

На правах рукописи

Селякова Мария Сергеевна

**ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ
ЦЕРВИКАЛЬНОЙ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ НЕОПЛАЗИИ И
МИКРОИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ У HPV-ИНФИЦИРОВАННЫХ
ПАЦИЕНТОК В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ**

14.03.02 – патологическая анатомия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Агеева Татьяна Августовна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Казачков Евгений Леонидович

(Южно-Уральский государственный медицинский университет, заведующий кафедрой патологической анатомии и судебной медицины, г. Челябинск)

доктор медицинских наук, доцент

Пурлик Игорь Леонидович

(Сибирский государственный медицинский университет, профессор кафедры патологической анатомии, г. Томск)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2020 г. в «_____» часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.07 на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52 тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; <http://ngmu.ru/dissertation/478>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

С. В. Залавина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. Среди злокачественных новообразований женских половых органов заболеваемость раком шейки матки (РШМ) в мире занимает второе место, в России – третье место, но у молодых женщин в возрасте от 15 до 39 лет данный патологический процесс встречается чаще и занимает 1 место (Короленкова Л. И., 2010; Каприн А. Д. и др., 2013; Parkin D. M. et al., 2001; Kurman R. J. et al., 2014). По данным годового отчета ГБУЗ НСО «Новосибирского областного клинического онкологического диспансера» (зав. онкогинекологическим отделением д-р мед. наук, профессор С. Э. Красильников) в 2018 году число женщин, проходивших лечение по поводу инвазивного РШМ, составило 177 человек и примерно 12 % от всех пациенток онкогинекологического отделения. Среди предопухолевых и доброкачественных гинекологических заболеваний в 2018 г. дисплазии шейки матки (ШМ) встречались чаще всего, составив более чем 36 % случаев.

В качестве предракового состояния в ШМ рассматривают цервикальную интраэпителиальную неоплазию (CIN) и доказано, что одним из главных условий развития дисплазии и рака является персистенция вируса папилломы человека (ВПЧ) (Tavassoli F., Devilee P., 2003; Stanley M. A. et al., 2007).

В настоящее время на основании большого количества исследований получено много сведений, которые указывают на то, что гормональный статус оказывает влияние на развитие патологических процессов в ШМ и поэтому они должны рассматриваться, в том числе с учетом возрастных анатомических и физиологических особенностей (Прилепская В. Н. и др., 2012; Роговская С. И., Липова Е. В., 2014; Winer R. L. et al., 2012).

В последние годы, на фоне стабильно высоких показателей заболеваемости РШМ в популяции отмечен некоторый рост данного показателя у женщин моложе 45 лет и параллельно – некоторое его снижение у женщин более старшего возраста (Прилепская В. Н., 1998; Роговская С. И. и др., 2011; Winer R. L. et al., 2012), что соответственно представляет большой интерес для изучения возрастных аспектов развития предопухолевых изменений и рака шейки матки.

Исходя из этого, является актуальным поиск косвенных суррогатных маркеров, которые бы отражали сущность неблагоприятных генетических нарушений и могли бы использоваться в ежедневной морфологической практике.

Одним из способов решения этой задачи является иммуногистохимическое исследование (ИГХ), позволяющего выявлять конкретно в ткани белки-продукты экспрессии генов. По изменению количества белка и его локализации можно косвенно судить об имеющихся молекулярных нарушениях в клетке. В литературе

приведены неоднозначные данные о влиянии стероидных гормонов на развитие патологических состояний в эпителии ШМ как регуляторов процессов регенерации, что дает предпосылки для рассмотрения возрастных особенностей морфологических и молекулярных проявлений разной степени дисплазии в ШМ.

Степень разработанности темы диссертации. Анализ материалов научных исследований в литературе указывает на очевидную недостаточность данных для понимания фундаментальных механизмов канцерогенеза в шейке матки в условиях HPV-инфекции у пациенток разных возрастных групп, на необходимость выработки дополнительных критериев алгоритма оценки диспластических изменений, их прогноза и для уточнения подходов к лечению, что определило цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования. Изучить морфологические проявления и молекулярные характеристики цервикальной интраэпителиальной неоплазии и микроинвазивной карциномы шейки матки в возрастном аспекте у пациенток, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска.

Задачи исследования

1. Провести сравнительное патоморфологическое исследование биоптатов шейки матки с диспластическими изменениями многослойного плоского эпителия разной степени выраженности и микроинвазивной карциномой у пациенток двух возрастных групп, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска.

2. Изучить экспрессию металлопротеиназ, их ингибитора TIMP1, ангиогенного фактора VEGF в строме шейки матки с диспластическими изменениями многослойного плоского эпителия разной степени выраженности и микроинвазивной карциномой у пациенток двух возрастных групп, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска.

3. Исследовать уровень экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона в эпителии и строме шейки матки с диспластическими изменениями многослойного плоского эпителия разной степени выраженности и микроинвазивной карциномой у пациенток двух возрастных групп, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска.

4. Изучить уровень экспрессии белка p16, а также состояния процессов пролиферации и апоптоза по белкам Ki67 и p53 в эпителии шейки матки с диспластическими изменениями многослойного плоского эпителия разной степени выраженности и микроинвазивной карциномой у пациенток двух возрастных групп, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска в возрастном аспекте.

Научная новизна. На основании оценки патоморфологических изменений в эпителии шейки матки у пациенток, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска, установлено, что диспластические изменения более тяжелой степени (CINII и III) встречаются чаще в репродуктивном возрасте на фоне более выраженного и активного воспаления в строме шейки матки. Также показано, что более активное и выраженное воспаление в строме шейки матки у женщин репродуктивного возраста сопровождается более высоким уровнем экспрессии металлопротеиназ и сосудистого эндотелиального ростового фактора, способствуя проинвазивному эффекту.

Впервые показано, что у женщин менопаузального возраста, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска, напротив, в строме шейки матки преобладают фибротические процессы, имеет место более активная экспрессия тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ – TIMP-1, которая снижает выработку металлопротеиназ у них.

Впервые в возрастном аспекте дана сравнительная характеристика экспрессии белков p16, p53 и Ki67 в многослойном плоском эпителии шейки матки у пациенток, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска, которая указывает на то, что у женщин репродуктивного возраста, в сравнении с показателями у женщин менопаузального возраста, в условиях CINI и CINII при более активном пролиферативном процессе имеет место более высокий уровень экспрессии белка p16. Более значимые нарушения клеточного цикла при CINIII и при микроинвазивной карциноме не сопровождаются достоверными различиями в экспрессии данных белков у пациенток сравниваемых возрастных групп.

Впервые показано, что у женщин менопаузального возраста экспрессия белка-регулятора апоптоза p53 нарастает с прогрессированием степени дисплазии до микроинвазивной карциномы, тогда как у женщин репродуктивного возраста данный показатель значительно снизился при прогрессировании дисплазии многослойного плоского эпителия.

Таким образом, впервые получены новые знания в понимании фундаментальных закономерностей канцерогенеза рака шейки матки у пациенток репродуктивного и менопаузального возраста, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты проведенного исследования дополняют современные представления о патогенезе, особенностях канцерогенеза, адаптивных механизмах, факторах прогрессии диспластических изменений шейки матки и микроинвазивной карциномы у пациенток репродуктивного и менопаузального возраста, инфицированных вирусом папилломы

человека высокого онкогенного риска.

Установленные особенности патоморфологических проявлений разных степеней дисплазии многослойного плоского эпителия шейки матки и микроинвазивной карциномы у женщин разного возраста, в условиях инфицирования вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска, необходимо учитывать при оценке тяжести интраэпителиальной неоплазии в диагностической практике.

У пациенток разных возрастных групп выявленные особенности экспрессии молекулярных маркеров, имеющих значение в трансформации интраэпителиальной неоплазии в микроинвазивную карциному, могут быть использованы как дополнительные критерии для объективизации оценки ее степени и прогнозирования темпов прогрессирования, что может быть учтено при определении тактики ведения и лечения пациенток разного возраста с данной патологией.

Методология и методы диссертационного исследования. В основу методологии диссертационной работы положены современные практические и теоретические представления о роли экспрессии онкобелков, о роли воспаления и факторов инвазии в прогрессировании интраэпителиальных неоплазий и развитии рака шейки матки у женщин разного возраста, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска. Исследование выполнялось в несколько этапов. Проводился отбор парафиновых блоков операционного материала с последующей морфометрической оценкой микропрепаратов, окрашенных гематоксилином и эозином. В каждом случае интраэпителиальной неоплазии оценивали степень ее тяжести, а при микроинвазивной карциноме оценивали глубину инвазии опухоли. Во всех случаях оценивали выраженность и клеточный состав воспалительной клеточной инфильтрации в строме шейки матки. Следующий этап включал иммуногистохимическое исследование материала, где определялся уровень экспрессии рецепторов к половым гормонам; внутриклеточных белков: p16, Ki67, p53 в эпителии шейки матки; матриксных металлопротеиназ, TIMP-1 и VEGF в строме шейки матки. Полученные результаты были проанализированы и обработаны корректными статистическими методами.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У пациенток репродуктивного и менопаузального возраста, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска, морфологические изменения многослойного плоского эпителия и стромы шейки матки, а также распределение экспрессии рецепторов половых гормонов при дисплазии разной степени выраженности и при микроинвазивной карциноме имеют различия, ассоциированные с возрастными особенностями гормонального статуса в вышеуказанных группах.

2. Экспрессия маркеров, характеризующих нарушение клеточного цикла, и факторов, способствующих стромальной инвазии, в многослойном плоском эпителии и строме шейки матки пациенток репродуктивного и менопаузального возраста, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска, ассоциирована с морфологическими изменениями в соответствующих группах и свидетельствует о большем проинвазивном потенциале у пациенток более молодого возраста, а также об отсутствии значимых различий при CINIII и микроинвазивной карциноме в обеих возрастных группах.

Степень достоверности. Все использованные методические приемы и способы статистической обработки соответствуют поставленным цели и задачам, позволяют получить достоверные и доступные анализу результаты. Диссертация выполнена на достаточном количестве морфологического биопсийного материала с использованием сертифицированного оборудования, современных высокоинформативных методов морфологического исследования (световая микроскопия, морфометрия, иммуногистохимическое исследование) и анализа результатов.

Апробация работы. Результаты работы представлены в виде устных докладов на 4-й Российской (итоговой) научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Авиценна-2013» (Новосибирск, 2013, на Всероссийской научно-практической конференции с Международным участием «Актуальные вопросы патологической анатомии» (Новосибирск, 2015), на 1-й Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки – фундаментальная основа практической медицины» (Новосибирск, 2016), на 2-й Международной морфологической научно-практической конференции студентов и молодых ученых (Новосибирск, 2017), на 3-й Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции «Морфологические науки фундаментальная основа медицины» (Новосибирск, 2018), на 9-й Российской (итоговой) научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Авиценна» (Новосибирск, 2018), на 4-й Всероссийской научно-практической конференции с Международным участием «Современные подходы к морфологической диагностике новообразований человека» (Челябинск, 2019).

Диссертационная работа доложена на заседании проблемной комиссии «Морфологические основы компенсаторно-приспособительных реакций» ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Новосибирск, 2019).

Диссертация выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»

Минздрава России «Изучение закономерностей развития нормальных и патологических процессов в организме при воздействии факторов экзо- и эндогенной природы: межклеточные и межсистемные взаимодействия при остром и хроническом воспалении, репаративной регенерации, онкогенезе, фиброзировании, дисплазии соединительной ткани; возможности диагностики, профилактики, лечения», номер государственной регистрации АААА-А15-115120910172-8.

Внедрение результатов исследования в практику. Выявленные морфологические и молекулярно-биологические особенности CIN и «микроинвазивной карциномы» ШМ у женщин разных возрастных групп на основе гистологического и ИГХ исследований могут использоваться как дополнительные критерии более точной оценки степени тяжести интраэпителиальной неоплазии и прогноза прогрессирования диспластических изменений. Результаты исследования внедрены для практического применения в патогистологической лаборатории ГБУЗ НСО ГKB № 1 г. Новосибирска, также результаты исследования используются для проведения учебного процесса на кафедре патологической анатомии, кафедре акушерства и гинекологии, кафедре онкологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 статьи в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 3 статьи в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Scopus).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы представлен 317 источниками, из которых 185 в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 6 таблиц и 45 рисунков.

Личный вклад автора. Все исследования, статистическая обработка полученных данных выполнены лично автором.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовался операционный материал – конизированные фрагменты шейки матки (экзоцервикс) женщин с CIN легкой, средней, тяжелой степени и «микроинвазивной карциномой», обратившихся по поводу патологии ШМ. Материал был выбран из архива от пациенток ГБУЗ НСО ГKB № 1 (Новосибирск, Россия), после одобрения этическим комитетом. Письменное информированное согласие было

предоставлено всеми пациентками, вошедшими в исследование.

В исследование вошли 180 биоптатов женщин, которые выбирали слепым методом, далее были сформированы 2 основные группы исследования и 2 контрольные группы. По соответствующим морфологическим критериям основные группы разделены по возрасту и на подгруппы – по степени тяжести CIN и с микрокарциномой. Первую группу составили женщины репродуктивного возраста от 20 до 35 лет ($n = 89$), средний возраст пациенток ($28,5 \pm 0,58$) лет. Во 2 группу вошли женщины менопаузального возраста от 49 до 65 лет ($n = 71$), средний возраст ($53,7 \pm 0,86$) лет. Также сформированы 2 контрольные группы, в которые вошли женщины близкого возраста к женщинам 1 и 2 основных групп, без CIN и «микроинвазивной карциномы». Критериями включения в основные группы исследования явилось наличие впервые установленного диагноза «CIN», «микроинвазивная карцинома (глубина инвазии не более 3мм)»; у всех женщин доказано на клиническом этапе обследования наличие HPV высокого онкогенного риска. В качестве критериев исключения учитывалось наличие дисплазии или рака шейки матки в анамнезе; наличие ВИЧ-инфекции, сифилиса, герпетической инфекции; наличие заболеваний эндокринных органов; бесплодие.

Морфологические методы, используемые в работе. Для проведения гистологического исследования из парафиновых блоков архивного материала на ротационном микротоме изготавливали срезы толщиной до 5 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином по стандартной методике. Процедуру ИГХ исследования, адаптированную для данной лаборатории, выполняли в соответствии с рекомендациями, изложенными в руководствах по ИГХ исследованиям (Dabbs D. G., 2010), рекомендациями фирм-производителей. Оценку результатов ИГХ исследования проводили полуколичественным методом. При исследовании препаратов окрашенных антителами, рассчитывали индекс мечения (ИМ) – отношение числа позитивно окрашенных клеточных структур на 100 клеток. Для белков p16, p53, Ki-67, Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR) – ИМ рассчитывали по позитивно-окрашенным ядрам. Для сосудистого эндотелиального ростового фактора (VEGF); матриксных металлопротеиназ (MMPs 2; 3; 7; 9); тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ (TIMP1) – оценивали позитивное цитоплазматическое окрашивание. Морфометрическое исследование проводили, используя основные принципы стереологии и морфометрии (Автандилов Г. Г., 1990).

Оборудование, использованное в работе. В работе для приготовления гистологических препаратов использовали аппарат для проводки TP 1020 («Leica», Германия), заливочную станцию EG 1160 («Leica», Германия), ротационный

микротом RM 2235 («Leica», Германия), аппарат окрашивания микропрепаратов Auto Stainer XL («Leica», Германия). Для иммуногистохимического окрашивания использовали PT Link модуль (Dako, Дания), Autostainer Link 48 (Dako, Дания). Изучали гистологические срезы в световом микроскопе Axiostar plus («Zeiss», Германия) и Leica DM 2500, оснащенного камерой («Leica» DFC 295, Германия).

Статистический анализ. Полученные цифровые данные были подвергнуты статистическому анализу с использованием прикладных программ Microsoft Office Excel 2010 и SPSS 13.0. Результаты представлены в виде средних значений и их ошибок для количественных величин или как значения и проценты для качественных. Показатели исследования были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Колмогорова – Смирнова. В случае нормального распределения значений применяли t-критерий Стьюдента. Достоверным считали различие между сравниваемыми рядами с уровнем достоверной вероятности 95 % ($p \leq 0,05$). Достоверность различий между выборками с отсутствием нормального распределения оценивали с помощью критерия Манна – Уитни. Различия считались достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка распределения частоты разных степеней интраэпителиальной дисплазии и микроинвазивного рака у женщин разных возрастных групп. При гистологическом и морфометрическом исследовании препаратов ШМ устанавливали диагноз «CIN», оценивали изменения ядер: увеличение размеров и гиперхромия, полиморфизм, наличие митозов выше базального слоя, койлоцитоз.

Диагноз «микроинвазивная карцинома» основывался на визуализируемом нарушении целостности базальной мембраны и наличии инвазивных комплексов в строме ШМ, глубиной до 3,0 мм.

Структура диагноза по группам сложилась следующим образом: у женщин 1 группы распространенность проявлений CIN I, II, III и микрокарцинома встречалась примерно с равной частотой, составив 27 %, 22 %, 28 %, 22 % соответственно, при этом суммарно доля более тяжелых изменений (CIN II, III и микрокарцинома) составила 72 %. У женщин старшей возрастной группы среди аналогичных показателей преобладали диспластические изменения легкой степени – CIN I, составившие 42 % случаев.

Морфометрическое исследование эпителия шейки матки с диспластическими изменениями разной степени выраженности и микроинвазивной карциномой у женщин разных возрастных групп. Морфометрическое исследование установило, что толщина МПЭ ШМ при наличии дисплазии была достоверно выше у женщин основных групп, чем у женщин обеих

контрольных групп. Также установлено, что у женщин 2 группы показатели толщины МПЭ в целом были ниже в сравнении с женщинами 1 возрастной группы во всех подгруппах.

В сравнении с группами контроля у пациенток обеих групп выявлено значительное расширение базального слоя, с увеличением значений от CIN I к микрокарциноме. Проводя сравнение между основными группами, у женщин молодого возраста также установлено более интенсивное расширение зоны базального слоя, достоверно отличающееся от показателей во второй группе.

В обеих возрастных группах с нарастанием степени CIN и до микроинвазивной карциномы в сравнении с показателями в контрольных группах, у женщин, как в первой, так и во второй группе отмечено увеличение диаметра ядер клеток базального слоя и других слоев МПЭ, что связано с появлением клеточной атипии и ядерного полиморфизма.

Установлено, что при CIN I у женщин 1-й группы койлоцитоз верифицировали у 100 % пациенток, во 2-й группе также часто – у 93 % женщин. Нарастание диспластических изменений сопровождалось снижением частоты и выраженности койлоцитоза, достигая минимальных значений при микрокарциноме.

Из всей группы женщин репродуктивного возраста лейкоплакия выявлена у 25 человек, и большая часть встречена при дисплазии легкой степени – 56 % (у 14 человек). Также ороговение в эпителии экзоцервикса встретили у 14 женщин менопаузального возраста, из которых менее чем в половине случаев при CIN I и CIN II – 42 % и 26 % соответственно. При CIN III признаков ороговения не было встречено ни у одной пациентки в обеих группах, при микрокарциноме – единичные случаи.

Морфометрический анализ воспалительного клеточного инфильтрата в шейке матки женщин двух возрастных групп с CIN разной степени выраженности и микроинвазивной карциномой. При морфометрической оценке воспалительных изменений в строме шейки матки выявлено, что объемная плотность воспалительного клеточного инфильтрата в подэпителиальной зоне стромы ШМ у женщин обеих основных групп была достоверно выше, чем у женщин контрольных групп и увеличивалась с прогрессированием дисплазии вплоть до микроинвазивной карциномы, а у пациенток менопаузального возраста этот показатель был достоверно ниже, чем у молодых женщин примерно в 2 раза в каждой подгруппе.

Морфометрический анализ клеточного состава воспалительного инфильтрата выявил, что у женщин обеих групп при всех степенях CIN и при микроинвазивной карциноме содержание макрофагов в составе воспалительного инфильтрата было примерно одинаковым и значительно не изменялось в обеих группах в каждой подгруппе, а в сравнении с группами контроля несколько увеличилось (таблица 1).

Наибольшую долю клеток инфильтрата составили лимфоидные клетки (лимфоциты и плазмоциты), содержание которых в сумме было около 40 % от всех клеток у женщин обеих возрастных групп (см. таблицу 1).

У женщин репродуктивного возраста доля плазматических клеток в инфильтрате увеличивалась с нарастанием степени CIN вплоть до микрокарциномы и в сравнении с группой контроля данный показатель стал выше практически в 5 раз и в 1,7 раза в сравнении с женщинами менопаузального возраста, у которых доля плазмоцитов значительно не изменялась при прогрессировании патологического процесса (см. таблицу 1).

В составе воспалительной инфильтрации содержание нейтрофилов и эозинофилов было невысоким у пациенток обеих групп, однако в целом суммарно доля этих клеток у пациенток репродуктивного возраста была выше во всех подгруппах (см. таблицу 1) и достигла максимальных значений при CINIII и микроинвазивной карциноме.

Доля фибробластов из общего состава клеток инфильтрата, напротив, была выше при всех степенях CIN и при микроинвазивной карциноме у пациенток 2-й группы в сравнении с молодыми женщинами, и даже в соответствующей контрольной группе данный показатель был выше в 1,7 раза (см. таблицу 1).

Оценка экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону (ER и PR) в многослойном плоском эпителии и строме шейки матки женщин двух возрастных групп с CIN разной степени выраженности и микроинвазивной карциномой. Экспрессия ER в эпителии ШМ контрольных групп встречалась в достоверно большем количестве клеток, в сравнении с соответствующими основными группами. У женщин старшего возраста экспрессия значительно не изменялась в подгруппах, но была примерно в 2 раза выше, чем у молодых женщин, у которых она достоверно снижалась при прогрессировании процесса. PR в эпителии ШМ в большем количестве экспрессировались у женщин 1-й контрольной группы и у молодых женщин при CIN I, в дальнейшем при прогрессировании патологического процесса, экспрессия рецепторов снижалась у женщин обеих исследуемых групп, что вероятно обусловлено нарастанием клеточной атипии и потерей клетками способности синтезировать рецепторы в достаточном количестве.

В сравнении с группами контроля у женщин молодого возраста не выявлено значительных изменений в экспрессии ER в строме ШМ, а у женщин старшего возраста их количество увеличивалось с прогрессированием CIN более чем в 2 раза в сравнении с соответствующей группой контроля. Экспрессия PR в строме ШМ у женщин обеих возрастных групп увеличивалась с прогрессированием CIN, вплоть до микроинвазивной карциномы.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика результатов морфометрического исследования клеточного состава воспалительного инфильтрата в группах женщин разных возрастов с CIN разной степени выраженности и микроинвазивной карциномой

Молодые женщины (1 группа) (n = 89)					Женщины старшего возраста (2 группа) (n = 71)				1 группа контроля (n=10)	2 группа контроля (n=10)
Оцениваемые параметры	CIN1 (n = 24)	CIN2 (n=20)	CIN3 (n=25)	Микроин- вазивная карцинома (n = 20)	CIN1 (n = 30)	CIN2 (n = 10)	CIN3 (n = 17)	Микроин- вазивная карцинома (n = 14)		
Лимфоциты	29,7 ± 0,9*	27,8 ± 1*	24,5 ± 0,6	24,6 ± 0,7*	28,5 ± 1,1*	25,3 ± 1,5*	24,5 ± 1,5	35,9 ± 0,5*	19,7 ± 0,6	22,01 ± 1,1
Макрофаги	26,3 ± 1,0*	28,9 ± 1*	22,0 ± 0,5*	23,6 ± 0,8*	24,3 ± 0,9*	20,9 ± 1*	30,0 ± 1,1*	18,2 ± 0,5*	16,3 ± 0,9	18,2 ± 0,8
Нейтрофилы	3,9 ± 0,4*	3,3 ± 0,4	14,0 ± 0,5*	2,6 ± 0,3*	3,1 ± 0,3*	3,01 ± 0,5	1,3 ± 0,2*	1,01 ± 0,2*	1,6 ± 0,03	0,4 ± 0,01
Эозинофилы	4,0 ± 0,6*	2,9 ± 0,5	5,7 ± 0,4*	11,8 ± 0,4*	1,3 ± 0,3*	2,5 ± 0,4	1,8 ± 0,5*	5,0 ± 0,5*	2,1 ± 0,04	0,8 ± 0,02
Плазмоциты	11,0 ± 0,8	12,4 ±0,7	19,0 ± 0,5*	24,0 ± 0,8*	9 ± 0,5	11,6 ± 0,8	7,8 ± 0,5*	14,1 ± 0,8*	4,9 ± 0,4	3,7 ± 0,6
Фибробласты	24,9 ±1,3*	24,0 ± 1,8*	13,5 ± 1,0*	13,4 ± 0,5*	33,5 ± 1,4*	37 ± 1,8*	34 ± 1,6*	25,9 ± 0,9*	9,7 ± 0,2	16,4 ± 0,9
Примечания: достоверные отличия средних величин рассматриваемых параметров ($p \leq 0,05$): * между сравниваемыми соответствующими значениями 1 и 2 группы										

Сравнительная оценка экспрессии внутриклеточных белков: p16, Ki67, p53 в эпителии шейки матки у женщин двух возрастных групп при диспластических изменениях и микроинвазивной карциноме. В условиях дисплазии экспрессия белка p16 у женщин обеих возрастных групп значительно увеличивалась вплоть до микроинвазивной карциномы и в сравнении с показателями в контрольных группах (таблица 2). Также установлено, что у молодых женщин экспрессия белка p16 была достоверно выше, чем у женщин менопаузального возраста при CIN I и CIN II: в 4,5 и в 2,5 раза соответственно. При CIN III и микрокарциноме этот показатель значительно не различался в обеих группах (см. таблицу 2).

В сравнении с группами контроля ядерная экспрессия белка p53 увеличилась при прогрессировании дисплазии, так у женщин 1-й и 2-й возрастной групп данный показатель увеличился более чем в 8 раз при микроинвазивной карциноме (см. таблицу 2). Установлено, что у пациенток молодого возраста максимальное количество клеток МПЭ, экспрессирующих белок p53, было выявлено при CIN I, однако данный показатель снижался при прогрессировании дисплазии, максимально снизившись при CIN III (см. таблицу 2). Тогда как у женщин старшего возраста отмечена противоположная картина, этот показатель нарастал и при микроинвазивной карциноме достиг максимального значения, увеличившись в 14 раз, и был самым высоким как внутри группы, так и в сравнении с женщинами молодого возраста (см. таблицу 2).

Индекс мечения (ИМ) маркера пролиферативной активности Ki67 нарастал при прогрессировании патологического процесса в МПЭ ШМ обеих возрастных групп, однако у женщин молодого возраста он был несколько выше во всех подгруппах – в 1,4; 1,8; 1,2; 1,2 раза, соответственно (см. таблицу 2). В сравнении с группами контроля индекс мечения достигал максимально высокого значения при микроинвазивной карциноме и у женщин 1-й возрастной группы увеличился примерно в 8 раз, а у женщин 2-й возрастной группы в 11 раз.

Экспрессия матриксных металлопротеиназ, их универсального тканевого ингибитора TIMP-1 и VEGF в строме шейки матки у женщин 2 возрастных групп при диспластических изменениях и микроинвазивной карциноме. При оценке экспрессии MMPs установлено, что в обеих основных группах пациенток при прогрессировании дисплазии от CIN I к CIN III и вплоть до микрокарциномы нарастает экспрессия металлопротеиназ 2, 3 и 9 в сравнении с соответствующими группами контроля (таблица 3). У пациенток репродуктивного возраста данные показатели были достоверно выше в каждой подгруппе в сравнении с показателями женщин старшего возраста (см. таблицу 3). При этом установлено, что MMP7 экспрессировалась в самых минимальных значениях при всех степенях CIN и при

микроинвазивной карциноме у женщин обеих возрастных групп, тогда как в соответствующих группах контроля экспрессия данной MMP практически не встречалась. Также установлено увеличение экспрессии MMP7 параллельно с прогрессированием степени дисплазии внутри основных групп: у молодых женщин в 18 раз с 0,07 % при CIN I и до 1,3 % при микрокарциноме; у женщин пострепродуктивного возраста в 36 раз с 0,03 % при CIN I и до 1,1 % при микрокарциноме, не имея достоверных различий между группами.

Проводя анализ экспрессии TIMP-1, установлено, что в сравнении с группами контроля у женщин обеих возрастных групп при дисплазии легкой степени его экспрессия достоверно увеличилась и у пациенток перименопаузального возраста продолжала нарастать, увеличившись в 42 раза, а у пациенток репродуктивного возраста, напротив, экспрессия снижается в 60 раз с прогрессированием патологического процесса.

С нарастанием степени дисплазии от CIN I и до микроинвазивной карциномы, у женщин молодого возраста, достоверно повышалась экспрессия VEGF, в сравнении с группой контроля и достигла максимального значения при микрокарциноме, увеличившись практически в 7 раз. У женщин старшего возраста экспрессия VEGF также повысилась по сравнению с группой контроля, но начиная с CIN III показатель начал снижаться, достигнув минимального значения при микрокарциноме (см. таблицу 3).

Таблица 2 – Иммуногистохимическое исследование экспрессии белка p16, белка p53, маркера пролиферативной активности Ki-67 в многослойном плоском эпителии шейки матки женщин 1 и 2 возрастных групп

Оцениваемые параметры	1 группа (женщины моложе 35 лет) (n = 89)				2 группа (женщины старше 49 лет) (n = 71)				1 группа контроля (n = 10)	2 группа контроля (n = 10)
	CINI (n = 24)	CINII (n = 20)	CINIII (n = 25)	микрокарцинома (n = 20)	CINI (n = 30)	CINII (n = 10)	CINIII (n = 17)	микрокарцинома (n = 14)		
p16	1,8 ± 0,4*	31,4 ± 3,8*	61 ± 2,4	74,5 ± 1,8*	0,4 ± 0,4*	12,3 ± 0,4*	60,4 ± 2,6	65,8 ± 2,3*	0,3 ± 0,01	0,03 ± 0,01
p53	1,5 ± 0,4*	2,1 ± 0,7*	0,7 ± 0,8*	1,7 ± 0,9*	0,5 ± 0,2*	0,8 ± 0,2*	5,6 ± 1,3*	7,1 ± 1,5*	0,2 ± 0,01	0,8 ± 0,01
Ki-67	17,7 ± 1,2*	25,2 ± 2*	65,1 ± 1,8*	73,3 ± 1,2*	12,5 ± 0,5*	13,4 ± 1,8*	54,2 ± 2,3*	61,7 ± 0,9*	9,4 ± 0,6	5,3 ± 1,2
Примечания: * достоверные отличия средних величин рассматриваемых параметров между сравниваемыми соответствующими значениями 1 и 2 группы. Различия между группами признавались достоверными при p < 0,05.										

Таблица 3– Сравнительная характеристика результатов иммуногистохимического исследования экспрессии матричных металлопротеиназ, TIMP1 и VEGF в группах женщин разных возрастов с CIN разной степени выраженности и микроинвазивной карциномой

Оцениваемые параметры	1 группа (женщины моложе 35 лет) (n = 89)				2 группа (женщины старше 49 лет) (n = 71)				1 группа контроля (n = 10)	2 группа контроля (n = 10)
	CINI (n = 24)	CINII (n = 20)	CINIII (n = 25)	микрокарцинома (n = 20)	CINI (n = 30)	CINII (n = 10)	CINIII (n = 17)	микрокарцинома (n = 14)		
MMP2	2,1 ± 0,4	20,3 ± 0,8*	23,2 ± 0,4*	31,5 ± 1,7*	2,0 ± 0,3	4 ± 1*	18,7 ± 1,4*	20,3 ± 1,3*	0,8 ± 0,01	0,5 ± 0,02
MMP3	16,2 ± 0,5*	18,4 ± 0,8*	19,5 ± 1,1*	23,03 ± 1*	9,3 ± 0,8*	9,6 ± 1*	11,4 ± 1*	20,5 ± 0,8*	9,3 ± 0,4	2,6 ± 0,4
MMP7	0,07 ± 0,01*	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,04	1,3 ± 0,2	0,03 ± 0,01*	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,1	1,13 ± 0,4	0,03 ± 0,01	0
MMP9	10,5 ± 2*	13,7 ± 0,5*	15,4 ± 1,2*	18,3 ± 1,3*	2,2 ± 0,4*	6,4 ± 1*	10,4 ± 1,4*	13,8 ± 1,3*	2,3 ± 0,9	1,6 ± 0,02
TIMP1	2,6 ± 0,08*	0,5 ± 0,01	0,4 ± 0,02*	0,04 ± 0,01*	0,1 ± 0,06*	0,4 ± 0,1	1,5 ± 0,3*	1,7 ± 0,4*	0,7 ± 0,04	0,03 ± 0,01
VEGF	10,6 ± 0,6	21,4 ± 1,8	24,6 ± 1	29,6 ± 0,4	12,4 ± 0,7	13,7 ± 0,9	5,3 ± 0,2	4,9 ± 0,3	4,4 ± 0,9	7,8 ± 1,2
Примечания: * достоверные отличия средних величин рассматриваемых параметров ($p \leq 0,05$) между сравниваемыми соответствующими значениями 1 и 2 группы.										

ВЫВОДЫ

1. Диспластические изменения в эпителии шейки матки у пациенток репродуктивного возраста, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска, чаще проявляются в виде CINII, III и микроинвазивной карциномы – суммарно в 72 % случаев, тогда как у пациенток менопаузального возраста 42 % случаев составила CINI. По данным морфометрии в условиях дисплазии пациентки репродуктивного возраста имеют более выраженные микроскопические признаки пролиферации в многослойном плоском эпителии шейки матки при всех степенях CIN.

2. В условиях диспластических изменений эпителия шейки матки у пациенток обеих возрастных групп, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска, имеет место более выраженная перифокальная воспалительная реакция в строме шейки матки в сравнении с группами контроля. При этом у пациенток репродуктивного возраста в условиях дисплазии морфологические проявления воспалительной реакции более выраженные – это установлено на основании большей объемной плотности клеток воспалительного инфильтрата, более высокой активности воспаления. У пациенток менопаузального возраста преобладают склеротические процессы в строме на фоне меньшей выраженности воспалительной реакции, при всех степенях CIN и при микроинвазивной карциноме.

3. У пациенток репродуктивного возраста с интраэпителиальным поражением ШМ, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска, на фоне более выраженного дисбаланса в экспрессии рецепторов к стероидным гормонам, в сравнении с пациентками старшей возрастной группы, имеют место различия в реакции клеточного микроокружения на диспластические изменения, свидетельствующие о возможном более быстром и агрессивном разрушении внеклеточного матрикса и базальной мембраны, новообразовании сосудов у пациенток репродуктивного возраста, что проявляется прогрессивным более значимым нарастанием индекса мечения металлопротеиназ 2, 3 и 9 в эпителии и клетках стромы, экспрессии VEGF. Экспрессия металлопротеиназы 7 невысокая в обеих возрастных группах, однако она увеличивается от CINI к микроинвазивной карциноме и не имеет достоверного различия между возрастными группами. У пациенток менопаузального возраста TIMP-1 экспрессируется в большем количестве при всех степенях дисплазии, достигая при микрокарциноме в 42 раза более высокого значения, чем у пациенток репродуктивного возраста, у которых экспрессия данного маркера, напротив, снижается в 60 раз с прогрессированием патологического процесса.

4. Выявленные изменения в экспрессии белков p16, p53 и маркера пролиферативной активности Ki67 в диспластичном многослойном плоском эпителии шейки матки свидетельствуют об имеющихся различиях в дисбалансе клеточного цикла у пациенток репродуктивного и менопаузального возраста, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска:

а. При CIN I и CIN II у пациенток репродуктивного возраста белок p16 в эпителии шейки матки экспрессируется в 4,5 и 2,5 раза большем количестве в сравнении с показателями у пациенток менопаузального возраста, но при CIN III и микроинвазивной карциноме экспрессия данного белка не имеет достоверных различий между группами.

б. У пациенток менопаузального возраста экспрессия маркера апоптоза – белка p53 нарастает с прогрессированием патологического процесса и в сравнении с пациентками репродуктивного возраста при микроинвазивной карциноме его экспрессия выше в 4 раза.

в. Индекс мечения маркера пролиферативной активности – Ki67 у пациенток репродуктивного возраста при всех степенях дисплазии многослойного плоского эпителия шейки матки и микрокарциноме был приблизительно в 1,5 раза выше, чем у пациенток менопаузального возраста.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные данные различий в составе и выраженности воспалительного инфильтрата, гормонального профиля и рецепторного статуса ткани шейки матки могут послужить обоснованием необходимости учета индивидуальных особенностей тканевых реакций у женщин разного возраста в условиях инфицирования вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска.

2. Определение изменений в системе металлопротеиназы / тканевые ингибиторы металлопротеиназ может быть положено в основу методических подходов для прогнозирования индивидуальных рисков прогрессирования интраэпителиальной неоплазии в шейке матки и метастазирования микроинвазивной карциномы.

3. Данные о роли матриксных металлопротеиназ и их тканевого ингибитора – TIMP1 в пато- и морфогенезе предопухолевых изменений в шейке матки позволяют обосновать их внедрение в протокол патоморфологического исследования биоптатов шейки матки для прогнозирования течения болезни в возрастном аспекте и для разработки индивидуального подхода к лечению цервикальной интраэпителиальной неоплазии и микроинвазивной карциномы шейки матки у пациенток, инфицированных вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Селякова, М. С.** Особенности патоморфологических проявлений диспластических изменений разной степени в шейке матки у женщин различных возрастных групп / **М. С. Селякова, Т. А. Агеева** // **Сибирский онкологический журнал.** – 2015. – № 4. – С. 58–62.
2. Особенности иммуногистохимических характеристик диспластичного многослойного плоского эпителия шейки матки у женщин разных возрастных групп / **М. С. Селякова** [и др.] // **Уральский медицинский журнал.** – 2018. – № 2. – С. 43–47.
3. **Селякова, М. С.** Взаимоотношение экспрессии металлопротеиназ и TIMP1 с выраженностью воспалительной инфильтрации в шейке матки у женщин разных возрастных групп при интраэпителиальной неоплазии и микроинвазивной карциноме / **М. С. Селякова, Т. А. Агеева, С. В. Савченко** // **Сибирский онкологический журнал.** – 2019. – Т. 6. – № 6. – С. 50–56.
4. **Селякова, М. С.** Структура диспластических изменений в шейке матки у женщин разных возрастных групп / **М. С. Селякова, Т. А. Агеева** // Авиценна-2013 : 4-я Российская (итоговая) научно-практическая конференция студентов и молодых учёных. – Новосибирск, 2013. – Т. 1. – С. 347–348.
5. **Селякова, М. С.** Особенности диспластических изменений многослойного плоского эпителия шейки матки у женщин разных возрастных групп / **М. С. Селякова, Т. А. Агеева** // Актуальные вопросы патологоанатомической практики : материалы научно-практической патологоанатомической конференции Южного Урала с участием патологоанатомов регионов России и СНГ, посвященной 30-летию основания Челябинского областного патологоанатомического бюро. – Челябинск, 2014. – С. 83–85.
6. **Селякова, М. С.** Особенности патоморфологических проявлений диспластических изменений разной степени в шейке матки у женщин разных возрастных групп / **М. С. Селякова, Т. А. Агеева** // Актуальные вопросы патологической анатомии : материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 80-летию образования кафедры патологической анатомии НГМУ. – Новосибирск : Сибмедиздат НГМУ, 2015. – С. 152–153.
7. **Селякова, М. С.** Воспалительная реакция на предопухолевые изменения в многослойном плоском эпителии шейки матки у женщин разных возрастных групп / **М. С. Селякова, Т. А. Агеева** // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов : материалы конференции. – Новосибирск, 2015. – С. 254–256.

8. **Селякова, М. С.** Морфология CIN разной степени выраженности в шейке матки у женщин разных возрастов / **М. С. Селякова**, Т. А. Агеева // Морфологические науки – фундаментальная основа практической медицины : 1-я Международная морфологическая научно-практическая конкурс-конференция студентов и молодых ученых, посвященная памяти профессора М. Я. Субботина. – Новосибирск, 2016. – С. 157–159.
9. **Селякова, М. С.** Особенности иммуногистохимических характеристик диспластичного многослойного плоского эпителия шейки матки у женщин разных возрастных групп / **М. С. Селякова**, Т. А. Агеева // 5-й съезд Российского общества патологоанатомов – Челябинск, 2017. – С. 295–296.
10. **Селякова, М. С.** Сравнительная характеристика рецепторного статуса в многослойном плоском эпителии шейки матки у женщин разных возрастных групп при интраэпителиальных поражениях / **М. С. Селякова**, Т. А. Агеева // Морфологические науки – фундаментальная основа практической медицины : 2-я Международная морфологическая конкурс-конференция студентов и молодых ученых, посвященная памяти М. А. Самотейкина. – Новосибирск, 2017. – С. 214–216.
11. **Селякова, М. С.** Экспрессии металлопротеиназы-9 и TIMP-1 с воспалением в шейке матки у женщин разных возрастных групп при интраэпителиальной неоплазии и микроинвазивной карциноме / **М. С. Селякова**, Е. И. Воронина // Морфологические науки – фундаментальная основа практической медицины : 3-я Международная морфологическая научно-практическая конкурс-конференция студентов и молодых ученых, посвященная 100-летию профессора Т. Д. Никитной. – Новосибирск, 2018. – С. 187–190.
12. **Селякова, М. С.** Экспрессия стероидных гормонов в многослойном плоском эпителии шейки матки у женщин разных возрастных групп при интраэпителиальных поражениях / **М. С. Селякова** // Авиценна 2018 : 9-я Российская (итоговая) научно-практическая конференция студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2018. – Т. 1. – С. 442–444.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВПЧ	вирус папилломы человека
ИГХ	иммуногистохимия
ИМ	индекс мечения
МПЭ	многослойный плоский эпителий
ПВИ	папилломавирусная инфекция
РШМ	рак шейки матки
ШМ	шейка матки
ЭМП	эпителиально-мезенхимальный переход
CIN	цервикальная интраэпителиальная неоплазия
ER	эстрогеновые рецепторы
HPV	human papillomavirus
PR	прогестероновые рецепторы
SIL	плоскоклеточное интраэпителиальное поражение
MMPs	металлопротеиназы
TIMP	тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ
VEGF	сосудистый эндотелиальный ростовой фактор