

О.В. Лесничая¹, Д.М. Семенов¹, Ю.В. Крылов²

Морфологические и иммуногистохимические параллели герпетической инфекции при тяжелой цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки

УО «Витебский государственный медицинский университет»*

Статья посвящена изучению морфологических изменений слизистой шейки матки при тяжелой цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки у женщин, инфицированных вирусом простого герпеса. В работе представлен комплексный клиничко-морфологический анализ герпетического поражения с использованием иммуногистохимического и морфометрического методов исследования. Выявлено, что наличие герпетического поражения отягощает течение плоскоклеточного рака шейки матки и является неблагоприятным прогностическим маркером.

Ключевые слова: вирус простого герпеса, цервикальная интраэпителиальная неоплазия, рак шейки матки

Summary.

Актуальность. В структуре злокачественных опухолей репродуктивной системы рак шейки матки (РШМ) занимает второе место [1]. По данным Белорусского канцер-регистра, в республике наблюдается рост заболеваемости раком шейки матки с 15,2 в 1999-2003 году, до 15,8 в 2004-2008 году на 100 тыс. женского населения [2]. Причем увеличение заболеваемости отмечается в основном в группе женщин детородного возраста.

Общеизвестна прямая связь между вирусами папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска и развитием предраковых состояний и РШМ.

Доказано, что при папилломавирусной инфекции риск прогрессии цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН) II степени в рак *in situ* равен 1% за год наблюдения, а риск прогрессии ЦИН II в ЦИН III за два года равен 16% [3].

Однако, считая вирус папилломы человека главным фактором развития предрака и рака шейки матки, нельзя не учитывать другие возможные влияния.

Существует мнение, что рост клеток, иммортализованных вирусом папилломы человека (ВПЧ) 16/18, может изменяться под действием вируса простого герпеса (ВПГ) [4]. В ряде исследований показано, что инфекция ВПГ 2 предшествует ВПЧ, в других, имеются данные о том, что ВПГ 2 действует на поздних стадиях канцерогенеза [5]. Также имеются указания на увеличение риска возникновения ЦИН при наличии комбинации вирусов ВПЧ-16 и *herpes simplex virus-2* [6]. Эти данные свидетельствуют о том, что и ВПЧ, и ВПГ, особенно ВПГ 2, способны индуцировать плоскоклеточную карциному, однако прямых доказательств этиологической роли ВПГ в развитии рака шейки матки нет.

Для прогнозирования течения предопухолевых и опухолевых процессов имеет большое значение определение баланса пролиферативной активности и апоптоза. В основе иммуногистохимической оценки пролиферации лежит использование антител к Ki-67 [7]. Нарушения механизма развития апоптоза могут наступать тогда, когда ключевой ген этого процесса *wt p53* теряет свою

функцию. Это может наступить в результате мутации гена wt p53 с образованием мутантного онкопротеина – mt p53, что наблюдается в условиях патологии или в результате блокады wt p53 другими протеинами, к которым, в первую очередь, относится bcl-2. Установлено, что онкопротеин bcl-2 является одним из главных ингибиторов апоптоза [7]. Выраженность процессов пролиферации и апоптоза при дисплазиях и РШМ (с учетом экспрессии Ki-67, p53, Bcl-2) активно обсуждается в литературе, но характеризуется отсутствием цифровых данных или их большим разбросом и противоречивостью [8]. Кроме того, до сих пор в литературе нет однозначных данных о прогностическом влиянии герпетического поражения шейки матки на особенности экспрессии указанных маркеров.

Цель исследования – установить влияние поражения вирусом простого герпеса 2 типа на течение тяжелой цервикальной интраэпителиальной неоплазии и рака шейки матки.

Материалы и методы исследования. Исследовано 45 биоптатов женщин, состоявших на учете в Витебском областном клиническом онкодиспансере. Средний возраст женщин составил $46,2 \pm 1,88$ года. Для клинической характеристики пациенток с дисплазией и раком шейки матки были использованы данные канцер-регистра и данные амбулаторных карт Витебского областного онкологического диспансера.

Основой для анализа предраковых состояний шейки матки служила Гистологическая классификация опухолей женского полового тракта Всемирной организации здравоохранения [9]. Гистологический диагноз ЦИН устанавливался на основании следующих морфологических критериев: изменение размеров и формы клеток и ядер, появление гиперхромных ядер, увеличение числа митозов, нарушение ядерно-цитоплазматического соотношения [10]. Учитывая, что ЦИН III является собирательным понятием, объединяющим дисплазию III степени и cancer in situ, к цервикальной интраэпителиальной неоплазии III степени (тяжелой дисплазии многослойного плоского эпителия) были отнесены случаи, когда патологический процесс локализовался в верхней трети эпителия, но не поражал всю толщину эпителиального пласта [10]. Критерием для постановки диагноза карцинома in situ являлось поражение всего пласта с наличием выраженной атипии клеток и ядер, митозов, в том числе патологических, на разных уровнях эпителия [11]. Светооптическое заключение о ВПГ-инфекции ставилось на основании внутриядерных включений I и II типа, наличия феноменов «тутовой ягоды», и «пустых ядер» [12].

Для морфологической характеристики из архивных парафиновых блоков делались срезы толщиной 5 мкм, которые депарафинировались в ксилоле, спиртах и окрашивались гематоксилином и эозином.

Оценка морфологических параметров проводилась с использованием светового оптического микроскопа «Carl Zeiss» AxioStar 40 при увеличении 100, 200 и 400. При исследовании срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, оценивались такие морфологические параметры как степень ЦИН, степень дифференцировки рака, наличие герпетических включений.

Для выявления пролиферативной активности клеток использовалось

иммуногистохимическое окрашивание гистологических срезов с применением моноклональных антител к ядерному протеину Ki-67, который экспрессируется при активных фазах клеточного цикла. Для выявления мутантного p53 протеина (являющегося продуктом мутации опухолевого гена-супрессора p53, который в норме блокирует прохождение клеток по митотическому циклу и индуцирует апоптоз) использовали моноклональные мышинные антитела. Для выявления подавления апоптоза использовали антитела к Bcl-2 онкопротеину. Антигены ВПГ II типа выявлялись с помощью поликлональных кроличьих антител (фирма «ДАКО»). Из парафиновых блоков готовились срезы толщиной 5 микрон, переносились на предметные стекла, покрытые L-полилизин. Срезы в вертикальном положении высушивали 18 часов при комнатной температуре, помещали в термостат на 30 мин. при температуре 60°C [13]. После этого проводилась депарафинация. Затем предметные стекла со срезами переносились в цитратный буфер pH 6.0, и помещались в водяную баню при температуре 98°C на 30 мин. С первичными антителами срезы инкубировались в течение 30 минут при комнатной температуре. В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител LSAB фирмы «ДАКО» с диаминбензидином. Ставились положительные контроли.

Для морфометрического исследования микропрепараты фотографировали в 5 полях зрения (объектив 40) с разрешением 2592 на 1944 пикселей при помощи микроскопа AxioStar 40 и цифровой камеры Canon Power Shot A95. Снимки конвертировали в бинарный вид и проводили морфометрический подсчет при помощи анализатора изображений WCIF ImageJ и Aperio Image Scope.

Степень экспрессии ВПГ 2 в ядрах и цитоплазме пораженных клеток оценивалась полуколичественным методом [+ , ++ , +++]. Для оценки степени окрашивания использовалась программа Aperio Image Scope, автоматически измеряющая интенсивность коричневой окраски продуктов реакции DAB-хромогена и разделяющая интенсивность на 3 уровня [14]. Резко выраженная экспрессия оценивалась как [+++], умеренно выраженная – [++], слабо выраженная – [+], 0 – отсутствие экспрессии.

Результаты исследования и обсуждение. В исследованных нами 22 биоптатах шейки матки у женщин с верифицированным диагнозом цервикальная интраэпителиальная неоплазия III степени, у 14 (64±0,11%) пациенток была выявлена тяжелая дисплазия многослойного плоского эпителия и у 8 (36±0,11%) – cancer in situ. При микроскопическом исследовании биоптатов женщин с тяжелой ЦИН установлен высокий уровень инфицированности вирусом простого герпеса. Так, герпетические включения имелись в 9 образцах шейки матки с тяжелой дисплазией и в 5 биоптатах с cancer in situ, что составило 64±0,13% и 63±0,18% соответственно. В 5 (36±0,13%) случаях с дисплазией МПЭ и в 3 (38±0,18%) – с раком in situ морфологических признаков герпетического поражения обнаружено не было (таблица 1).

Таблица 1 – Распределение больных с ЦИН III в зависимости от наличия светооптических признаков герпеса

ЦИН III			
Дисплазия III (n=14)		Cancer in situ (n=8)	
абс. (% ±m)		абс. (% ±m)	
Количество больных с герпетическими включениями	Количество больных без герпетических включений	Количество больных с герпетическими включениями	Количество больных без герпетических включений
9 (64±0,13)	5 (36±0,13)	5 (63±0,18)	3 (38±0,18)

В исследованных нами 23 биоптатах шейки матки у женщин с верифицированным раком шейки матки преобладали случаи со степенью злокачественности Грейд II (18 женщин (78±0,09%)), у 16 пациенток (70±0,1%) имело место вовлечение в патологический процесс более одной локализации, у 8 женщин (35±0,1%) наблюдались лимфогенные и гематогенные метастазы. Анализ структуры онкологической патологии свидетельствует о достаточно агрессивном течении рака шейки матки. Только у 5 пациенток (22±0,09%) имела место высокая степень дифференцировки (Грейд I) и у 7 (30±0,1%) – поражение ограничивалось только экзоцервиксом. При светооптическом изучении биоптатов с раком шейки матки также установлена высокая частота герпетической инфекции. Так, морфологические признаки герпетического поражения были выявлены в 11 биоптатах, что составило 48±0,11% случаев, в 12 (52±0,11%) биоптатах включения вируса простого герпеса отсутствовали. Сформированные по наличию инфицированности вирусом простого герпеса группы больных раком шейки матки были проанализированы клинически по следующим критериям: наличие метастазов, степень дифференцировки опухоли, распространенность процесса (таблица 2).

Таблица 2 – Анализ герпетического поражения при клинико-морфологических особенностях рака шейки матки

Клинико-морфологические критерии	Рак шейки матки абс.(%)	
	С наличием герпетических включений (n=11)	Без герпетических включений (n=12)
Наличие метастазов	3 (27%)	6 (50%)
Поражение только экзоцервикса	3 (27%)	4 (33%)
Поражение более 1 локализации	8 (73%)	8 (67%)
Грейд I	1 (9%)	4 (33%)
Грейд II	10 (91%)	8 (67%)

Установлены следующие закономерности. В группе больных раком шейки матки со светооптическими признаками герпетического поражения статистически значимо чаще ($p < 0,05$) преобладала более низкая степень дифференцировки (Грейд II, плоскоклеточный рак с тенденцией к ороговению). Также в данной группе преобладало ($p < 0,05$).

Выявление герпетического поражения с помощью поликлональных антител к ВПГ 2 в исследуемом материале показало, что экспрессия в 4 случаях из 45 ($9 \pm 0,04\%$) отсутствовала. В остальных биоптатах наблюдалась положительная реакция от слабой до выраженной экспрессии. Сравнительный анализ светооптического и иммуногистохимического исследования инфицированности вирусом простого герпеса при ЦИН III шейки матки представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Сравнительный анализ светооптического и иммуногистохимического методов исследования ВПГ 2 при ЦИН III шейки матки

Выраженность экспрессии ВПГ 2 антигенов	Светооптические признаки наличия ВПГ включений абс. (%±m)		Светооптически ВПГ включения отсутствуют абс. (%±m)		Всего абс. (%±m)	
	cancer in situ	дисплазия III ст.	cancer in situ	дисплазия III ст.	cancer in situ	дисплазия III ст.
-	-	-	-	1 (7,1±0,07)	-	1 (7,1±0,07)
+	1 (12,5±0,13)	2 (14,3±0,1)	-	2 (14,3±0,1)	1 (12,5±0,13)	4 (28,6±0,13)
++	2 (25±0,16)	2 (14,3±0,1)	-	1 (7,1±0,07)	2 (25±0,16)	3 (21,4±0,11)
+++	2 (25±0,16)	5 (35,8±0,13)	3 (37,5±0,18)	1 (7,1±0,07)	5 (62,5±0,18)	6 (42,9±0,14)
Всего случаев	5 (62,5±0,18)	9 (64,2±0,13)	3 (37,5±0,18)	5 (35,8±0,13)	8	14

Примечание: «-» - ИГХ реакция отрицательная; «+» - слабо выраженная положительная;

«++» - умеренно выраженная положительная; «+++» - резко выраженная положительная

Согласно полученным данным, из 22 случаев с цервикальной интраэпителиальной неоплазией иммуногистохимическая реакция была негативной в одном случае (5±4,6%). Экспрессия ВПГ 2 антигенов была выявлена в 100% случаев при cancer in situ (CIS) и в 92,9±0,07% случаев при тяжелой дисплазии. При морфометрическом определении выраженности экспрессии, в группе CIS преобладала умеренно и резко выраженная положительная реакция (25±0,16% и 63±0,18% соответственно), в группе тяжелой дисплазии превалировала слабо и резко выраженная положительная реакция (28,6±0,13% и 42,9±0,14% соответственно). Таким образом, в обеих группах большая часть (5 из 8 – 63±0,18% – в материале с тяжелой дисплазией и 6 из 14 – 42,9±0,14% – в образцах с cancer in situ) биоптатов была с выраженной экспрессией ВПГ антигенов.

Полученные данные свидетельствуют о более высокой чувствительности и информативности иммуногистохимического исследования для определения герпетического поражения по сравнению со светооптической диагностикой в препаратах окрашенных рутинным методом (гематоксилин-эозин). Причина

существенной разницы в диагностике заключается в трудностях светооптического определения герпетических включений при неопластических поражениях шейки матки в связи с клеточной атипией и полиморфизмом клеток, которые «вуалируют» косвенные морфологические признаки инфекции. С целью установления взаимосвязи экспрессии герпеса с особенностями пролиферативной активности клеток и апоптоза при цервикальной интраэпителиальной неоплазии, 21 случай с положительной экспрессией ВПГ 2 антигенов был разделен на три группы. В первую группу вошло 5 (24±0,09%) случаев со слабо выраженной экспрессией вирусных антигенов. Вторую группу также составило 5 (24±0,09%) случаев с умеренно выраженной реакцией. В третью группу вошло 11 (52±0,11%) биоптатов ЦИН III с выраженной экспрессией антигенов вируса простого герпеса 2 типа. При анализе среднего количества Ki-67 позитивных клеток было выявлено нарастание пролиферативной активности с увеличением выраженности экспрессии герпетического поражения. В отличие от Ki-67, количество bcl-2 положительных клеток снижалось при нарастании экспрессии антигенов вируса. Экспрессия p53 была приблизительно одинаковой во всех группах (таблица 4).

Таблица 4 – Среднее количество Ki-67, bcl-2 и p53 положительных клеток при различной степени выраженности экспрессии антигенов вируса ВПГ 2 типа в биоптатах шейки матки с ЦИН III

Выраженность экспрессии	Ki-67	Bcl-2	p53
+	228,40±51,78	232,80±116,67	66,90±35,17
++	303,00±78,18	58,80±10,29	64,20±30,44
+++	493,73±68,17	53,18±20,78	87,42±29,27
Среднее групп	385,14±48,14	97,29±32,46	77,01±18,26

Примечание: «+» - слабо выраженная экспрессия; «++» - умеренно выраженная экспрессия; «+++» - выраженная экспрессия

Применив непараметрический критерий Краскела-Уоллиса, мы провели сравнения между указанными группами в зависимости от степени экспрессии исследуемых маркеров. Было обнаружено, что пролиферативная активность статистически значимо связана с выраженностью экспрессии герпетического поражения (тест Краскела-Уоллиса $H=6,106$; $p=0,04$). При парном сравнении с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, количество Ki-67 позитивных клеток было статистически значимо выше в группе с выраженной экспрессией антигенов простого герпеса ($p=0,02$).

Использование непараметрического критерия Краскела-Уоллиса также показало статистически значимую связь между слабо позитивной реакцией с антигенами ВПГ 2 и выраженной экспрессией ингибитора апоптоза bcl-2 ($H=6,393$; $p=0,04$).

Парное сравнение групп с помощью критерия Манна-Уитни, показало, что в группе пациентов со слабой позитивной реакцией с вирусом простого герпеса экспрессия ингибитора апоптоза статистически значимо выше, чем в группе с выраженной позитивной реакцией ($p=0,03$). Парное сравнение групп не выявило статистически значимых различий в уровне накопления мутантного p53 при герпетическом поражении различной степени выраженности.

Таким образом, выраженная экспрессия антигенов вируса простого герпеса 2 типа сопровождается повышением пролиферативной активности при ЦИН III шейки матки ($p=0,04$), в то время как при слабо выраженной положительной реакции с ВПГ 2 наблюдается высокий уровень экспрессии ингибитора апоптоза bcl-2 ($p=0,04$). Полученные данные свидетельствуют о коканцерогенном значении герпетического поражения при предраковых процессах шейки матки. У 9 женщин с выявленными метастазами рака шейки матки иммуногистохимически герпес отсутствовал в 1 ($11,1\pm 0,11\%$) случае. В 8 случаях ($88,9\pm 0,11\%$) экспрессия антигенов вируса герпеса была умеренной и выраженной позитивной. В группе больных, где метастазы отсутствовали, герпес не был обнаружен в $14\pm 0,1\%$ случаев. В герпесоположительных цервикобиоптатах этих пациентов преобладала слабая позитивная реакция ($43\pm 0,14\%$). Таким образом, частота выявления герпеса в группах с наличием и отсутствием метастазов статистически значимых различий не имела ($p>0,05$). Однако, при сравнении выраженности поражения в обеих группах, в случаях без метастатического поражения статистически значимо чаще наблюдалась слабо позитивная экспрессия ВПГ 2 антигенов ($p<0,01$). При герпетическом поражении статистически значимо чаще наблюдалась более низкая степень дифференцировки рака ($p<0,001$).

Морфометрический анализ иммуногистохимического исследования выраженности экспрессии ВПГ 2 антигенов показал, что у больных с плоскоклеточным раком, ограниченным одной локализацией, преобладает слабopоложительная реакция ($67\pm 0,21\%$). В биоптатах женщин, у которых плоскоклеточный рак распространялся за пределы одной локализации, преобладала выраженная положительная реакция ($86\pm 0,14\%$). Таким образом, степень выраженности экспрессии антигенов герпеса коррелирует с распространенностью процесса ($p<0,05$).

Выводы.

1. В группе больных раком шейки матки со светооптическими признаками герпетического поражения статистически значимо чаще ($p<0,05$) имеет место более низкая степень дифференцировки (Грейд II, плоскоклеточный рак с тенденцией к ороговению), что подтверждается иммуногистохимически и морфометрически ($p<0,001$).
3. Наличие герпетического поражения отягощает течение плоскоклеточного рака шейки матки, способствуя снижению степени его дифференцировки и выходу за пределы одной локализации ($p<0,05$).
4. Установлена более высокая чувствительность и информативность иммуногистохимического исследования для определения герпетического поражения по сравнению со светооптической диагностикой.

5. Выявлена связь между герпетическим поражением и метастатическим потенциалом опухоли. При сравнении выраженности герпетического поражения в биоптатах больных с наличием метастазов и без метастатического поражения, у последних статистически значимо чаще наблюдалась слабо позитивная экспрессия ВПГ 2 антигенов ($p < 0,01$).
6. Морфометрический анализ иммуногистохимического исследования выраженности экспрессии ВПГ 2 антигенов показал, что степень выраженности экспрессии коррелирует с распространенностью опухолевого процесса ($p < 0,05$).
7. Установлено, что выраженная экспрессия антигенов вируса простого герпеса 2 типа сопровождается повышением пролиферативной активности при ЦИН III шейки матки ($p = 0,04$), в то время как при слабо выраженной положительной реакции с ВПГ 2 наблюдается более высокий уровень экспрессии ингибитора апоптоза bcl-2 ($p = 0,04$). Полученные данные свидетельствуют о коканцерогенном влиянии герпетического поражения при предраковых процессах шейки матки. Таким образом, выявление ВПГ 2 следует относить к неблагоприятным прогностическим маркерам.

Литература

1. Эпителиальные дисплазии шейки матки (диагностика и лечение): рук. для врачей / Ю. И. Подистов [и др.]. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 136 с.
2. Злокачественные новообразования в Беларуси / С. М. Поляков [и др.]; под ред. И. В. Малаховой, И. В. Залуцкого. Минск: РНПЦ М.Т., 2009. 205 с.
3. Holowaty, P. Natural history of dysplasia of the uterine cervix / P. Holowaty [et al.] // J Natl Cancer Inst. 1999, Feb, 3; 91(3):252–8.
4. Wingo, P. A. Cancer Statistics / P. A. Wingo, T. Tong, S. Bolden // CA Cancer J. Clin. 1995. Vol. 45. P. 8–30.
5. Macnab, J.C.M. Herpes simplex virus and human cytomegalovirus: their role in morphological transformation and genital cancers / J.C.M. Macnab // J. Gen. Virol. 1987. Vol. 68. P. 2525–2550.
6. Padilla Cruz, A. P. Low grade surveillance or treatment / A. P. Padilla Cruz // In abstract book: 9th World Congress Cervical Pathology and Colposcopy, Australia. Sydney, 1996. P. 110.
7. Петров, С. В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / С. В. Петров, Н. Г. Райхман; под ред. С. В. Петрова, Н. Г. Райхмана. Казань, 2000. 287 с.
8. Роговская, С. И. Апоптоз при патологии шейки матки ассоциированный с вирусом папилломы человека / С. И. Роговская. // Гинекология. 2005. № 4. С. 48–53.
9. Histological typing of female genital tract tumors. WHO, 2nd ed. / Scally R.E. [et al.]. Berlin, Heidelberg, 1994.
10. Кондриков, Н. И. Патология матки: иллюстрир. рук. / Н. И. Кондриков. М.: Практическая медицина, 2008. 334 с.
11. Железнов, Б. И. Ультраструктура эпителия шейки матки при дисплазии / Б. И. Железнов, Л. С. Ежова, Л. А. Беляева // Арх.патологии. 1989. Вып. 6. С. 56–62.

12. Недзьведь, М. К. Морфологическая характеристика герпетической инфекции у человека / М. К. Недзьведь, С. А. Гузов // Актуальные проблемы биологии и медицины (сб. тр.в сотрудников МГМИ). Минск, 1996. С. 107–108.
13. Гуревич, Л. Е. Использование в иммуногистохимических исследованиях метода восстановления антигенной специфичности, воздействием на ткани, фиксированные формалином / Л. Е. Гуревич, В. А. Исаков // Архив патологии. 1999. № 2. С. 48–50.
14. Гриб, А. К. Оценка прогностического значения ангиогенеза в раке предстательной железы по данным иммуногистохимического и морфометрического исследования / А. К. Гриб, В. А. Басинский, А. В. Проворов // Журнал ГрГМУ. 2007. № 2. С. 59–62