И KI67 ПРИ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННОМ ПРЕДРАКЕ И РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ

Коган Е.А.¹, Ли Ц.Ц.¹, Файзуллина Н.М.², Казаченко А.В.²

¹ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

²ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии
им. академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва

При патологии шейки матки на фоне ВПЧ инфекции обнаруживается три вида сфероидных эпителиально-мезенхимальных структур: репаративные, неопластические и раковые, участвующие в репаративных процессах и в опухолевом росте. Раковые сфероиды, отличаются от неопластических не только более крупными размерами, но и тенденцией к слиянию, а также высокой экспрессией p53. Экспрессия онкомаркеров p53, p16 и Ki-67 может быть использована в ранней дифференциальной диагностике предрака и плоскоклеточного рака шейки матки.

Ключевые слова: рак шейки матки, p53, p16, Ki-67, ВПЧ.

EXPRESSION OF OCT-4, P53, P16 AND KI-67, WITH HPV ASSOCIATED PRECANCER AND CANCER OF THE CERVIX

Kogan E.A., Li Ts.Ts., Faizullina N.M., Kazachenko A.V.

The pathology of cervical HPV infection is detected by three types of epithelial-mesenchymal spheroidal structures: reparative, neoplastic and cancerous involved in reparation processes and in tumor growth. Cancer spheroids are different from neoplastic not only larger in size but also a tendency to merge, and high expression of p53. Expression of tumor markers p53, p16 and Ki-67 could be used in the early differential diagnosis of precancer and squamous cell carcinoma of the cervix.

Key words: cervical cancer, p53, p16, Ki-67, HPV.

Введение

Рак шейки матки (РШМ) является наиболее распространенной формой онкологической патологии репродуктивной системы женщин, занимающей 7-е место среди всех злокачественных опухолей и 3-е место среди карцином [1].

Вирус папилломы человека (ВПЧ) в настоящее время признается в качестве этиологического фактора этого новообразования и обнаруживается в 98% случаев РШМ [2].

Согласно современной концепции канцерогенеза полагают, что опухоль обычно возникает

в зонах активных регенераторных процессов, в области ниш стволовых клеток (НСК) из трансформированных тканевых стволовых клеток или путем перепрограммирования трансформированных клеток очагов предраковых изменений [3, 4, 5]. В шейке матки НСК соответствует зоне трансформации [6]. Остается открытым вопрос о роли стволовой тканевой и стволовой раковой клетки в канцерогенезе рака шейки матки.

Полагают, что мутантный ген-супрессор рака р53 играет важную роль в развитии плоскоклеточного рака шейки матки и может использоваться для его диагностики [7, 8]. Кроме того, онкобелок Е6 ВПЧ связывается с диким типом р53 и инактивирует его [9]. В результате чего, клетки с поврежденным геномом не отправляются в апоптоз, сохраняются, дают потомство, что ведет к накоплению мутаций в клетках и их злокачественной трансформации [10, 11].

Ранее нами были описаны сфероидные эпителиально-мезенхимальные структуры (СЭМС), обнаруживаемые в пласте плоского эпителия по экспрессии маркера эмбриональных стволовых клеток Oct-4 при ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки, включая предрак и плоскоклеточный рак [12]. Как было установлено, СЭМС формируются в зоне НСК, при этом их клетки обладают пролиферативной активностью. Часть сфероидов не имеют признаков клеточного атипизма, экспрессируют только Ki-67, не содержат p16 и были названы нами репаративными сфероидами [12], в то время как другие построены из атипичных клеток и экспрессируют и Ki-67 и p16, за что получили название опухолевых сфероидов [12]. Данные об экспрессии p53 в СЭМС в доступной литературе отсутствуют.

Целью исследования явилось изучение экспрессии p53, Oct-4, p16 и Ki-67, в репаративных и опухолевых сфероидов при ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки: хронический цервицит, цервикальная интраэпителиальная неоплазия < II степень (ЦИН<II), цервикальная интраэпителиальная неоплазия ≥ II степень (ЦИН≥II), а также при микроинвазивной плоскоклеточной карциноме.

Материалы и методы исследования

Проведено клинко-морфологическое и иммуногистохимическое исследование биопсийного материала, полученного от 61 пациентки

репродуктивного возраста, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Минздрава РФ за 2013-2015 год. Обследованные женщины были в возрасте от 17 до 56 лет (средний возраст 36,5 лет). Всем женщинам проводили ВПЧ-тестирование цервикального содержимого, полученного при заборе цитологического материала, на приборе Cobas 4800 методом ПЦР-НВ, представляющем собой полностью автоматизированную систему, выдающую результат по трем отдельным каналам: индивидуально ДНК ВПЧ16, ДНК ВПЧ18 и общий пул ДНК других 12 высокоонкогенных генотипов ВПЧ (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68) [13, 14]. Во всех образцах получили положительные результаты, причем ДНК ВПЧ 16 типа обнаружена в 19 случаях (31,15%), ДНК ВПЧ 18 типа - в 4 случаях (6,55%), ДНК ВПЧ других 12 высокоонкогенных типов - в 38 случаях (62,30%). Все женщины были разделены на 4 группы в зависимости от патологического процесса в шейке матки: хронический цервицит (15), ЦИН<II (12), ЦИН≥II (25), микроинвазивный рак шейки матки (9). Биопсийный материал был представлен соскобами цервикального канала, биоптатами шейки матки в случаях хронического цервицита и ЦИН<II, а также операционным материалом (резецированные конусы шейки матки) при ЦИН≥II и микроинвазивном раке. Ткань фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин и готовили серийные парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином и инкубировали в ретривере для восстановления антигенности тканей. Ставили иммуногистохимические реакции с использованием моноклональных антител к Oct-4 (MRQ-10, 309M-15, CELL MARQUE CORPORATION), p53 (RTU, клон DO-7 RTU, N158187-2, DAKO), и антител для двойной окраски p16/Ki67 (CINtec PLUS cytology kit, Рош). Докрашивание ядер осуществлялось гематоксилином и эозином. Ставились положительные и отрицательные контрольные реакции. Результаты реакций оценили в процентах окрашенных эпителиальных клеток из расчета на 300 клеток. Для статистического анализа применялся непараметрический метод для малых выборок по Манну-Уитни.

Результаты и их обсуждение

При гистологическом исследовании биоптатов шейки матки морфологический диагноз

хронического ВПЧ-ассоциированного цервицита ставился при обнаружении лимфогистиоцитарной инфильтрации подслизистого слоя, лейкопедеза в эпителиальном пласте, явления акантоза, очаговой плоскоклеточной метаплазии и койлоцитоза.

При ЦИН < II и ЦИН ≥ II, также выявлялись признаки хронического воспаления с койлоцитозом в сочетании с появлением атипичных клеток, распространяющихся не более чем на 1/3 толщины плоского эпителия при ЦИН < II и более 2/3 толщины эпителия при ЦИН ≥ II. Микроинвазивный плоскоклеточный рак отличался наличием разрушения базальной мембраны с микроинвазией раковых клеток в подслизистый слой на глубину менее 3 мм.

СЭМС идентифицированы при использовании иммуногистохимической реакции на Oct-4, который экспрессируется во всех клетках сфероидов. В среднем данный маркер определяется в эпителии шейки матки при хроническом цервиците в 13.5% клеток, при ЦИН < II в 33.5% клетках, при ЦИН ≥ II в 43.75% клеток и при микроинвазивном раке в 48.5% клеток.

При гистологическом исследовании выявляли 3 типа СЭМС: 1 тип - небольших размеров, построенные из крупных эпителиальных клеток типа базальных, в центре, как правило, можно быть увидеть кровеносный сосуд; 2 тип - более крупных размеров, построенные из клеток с признаком атипизма, часто не имеющие сосудов; 3 тип - крупные и сливающиеся между собой, образованные резко атипичными раковыми клетками. При хроническом цервиците обнаруживались СЭМС 1 типа, при ЦИН < II – преобладали СЭМС 1 типа в сочетании с СЭМС 2 типа, при ЦИН ≥ II – СЭМС 2 типа, а при микроинвазивной карциноме – СЭМС 3 типа (в окружающей ткани с морфологией ЦИН<II и ЦИН≥II обнаруживались также СЭМС 2 типа).

При двойной окраске p16/Ki67 СЭМС 1 типа содержали клетки, экспрессирующие только Ki67, что наблюдалось при хроническом цервиците. В СЭМС 2 типа клетки экспрессировали одновременно оба маркера. При этом одновременная экспрессия p16/Ki67 определялась в 7.5% клеток СЭМС при ЦИН<II, и в 72,5 % клеток СЭМС при ЦИН≥II, а при микроинвазивной карциноме - в 55% (Рис.1).

p53 не обнаруживался в СЭМС 1 типа (Рис. 2 А, Б), выявлялся в 10% клеток СЭМС 2 типа (Рис. 2С) и в 70% клеток СЭМС 3 типа (Рис.

2Д.). В целом в эпителиальном пласте маркер не определялся при хроническом цервиците и при ЦИН<II, при ЦИН≥II в 7.5% клеток, а при микроинвазивном раке - в 52.5% всего эпителиального пласта.

Таким образом, на основании всех полученных данных и данных литературы [8, 12], было установлено, что процесс канцерогенеза в шейке матки связан с формированием СЭМС, которые могут быть разделены на 3 типа в соответствии с иммунофенотипом, участием в репаративных СЭМС процессах и опухолевом росте: репаративные, не экспрессирующие p16 и p53, неопластические, экспрессирующие p16 и p53 в единичных клетках, и раковые СЭМС с высокой экспрессией клетками p16 и p53.

В результате проведенного исследования установлено, что высокая экспрессия p53 (70,0%) позволяет проводить дифференциальный диагноз между ЦИН≥II и микроинвазивным раком шейки матки, что совпадает с данными других авторов. Согласно работам Wang N. [8], Alan Storey [15], при злокачественной трансформации, экспрессия белка p53 увеличивается. Нами получены новые данные о том, что p53 положительные клетки сосредоточены в основном в СЭМС 2 типа (10%) и в большей степени в СЭМС 3 типа (70%), относящихся к раковым СЭМС. Последнее может быть косвенным подтверждением развития злокачественной трансформации в клетках с признаками стволовости, экспрессирующих Oct-4, p16 и Ki-67.

Выводы

1. При патологии шейки матки на фоне ВПЧ инфекции обнаруживаются репаративные, неопластические и раковые СЭМС, участвующие в репаративных процессах и в опухолевом росте.

2. Репаративные СЭМС встречаются при хроническом цервиците и ЦИН<II, имеют мор-



Рис. 1. Экспрессия разных маркеров в сфероиде на фоне ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки.

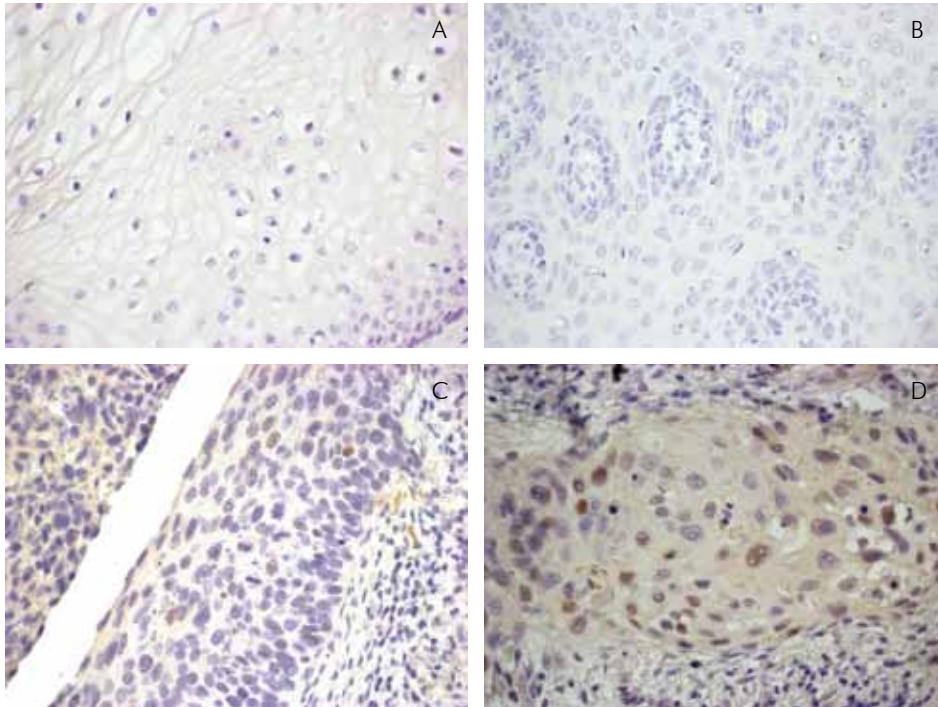


Рис. 2. Экспрессия p53 в СЭМС при ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки, иммунопероксидазная реакция, X600.

А. Отсутствие экспрессии p53 в клетках репаративных СЭМС при хроническом ВПЧ-ассоциированном цервиците.

В. Отсутствие экспрессии p53 в клетках репаративных СЭМС при ЦИН < II.

С. Экспрессия p53 в единичных клетках неопластических СЭМС при ЦИН \geq II.

Д. Экспрессия p53 в клетках раковых СЭМС при ВПЧ-ассоциированной микроинвазивной карциноме шейки матки.

фологические особенности: небольшие размеры, всегда формируются вокруг сосудов, построены из клеток типа базальных кератиноцитов, клеточный атипизм отсутствует, в клетках сфероидов имеется экспрессия Ki-67 при отсутствии экспрессии p16, отсутствует экспрессия p53.

3. Неопластические СЭМС встречаются при ЦИН < II, ЦИН \geq II и в окружающей ткани при плоскоклеточном раке шейки матки, имеют большие размеры, формируются вне зависимости от сосудов, построены из эпителиаль-

ных клеток с признаками атипии или из раковых клеток, отличаются высокой экспрессией Ki-67, p16, а также содержат p53.

4. Целесообразно выделять также и раковые СЭМС, отличающиеся от неопластических не только более крупными размерами, но и тенденцией к слиянию, а также высокой экспрессией p53.

5. Экспрессия онкомаркеров p53, p16 и Ki67 может быть использована в ранней дифференциальной диагностике предрака и плоскоклеточного рака шейки матки.

Литература:

1. Новик В.И. Скрининг рака шейки матки. Практическая онкология, 2010, 11(2): 66-73.
2. Jacobs MV, Snijders PJ, Voorhorst F J, et al. Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. Journal of clinical pathology, 1999, 52(7): 498-503.
3. Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. Nature, 2004, 432(7015): 324-31.
4. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature, 2001, 414(6859): 105-111.
5. Schlessinger D, Van Zant G. Does functional depletion of stem cells drive aging?. Mechanisms of

ageing and development, 2001, 122(14): 1537-53.

6. Crum CP. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host, and the stem cell. Modern Pathology, 2000, 13(3): 243-51.

7. Regezi J A, Zarbo R J, Regev E, et al. p53 protein expression in sequential biopsies of oral dysplasias and in situ carcinomas. Journal of oral pathology & medicine, 1995, 24(1): 18-22.

8. Wang N, Yao Q, Li X, et al. Detection of HPV and p53 gene expressions in cervical cancer tissue[J]. Medical Journal of Qilu, 2004, 20(2): 98-100,102.

9. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, et al. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. Cell, 1993, 75(3): 495-505.

10. Liu Y, He Y, Jin A, et al. Ribosomal protein–Mdm2–p53 pathway coordinates nutrient stress with lipid metabolism by regulating MCD and promoting fatty acid oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(23): E2414–E2422.
11. Vousden KH, Ryan KM. p53 and metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9(10): 691–700.
12. E.A. Kogan, PhD, ScD; N.M. Fayzullina, PhD; T.A. Demura, PhD; G.T. Sukhikh, PhD, ScD. Reparative Spheroids in HPV-Associated Chronic Cervicitis. Science Center of obstetrics, gynecology and perinatology n.a. acad. V.I. Kulakov Moscow, RF. *International Journal of BioMedicine* 2013; 3(3): 192–6.
13. Castle P.E., Sadorra M., Lau T., et al. Evaluation of a prototype real-time PCR assay for carcinogenic human papilloma virus (HPV) detection and simultaneous HPV genotype 16 (HPV16) and HPV18 genotyping // *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3344–47.
14. Коган Е.А., Файзуллина Н.М., Ли Ц. и др. Эффективность диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки с использованием комплекса методов: жидкостной цитологии, двойного иммуноокрашивания p16/Ki67 и ВПЧ тестирования // *Акушерство и гинекология*. 2014. №7. С. 43–47.
15. Storey A, Thomas M, Kalita A, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer. *Nature* 1998; 393(6682): 229–34.

Информация об авторах:

Коган Евгения Александровна – д.м.н., профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии ГБОУ Первый медицинский университет им. И.М.Сеченова. Тел.: 8-926-533-12-71.

Ли Дзьзя Дзинь – аспирант кафедры ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

Файзулина Нафиса Мануваровна – к.х.м., ст.н.с. ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова Минздрав России.

Козаченко Андрей Владимирович – в.н.с., доктор медицинских наук, ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова Минздрав России, Москва