

УДК 618.146-006-091.8:576.8.077.3:612.014.1].001.8

Н.Ф. Иевлева¹, Г.В. Чижова², И.И. Курунова¹, М.Ю. Флейшман³

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЭПИТЕЛИЯ ШЕЙКИ МАТКИ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ВЫРАЖЕННОСТИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

¹Дорожная клиническая больница на ст. Хабаровск-1 ОАО «РЖД»,
680022, ул. Воронежская, 49, тел. 8-(4212)-98-01-04, e-mail: mail@dkb-dv.ru;

²Институт повышения квалификации специалистов здравоохранения Хабаровского края,
680009, ул. Краснодарская, 9, тел. 8-(4212)-72-87-15, e-mail: rec@ipkszh.khv.ru;

³Дальневосточный государственный медицинский университет,
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-30-53-11, e-mail: rec@mail.fesmu.ru, г. Хабаровск

Резюме

В настоящее время прослеживается стабильная тенденция к повышению заболеваемости раком шейки матки (РШМ) среди женщин молодого возраста. В этой связи, совершенствование и внедрение методов ранней диагностики и новых скрининговых технологий является актуальным направлением в профилактике и лечении данной патологии. Проведено гистоморфологическое и гистохимическое исследование 68-ми биоптатов шейки матки (ШМ), полученных от 13-ти женщин, не имеющих заболеваний и от 55-ти пациенток с различной степенью выраженности патологических изменений эпителия экзоцервикса: CIN I – 20, CIN II – 15, CIN III, включая рак in situ – 15 и 5 случаев инвазивного РШМ. Выполненное иммуногистохимическое исследование (ИГХ) пролиферативной активности цервикального эпителия у женщин с неизменной слизистой ШМ показало, что уровень пролиферации с маркером Ki-67 составил $5,3 \pm 0,3$. Выявлено, что маркер Ki-67 ядер эпителия при CIN I достоверно выше по сравнению с неизменным многослойным плоским эпителием (МПЭ) в 3,47 раз, при CIN II – в 6,72. При CIN III, включая рак in situ – в 14,23 и при инвазивном раке в 15,58 раз повышен по отношению к норме. Установлено, что степень выраженности активности пролиферации тем выше, чем более выраженнее диспластические изменения эпителия, а максимально высокие значения отмечены при РШМ.

Ключевые слова: дисплазия (CIN), рак шейки матки, маркер пролиферации Ki-67, иммуногистохимический метод.

N.F. Ievleva¹, G. V. Chigova¹, I.I. Kurunova², M.U. Fleishman³

THE IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF CERVIX UTERI EPITHELIUM WITH VARYING DEGREES OF SYMPTOMS OF PATHOLOGICAL CONDITIONS

¹Railway hospital;

²Territorial state budget educational institution of additional professional education «Postgraduate Institute for Public Health Workers»;

³Far East State Medical University, Khabarovsk

Summary

In the last 15-20 years a disturbing tendency to increase of cervical cancer in young women has been observed. The methods of early diagnostics, improvement and introduction of new screening technologies are very significant in prevention of this problem. The histomorphological and histochemical research of 68 biopsy tissues of cervix uteri was carried out: there were 13 females without cervix uteri diseases and 55 patients with different degree of pathological changes of the cervical epithelium: CIN I – 20, CIN II – 15, CIN III, including cancer in situ – 15 and 5 cases of invasive cancer of cervix uteri. The immunohistochemical analysis of proliferative activity of cervical epithelium in females with intact cervix uteri

mucous, showed that the rate of marker proliferation Ki-67 was $5,3 \pm 0,3$. The level of epithelium proliferation (Ki-67) at CIN I was higher 3,47 times, at CIN II –6,72, at CIN III, including in situ cancer – in 14,23 and in invasive cancer by 15,58 times in comparison to unchanged squamous epithelium. The results of the research showed that the more expressive proliferation degree activity was, the more dysplastic epithelium changes were observed. The maximum figures were noted in cervix uteri cancer.

Key words: dysplasia (CIN), cancer cervix uteri, marker proliferation Ki-67, immunohistochemical analysis.

Несмотря на существование в настоящее время четкой концепции о фоновых процессах, предраке и раке шейки матки, а также наличие доступного и относительно надежного цитологического скрининга и кольпоскопии, РШМ остается одной из самых актуальных проблем онкогинекологии и занимает лидирующее положение (2-3 место) среди злокачественных опухолей репродуктивных органов [5, 1].

Развитию РШМ предшествуют цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN). По современным представлениям, CIN I имеет вероятность развития следующих вариантов: регресс, при котором наблюдаются полностью обратимые изменения, прогрессирование и персистенция [3]. CIN II и CIN III относятся к группе истинных предраковых изменений эпителия ШМ с высокой вероятностью прогрессирования в рак [5].

Методы ранней диагностики и внедрение новых скрининговых технологий с использованием иммуногистохимии при заболеваниях шейки матки открывают дополнительные возможности для профилактики РШМ [5, 6]. Для прогнозирования течения предопухолевых и опухолевых процессов имеет большое значение определение баланса пролиферативной активности и апоптоза [6]. В основе иммуногистохимической оценки пролиферации лежит использование антител к Ki-67 [4].

Цель исследования – изучение уровня пролиферативной активности с использованием ядерного маркера Ki-67 в неизменном многослойном плоском эпителии и при различной степени CIN изменений с целью определения его роли как предиктора онкопатологии шейки матки.

Материалы и методы

Проведено гистоморфологическое и иммуногистохимическое исследование биоптатов шейки матки, полученных при обследовании и лечении 68-ми женщин, обратившихся за медицинской помощью в НУЗ ДКБ преимущественно с патологией ШМ. По результатам обследования выявлено 13 здоровых женщин и 55 больных с различной степенью выраженности патологических изменений ШМ: CIN I – 20 случаев, CIN II – 15, CIN III, включая рак in situ – 15 и 5 случаев инвазивного РШМ.

Для гистологических исследований готовили серийные срезы толщиной в 5 мкм с последующей окраской гематоксилин-эозином по стандартной методике. Для характеристики диспластических изменений использовали классификацию предраковых состояний шейки матки по трем степеням цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN) [7].

Иммуногистохимические исследования выполняли по стандартным протоколам с выявлением экспрессии белка Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation Denmark A/S) с системой визуализации EnVision+ [4]. Подсчет меченых Ki-67 ядер производили в 50-ти полях зрения

на 100 клеток в каждом случае с последующим установлением частоты положительно окрашенных ядер в процентах к общему числу ядер эпителиального пласта.

Результаты и обсуждение

На основании данных проведенного комплексного обследования с учетом результатов гистологического исследования больные были распределены на группы с неизменным МПЭ, с CIN I, CIN II, CIN III, включая рак in situ и с инвазивным раком в соответствие с современной классификацией и терминологией [2].

В неизменном МПЭ базальный слой клеток расположен на базальной мембране, представлен одним рядом округлых клеток. Парабазальный, промежуточный и поверхностный слои отличаются дифференцировкой эпителиальных клеток. В неизменном МПЭ отметка маркером Ki-67 была выявлена в ядрах клеток, расположенных парабазально, в виде тонкой полоски из 1-3 слоев клеток (рис. 1). Уровень пролиферации меченых Ki-67 ядер был низким и составил $5,3 \pm 0,3$ % (табл.).

Уровень пролиферативной активности (Ki-67) эпителиальных клеток ШМ в неизменном многослойном плоском эпителии (МПЭ) и при различной степени выраженности патологических состояний

Диагноз	n (абс.)	%	M±m (%)	P
Неизменный МПЭ	13	19,1	5,3±0,3	$p_1 < 0,001$ $p_6 < 0,001$
CIN I	20	29,4	18,4±2,1	$p_2 < 0,001$
CIN II	15	22,1	35,6±3,2	$p_3 < 0,001$
CIN III, включая рак in situ	15	22,1	75,4±6,9	$p_4 > 0,05$ $p_5 < 0,001$
Рак invas	5	7,3	82,6±8,4	$p_7 < 0,001$
Всего	68	100		

Примечания. p_1 – достоверность различий между показателями пролиферации клеток эпителия ШМ Ki-67 в группе женщин с неизменным МПЭ и CIN I; p_2 – $-/-$ в группе женщин с CIN I и CIN II; p_3 – $-/-$ в группе женщин с CIN II и CIN III, включая рак in situ; p_4 – $-/-$ в группе женщин с CIN III, включая рак in situ и инвазивным раком; p_5 – $-/-$ в группе женщин с неизменным МПЭ и CIN II; p_6 – $-/-$ в группе женщин с неизменным МПЭ.

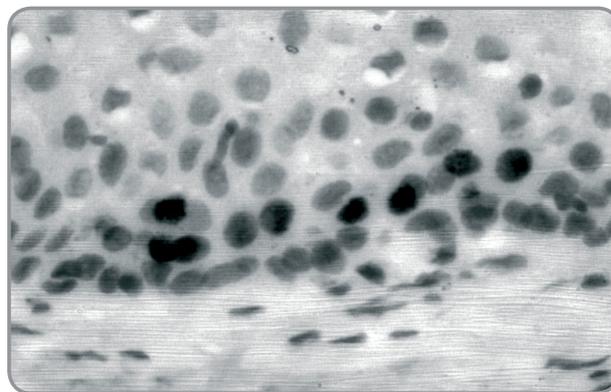


Рис. 1. Неизменный МПЭ шейки матки. ИГХ реакция с Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation Denmark A/S), x 200, гематоксилин-эозин

Гистологически при CIN I установлены клеточные изменения в нижней трети эпителиального пласта, проявляющиеся гиперплазией базальных и парабазальных клеток глубоких слоев в сочетании с клеточным и ядерным полиморфизмом. При этом регистрировали утрату полярности расположения клеток в указанных слоях и их правильную послойность, единичные митозы в клетках базального слоя, а в более поверхностных клетках явления гипер- и/или паракератоза. Чаще всего подобные изменения связаны с папилломавирусной инфекцией. При CIN I Ki-67-положительные ядра были сосредоточены парабазально и не регистрировались за пределами этого слоя (рис. 2). Морфометрический анализ показал увеличение числа меченных Ki-67 ядер до $18,4 \pm 2,1$ %, что в 3,47 раза ($p < 0,001$) превышает уровень в неизменном многослойном плоском эпителии.

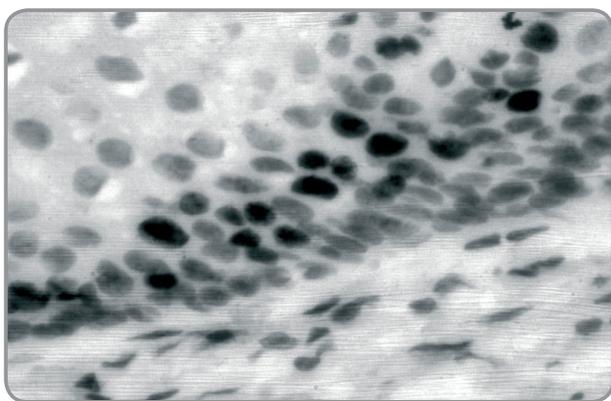


Рис. 2. CIN I.

ИГХ реакция с Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation Denmark A/S), x 200, гематоксилин-эозин и CIN III, включая рак in situ, p₇ – -//-

При CIN II в гистологических препаратах была выявлена гиперплазия в нижней половине толщи эпителиального пласта. При этом регистрировали расширение зоны пролиферативного компартмента, что подтверждено наличием меченых Ki-67 ядер, определяемых в разных слоях покровного эпителия. Доля меченых Ki-67 ядер была увеличена в 6,72 раза в сравнение с контролем ($p < 0,001$) и составила $35,6 \pm 3,2$ %.

Гистологически при CIN III анаплазия определялась не менее чем в двух третях эпителиального пласта, базальная мембрана была сохранена, отмечали нарушение стратификации слоев, явления клеточного и ядерного полиморфизма, пролиферацию клеток парабазального слоя, вращание атипичного эпителия в просвет желез. При интраэпителиальном раке (раке in situ) регистрировали тканевую и клеточную атипию, проявляющуюся полной утратой послойности полиморфного эпителия, затрагивающей и поверхностный слой клеток. Кроме того, на фоне значительного числа митозов на разных уровнях пласта, определяли патологические мультиполярные митозы.

Ki-67-положительные клетки выявлялись во всех, особенно, наружных ороговевающих слоях эпителиального покрова. Максимальные уровни частот реагирующих клеток выявлены в эпицентре диспластических изменений, а по периферии очагов их уровень был значительно ниже. Отмечено, что вовлечение

новых клеточных популяций в группы, положительно реагирующих на Ki-67 клеток, происходит в основном выше парабазальных слоев. При CIN III, в том числе и раке in situ, отмечена интенсивная иммуногистохимическая реакция во всех слоях эпителия с особым постоянством в самых наружных (рис. 3). Следует заметить, что изменения при раке in situ характеризуются мозаичностью – наблюдаются участки диспластического и неизменного эпителия. Морфометрический анализ показал, что доля меченных по Ki-67 ядер при CIN III, в том числе при раке in situ, достоверно превышала его значение в сравнение с неизменным эпителием, CIN I и CIN II (табл. 1). При этом частота окрашенных Ki-67 ядер составила $75,4 \pm 6,9$ %. Объединение изменений CIN III и рак in situ по морфологической сущности в единый процесс обусловлено тем, что регистрировался относительно одинаково высокий уровень Ki-67-положительно реагирующих клеток при данных патологических состояниях шейки матки.

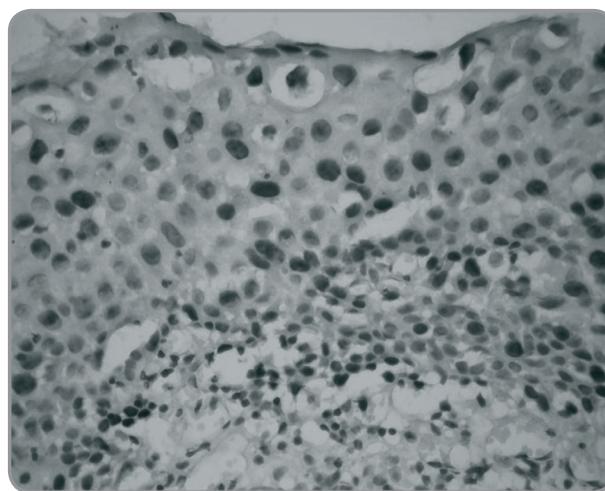


Рис. 3. CIN III, включая рак in situ.

ИГХ реакция с Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation Denmark A/S), x 200, гематоксилин-эозин

Стратификация покровного эпителия при инвазивном раке ШМ нарушена во всей толще эпителиального пласта. Базальная мембрана при этом частично разрушена, в подэпителиальной строме определяются мелкие комплексы и гнездные скопления атипичных эпителиальных клеток с выраженной атипией ядер. При инвазивном раке регистрировали достоверно высокий уровень меченых ядер Ki-67 в сравнении с МПЭ, CIN I, CIN II. Доля меченых Ki-67 ядер при инвазивном раке была максимальной и составила $82,6 \pm 8,4$ %, однако по сравнению с CIN III, включая рак in situ, это превышение не было достоверным.

Таким образом, существенное значение в изучении уровня пролиферативной активности эпителия шейки матки может быть наиболее значимо при CIN I. Согласно наблюдениям Минкиной Г.Н. и др. (2008), исход при CIN I может быть следующим: в 40-75 % случаев имеет место регресс, при котором наблюдаются полностью обратимые изменения, 5-10 % – прогрессирование процесса и в 29-43 % – персистенция. Динамическое наблюдение пациенток с CIN I и исследование у них пролиферативной активности с использованием маркера Ki-67 позволит определить тактику

ведения данной категории больных с целью исключения необоснованного хирургического вмешательства.

Выводы

1. При всех степенях эпителиальных дисплазий, включая рак *in situ* в группе CIN III, и при инвазивном раке число Ki-67-положительно реагирующих ядер достоверно выше по сравнению с неизменным эпителием.

2. Микроскопически определяли различные варианты расположения клеток с Ki-67-положительными

ядрами: это могут быть участки в виде «гнезд» или участки с равномерно расположенными мечеными Ki-67-клетками в разных слоях эпителия с кумуляцией в очагах дисплазии.

3. Уровень пролиферации эпителия (Ki-67) имел достоверные различия между всеми исследуемыми группами эпителиальных дисплазий и различной степени неоплазий, за исключением 2-х групп (CIN III, включая рак *in situ* и рак *invas.*), между которыми не было достоверных различий.

Литература

1. Бебнева Т.Н., Прилепская В.Н. Профилактика рака шейки матки: скрининг (обзор литературы) // Научно-практический медицинский журнал «Доктор. Ру». – 2009. – № 6 (50). – С. 14–15.

2. Кондриков Н. И. Патология матки. – М.: Практическая медицина, 2008. – 334 с.

3. Минкина Г.Н., Манухин И.Б. Пролиферативная активность эпителия при плоскоклеточных эпителиальных поражениях шейки матки // Журнал акушерства и женских болезней. – 2008. – № 1. – С. 34–36.

4. Петров С.В., Райхлин Н.Г. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. – Казань, 2000. – 287 с.

5. Прилепская В.Н., Роговская С.И. Новые технологии профилактики рака шейки матки. Патология шейки матки и генитальная инфекция. – М.: МЕД-пресс-информ, 2008. – С. 8–14.

6. Looi M.L., Dali A.Z., Ali S.A. Expression of p53, bcl-2 and Ki-67 in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix // Anal.Quant.Cytol.Histol. – 2008. – Vol. 30 (2). – P. 63–70.

7. Richart R.M. Cervical intraepithelial neoplasia // Pathology Annual. – 1973. – Vol. 8. – P. 301–328.

Координаты для связи с авторами: *Иевлева Надежда Федоровна* – кандидат мед. наук, заведующая хирургическим отделением ДКДЦ НУЗ «ДКБ на ст. Хабаровск-1 ОАО «РЖД», доцент кафедры акушерства и гинекологии ИПКСЗ Хабаровского края, тел.: 8-(4212)-98-01-04, +7-914-541-45-90, e-mail: nadezda.ievleva@dkb-dv.ru; *Чижова Галина Всеволодовна* – д.м.н., профессор, ректор ИПКСЗ, зав. кафедрой акушерства и гинекологии, e-mail: rec@ipkszh.khv.ru, тел. 8-(4212)-72-87-15; *Курунова Ирина Игоревна* – заведующая ПАО «Дорожная клиническая больница на ст. Хабаровск-1 ОАО «РЖД», тел. 8-(4212)-98-05-39, e-mail: irina.kurunova@dkb-dv.ru; *Флейшман Марина Юрьевна* – доктор мед. наук, главный научный сотрудник ЦНИЛ ДВГМУ, e-mail: marfl@yandex.ru.



УДК 681.324

Н.Э. Косых¹, В.В. Гостюшкин², Т.П. Потапова¹, С.З. Савин², А.В. Еременко¹

МЕТОДИКА АВТОМАТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ КОСТНЫХ МЕТАСТАЗОВ ПО ДАННЫМ ПЛАНАРНОЙ ОСТЕОСЦИНТИГРАФИИ

¹Дальневосточный государственный медицинский университет, 680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-32-63-93, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru;

²Вычислительный центр ДВО РАН, 680000, ул. Ким Ю Чена, 65, тел. 8-(4212)-22-72-67, e-mail: 1420@as.dv.khv.ru, г. Хабаровск

Резюме

Создана система автоматизированной компьютерной диагностики скелетных метастазов по данным планарной скинтиграфии, основанная на принципах распознавания изображений и обладающая функциями экспертного анализа. Математический аппарат системы позволяет проводить расчет текстурных, гистограммных и морфометрических параметров очагов гиперфиксации радиофармпрепарата и более точно выявлять зоны скелета подозрительные на метастатическое поражение.

Ключевые слова: автоматическая компьютерная диагностика, скинтиграфия скелета, костные метастазы.