

О.В.Дорохова

Дніпропетровська державна
медична академія

Ключові слова: рак шийки
матки, дисплазії шийки мат-
ки, імуногістохімія, маркер
проліферації, апоптоз, віруси
папіломи людини

Надійшла: 14.10.2006

Прийнята: 17.11.2006

УДК 618.146-006:616-008.9:577.218-037-07

ЕКСПРЕСІЯ Ki67, p16^{INK4A} ТА p53 ЯК ПОКАЗНИК ОНКОГЕННОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ТА ЙМОВІРНОСТІ ПРОГРЕСІЇ ЦЕРВІКАЛЬНИХ ІНТРАЕПІТЕЛІАЛЬНИХ НЕОПЛАЗІЙ

Резюме. Широка розповсюдженість, висока летальність та інвалідизація пацієнтів на рак шийки матки диктує необхідність пошуку нових діагностичних та прогностичних маркерів для ранньої та коректної діагностики передпухлинних процесів шийки матки, для оцінки ймовірності їх прогресування у інвазивні пухлини та визначення біологічних властивостей злоякісних пухлин шийки матки. Тому метою нашого дослідження була оцінка експресії Ki67, p16^{INK4A} та p53 для визначення інтенсивності процесів проліферації та онкотрансформації при диспластичних та неопластичних процесах шийки матки та їх зв'язок з персистуючою інфекцією, викликану вірусами папіломи людини високого канцерогенного ризику. Був досліджений операційний і біопсійний матеріал, отриманий від 89 пацієток, яким була проведена пангістеректомія, конізація шийки матки або кольпоскопічне дослідження з прицільною біопсією тканини шийки матки з ЦІН1, ЦІН2 і ЦІН3, інвазивними раками. Встановлена пряма залежність між ступенем ушкодження шийки матки та інтенсивністю фарбування з Ki67 та p53 та тісний зв'язок між інтенсивністю імуногістохімічної реакції з антитілом p16^{INK4A} та наявністю ДНК вірусів папіломи людини високого канцерогенного ризику. Таким чином визначення експресії цих маркерів дозволяє виявляти ділянки, підозрілі на диспластичні чи неопластичні зміни у візуально не зміненому епітелії, допомагає відрізняти диспластично змінені клітини від дистрофічних і атрофічних та визначати пухлин з вираженими злоякісними і інвазивними властивостями.

Dorokhova O.V. Expression of Ki67, p16^{INK4A} and p53 as an indicator of oncogenic transformation and probable progression of cervical intraepithelial neoplasia.

Summary. High prevalence, mortality and disabling rate of malignant tumors of cervix uteri direct us to necessity to search for new diagnostic and prognostic markers for earlier and proper diagnostics of precancerous lesions of uterine cervix, to estimate probability of progression those lesions in invasive carcinomas and to determine biological behavior of cervical malignant tumors. Therefore the purpose of this study was to estimate Ki67, p16^{INK4A} and p53 expression in order to determine intensity of proliferation and oncogenic transformation in displastic and neoplastic cervical lesions and their relation to persistent oncogenic human papillomavirus infection. Operating and bioptic material from 89 patients after hysterectomy, conization of cervix and colposcopy with biopsy of cervical tissue under visual control was investigated and diagnoses such as CIN1, CINII, CINIII, invasive carcinoma were confirmed. Strait relationships between the degree of cervical lesion and intensity of staining were established for Ki67 and p53, and also correlation between intensity of immunohistochemical reaction with p16^{INK4A} antibody and presence of DNA of oncogenic human papillomavirus was determined. Consequently estimation of these marker expressions lets us reveal those regions, which are suspicious on presence of displastic and neoplastic changes in epithelium, which looks normal with conventional staining and also assist in distinguishing those displastic and neoplastic lesions from dystrophic and atrophic ones, as well as define carcinomas with marked malignant and invasive behavior.

Keywords: cancer of uterine cervix, cervical intraepithelial dysplasia, immunohistochemistry, marker of proliferation, apoptosis, human papilloma viruses.

Вступ

Рак шийки матки є одним з найбільш розповсюджених злоякісних захворювань. В країнах, які розвиваються, рак шийки матки посідає друге місце з відносною частотою 15% серед усіх раків у жінок, тоді як у розвинених країнах він займає п'яте місце з відносною частотою у 4,4%. Пар-тест - є цитологічною методикою, яка дозволяє ідентифікувати жінок з асимптоматичним перебігом передракових ушкоджень та раками шийки матки на ранніх стадіях. Хоча введення програм скринінгу було ефективним у зниженні смертності та захворюваності від раку шийки матки у розвинених країнах, використання цього методу обмежено

через низьку специфічність та чутливість. Помилковонегативні результати складають 15-50%, тоді як помилковопозитивні - 30% (І.С.Шпонька та співавт., 2005). Це зумовлено, головним чином, суб'єктивністю цитологічних діагнозів. Крім того, навіть гістологічний аналіз біопсій шийки матки, які були взяті у жінок з абнормальними мазками, також були не однаково інтерпретовані у різних патоморфологів. Тому на даний момент існує необхідність у пошуку нових критеріїв, які допоможуть у ранній та коректній діагностиці ЦІН та інвазивних раків шийки матки.

Як вже встановлено, виникнення цервікальних інтраепітеліальних неоплазій (ЦІН) пов'язано

з персистенцією вірусів папіломи людини високого канцерогенного ризику (ВПЛ ВКР), особливо важливими з яких є типи 16 та 18. Ці віруси зумовлюють пухлинну трансформацію через дію двох вірусних білків E6 та E7 (Young T., Min Z., 2005) Очевидно, що ВПЧ є першопричиною раку шийки матки, однак інфікування епітеліальних клітин шийки матки створює лише передумови для злоякісної трансформації. Для необоротного розвитку пухлинної трансформації необхідні супутні умови, серед яких основне місце приділяється гормональним порушенням, асоційованою інфекцією в першу чергу вірусами генітального герпеса, палінню і характеру харчування. У більшості випадків виникненню раку шийки матки можна запобігти. Вважається, що канцерогенез в епітелії шийки матки є етапним процесом і може займати від 2 до 10 років, однак відповідний лікувальний вплив на ранніх стадіях розвитку ЦІН дозволяє уникнути виникнення інвазивних форм раку. Багаторічний пошук медикаментозних методів лікування також доки не увінчався успіхом, і проблема раку шийки матки залишається однією з найважливіших в онкології.

Останнім часом намітилося деяке просування на шляху вирішення проблеми ранньої та коректної діагностики диспластичних та неопластичних процесів шийки матки завдяки використанню ряду онкомаркерів, які характеризують різноманітні біологічні властивості тканин, таких як Ki-67, p16^{INK4A} та p53.

Як було вказано вище, геном вірусу взаємодіє з білками клітин хазяїна, порушуючи їх біологічну функцію завдяки експресії 2 вірусних протеїнів E6 і E7, які підвищують деградацію p53 чи інактивують pRb - пухлинного супресійного протеїну, відповідно, завдяки чому клітини не підлягають p53 індукованому апоптозу і, як наслідок, порушується нормальний контроль клітинного циклу. p53 і pRb шляхи контролюються CDKN2A (INK4A/ARF) локусом, що кодує пухлинний супресорний протеїн p16^{INK4A}. Цей CDKN2A локус часто підлягає мутаціям, делеціям чи метилюється в більшості пухлин людини. p16^{INK4A} представляє собою інгібітор циклінозалежних кіназ Cdk 4,6 та є частиною pRb шляху і може індукувати зупинку клітинного циклу в G1 шляхом інгібування фосфорилляції pRb циклінозалежною кіназою 4 і циклінозалежною кіназою 6. Даний білок, що є негативним регулятором проліферації клітин, бере участь в сигнальному шляху Cdk-Rb-E2F, що контролює перехід клітини з фази G1 у S-фазу клітинного циклу. p16^{INK4A} також відіграє важливу роль у клітинному старінні. У нормальних, недиспластичних, клітинах білок p16^{INK4A} експресується на дуже низькому рівні, і не визначається імуногістохімічним методом (Sophia S. et al., 2004). У літературі відзначається пряма кореляція між експресією p16^{INK4A} і ступенем патологічних змін епітелію, при цьому зазначено, що залежність між експресією p16^{INK4A} і ступенем запального процесу в тканинах, чи гормональними параметрами відсутня (Danielle W. et al., 2003; Carrilho C. et al., 2005;

Takaaki S. et al., 1998)

p53 є основним регулятором апоптозу, він може інгібувати клітинну проліферацію шляхом блокування входу в S фазу клітинного циклу. Описано чітку кореляцію між кінетикою пухлинних клітин та показниками експресії Ki-67 і статусом p53 гена в деяких пухлинах (Dabbs D.J., 2006).

Антиген Ki-67 являє собою універсальний маркер проліферації клітин як нормальної, так і пухлинної тканини. В даний час він найбільше широко використовуються для визначення числа клітин, які розмножуються. Це антитіло фарбує ядра клітин, що поділяються, у всіх активних фазах клітинного циклу (пізньої (G1,S і G2+M), крім фази спокою G0 і ранньої G1 фази. Однак він ніяк не відрізняє диспластичні чи неопластичні проліферуючі клітини від нормальних. Антиген Ki-67 використовується як прогностичний фактор при оцінці плин дисплазії і раку шийки матки, його гіперекспресія корелює з несприятливим плином ЦІН та інвазивних раків шийки матки (Sahabali S. et al., 2003; Panjkovic M., Ivkovic-Kapiclj T., 2006).

Мета дослідження

Визначення інтенсивності процесів проліферації та онкотрансформації при диспластичних та неопластичних процесах шийки матки та їх зв'язок з персистуючою інфекцією, викликаною вірусами папіломи людини високого канцерогенного ризику.

Матеріал і методи

Ретроспективно було досліджено операційний і біопсійний матеріал, отриманий від 89 пацієнток, яким була проведена пангістеректомія, конізація шийки матки або кольпоскопічне дослідження з прицільною біопсією тканини шийки матки з ЦІН1, ЦІН2 і ЦІН3, інвазивними раками, які лікувалися на базі обласного онкологічного диспансеру, міських клінічних лікарень № 4, 19 м. Дніпропетровська, обласної клінічної лікарні ім. І.І.Мечникова, поліклініки Медичної академії. Середній вік пацієнток з ЦІН складав 37 (18-65) років, з інвазивними раками 60 (30-70) років.

Весь клініко-анатомічний матеріал був розподілений на 3 групи (табл. 1): 1 група – 54 пацієнтки з ЦІН1, ЦІН2, ЦІН3 у віці від 18 до 65 років (60,6%). Розподіл матеріалу у залежності від ступеня диспластичних трансформацій був наступним: ЦІН1 – 15 випадків (23,5%), ЦІН2 – 18 (20,2%), ЦІН3 та рак на місці – 21 (16,8%). Матеріал представлено гістологічними препаратами.

2 група - 29 пацієнток з інвазивними раками шийки матки у віці від 30 до 70 років (32,5%). Розподіл матеріалу, у залежності від форми захворювання, був наступним: плоскоклітинні раки – 22 випадки (24,7%, із них з ороговінням – 13 випадків (14,6%), без ороговіння – 9 (10,1%)), аденокарциноми – 7 (7,8%, із них високодиференційовані – 4 (4,4%), низькодиференційовані – 3 (3,3%)). Матеріал представлено гістологічними препаратами.

3 група - 6 пацієнток з патологією шийки ма-

тки, яка не була пов'язана з ЦІН або новоутвореннями шийки матки - як контроль (6,7%). Розподіл матеріалу, у залежності від форми захворю-

вання, був наступним: ендоцервіцит - 3, нормальний епітелій шийки матки - 3.

Таблиця 1

Загальний розподіл клінічного матеріалу		
Гістологічний діагноз	Кількість спостережень	%
ЦІН	54	60.6
• ЦІН1	21	23.5
• ЦІН2	18	20.2
• ЦІН3	15	16.8
Інвазивні раки	29	32.5
• плоскоклітинні раки	22	24.7
▪ з ороговінням	13	14.6
▪ без ороговіння	9	10.1
• аденокарциноми	7	7.8
▪ високодиференційовані	4	4.4
▪ низькодиференційовані	3	3.3
Контрольна група	6	6.7

Для проведення морфологічного дослідження операційний і біопсійний матеріал хворих фіксувався в 10% розчині нейтрального формаліну. Після фіксації і проводки матеріал піддавався ретельному мікроскопічному рутинному дослідженню (фарбування гематоксином-еозином).

Для імуногістохімічного дослідження зрізи товщиною 4-5 мкм наносилися на предметне скло, попередньо оброблене адгезивною рідиною (poly-L-lysine), слідом за чим депарафінізувалися відповідно до прийнятих стандартів. Для демаскування антигенів (HAR) ми використовували нагрівання на водяній бані в цитратному буфері з рН=6,0 (на протязі 30 хвилин після досягнення температури 98⁰) або обробку в автоклаві (5 хвилин при температурі +121⁰С). Як первинні антитіла використовувалися моноклональні антитіла Ki67, p53 та p16^{INK4A} фірми Dako. Були виконані також контрольні дослідження з метою виключення помилковопозитивних чи помилковонегативних реакцій (Петров С.В., Райхлин Н.Т., 2000).

Подальшу обробку проводили з використанням системи візуалізації LSAB2, EnVision (DAKO) протягом 10 хвилин (з біотинільованими антитілами і стрептавідин-пероксидазним комплексом). Після цього проводили реакцію з хромогеном (DAB (DAKO)), оцінюючи якість взаємодії під контролем мікроскопу (Leica) протягом від 20 секунд до 3 хвилин.

Для адекватної диференціації структури тканин зрізи додатково фарбували гематоксином Майєра.

З метою контролю специфічності імуногістохімічних реакцій було проведено серію досліджень з використанням гістологічних зрізів тканини матки і шийки матки з захворюваннями, не пов'язаними з диспластичними ушкодженнями. Диференційоване фарбування тканини саме по собі служило внутрішнім контролем (наприклад, негативна реакція стромы при позитивній реакції пухлинної тканини). Потім проводився ретельний

порівняльний морфологічний аналіз зрізів, пофарбованих рутинними барвниками і за допомогою імуногістохімічних методик.

Для максимального виключення суб'єктивного фактору, дослідження проводили незалежно один від одного два досвідчених патоморфолога, оцінюючи ступінь ЦІН і ступінь диференціювання пухлини, а також визначаючи наявність достатньої кількості матеріалу і його якість для проведення імуногістохімічного дослідження.

Клітини позитивні у відношенні експресії Ki67, p53 та p16^{INK4A} підраховувалися в 4-6 полях зору. Як позитивну, враховували реакцію у клітинах епітеліального шару, як диспластично і неопластично змінених, так і нормальних. При оцінці імуногістохімічного фарбування позитивна імуногістохімічна реакція з Ki-67 та p53 антитілами виявлялася коричневим фарбуванням ядер клітин різного ступеня інтенсивності. Найбільш розповсюдженою формою позитивної реакції на p16^{INK4A} було коричневе одночасне фарбування ядер і цитоплазми - так звана змішана позитивна реакція (Takaaki S. et al., 1998).

Оцінка імуногістохімічної реакції ґрунтувалася на інтенсивності фарбування і розподілі імунопозитивних клітин відповідно до досліджень інших авторів. Шкала інтенсивності фарбування: - немає експресії; + - слабка експресія; ++ - помірна експресія; та +++ - інтенсивне фарбування.

Для оцінки ступеню фарбування з p16^{INK4A} використовувався наступна шкала: негативна реакція – коли 0-5% клітин були зафарблені позитивно; осередкова/розкидана реакція - якщо до 80% клітин були позитивними; дифузно позитивна – якщо більш ніж 80% клітин фарбувалися цим антитілом (Takaaki S., et al, 1998).

Проліферативна активність розцінювалася як висока при фарбуванні більш 50% клітин, низькою - при фарбуванні менш 10%, значення 10-50% розглядалося як проміжна зона (Panjkovic M., Ivkovic-Kapicl T., 2006). Інтенсивність фарбу-

вання ядра з p53 оцінювалася за градацією: 0 - відсутність фарбування, 1+ - слабе, 2+ - помірне, 3+ - сильне. При фарбуванні менш 5% ядер, поза залежністю від інтенсивності, пухлина вважалася p53-негативною. Пухлина вважалася p53-позитивною при: 1) фарбуванні більш 50% ядер поза залежністю від інтенсивності, 2) інтенсивному фарбуванні (3+) більш 5% ядер, 3) помірно-му фарбуванні 10 - 50% ядер (Jian-Liu W. et al., 2004).

Статистичні методи. Індивідуальні значення кількості клітин з експресією Ki67, p53 та p16^{INK4A} були записані як середнє арифметичне + стандартне відхилення. Для визначення кореляції між ступенем експресії Ki67, p53 та p16^{INK4A} і ступенем виразності диспластичних і неопластичних змін шийки матки був використаний Chi-square тест (значення p нижче 0,05 вважалося статистичне достовірним).

Матеріал більшості пацієнток був підданий ПЦР дослідженню на предмет виявлення ВПЛ. Застосовувалася тест-система "Амплиценс ВПЧ ВКР генотип", призначена для виявлення і диференціації ДНК вірусів папіломи людини високого канцерогенного ризику 16, 31, 33, 35, 18, 39, 45, 59, і 52, 56, 58, 66 типів у клінічному матеріалі методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЦР) з електрофоретичною детекцією продуктів ампліфікації в агарозному гелі. Метод заснований на одночасній ампліфікації (мультиплекс-ПЦР) в одній пробірці ділянок ДНК чотирьох типів ВПЛ і ділянки ДНК β -глобінового гена, використовуваного як внутрішній контроль. ПЦР аналіз на наявність

ДНК 12 типів ВПЛ проводився в трьох пробірках. Всі ампліфікуємі фрагменти мають різну довжину, що дозволяло не тільки виявляти, але і визначити генотип виявленого вірусу папіломи людини високого канцерогенного ризику. ДНК-мішень, обрана як внутрішній контроль, є ділянкою генома людини і повинна завжди бути присутнім у пробі (цервікальний мазок) у достатній кількості, еквівалентній кількості клітин у мазку (10^3 - 10^5 геномів). У випадках, якщо зіскрібок узятий не правильно (велика кількість слизу і мала кількість клітин) смуга ампліфікації β -глобінового гена була відсутня на фореграмі.

Результати та їх обговорення

Експресія Ki-67.

В нашому дослідженні було визначено пряму залежність між ступенем ушкодження шийки матки та інтенсивністю фарбування з Ki-67 ($p=0.001$). У результаті імуногістохімічних досліджень виявлено, що при всіх ступенях ЦН число позитивних на Ki-67 клітин значно більше у порівнянні з нормальною тканиною шийки матки. Було виявлено два типу забарвлення. Найбільш часто зустрічався перший тип, при якому осередки ЦН, незалежно від їхнього ступеня, були відділені один від одного ділянками епітелію, у яких Ki67-позитивні клітини знаходилися тільки в парабазальному шарі. При другому типі число клітин з Ki-67-позитивними ядрами виявлялися в різних шарах епітелію, в основному у осередках дисплазій.

При ЦН1 частота Ki-67 - позитивних ядер коливалась від 5 до 20%, усі вони переважно розташовувалися в парабазальному шарі (рис. 1, 2).

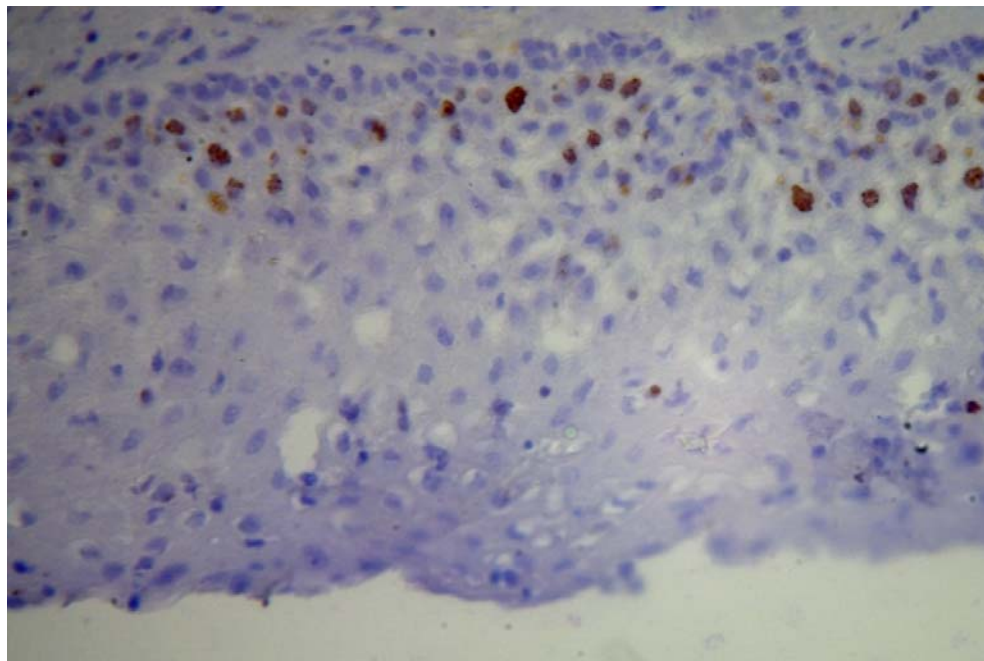


Рис. 1. Інтрануклеарна реакція з Ki-67 переважно в парабазальному шарі епітелію при ЦН1 з характерними морфологічними ознаками інфекції, викликаной ВПЛ ВКР (койлоцити) у середньому і поверхневому шарах. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Маєра. $\times 400$.

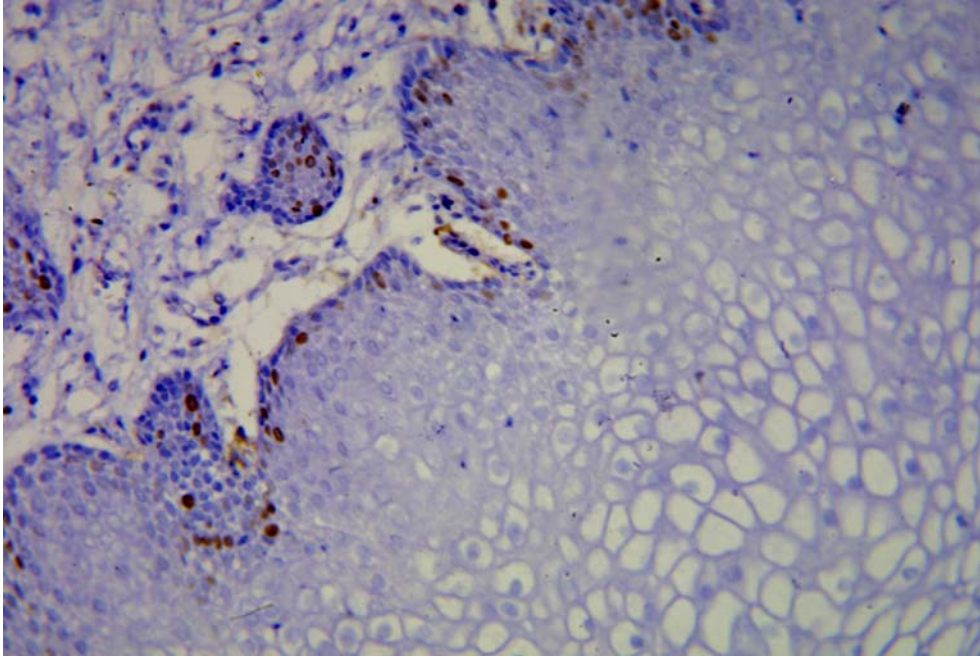


Рис.2. Інтрануклеарна реакція з Ki-67 переважно в парабазальному шарі при ЦІН1. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Маєра. $\times 400$.

При ЦІН2 число клітин з Ki67-позитивними ядрами складало 10-50%. Для даного ступеня ЦІН характерним було зростання числа Ki-67 - позитивних ядер у різних шарах епітелію, при цьому

значна частина клітин, що містять Ki-67 - позитивні ядра, локалізувалася в центральних ділянках покривного епітелію (рис.3).

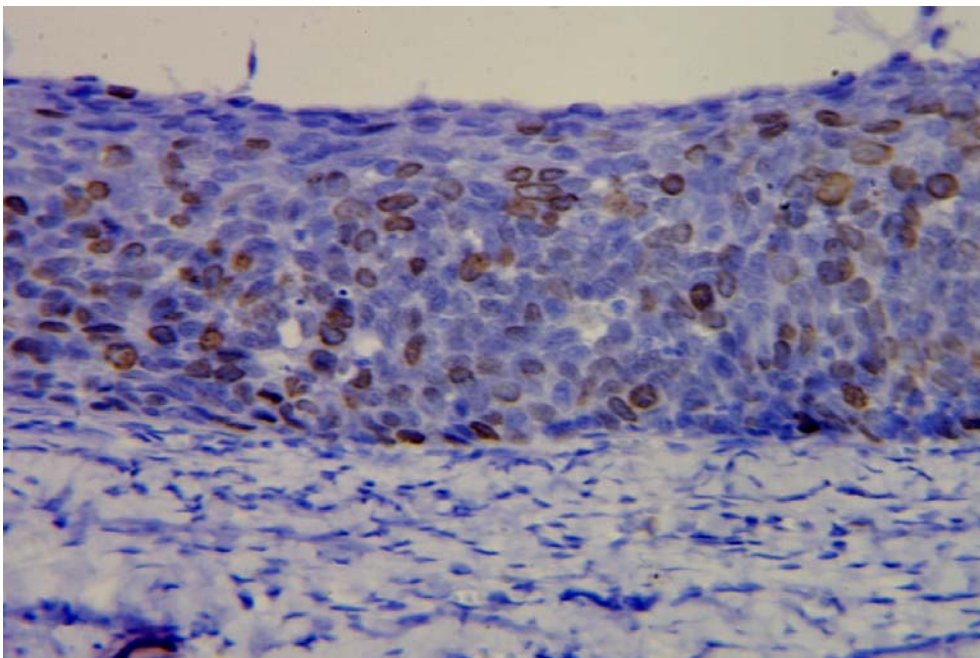


Рис.3. Інтрануклеарна реакція з Ki-67 у різних шарах епітелію, переважно в центральних ділянках покривного епітелію при ЦІН2. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Маєра. $\times 400$.

При ЦІН3 кількість клітин з ядрами, що позитивно реагують на Ki-67, коливалася від 50 до 80-90%, при цьому позитивно реагуючі клітини виявлялися у всіх, переважно зовнішніх шарах епітелію. В деяких випадках клітини базального шару епітелію були Ki67-негативними (рис.4).

В зонах мікроінвазії (рис.5) майже всі ядра клітин пухлини були Ki67-позитивними. В пух-

линах з інвазивним ростом Ki67-позитивні клітини чергувалися з Ki67-негативними (рис.6).

У таблиці 2 представлені показники експресії Ki67 у залежності від ступеня диспластичних та неопластичних ушкоджень епітелію шийки матки.

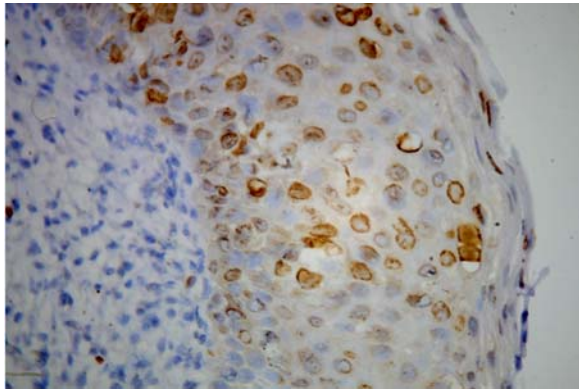


Рис.4. Интрануклеарна реакція з Ki-67 при ЦІН3. Позитивно реагуючі клітини виявлялися у всіх, переважно зовнішніх шарах епітелію, частина клітин базального шару епітелію є Ki67-негативними. $\times 400$.

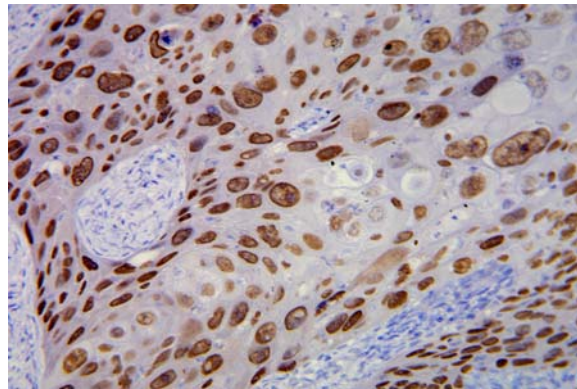


Рис.5. Интрануклеарна реакція з Ki-67 більшості пухлинних клітин в зонах мікроінвазії. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Маєра. $\times 800$.

Таблиця 2

Експресія Ki67 у залежності від ступеня ушкоджень епітелію шийки матки

Гістологічний діагноз	Кількість спостережень	Експресія Ki67					
		<10%		10-50%		>50%	
		n	%	n	%	n	%
Нормальний епітелій	6	6	100.0	0	-	0	-
ЦІН1	21	19	90.5	2	9.5	0	00.0
ЦІН2	18	4	22.2	12	66.6	2	11.1
ЦІН3	15	0	00.0	4	19.0	11	73.3
Раки	29	0	00.0	7	17.2	22	75.9
Усього	89	29	32.5	26	29.2	34	38.2

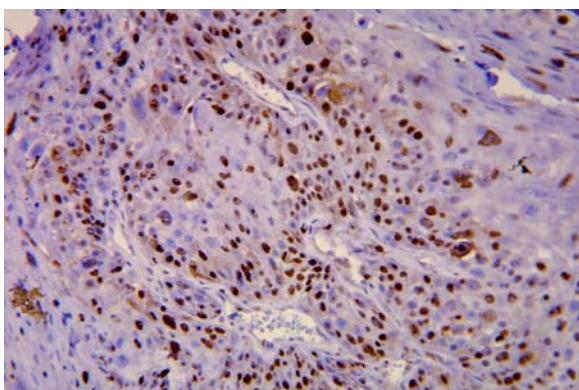


Рис.6. Интрануклеарна реакція з Ki-67 в плоскоклітинному раці шийки матки з інвазивним ростом. Інтенсивно забарвленні Ki67-позитивні клітини чергуються з Ki67-негативними ділянками. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Маєра. $\times 400$.

Таким чином за допомогою імуногістохімічної реакції з Ki67 можна характеризувати виразність проліферації клітин епітеліального шару й адекватно класифікувати стадії диспластичного процесу.

Експресія p16^{INK4A}.

Дослідження експресії білка p16^{INK4A} при дисплазіях різного ступеню в нашому дослідженні визначило суттєві відмінності.

При ЦІН1 слабка реакція спостерігалась в окремих клітинах або групах клітин, переважно базального та парабазального шарів епітелію. При ЦІН2 території та інтенсивність реакцій збільшу-

вались. Треба відзначити, що в цій групі ми відзначали переважно цитоплазматичне забарвлення в клітинах парабазального та базального шарів (рис.7).

Найбільш суттєву інтенсивність реакцій а також гетерогенність їх типів ми спостерігали при важких ступенях диспластичних уражень (ЦІН3). У більшості випадків переважала інтенсивна реакція з одночасним фарбуванням ядер і цитоплазми (так звана змішана реакція) в клітинах парабазального та базального шарів. Рідше спостерігалась інтенсивна змішана реакція або змішана реакція помірної інтенсивності в нижній половині епітеліального шару (рис.8).

Експресія p16^{INK4A} в койлоцитах спостерігалась частіше по змішаному типу, особливо якщо останні розташовувалися в акантотичних тяжках або в шарах плоского епітелію в цервікальних залозах у випадках епідермізації цих ділянок.

При дослідженні реакції на p16^{INK4A} при раках in situ в зонах з інвазивним компонентом частіше спостерігалось посилення інтенсивності цитоплазматичної реакції. Іноді спостерігалось зворотне явище, а саме ослаблення інтенсивності цитоплазматичної реакції в клітинах з ознаками посилення зроговіння. Імовірно, в акантотичних структурах, незалежно від доброякісності чи злоякісності клітин, в зроговілих клітинах реакція з p16INK4A негативна, що спостерігається наприклад в так званих "ракових перлинах" у інвазивному раці з ороговінням (рис.9).

При інвазивних раках шийки матки не спо-

стерігалась рівномірна інтенсивна реакція змішаного типу. Навпаки, імуногістохімічна реакція частіше була гетерогенною різної інтенсивності.

Як правило, інтенсивність реакцій в клітинах підсилювалася в зонах інвазивного росту пухлини.

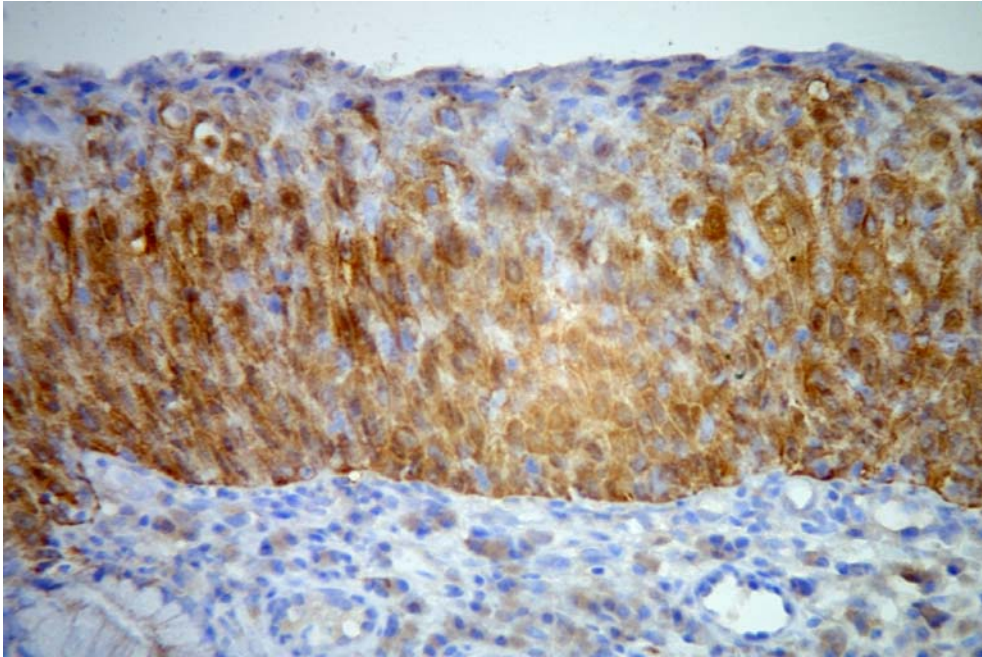


Рис.7. Переважно цитоплазматична реакція з p16INK4A в клітинах парабазального та базального шарів шийки матки при ЦІН2. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Маєра. $\times 400$.

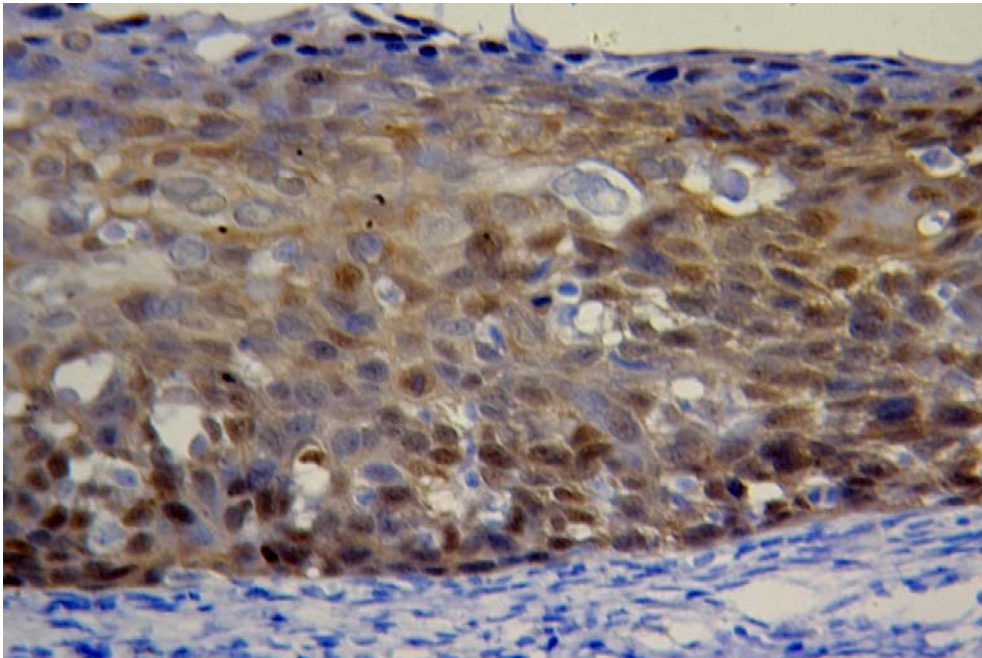


Рис.8. Змішаний тип реакції з p16INK4A при ЦІН3. Інтенсивна інтрануклеарна реакція з одночасним фарбуванням цитоплазми в клітинах парабазального та базального шарів. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Маєра. $\times 400$.

У таблиці 3 представлені показники експресії p16^{INK4A} в залежності від ступеня диспластичних та неопластичних ушкоджень епіте-

лію шийки матки та наявності чи відсутності ДНК ВПЛ.

Експресія p16INK4A у залежності від ступеня ушкоджень епітелію шийки матки та наявності чи відсутності ДНК ВПЛ

Гістологічний діагноз	Число спостережень	ДНК ВПЛ	Експресія p16INK4A		
			Негативна	Осередкова /розкидана	Дифузна
Нормальний епітелій	6	Відсутність ДНК ВПЛ	4 (66,6%)	0	0
		Наявність ДНК ВПЛІНКР	1 (16,6%)	0	0
		Наявність ДНК ВПЛВКР	1 (16,6%)	0	0
ЦІН1	21	Відсутність ДНК ВПЛ	8 (38,0%)	1 (4,76%)	0
		Наявність ДНК ВПЛІНКР	3 (14,2%)	0	0
		Наявність ДНК ВПЛВКР	5 (23,8%)	4 (19%)	0
ЦІН2	18	Відсутність ДНК ВПЛ	1 (5,5%)	1 (5,5%)	1 (5,5%)
		Наявність ДНК ВПЛІНКР	0	2 (11,1%)	3 (16,6%)
		Наявність ДНК ВПЛВКР	1 (5,5%)	3 (16,6%)	6 (33,3%)
ЦІН3	15	Відсутність ДНК ВПЛ	0	0	0
		Наявність ДНК ВПЛІНКР	0	0	1 (6,6%)
		Наявність ДНК ВПЛВКР	0	1 (6,6%)	13 (86,6%)
Інвазивні раки	29	Відсутність ДНК ВПЛ	0	1 (3,44%)	0
		Наявність ДНК ВПЛІНКР	0	1 (3,44%)	0
		Наявність ДНК ВПЛВКР	0	0	27 (93,1%)

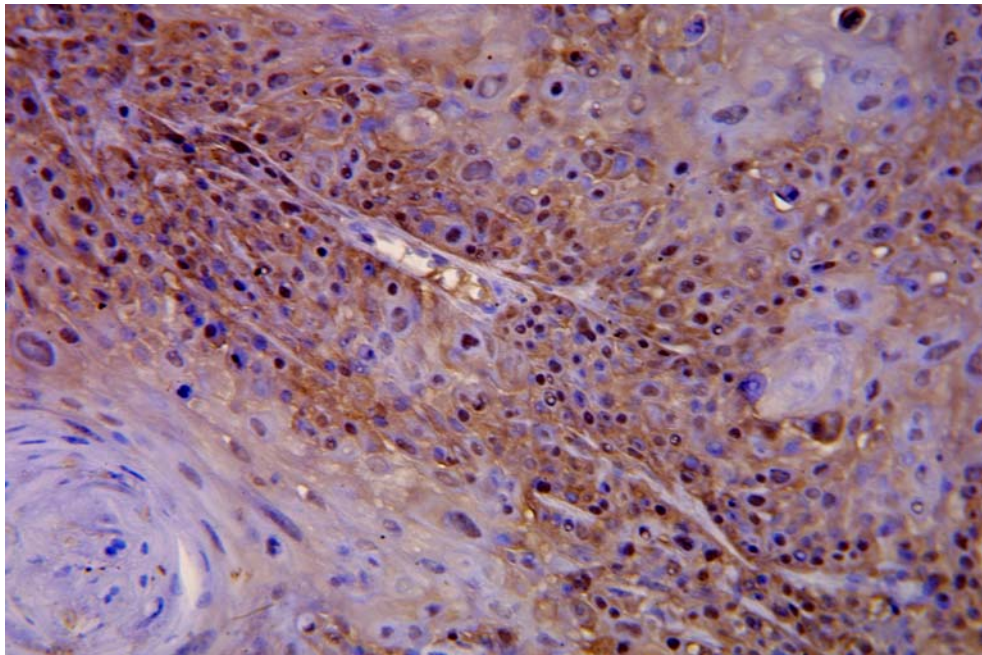


Рис.9. Гетерогенний варіант експресії p16INK4A у інвазивному раці з ороговінням з негативною реакцією у так званих "ракових перлинах" Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Маєра. $\times 400$.

При порівнянні особливостей експресії двох білків - Ki67 і p16^{INK4A} в гомологічних структурах приблизно в половині усіх випадків відзначено збіг результатів імуногістохімічних реакцій на Ki67 і p16^{INK4A}, тобто пряму залежність інтенсивності реакцій. При цьому в нормальному епітелії експресія Ki67 завжди спостерігалася в парабазальному шарі, а індекс проліферації був на мінімальному рівні, у той же час експресія p16^{INK4A} в наших спостереженнях не визначалася.

Експресія p53 онкопротеїну

У результаті проведених досліджень нами встановлено, що онкопротеїн p53 не виявлявся

імуногістохімічними методами в незмінених тканинах шийки матки (рис.10). В міру наростання неопластичних процесів в епітелії шийки матки від ЦІН I до ЦІН III експресія продуктів відповідного гена збільшується і фарбування на p53 виявлялося в ядрах клітин з ознаками атипії в усіх епітеліальних шарах (рис.11). Імуногістохімічно показана надлишкова експресія p53 при ЦІН III та раках при ураженні ВПЧ ВКР(рис.12). При цьому у випадку ЦІН I та ЦІН II високий рівень p53 визначався у клітинах базального і парабазального шарів епітелію. Рівні експресії p53 при різних типах ушкодження шийки матки представлені в таблиці 4.

Рівень експресії p53 в нормальних, диспластичних та неопластичних клітинах шийки матки

Гістологічний діагноз	Число спостережень	p53
Нормальний епітелій	6	негативна в усіх випадках (0%)
ЦІН1	21	негативна в усіх випадках (0%)
ЦІН2	18	негативна в 16 випадках, позитивна в 2 випадках (11,1%)
ЦІН3	15	позитивна в 12 випадках (80%)
Інвазивні раки	29	позитивна в 23 випадках (79,3%)

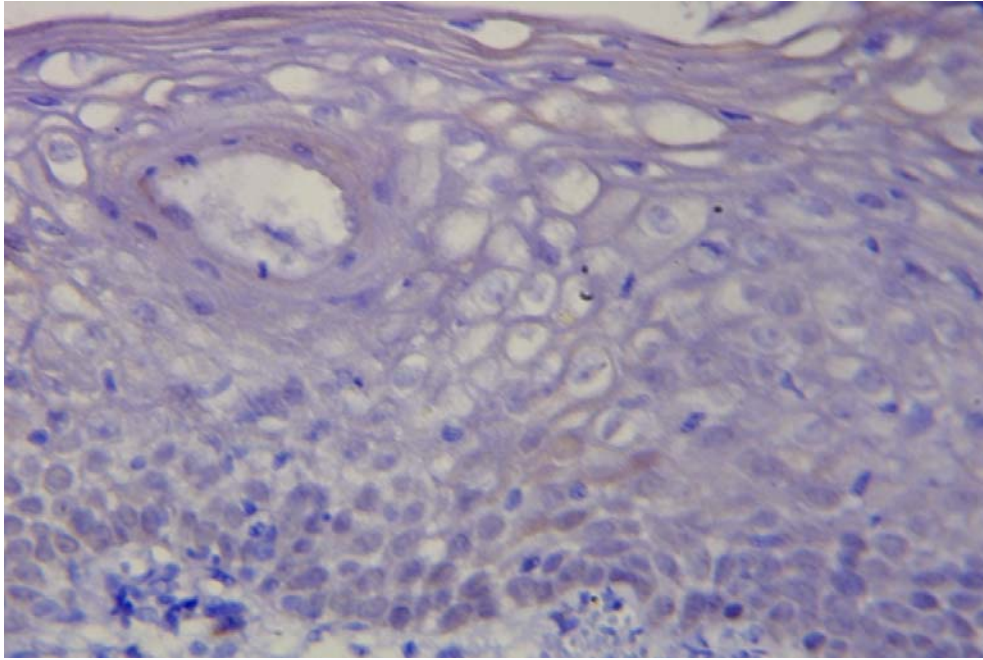


Рис.10. Негативна імуногістохімічна реакція з p53 при ЦІН1 з характерними морфологічними ознаками інфекції, викликані ВПЛ ВКР (койлоцити) у середньому і поверхневому шарах. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Маєра. $\times 400$.

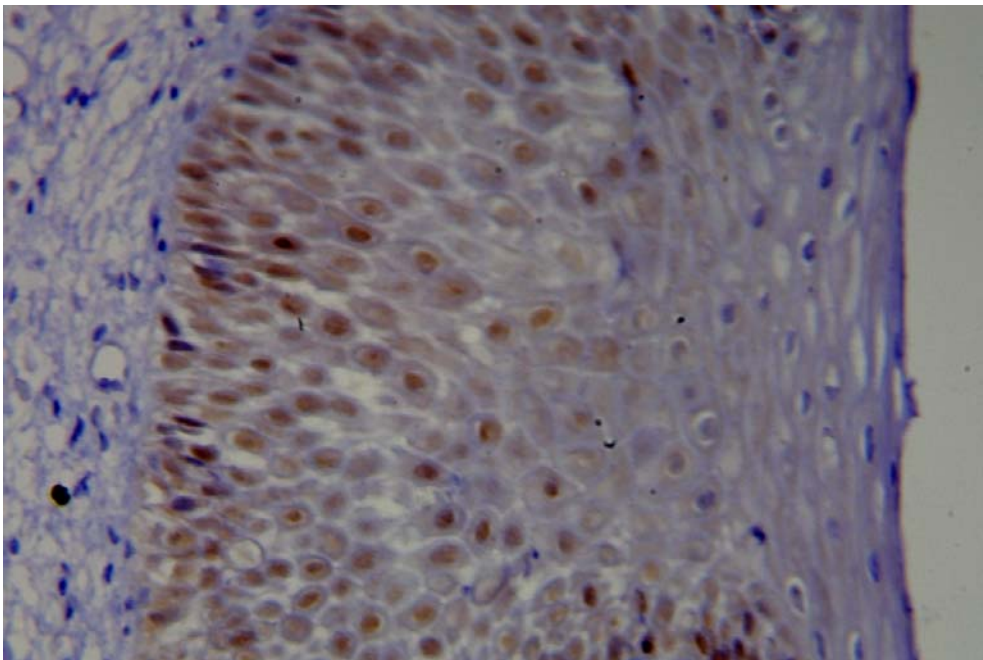


Рис.11. Ядерна імуногістохімічна реакція з p53 при ЦІН2 у різних шарах епітелію. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Маєра. $\times 400$.

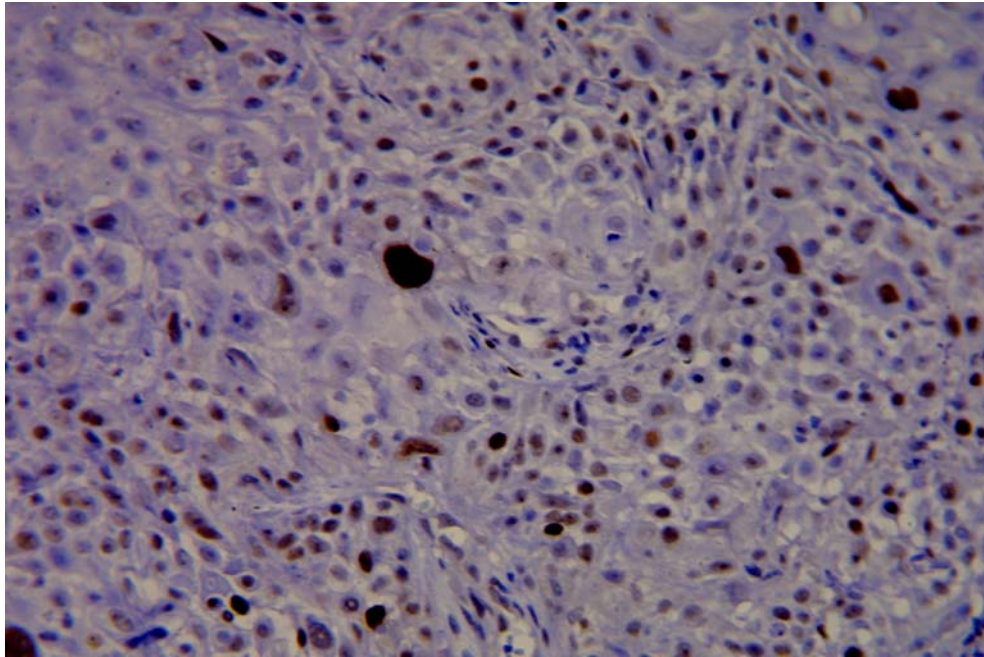


Рис.12. Ядерна імуногістохімічна реакція з p53 в пухлині з інвазивним ростом. p53-позитивні ділянки чергуються з p53-негативними. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Маєра. $\times 400$.

Висновки

Визначення експресії p16^{INK4A} дозволяє вивчати різні ланки персистенції папіломовірусної інфекції, сприяє виявленню підозрілих на диспластичні чи неопластичні зміни ділянок у візуально не зміненому епітелії, допомагає відрізнити диспластично змінені клітини від дистрофічних і атрофічних. Показники експресії Ki67 дозволяють усунути суб'єктивність уявлень про ступінь проліферації клітин, виявити диспластичний процес на тлі запальних змін.

Інактивація функції гена p53 за рахунок ВПЧ чи ушкодження білка p53 приводить до розвитку пухлин з вираженими злоякісними і інвазивними властивостями і відіграє важливу роль у процесах канцерогенезу в шийці матки.

Перспективи подальших розробок пов'язані з вивченням додаткових показників властивостей диспластично та неопластично змінених клітин та визначення значення додаткових факторів (куріння, вірус герпеса) в процесах онкотрансформацій.

Літературні джерела

Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека.- Казань, 2000.- 288 с.

І.С. Шпонька, О.В. Дорохова, О.В.Шпонька. Прогностичне та діагностичне значення експресії маркерів біологічних властивостей тканин при диспластичних та непластичних процесах шийки матки // Медичні перспективи. - 2005.- Т. X, № 4.- С. 8-16.

Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry.- Churchill Livingstone, 2006.- 828p.

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.

Distribution of HPV infection and tumour markers in cervical intraepithelial neoplasia from cone biopsies of Mozambican women / Carrilho C., Cirnes L., Alberto M. et al. // J. Clin. Pathol.- 2005.- Vol.58.- P.61-68.

Expression Status of p16 Protein Is Associated with Human Papillomavirus Oncogenic Potential in

Cervical and Genital Lesions / Takaaki S., Tetsunari O., Kenji K. et al // Amer. J. Pathol.- 1998.- Vol.153.- P.1741-1748.

Ki-67 immunocytochemistry in liquid based cervical cytology: useful as an adjunctive tool? / Sahebali S., Depuydt C.E., Segers K. et al. // J. Clin. Pathol.- 2003.- Vol.56.- P.681-686.

Panjkoic M., Ivkovic-Kapicel T. Ki-67 expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix // Arch. Oncol.- 2006.- Vol.14.- P.23-25.

Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer / Jian-Liu W., Bi-Ying Z., Xi-Dan L. et al. // Clin. Cancer Res.- 2004.-Vol.10.- P.2407-2414.

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

Young T., Min Z. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma // Yonsei Med. J.- 2005.- Vol.46.-

Дорохова Е.В. Экспрессия Ki67, p16^{INK4A} и p53 как показатель онкогенной трансформации и вероятности прогрессии цервикальных интраэпителиальных неоплазий.

Резюме. Широкая распространенность, высокая летальность и инвалидизация пациенток со злокачественными новообразованиями шейки матки диктуют необходимость поиска новых диагностических и прогностических маркеров, для ранней и корректной диагностики предопухолевых процессов шейки матки, для оценки вероятности их прогрессирования в инвазивные опухоли и определения биологических свойств злокачественных опухолей шейки матки. Поэтому целью нашего исследования была оценка экспрессии Ki67, p16^{INK4A} и p53 для определения интенсивности процессов пролиферации и онкотрансформации при диспластических и неопластических процессах шейки матки и их связи с персистирующей инфекцией, вызванной вирусами папилломы человека высокого канцерогенного риска. Был исследовано операционный и биопсийный материал, полученный от 89 пациенток, которым была проведена пангистерэктомия, конизация шейки матки или кольпоскопическое исследование с прицельной биопсией ткани шейки матки с ЦИН1, ЦИН2 и ЦИН3, инвазивными раками. Установлена прямая зависимость между степенью поражения шейки матки и интенсивностью окрашивания с Ki67 и p53, а также корреляция между интенсивностью иммуногистохимической реакции с антителом p16^{INK4A} и наличием ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска. Таким образом, определение экспрессии этих маркеров позволяет выявить участки, подозрительные на наличие диспластических или неопластических изменений в визуально не измененном эпителии, помогает отличить диспластически измененные клетки от дистрофических и атрофических, а также определить опухоли с выраженными злокачественными и инвазивными свойствами.