

УДК 618.146:616-006:578.825.11

О.В. Лесничая*, Д.М. Семенов*,

Ю.В. Крылов**, С.В. Малашенко**

УО «Витебский государственный медицинский университет»*

Витебское областное клиническое патологоанатомическое бюро**

Прогностическое значение поражения вирусом простого герпеса 2 типа при цервикальной интраэпителиальной неоплазии III степени и раке шейки матки

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

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

Актуальность

Рак шейки матки (РШМ) является тяжелым, быстро прогрессирующим и трудноизлечимым заболеванием, поражающим женщин детородного и трудоспособного возраста. По данным Белорусского канцер-регистра, в республике наблюдается рост заболеваемости раком шейки матки с 15,2 в 1999-2003 году, до 15,8 в 2004-2008 году на 100 тыс. женского населения [1]. Причем увеличение заболеваемости отмечается в основном в группе женщин детородного возраста.

В настоящее время имеется достаточно данных, подтверждающих причинную связь папилломавирусной инфекции с предопухолевыми заболеваниями и раком шейки матки. Доказано, что при папилломавирусной инфекции риск прогрессии цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН) II степени в рак *in situ* равен 1% за год наблюдения, а риск прогрессии ЦИН II в ЦИН III за два года равен 16% [2].

Существует также мнение, что рост клеток, immortalized вирусом папилломы человека (ВПЧ) 16/18, может изменяться под действием вируса простого герпеса (ВПГ) [3]. В ряде исследований показано, что инфекция ВПГ 2 предшествует ВПЧ, в других, более многочисленных, имеются данные о том, что ВПГ 2 действует на поздних стадиях канцерогенеза [4]. Это свидетельствует о том, что и ВПЧ, и ВПГ, особенно ВПГ 2, способны индуцировать плоскоклеточную карциному.

Многочисленные исследования свидетельствуют о наличии связи между герпетической инфекцией гениталий и онкологическими заболеваниями шейки матки [5]. Однако прямых доказательств этиологической роли ВПГ в развитии рака шейки матки нет.

Таким образом, несмотря на то, что острые проблемы вирусного канцеро-генеза с достоверностью сместились к основной роли вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки, нельзя недооценивать значение ВПГ 2 в этиологии плоскоклеточных неоплазий, так как до сих пор нет однозначных данных в литературе о роли герпетической инфекции в возникновении рака шейки матки.

Цель исследования – установить клинико-морфологические особенности поражения вирусом простого герпеса 2 типа при тяжелой цервикальной ин-траэпителиальной неоплазии и раке шейки матки на основании морфометрической оценки результатов иммуногистохимического исследования.

Материалы и методы исследования. Исследовано 45 биоптатов женщин, состоявших на учете в Витебском областном клиническом онкодиспансере. Средний возраст женщин составил $46,2 \pm 1,88$ года. Было выделено три группы в зависимости от тяжести патологического процесса. В первую группу были включены случаи с CIN III (дисплазия III), 14 женщин. Во вторую группу были включены случаи с cancer in situ, 8 случаев. В третью группу вошло 23 женщины с диагнозом рак шейки матки.

Для клинической характеристики пациенток с дисплазией и раком шейки матки были использованы данные канцер-регистра и данные амбулаторных карт Витебского областного онкологического диспансера.

Основой для анализа предраковых состояний шейки матки служила Гистологическая классификация опухолей женского полового тракта Всемирной организации здравоохранения [6]. Гистологический диагноз ЦИН устанавливался на основании следующих морфологических критериев: изменение размеров и формы клеток и ядер, появление гиперхромных ядер, увеличение числа митозов, нарушение ядерно-цитоплазматического соотношения [7]. К цервикальной интраэпителиальной неоплазии III степени были отнесены случаи, когда почти вся толщина многослойного плоского эпителия представлена недифференцированными клетками с гиперхромными атипичными ядрами и полиморфизмом клеточных элементов. Критерием для постановки диагноза карцинома in situ являлось поражение всего пласта с наличием выраженной атипии клеток и ядер, митозов, в том числе патологических, на разных уровнях эпителия [8]. Заключение о ВПГ-инфекции ставилось на основании внутриядерных включений I и II типа, наличия феноменов «тутовой ягоды», и «пустых ядер» [9].

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

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

Для выявления герпетического поражения с помощью иммуногистохимического исследования, использовались поликлональные мышинные антитела к ВПГ 2 типа готовые к использованию (фирма «ДАКО»). Из парафиновых блоков готовились срезы толщиной 5 микрон, переносились на предметные стекла, покрытые L-полилизинном. Срезы в вертикальном положении высушивали 18 часов при комнатной температуре, помещали в термостат на 30 мин. при температуре 60°C [10]. После этого проводилась депарафинация в ксилоле (в батарее из 2 емкостей по 15 минут в каждой), обработка 96° этиловым спиртом (в батарее из 2 емкостей по 1 минуте в каждой) и обработка 70° этиловым спиртом (в батарее из 2 емкостей: в первой – 1 минуте, во второй – 4 минуты). Предметные стекла со срезами переносились в цитратный буфер pH 6.0, и помещались в водяную баню при температуре 98°C на 30 мин. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы обрабатывались 3% перекисью водорода в течение 15 минут, и после промывки в Трис-буфере (Tris Buffered Saline pH 7,5) наносились первичные антитела в стандартном разведении. Срезы инкубировались в течение 30 минут при комнатной температуре. В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител LSAB фирмы «ДАКО» с диамибензидином. Затем срезы промывали проточной водой, проводили контр-окрашивание гематоксилином и заключали в полистирол.

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

Таблица 1

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

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

Степень экспрессии ВПГ 2 в ядрах и цитоплазме пораженных клеток оценивалась полуколичественным методом [+ , ++ , +++]. Для оценки степени окрашивания использовалась программа Aperio Image Score, автоматически измеряющая интенсивность коричневой окраски продуктов реакции DAB - хромогена и разделяющая интенсивность на 3 уровня [11]. Резко выраженная экспрессия оценивалась как [+++], умеренно выраженная – [++], слабо выраженная – [+], 0 – отсутствие экспрессии.

Результаты исследования и обсуждение. В группе больных с диагнозом рак шейки матки при анализе степени злокачественности плоскоклеточного рака преобладали случаи со степенью злокачественности Грейд II (18 женщин (78±0,09%)), у 5 пациенток (22±0,09%) имела место высокая степень дифференцировки (Грейд I). У 8

женщин (35±0,1%) с диагнозом рак шейки матки наблюдались лимфогенные и гематогенные метастазы, из них 3 случая (13±0,07%) закончились летальным исходом от основного заболевания. У 16 пациенток (70±0,1%) имело место вовлечение в патологический процесс более одной локализации, у 7 (30±0,1%) – поражение ограничивалось только экзоцервиксом.

При микроскопическом исследовании биоптатов женщин с тяжелой дис-плазией, в 5 (35,7±13,3%) случаях морфологических признаков герпетического поражения не было обнаружено. У 6 (42,9±13,7%) женщин имелись герпетические включения в единичных ядрах, и у 3 (21,4±11,4%) пациенток наблюдались выраженные признаки герпетического поражения.

В группе пациентов с cancer in situ в 3 (37,5±0,18%)

Таблица 2

Анализ герпетического поражения при клинко-морфологических особенностях рака шейки матки

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

Таблица 3

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

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

Примечание:

- « - » - ИГХ реакция отрицательная;
- «+» - слабо выраженная положительная;
- «++» - умеренно выраженная положительная;
- «+++» - резко выраженная положительная.

биоптатах шейки матки включений герпеса светооптически обнаружено не было, в 5 (62,5±0,18%) случаях имели место косвенные признаки герпетического поражения от умеренного до выраженного (таблица 1).

Случаи с раком шейки матки были разделены на две группы в зависимости от наличия или отсутствия светооптических признаков герпетического поражения. Сформированные группы были проанализированы клинически по следующим критериям: наличие метастазов, степень дифференцировки опухоли, распространенность

процесса (таблица 2).

Установлены следующие закономерности. В группе больных раком шейки матки со светооптическими признаками герпетического поражения статистически значимо чаще (p<0,05) преобладала более низкая степень дифференцировки (Грейд II, плоскоклеточный рак с тенденцией к ороговению). Также в данной группе преобладало (p<0,05) поражение, выходящее за пределы одной локализации (преимущественно в злокачественный процесс были вовлечены экзо- и эндоцервикс). Статистиче-

ски значимых различий в метастатическом поведении опухолевого роста в анализируемых группах получено не было ($p > 0,05$).

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

Согласно полученным данным, иммуногистохимическое исследование выявило экспрессию ВПГ 2 антигенов в 100% случаев при cancer in situ (CIS) и в $92,9 \pm 0,07\%$ случаев при тяжелой дисплазии. При морфометрическом определении выраженности экспрессии, в группе CIS преобладала умеренно и резко выраженная положительная реакция ($25 \pm 0,16\%$ и $63 \pm 0,18\%$ соответственно), в группе тяжелой дисплазии превалировала слабо и резко выраженная положительная реакция ($28,6 \pm 0,13\%$ и $42,9 \pm 0,14\%$ соответственно). Таким образом, в обеих группах большая часть (5 из 8 – $63 \pm 0,18\%$ – в материале с тяжелой дисплазией и 6 из 14 – $42,9 \pm 0,14\%$ – в образцах с cancer in situ) биоптатов была с выраженной экспрессией ВПГ антигенов.

Полученные данные свидетельствуют о более высокой чувствительности и информативности иммуногистохимического исследования для определения герпетического поражения по сравнению со светооптической диагностикой в препаратах, окрашенных рутинным методом (гематоксилин-эозин). Причина существенной разницы в диагностике, заключается в трудностях светооптического определения герпетических включений при неопластических поражениях шейки матки в связи с клеточной атипией и полиморфизмом, которые «вуалируют» косвенные морфологические признаки инфекции.

У 9 женщин с выявленными метастазами рака шейки матки иммуногистохимически герпес отсутствовал в 1 ($11,1 \pm 0,11\%$) случае. В 8 случаях ($88,9 \pm 0,11\%$) экспрессия антигенов вируса герпеса была умеренной и выраженной позитивной. В группе больных, где метастазы отсутствовали, герпес не был обнаружен в $14 \pm 0,1\%$ случаев. В герпесоположительных цервикобиоптатах этих пациентов преобладала слабая позитивная реакция ($43 \pm 0,14\%$). Таким образом, частота выявления герпеса в группах с

наличием и отсутствием метастазов статистически значимых различий не имела ($p > 0,05$). Однако, при сравнении выраженности поражения в обеих группах, в случаях без метастатического поражения статистически значимо чаще наблюдалась слабо позитивная экспрессия ВПГ 2 антигенов ($p < 0,01$). При герпетическом поражении статистически значимо чаще наблюдалась более низкая степень дифференцировки рака ($p < 0,001$).

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

Выводы

В группе больных раком шейки матки со светооптическими признаками герпетического поражения статистически значимо чаще ($p < 0,05$) имеет место более низкая степень дифференцировки (Грейд II, плоскоклеточный рак с тенденцией к ороговению), что подтверждается иммуногистохимически и морфометрически ($p < 0,001$).

Наличие герпетического поражения отягощает течение плоскоклеточного рака шейки матки, способствуя снижению степени его дифференцировки и выходу за пределы одной локализации ($p < 0,05$).

Установлена более высокая чувствительность и информативность иммуногистохимического исследования для определения герпетического поражения по сравнению со светооптической диагностикой.

Выявлена связь между герпетическим поражением и метастатическим потенциалом опухоли. При сравнении выраженности герпетического поражения в биоптатах больных с наличием метастазов и без метастатического поражения, у последних статистически значимо чаще наблюдалась слабо позитивная экспрессия ВПГ 2 антигенов ($p < 0,01$).

Морфометрический анализ иммуногистохимического исследования выраженности экспрессии ВПГ 2 антигенов показал, что степень выраженности экспрессии коррелирует с распространенностью опухолевого процесса ($p < 0,05$).

Литература

1. Злокачественные новообразования в Беларуси / С.М. Поляков [и др.]; под ред. И.В. Малаховой, И.В. Залуцкого. – Минск: РНПЦ М.Т., 2009. – 205 с.
2. Holowaty P., Miller A.B., Rohan T., To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst.* 1999, Feb, 3; 91(3):252-8.

3. Wingo P.A., Tong T., Bolden S. *Cancer Statistics.// CA Cancer J.Clin.*-1995.-Vol.45.-P.8-30.
4. Macnab J.C.M. Herpes simplex virus and human cytomegalovirus: their role in morphological transformation and genital cancers//*J. Gen. Virol.* - 1987. - Vol. 68. - P. 2525-2550.

5. Малярская, М.М. Проблема генитального герпеса в гинекологии и акушерстве / М.М. Малярская // Литобзор. Москва 1997 [Электронный ресурс]. - 1997 - Режим доступа: <http://www.med2000.ru/perevod/article261.htm> Дата доступа: 13.07.2007.

6. *Histological typing of female genital tract tumors. WHO, 2nd ed.* / Scally R.E. et al. – Berlin, Heidelberg, 1994.

7. Кондриков, Н.И. Патология матки. Иллюстрир. руково 2008г.

8. Железнов Б.И., Ежова Л.С., Беляева Л.А. Ультра-структура эпителия шейки матки при дисплазии // *Арх. патологии.* 1989. – Вып. 6. – С. 56 – 62.

9. Недзьведь, М.К. Морфологическая характеристика герпетической инфекции у человека / М.К. Недзьведь,

С.А. Гузов // *Актуальные проблемы биологии и медицины (сборник трудов сотрудников МГМИ).* – Минск, 1996. – С. 107-108.

10. Гуревич, Л.Е., В.А. Исаков. Использование в иммуногистохимических исследованиях метода восстановления антигенной специфичности, воздействием на ткани, фиксированные формалином. / Л.Е. Гуревич, В.А. Исаков. // *Архив патологии.* – 1999. – № 2. – С. 48-50.

11. Гриб, А.К. Оценка прогностического значения ангиогенеза в раке предстательной железы по данным иммуногистохимического и морфометрического исследования / А.К. Гриб, В.А. Басинский, А. В. Проворов // *Журнал ГрГМУ.* – 2007. – № 2. – С. 59–62.

**O.V. Lesnichaya,* D.M. Semenov,*
Y.V. Krylov,** S.V. Malashenko****

Educational institution “Vitebsk State Medical University”*

Vitebsk regional clinical pathoanatomical bureau**

Prognostic value of 2 type herpes simplex virus infection at cervical intraepithelial neoplasia of iii degree and cervical carcinoma

The article is devoted to studying of morphological changes in cervical mucous membrane among women infected with herpes simplex virus. The complex clinico-morphological analysis of herpetic infection with the use of immunohistochemical and morphometric research methods is presented in the work. It is revealed, that the presence of herpetic infection burdens a course of squamous cell cervical carcinoma and is adverse prognostic marker.

Keywords: herpes simplex virus, cervical intraepithelial neoplasia, cervical carcinoma.