

*А.А. Должиков, В.Н. Дмитриев,
Н.И. Жернакова, Е.В. Жернаков, И.А. Хамидех*

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
КЛИНИЧЕСКОЙ, ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЙ И
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
ПРЕДРАКОВЫХ ИЗМЕНЕНИЙ И РАКА ШЕЙКИ МАТКИ**

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

Резюме. Проведено патогистологическое исследование материала инцизионных биопсий и материала после операций диатермокоагуляции шейки матки, иммуногистохимическое исследование с выявлением экспрессии белка p16INK4a у 240 пациенток с плоскоклеточными изменениями шейки матки в возрасте 20-80 лет. Выявлены случаи расхождения между первичным патогистологическим диагнозом и результатами последующего иммуногистохимического исследования. Полученные результаты обосновывают необходимость адекватного и полного взятия материала применения этапных сопоставлений данных цитологического и гистологического исследований и использования иммуногистохимического или иммуноцитохимического определения экспрессии белка p16INK4a и маркера пролиферации Ki67 в пограничных случаях.

Ключевые слова: иммуногистохимическая диагностика, рак шейки матки, маркер пролиферации, цитологическое, гистологическое исследование.

Актуальность. Предраковые изменения и рак шейки матки (РШМ) являются одной из основных проблем онкогинекологии, занимая 5-е место в структуре онкологической заболеваемости женщин [2]. В России в 2009 году зарегистрирован 14351 случай РШМ, стандартизованный (на 100 000 населения) показатель составляет 13,4. Под наблюдением у онкологов состоит 159 774 женщин, пролеченных по поводу РШМ [6]. В разных регионах России стандартизованный показатель варьирует от 8,11 (в Пензенской области) до 30,74 (в Забайкальском крае). В Москве он составляет 9,77, в Санкт-Петербурге - 9,55. Масштабные эпидемиологические исследования проблемы в России немногочисленны. В популяционном исследовании, проведенном в Северо-Западном Федеральном округе России, приведены данные в динамике с 1980 по 2010 годы [6]. До 1995 года происходило снижение заболеваемости РШМ, затем показатели плавно повысились до уровня около 400 случаев в год (в 1980 году – 525) и стабильно остаются на этом уровне. Более существенно то, что изменилась возрастная структура заболеваемости. С 90-х годов она увеличилась в возрастной группе от 25 до 45 лет (стандартизованный показатель в возрасте 25 лет в 1980 году – 1,4; в 2009 году – 6,9), а в старших возрастных группах произошло снижение. Смертность от РШМ в г. Санкт-Петербурге за период с 1980 года значимо не снижалась, а к 2009 году возросла на 4,03% (среднегодовой прирост 0,14%). Такая картина, характеризующаяся не снижающейся и даже растущей смертностью на фоне снижения заболеваемости, свидетельствует о значительном увеличении доли лиц с поздними стадиями опухолевого процесса, о низкой эффективности массовых профилактических обследований для выявления предраковых изменений и преинвазивных форм РШМ. Указанное определяет актуальность проблемы ранней диагностики и определения прогноза предраковых

изменений шейки матки, к которым относятся цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN) различной степени. Решение проблемы возможно посредством совершенствования программ скрининга и повышения точности и диагностической информативности цитологических и гистологических методов, прежде всего, с учетом известной этиологической роли вирусов папилломы человека (ВПЧ) [3, 8, 9].

Целью нашего исследования явился анализ случаев с CIN и РШМ, диагностированных по результатам патоморфологического исследования, сопоставление результатов клинической диагностики, стандартного патоморфологического и иммуногистохимического исследования с выявлением маркера активной ВПЧ-инфекции – белка p16INK4a и маркера пролиферации – Ki67.

Материал и методы исследования. Работа основана на исследовании 240 случаев, направленных на выполнение иммуногистохимии по клиническим показаниям в течение 2011 – 2012 гг. При первичном патоморфологическом исследовании в 10 из них выявлены железистые и железисто-плоскоклеточные карциномы, в 1 наблюдении – ботриоидная рабдомиосаркома. Данные случаи исключены из анализа и, таким образом, проведено исследование 229 наблюдений плоскоклеточных изменений шейки матки. Возраст пациенток варьировал от 20 до 80 лет (в среднем 41,0 год). Проведено стандартное патогистологическое исследование материала инцизионных биопсий и материала после операций диатермоконизации шейки матки, а также иммуногистохимическое исследование по стандартным протоколам с выявлением экспрессии белка p16INK4a (поликлональные антитела, EpiTomix) и белка Ki67 (клон SP6, CellMarque). С применением таблиц MS Excel и программы Statistica 6.0 проведен статистический анализ. Определены показатели чувствительности и специфичности клинического и патоморфологического методов.

Полученные результаты и их обсуждение. В возрастной структуре группа 20-30 лет составила 50 (21,8%) больных, наибольшее число наблюдений (134; 58,5%) пришлось на возрастную группу 31 год – 50 лет, группа перименопаузы (после 51 года) составила 45 (19,7%) случаев. Клинические диагнозы были в целом представлены 4-мя группами: эрозии/псевдоэрозии шейки матки, дисплазии/лейкоплакия, подозрение на рак шейки матки, рак шейки матки. Градация патоморфологических и иммуногистохимических диагнозов для анализа была детализирована на 5 групп следующим образом: псевдоэрозии/нет CIN, CIN I, CIN II, CIN III и рак in situ, инвазивный рак. Группа с клиническими подозрениями на РШМ составила 70 случаев, в 59 клинически диагностированы дисплазии. Таким образом, суммарно предраковые изменения и рак шейки матки клинически выявлены в 129 (56,3%) случаев. По результатам патоморфологического исследования CIN III (включая рак in situ) выявлена у 97 пациенток, инвазивный рак у 58. По результатам иммуногистохимического исследования диагнозов CIN III было на 10 случаев меньше. Из данных первичных показателей видно, что имеется существенная гиподиагностика РШМ по клиническим результатам, составившая 16,7% случаев от всех патоморфологически верифицированных CIN III и инвазивных раков. В определенном числе случаев это

связано с формальным написанием направительного клинического диагноза при отправке материала на морфологическое исследование.

Анализ внутренней структуры диагнозов, их совпадений и расхождений мы провели в обозначенных выше возрастных группах, которые выделены с учетом принятых в настоящее время возрастных интервалов для скрининга РШМ. В возрасте до 30 лет почти в половине наблюдений был клинический диагноз «эрозия/псевдоэрозия шейки матки». При морфологической исследовании из этих 22 случаев в 6 (27,2%) диагностирована CIN III, подтвержденная последующим иммуногистохимическим исследованием. В группе с клиническим диагнозом «дисплазия» (9 пациенток) она подтверждена во всех случаях: 5 – CIN II, 4 – CIN III. При подозрении на РШМ морфологическое подтверждение получено в 5 наблюдениях из 8, однако по результатам иммуногистохимического исследования во всех 3-х случаях с патогистологическим диагнозом CIN III степень снижена до CIN II, а инвазивные карциномы подтверждены. Клинический диагноз «рак шейки матки» не подтвержден только в 1 наблюдении из 11. Расхождений между патогистологическими и иммуногистохимическими диагнозами не было. В целом, в данной возрастной группе CIN III и РШМ выявлены у 25 пациенток: у 19 – CIN III, у 6 – инвазивный рак, что составляет 16,1% от всех случаев CIN III/рак *in situ* и инвазивных карцином. Частота CIN III в данной возрастной группе составила 38,0%, инвазивных карцином – 12,0%.

В возрастной группе 31-50 лет частота CIN III составила 43,2%, инвазивных плоскоклеточных раков – 23,1% от общего числа пациенток данных возрастов. В общем числе наблюдений CIN III и инвазивные плоскоклеточные раки в данном возрастном интервале составили 57,4% от их общего числа. Более чем у половины пациенток с клиническими диагнозами эрозий, псевдоэрозий или дисплазий шейки матки патоморфологически выявлены CIN III или инвазивный плоскоклеточный рак (суммарно 40 наблюдений из 70). При клиническом подозрении на РШМ в 73,6% случаев диагностированы CIN III и инвазивные карциномы с преобладанием CIN III (19 наблюдений против 9). В группе же с клиническим диагнозом РШМ по результатам патоморфологического исследования CIN III и инвазивные плоскоклеточные раки выявлены с одинаковой частотой (15 и 14 случаев соответственно).

В возрастной группе 51 год и старше преобладали (у 86,6% пациенток) клинические диагнозы подозрения на рак шейки матки и РШМ, которые по результатам морфологического исследования подтверждены в 94,8% наблюдений (в 100% при однозначном клиническом диагнозе РШМ).

Расхождения между первичным патогистологическим диагнозом и результатами последующего иммуногистохимического исследования выявлены в 16 случаях (6,9% от общего числа). Они представлены 4-мя категориями: нет рака – есть рак – 1, есть рак – нет рака – 2, инвазивный рак – неинвазивный рак – 5, неинвазивный рак – инвазивный рак – 8. Как видно, наибольшее число расхождений приходится на неверную оценку наличия/отсутствия инвазивного роста с гиподиагностикой инвазии. Одним из очевидных объяснений этому является недооценка инвазивного компонента, который на

фоне воспалительного инфильтрата или за счет неотчетливых границ опухолевых структур может быть неразличим, но выявляется при иммуногистохимическом исследовании, в частности, по экспрессии белка p16INK4a. С другой стороны, при последующем иммуногистохимическом исследовании выполняется дорезка с блока с выявлением структур, которые не попадают в первичные гистологические препараты. В гипердиагностике РШМ, особенно после ранее выполненных инцизионных биопсий или конизации шейки матки имеет значение переоценка изменений многослойного плоского эпителия регенераторного характера. Такие случаи единичные, и наш опыт свидетельствует, что существенную помощь в данных ситуациях оказывает выявление в дополнение к экспрессии p16INK4a и Ki67 маркера базальных эпителиоцитов – p63 и цитokerатина 17.

В динамике наблюдения за пациентками с повторными исследованиями биопсийного и операционного материала этапные расхождения диагнозов имелись в 6 наблюдениях, которые представлены двумя категориями. У половины пациенток с первоначальным диагнозом по операционному материалу (диатермоконизации) CIN III/рака *in situ* при последующей биопсии диагностирована CIN II с экспрессией белка p16INK4a – признаком активной ВПЧ-инфекции. В 3-х других наблюдениях в течение года с выполнением от 1 до 4-х промежуточных биопсий наблюдалась прогрессия от CIN II до инвазивного РШМ. Эти пациентки составили всего 1,3% всех наблюдений. Однако с учетом длительной в абсолютном большинстве случаев прогрессии CIN II в инвазивный рак не исключен элемент гиподиагностики на этапах обследования, в том числе вследствие дефектов взятия материала.

Чувствительность клинических методов диагностики РШМ оказалась низкой – только 43,2%, но отличается высокой специфичностью – 91,8%. Патоморфологическая диагностика (при сопоставлении с дополненной иммуногистохимией как эталонным методом) отличается высокой чувствительностью – 93,0%, но несколько меньшей специфичностью – 75,2%. Таким образом, отрицательный результат патоморфологического и иммуногистохимического исследования с высокой вероятностью исключают вероятность заболевания при соблюдении условия адекватности взятия и репрезентативности материала. С другой стороны, при наличии явных клинических признаков РШМ вероятность его фактического наличия высокая.

В аспекте обсуждения полученных нами результатов заслуживают внимания данные опубликованные Г.А. Раскиным и соавт. [7]. Авторами проведено сравнительное исследование диагностики цервикальных неоплазий традиционным цитологическим методом, методом жидкостной цитологии в сочетании с иммуноцитохимическим исследованием белка p16INK4a и ПЦР на вирусы высокого онкогенного риска. Из 199 исследованных случаев по результатам жидкостной цитологии в 38 выявлена легкая дисплазия (CIN I), в 22 - умеренная (CIN II), в 10 - тяжелая (CIN III), в 8 наблюдениях выявлено подозрение на плоскоклеточный рак *in situ*. При ПЦР анализе установлено, что при CIN III и карциноме *in situ* ВПЧ инфекция выявляется в 100% случаев, однако и при отсутствии дисплазии ее частота составляет 73%, отличаясь от CIN I только на 5%, а от

CIN II – на 16%. Частота положительной реакции на p16INK4a оказалась иной: в наблюдениях без дисплазии реакции не было ни в одном случае, при CIN I реакция позитивная в 16%, при CIN II – уже в 64%, при CIN III – 90%, при карциноме *in situ* реакция положительная в 100% наблюдений. В 3-х случаях CIN I с позитивной реакцией на p16INK4a при последующем гистологическом исследовании был выявлен рак *in situ*, а в 2-х случаях CIN II также с положительной реакцией на p16INK4a выявлен инвазивный рак. Полученные данные свидетельствуют о высокой диагностической значимости сочетания жидкостной цитологии и иммуноцитохимического исследования экспрессии белка p16INK4a, что позволяет рекомендовать данную технологию в практику скрининга РШМ.

Использование иммуноцитохимических методов при диагностике предраковых изменений и рака шейки матки не ограничивается только определением экспрессии белка p16INK4a. Важным является определение пролиферативной активности клеток плоского эпителия и ее распределения в толще эпителиального пласта. Для этих целей в настоящее время наилучшим является использование реакции на белок Ki67 [5]. Белок Ki-67 является ценным маркером клеточной пролиферации и широко используется в иммуногистохимической диагностике многих опухолей. При дифференциальной диагностике CIN и инвазивных карцином шейки матки он является вторым необходимым маркером наряду с определением экспрессии белка p16INK4a [1]. Экспрессия Ki-67 определяется в поздней G1, S, G2 и M фазах клеточного цикла, маркируя, таким образом, весь пролиферативный пул в составе тканей. Однако актуальным остается вопрос о количественных показателях, которые могли бы служить диагностическими и прогностическими критериями, а также связи с другими молекулярно-биологическими характеристиками неопластических клеток. Группой авторов из РОНЦ им. Н.Н. Блохина [4] на 52 случаях CIN различной степени изучена роль оценки экспрессии Ki-67, ангиогенного фермента – тимидин фосфорилазы, и индуцирующего апоптоз белка-онкосупрессора PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog). Выявлена прямая зависимость индекса Ki-67 от степени CIN: в нормальном эпителии он не превышал 7%, по мере увеличения степени CIN происходило увеличение количества Ki-67-позитивных клеток: при CIN I до 18%, при CIN II до 57%, при CIN III до 87%. Уровень расположения Ki-67-позитивных клеток также прямо связан со степенью CIN. В норме они обнаруживаются только в базальном слое, при CIN I не выходят за пределы 1/3 толщины эпителиального пласта, при CIN II находится в пределах его 1/2. Авторами установлена прямая корреляция и сходный характер локализации экспрессии Ki-67 и тимидин фосфорилазы. В нормальном эпителии, при CIN I и CIN II во всех клетках плоского эпителия выявлялась ядерная экспрессия PTEN, при CIN III в 15% случаев выявлена ее утрата. С персистенцией ВПЧ высокого онкогенного риска это явление не связано. Поэтому в отличие от экспрессии Ki-67 и тимидин фосфорилазы содержание PTEN пока не является надежным маркером степени неоплазии, хотя его утрата может быть связана с потенциальным утяжелением CIN до преинвазивного и инвазивного рака.

Выводы. Полученные нами результаты и их сопоставление с имеющимися литературными данными свидетельствуют, что для успешной диагностики предраковых изменений и неинвазивного рака шейки матки помимо очевидной необходимости организованного скрининга важными методическими составляющими являются:

адекватность и полнота взятия материала с учетом возрастной динамики локализации зоны трансформации;

применение этапных сопоставлений данных цитологического и гистологического исследований;

применение иммуногистохимического, по возможности иммуноцитохимического определения экспрессии белка p16INK4a и маркера пролиферации Ki67 в пограничных случаях.

Литература.

1. Волгарева Г.М., Завалишина Л.Э., Франк Г.А. [и др.]. Экспрессия белкового маркера p16INK4a в раке шейки матки // Архив патологии. – 2002. – Т.64, №1. – С. 22 – 24.
2. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2008 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2010. – Т. 21. – Прил. 1. – 160 с.
3. Кондриков Н.И. Патология матки. – М.: Практическая медицина, 2008. – 334 с.
4. Короленкова Л.И., Степанова Е.В., Ермилова В.Д. [и др.] Экспрессия Ki-67, тимидин фосфорилазы (ТФ) и PTEN в интраэпителиальных неоплазиях шейки матки // Вопросы онкологии.- 2011. – Т. 57. - №2. – С. 199 – 203.
5. Кузнецова М.Е., Пожарисский К.М., Винокуров В.Л. [и др.]. Экспрессия Ki-767 как показатель эффективности лучевой терапии и исхода плоскоклеточного местнораспространенного рака шейки матки (иммуногистохимическое исследование) // Вопросы онкологии. – 2007. – Т. 53, №2. – С. 175 – 180.
6. Мерабишвили В.М., Лалианци Э.И., Субботина О.Ю. Рак шейки матки: заболеваемость, смертность (популяционное исследование) // Вопросы онкологии. – 2012. – Т. 58. - №1. – С. 41 – 44.
7. Раскин Г.А., Петров С.В., Орлова Р.В. [и др.]. Эффективность использования жидкостной цитологии в сочетании с иммуноцитохимическим исследованием p16ink4a в сравнении с традиционной цитологией и ПЦР-анализом ВПЧ высокого онкогенного риска в диагностике дисплазий и рака шейки матки // Вопросы онкологии. – 2009. – Т. 55, №2. – С. 192 – 200.
8. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки: В помощь практическому врачу. – Изд. 2-е, испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 192 с.
9. Титмуш Э., Адамс К. Шейка матки. Цитологический атлас /Пер. с англ. под ред. Н.И. Кондрикова. – М.: Практическая медицина, 2009. – 251 с.

AA Dolzhikov, VN Dmitriev, NI Zhcherbakova, EV Zhernakov IA Hamideh

COMPARATIVE ANALYSIS

CLINICAL, PATHOMORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL DIAGNOSIS PRECANCEROUS CHANGES AND CERVICAL CANCER

Belgorod State University

Abstract: A histopathological study material and incisional biopsy material after operations of cervical diatermokonizatsii, immunohistochemistry with detection of p16INK4a protein expression in 240 patients with squamous cervical changes in the age of 20-80 years. Revealed cases of discrepancy between the primary histopathological diagnosis and results of subsequent immunohistochemistry results obtained justify the need for adequate and full use of the material taking landmark comparison of data cytological and histological studies and the use of

immunohistochemistry or immunocytochemistry the expression of p16INK4a protein and Ki67 proliferation marker in borderline cases.

Keywords: immunogitohimicheskaya diagnosis of cervical cancer, the proliferation of the marker, cytological, histological examination.

References:

1. Volgareva G.M., Zavalishina L.Je., Frank G.A. [i dr.]. Jekspressija belkovogo markera p16INK4a v rake shejki matki // Arhiv patologii. – 2002. – T.64, №1. – S. 22 – 24.
2. Davydov M.I., Aksel' E.M. Statistika zlokachestvennyh novoobrazovanij v Rossii i stranah SNG v 2008 g. // Vestnik RONC im. N.N. Blohina RAMN. – 2010. – T. 21. – Pril. 1. – 160 s.
3. Kondrikov N.I. Patologija matki. – M.: Prakticheskaja medicina, 2008. – 334 s.
4. Korolenkova L.I., Stepanova E.V., Ermilova V.D. [i dr.] Jekspressija Ki-67, timidin fosforilazy (TF) i PTEN v intrajepitelial'nyh neoplazijah shejki matki // Voprosy onkologii.- 2011. – T. 57. - №2. – S. 199 – 203.
5. Kuznecova M.E., Pozharisskij K.M., Vinokurov V.L. [i dr.]. Jekspressija Ki-767 kak pokazatel' jeffektivnosti luchevoj terapii i ishoda ploskokletochnogo mestnorasprostranennogo raka shejki matki (immunogitohimicheskoe issledovanie) // Voprosy onkologii. – 2007. – T. 53, №2. – S. 175 – 180.
6. Merabishvili V.M., Lalianci Je.I., Subbotina O.Ju. Rak shejki matki: zbolevaemost', smertnost' (populjacionnoe issledovanie) // Voprosy onkologii. – 2012. – T. 58. - №1. – S. 41 – 44.
7. Raskin G.A., Petrov S.V., Orlova R.V. [i dr.]. Jeffektivnost' ispol'zovanija zhidkostnoj citologii v sochetanii s immunocitohimicheskim issledovanijem p16ink4a v sravnenii s tradicionnoj citologiej i PCR-analizom VPCh vysokogo onkogenogo riska v diagnostike displazij i raka shejki matki // Voprosy onkologii. – 2009. – T. 55, №2. – S. 192 – 200.
8. Rogovskaja S.I. Papillomavirusnaja infekcija u zhenshhin i patologija shejki matki: V pomoshh' prakticheskomu vrachu. – Izd. 2-e, ispr. i dop. – M.: GJeOTAR-Media, 2008. – 192 s.
9. Titmushsh Je., Adams K. Shejka matki. Citologicheskij atlas /Per. s angl. pod red. N.I. Kondrikova. – M.: Prakticheskaja medicina, 2009. – 251 s.

Сведения об авторах: А.А. Должиков-д.м.н., профессор, заведующий кафедрой анатомии и гистологии человека; В.Н. Дмитриев; Н.И. Жернакова-д.м.н., профессор; Е.В. Жернаков; И.А. Хамидех.