

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 618.146-006:083.1:616.621.31

Т.Е. Белокриницкая¹, Ю.Н. Пономарева¹, Г.М. Ломнева², Е.П. Маккавеев³, Е.В. Вологдин⁴,
О.В. Вершинин⁴

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРОГЕНОВ И ПРОГЕСТЕРОНА В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЯХ ШЕЙКИ МАТКИ

¹Читинская государственная медицинская академия (Чита)

²Читинский областной диагностический центр (Чита)

³Читинское областное патологоанатомическое бюро (Чита)

⁴Читинский областной онкологический диспансер (Чита)

Проведено ретроспективное иммуногистохимическое исследование экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона в 144 опухолях и окружающей их здоровой ткани шейки матки в сравнении с возрастом больных, стадией заболевания и гистологической формой цервикального рака. Показано, что все образцы здоровых тканей шейки матки содержали рецепторы половых стероидов. Умеренная экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона встречалась при умеренно и высокодифференцированном плоскоклеточном раке у пациенток пременопаузального и репродуктивного возраста. Эстрогензависимый цервикальный рак у больных в менопаузе сочетался с высокими уровнями экспрессии рецепторов женских половых гормонов и развитием мезонефроидной аденокарцинома. Прогестеронпозитивные карциномы характеризовались умеренной степенью экспрессии рецепторов и были представлены плоскоклеточным раком разной степени дифференцировки. Среди рецепторнегативных опухолей преобладали низкодифференцированный рак и эндометриальная аденокарцинома. Таким образом, определение экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона в опухолях шейки матки может быть использовано в качестве прогностического критерия течения и исхода злокачественного процесса.

Ключевые слова: опухоли шейки матки, рецепторы эстрогенов, рецепторы прогестерона

EXPRESSION OF ESTROGEN AND PROGESTERONE RECEPTORS IN THE NORMAL AND NEOPLASTIC TISSUES OF THE UTERINE CERVIX

T.E. Belokrinitskaya¹, Yu.N. Ponomaryova¹, G.M. Lomneva², Ye.P. Makkaveyev³,
Ye.V. Vologdin⁴, O.V. Vershinin⁴

¹Chita State Medical Academy, Chita

²Regional Diagnostic Centre, Chita

³Regional Department of Pathomorphology, Chita

⁴Regional Oncologic Centre, Chita

There was a retrospective immunohistochemical investigation of the expression of estrogen and progesterone receptors in 144 carcinomas and in the normal tissues of the uterine cervix. The receptor status correlates with the age, stages of the cases and histological variants of cervical cancer. It became obvious that normal tissues in all the cases had the receptors of sex steroid, the expression of which got diminished according to the increased age of the patients. The women of reproductive and premenopausal periods with high-grade differentiated cervical squamous carcinoma had the average expression of estrogen and progesterone receptors. Patients in menopause with estrogen-positive cervical cancer had high level expression of estrogen receptors, which caused to the development of mesonephroid adenocarcinoma. Progesterone-positive cancer were presented of cervical squamous carcinoma of various differentiation. Receptor-negative tumours were of low-grade differentiated cervical squamous carcinoma and endometrial adenocarcinoma. Consequently, the investigation of the estrogen and progesterone receptors in cervical carcinoma may be used as a prognostic criterion in the development of malignant tumours.

Key words: tumours of the uterine cervix, estrogen receptors, progesterone receptors

Исследованиями последних лет убедительно показана важная роль генитальной папилломавирусной инфекции в инициации и прогрессии цервикального канцерогенеза [4, 10, 12]. Однако длительный период инфекции, развитие рака у меньшего числа инфицированных и моноклональность опухо-

лей дают основание предполагать, что вирус является необходимым, но не единственным условием для развития злокачественных новообразований, т.е. существуют дополнительные факторы, в том числе, возможно, и эндокринные, участвующие в процессе опухолевой трансформации клеток [2, 3].

В настоящее время одним из основных критериев гормонозависимости злокачественных опухолей, определяющих эффективность лечения и прогноз заболевания, является рецепторный статус [1]. В то же время, данные об экспрессии рецепторов стероидных гормонов в опухолях шейки матки и их взаимосвязь с возрастом пациенток, стадией и прогнозом заболевания достаточно противоречивы и крайне немногочисленны [8, 9, 11].

В связи с этим нами было проведено ретроспективное иммуногистохимическое определение рецепторов эстрогенов и прогестерона в нормальных тканях и опухолях шейки матки в сравнении с возрастом больных, стадией заболевания и гистологической формой цервикального рака.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 144 больных раком шейки матки, находившихся на лечении в Читинском областном онкологическом диспансере в 1998 – 2002 гг.

Нами был изучен биопсийный и операционный материал 144 опухолей и 104 образцов окружающей их нормальной ткани шейки матки, полученный до проводимого лечения и во время операции больных цервикальным раком.

Возраст больных раком шейки матки варьировал от 29 до 68 лет, и составил, в среднем, $44,9 \pm 6,9$ года. 73,9 % женщин были репродуктивного возраста и 26,1 % пациенток находились в постменопаузе длительностью от 2 до 25 лет.

Диагностика злокачественного поражения шейки матки включала комплекс клинических, кольпоскопических, цитологических, гистологических и иммуногистохимических методов обследования. Стадирование рака шейки матки проводилось в соответствии с классификацией по системе TNM и по системе FIGO (1997), а также гистологической классификации опухолей женской половой системы (1994). У 31,3 \pm 1,2 % пациенток был обнаружен внутриэпителиальный цервикальный рак, 27,8 \pm 1,1 % – I стадия карциномы шейки матки, 21,4 \pm 1,8 % – II стадия злокачественного процесса и у 19,5 \pm 0,5 % больных была диагностирована III стадия рака шейки матки.

Исследование рецепторов эстрогенов и прогестерона проводилось иммуногистохимическим методом в лаборатории патоморфологии областного диагностического центра г. Читы. Для этого биоптаты опухолей фиксировали в 10% растворе забуференного формалина в течение 12–24 часов, и после стандартной обработки заливали в парафин. Иммуногистохимическое исследование рецепторов стероидных гормонов проводили стрептавидин-биотин-пероксидазным методом на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм с помощью моноклональных антител (фирма «ДАКО») с предварительной высокотемпературной демаскировкой антигенов в тканях кипячением в 0,01 М цитратном буфере под давлением в скороварке. Далее срезы инкубировали с нормальной неимунной сывороткой, первичны-

ми (специфичными) антителами, вторичными биотинилированными антителами и со стрептавидин-биотин-пероксидазным комплексом. Выявление пероксидазы хрена проводили диаминобензидином (фирма «ДАКО»). Проявление реакции контролировали под микроскопом в течение 3 мин с последующей промывкой в дистиллированной воде, докрасиванием гематоксилином Майера, дегидратацией срезов и заключением в канадский бальзам [6].

Положительным результатом считалось специфическое окрашивание ядер в коричневый цвет. Количественная оценка степени экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона проводилась по системе Hystochemical score (H-score) (McCarthy и соавт., 1985) [5]. Система подсчета включала интенсивность иммуногистохимической окраски, оцениваемой по 3-бальной шкале и процент окрашенных клеток. Подсчет проводился в трех когортах по 100 опухолевых клеток в различных полях зрения объективом \times 40. Интенсивность окраски оценивалась следующим образом: 0 – нет окрашивания, 1 – слабое окрашивание, 2 – умеренное и 3 – сильное окрашивание. Формула подсчета:

$$H\text{-score} = \sum P_i \times i,$$

где: P_i - процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью, i - интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0 до 3.

О степени экспрессии стероидных гормонов судили по результату H-score: 0–50 – отрицательная, 51–100 – низкая, 101–200 – умеренная и 201 и более – высокая [7].

Значимость различий оценивали по критерию Стьюдента, считая статистически достоверным значение $p < 0,05$. Коэффициенты корреляции рассчитывали по методу Пирсона, различия считали достоверными при $p < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В образцах здоровых тканей шейки матки рецепторы половых стероидов были представлены следующим образом. В 54,2 \pm 1,9 % случаев нами были обнаружены рецепторы эстрогенов и прогестерона, 27,3 \pm 1,4 % составили ткани, экспрессировавшие рецепторы прогестерона и в 18,2 \pm 1,0 % случаев были выявлены рецепторы эстрогенов. Степень экспрессии рецепторов половых гормонов соответствовала умеренным показателям, – средние значения H-score были 101,1 \pm 6,5 при определении рецепторов прогестерона и 108,0 \pm 4,9 – рецепторов эстрогенов ($p > 0,05$). Следует отметить, что уровень экспрессии рецепторов половых стероидов уменьшался по мере увеличения возраста женщин, – в менопаузальном периоде степень экспрессии рецепторов характеризовалась низкими и отрицательными значениями (средние H-score 55,0 \pm 0,1 для рецепторов прогестерона и H-score 25,0 \pm 0,2 – для рецепторов эстрогенов, $p > 0,05$).

При изучении рецепторного статуса опухолей шейки матки установлено, что $29,9 \pm 1,1$ % цервикальных карцином экспрессировали рецепторы эстрогенов и прогестерона с соответствующими средними значениями H-score $97,8 \pm 2,3$ и $77,0 \pm 2,0$ ($p > 0,05$). В $24,3 \pm 1,0$ % случаев в опухолях были выявлены рецепторы эстрогенов со средним значением H-score $121,0 \pm 3,5$ ($p > 0,001$). $22,9 \pm 0,6$ % новообразований экспрессировали рецепторы прогестерона с H-score $103,3 \pm 4,1$ ($p < 0,001$). $22,9 \pm 0,3$ % цервикальных карцином были рецепторонегативными.

Данные о возрасте пациенток с различными вариантами рецепторного статуса стероидных гормонов представлены в таблице 1. Рецепторопозитивные опухоли шейки матки наиболее часто встречались в возрастной группе 20 – 40 лет с практически равнозначным распределением у женщин этого возраста эстроген- и прогестеронпозитивных опухолей с умеренной степенью экспрессии гормональных рецепторов и средними значениями H-score соответственно $114,0 \pm 2,6$ и $106,1 \pm 4,1$ ($p > 0,05$). Количество рецепторопозитивных опухолей и степень экспрессии рецепторов уменьшалось, а карцином, не экспрессирующих рецепторы половых стероидов, возрастало по мере старения пациенток ($p < 0,001$). Рецепторонегативные карциномы встречались во всех возрастных группах, однако, статистически достоверное увеличение этих опухолей приходилось на возраст 50 лет и более ($p < 0,01$). Сравнивая средний возраст больных с рецепторопозитивными и рецепторонегативными опу-

холями шейки матки, оказалось, что последние на 10,3 года старше пациенток с опухолями, экспрессирующими рецепторы половых стероидов ($p < 0,001$).

Нами выявлена обратная зависимость между рецепторным статусом половых стероидов и клинической стадией цервикального рака (табл. 2). Так, при внутриэпителиальном и инвазивном раке I стадии было отмечено наибольшее число рецепторопозитивных опухолей. Уровень экспрессии рецепторов при этих стадиях рака соответствовал в среднем H-score рецепторов эстрогенов $195,0 \pm 6,6$ и $165,5 \pm 7,1$ ($p < 0,05$); H-score рецепторов прогестерона $170,9 \pm 8,4$ и $184,1 \pm 9,1$ ($p > 0,05$).

II клиническая стадия цервикального рака характеризовалась значительным сокращением количества и уменьшением степени экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона по сравнению с предыдущими стадиями заболевания, H-score для рецепторов эстрогенов соответствовало $103,0 \pm 13,1$ ($p < 0,01$) и для рецепторов прогестерона – $98,2 \pm 9,0$ ($p < 0,001$).

В опухолях шейки матки, соответствующих III стадии рака, в большинстве случаев рецепторы половых гормонов не были обнаружены. Рецепторопозитивные карциномы этой стадии заболевания сопровождались низкой экспрессией рецепторов эстрогенов (H-score $65,0 \pm 8,8$; $p > 0,05$) и прогестерона (H-score $50,1 \pm 7,1$; $p < 0,01$).

Среди гистологических вариантов опухолей шейки матки у $81,3 \pm 5,2$ % больных был обнаружен плоскоклеточный рак, $18,1 \pm 1,1$ % - аденокарцинома и у $0,6 \pm 0,01$ % была выявлена лейо-

Таблица 1
Экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона в цервикальных опухолях в зависимости от возраста больных раком шейки матки

Рецепторы, %	Возраст, лет				
	20–29	30–39	40–49	50–59	≥ 60
E+Pg+	$44,2 \pm 1,9$	$37,2 \pm 1,0$	$18,6 \pm 0,7$	0	0
E+Pg–	$25,7 \pm 1,0$	$40,0 \pm 0,9$	$14,3 \pm 0,06$	$11,4 \pm 0,08$	$8,6 \pm 0,1$
E–Pg+	$18,2 \pm 1,0$	$30,3 \pm 0,5$	$21,2 \pm 0,9$	$15,3 \pm 0,7$	$12,1 \pm 0,1$
E–Pg–	$6,1 \pm 0,03$	$12,1 \pm 0,04$	$15,2 \pm 0,6$	$33,3 \pm 1,5$	$33,4 \pm 1,3$

Таблица 2
Экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона в здоровых тканях и опухолях шейки матки в зависимости от стадии рака

Рецепторы, %	Здоровые ткани, n = 104	Стадия рака шейки матки			
		In situ, n = 45	I, n = 40	II, n = 31	III, n = 28
E+Pg+	$54,9 \pm 3,1$	$46,5 \pm 1,6$ $p > 0,05$	$39,5 \pm 0,8$ $p < 0,01$	$11,7 \pm 0,09$ $p < 0,001$	$2,3 \pm 0,05$ $p < 0,001$
E+Pg–	$18,1 \pm 1,0$	$34,3 \pm 0,7$ $p < 0,001$	$25,7 \pm 1,0$ $p < 0,001$	$25,7 \pm 0,3$ $p < 0,001$	$14,3 \pm 0,4$ $p < 0,001$
E–Pg+	$27,0 \pm 1,9$	$30,3 \pm 1,1$ $p > 0,05$	$39,4 \pm 1,1$ $p < 0,001$	$18,2 \pm 0,6$ $p < 0,001$	$12,1 \pm 0,2$ $p < 0,001$
E–Pg–	0	0	$12,1 \pm 0,5$ $p < 0,001$	$33,3 \pm 2,0$ $p < 0,001$	$54,6 \pm 1,2$ $p < 0,001$

Примечание: p – достоверность различий по сравнению со здоровыми тканями шейки матки.

миосаркома шейки матки. Плоскоклеточный рак в $41,7 \pm 3,0$ % случаев был с ороговением, $30,5 \pm 0,9$ % - крупноклеточный рак без ороговения и $9,1 \pm 0,5$ % - мелкоклеточный рак без ороговения. У $9,2 \pm 1,5$ % пациенток опухоли имели строение мезонефرويدной аденокарциномы, $7,7 \pm 1,0$ % - эндометриоидной аденокарциномы и у $1,2 \pm 0,5$ % больных был выявлен железисто-плоскоклеточный рак.

Рецепторы эстрогенов и прогестерона с умеренной степенью экспрессии были обнаружены в 98,6 % случаев ороговевающего и крупноклеточного неороговевающего рака, и только 1,4 % этих опухолей были рецепторонегативными (табл. 3).

При мелкоклеточном раке в большинстве случаев – $68,3 \pm 3,0$ %, – рецепторы половых стероидов не были определены и в $31,7 \pm 1,5$ % новообразований были выявлены рецепторы прогестерона с низкой степенью экспрессии.

$27,6 \pm 2,2$ % мезонефроидных и все эндометриоидные аденокарциномы были рецепторонегативными. Напротив, $72,4 \pm 5,1$ % светлоклеточных железистых раков были опухолями с высокой экспрессией рецепторов прогестерона. Железисто-плоскоклеточный рак характеризовался высокой экспрессией рецепторов эстрогенов (рис. 1). Опухолью с высоким уровнем экспрессии рецепторов прогестерона была крайне редко встречающаяся лейомиосаркома шейки матки (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что во всех образцах здоровых тканей шейки матки были обнаружены рецепторы половых стероидов. Степень экспрессии последних уменьшалась от умеренных показателей до отрицательных по мере увеличения возраста пациенток.

Таблица 3

Уровень экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона в опухолях шейки матки в зависимости от гистологической формы рака

Гистологические формы опухолей шейки матки	Степень экспрессии рецепторов H-score, $M \pm m$	
	E	Pg
Рак с ороговением	$129,0 \pm 11,9$ $p < 0,05$	$135,9 \pm 16,4$ $p < 0,001$
Крупноклеточный рак без ороговения	$118,1 \pm 5,2$ $p < 0,01$	$80,0 \pm 3,5$ $p < 0,001$
Мелкоклеточный рак без ороговения	–	$51,5 \pm 2,0$ $p < 0,001$
Мезонефرويدная аденокарцинома	$191,0 \pm 13,1$ $p < 0,001$	–
Железисто-плоскоклеточный рак	$143,3 \pm 15,0$ $p < 0,001$	–
Саркома	–	204 $p < 0,001$
Здоровые ткани шейки матки	$101,0 \pm 4,9$	$108,1 \pm 6,5$

Примечание: p – достоверность различий по сравнению с здоровыми тканями шейки матки.

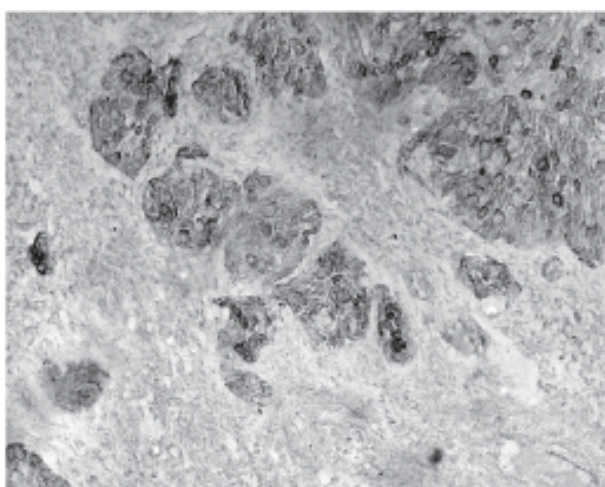


Рис. 1. Экспрессия рецепторов эстрогенов в железисто-плоскоклеточном раке шейки матки. Стрептавидин-биотиновый метод, хромоген-диаминобензидин. $\times 400$.

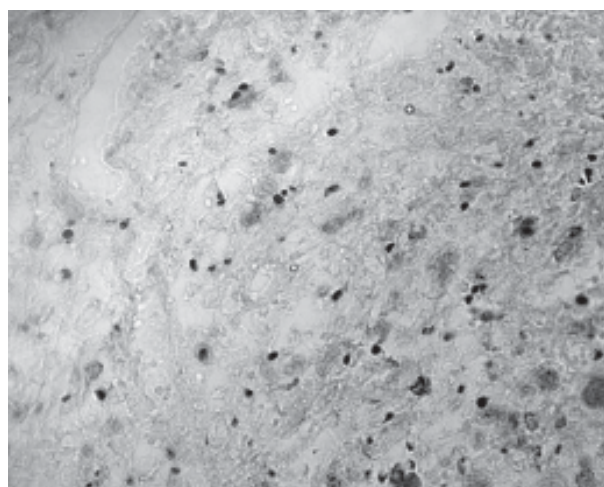


Рис. 2. Экспрессия рецепторов прогестерона в лейомиосаркоме шейки матки. Стрептавидин-биотиновый метод, хромоген-диаминобензидин. $\times 400$.

Опухоли шейки матки, экспрессирующие рецепторы эстрогенов и прогестерона, преобладали у пациенток репродуктивного и перименопаузального возрастов. Степень экспрессии рецепторов половых гормонов в этих опухолях была умеренной и гистологические варианты плоскоклеточного рака, как правило, характеризовались высокой и умеренной дифференцировкой клеток. В свою очередь, распространенность опухолевого процесса в большинстве случаев ограничивалась внутриэпителиальным поражением и инвазивным ростом, соответствующим I клинической стадии рака.

Новообразования, в которых определялись рецепторы или эстрогенов или прогестерона, встречались во всех возрастных группах с частотой, обратно пропорциональной возрасту. Наличие рецепторов эстрогенов в опухолях пациенток пре- и менопаузального возраста сочеталось с высокими уровнями их экспрессии и развитием железистого рака, преимущественно мезонефroidного и железисто-плоскоклеточного. Высоко- и умереннодифференцированный плоскоклеточный рак чаще встречался у пациенток до 40 лет с умеренной и низкой степенью экспрессии рецепторов женских половых гормонов. Стадии злокачественного роста эстрогензависимых опухолей были представлены от преинвазивного рака и включая III стадию опухоли. Достаточно высокий удельный вес II – III стадий рака, возможно, частично был обусловлен трудностью диагностики аденокарцином с преимущественной локализацией в цервикальном канале, которые, в большей степени были представлены эстрогензависимыми опухолями.

Прогестеронпозитивные опухоли в большинстве случаев имели умеренную степень экспрессии рецепторов и были представлены плоскоклеточным раком разной степени дифференцировки. В свою очередь, минимальная степень экспрессии рецепторов прогестерона была отмечена в низкодифференцированных карциномах и максимально высокая – саркоме шейки матки. Опухоли с экспрессией рецепторов прогестерона были равнозначно представлены 0 – III стадиями рака.

Карциномы, не содержащие рецепторов половых гормонов, были обнаружены преимущественно у больных менопаузального возраста, встречаясь во всех возрастных группах. Среди гистологических вариантов этих опухолей преобладали низкодифференцированный рак и эндометриальная аденокарцинома с распространением опухоли, соответствующие II – III стадии.

Таким образом, рецепторный статус половых гормонов в злокачественных опухолях шейки матки достаточно разнообразен и ассоциирован

с биологической агрессивностью опухоли. Представленные нами данные демонстрируют, что определение рецепторов эстрогенов и прогестерона, возможно в сочетании с другими иммуногистохимическими маркерами, может быть использовано в качестве прогностического критерия течения и исхода злокачественного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берштейн Л.М. Гормональный канцерогенез / Л.М. Берштейн. — СПб.: Наука, 2000. — 199 с.
2. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии / Я.В. Бохман. — Л.: Медицина, 1989. — 464 с.
3. Вишневский А.С. Дискуссионные вопросы лечения папилломавирусной инфекции шейки матки / А.С. Вишневский, Н.Р. Сафронникова // Практическая онкология. — 2002. — Т. 3, № 3. — С. 166 – 172.
4. Козаченко В.П. Современное состояние проблемы рака шейки матки / В.П. Козаченко // Заболевания шейки матки, влагалища и вульвы (Клинические лекции) / Под ред. В.Н. Прилепской. — М.: МЕДпресс, 2000. — 432 с.
5. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. — Казань, 2004. — 456 с.
6. Хариет Э.Р. Иммуноцитохимия: электронная микроскопия / Э.Р. Хариет, К.С. Гаттер // Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. / Под ред. С. Херрингтон, Дж. Макги. — М.: Мир, 1999. — 558 с.
7. A multicentre the reliability of steroid receptor immunocytochemical assay quantification / R.A. McClelland, D. Willson, R. Leake et al. // *Europ. J. Cancer.* — 1991. — Vol. 27. — P. 711 – 715.
8. Adenocarcinoma of the cervix. Expression and clinical significance of estrogen and progesterone receptors / H. Fujiwara, G. Tortolero-Luna, M.F. Mitcell et al. // *Cancer.* — 1997. — Vol. 79. — P. 505 – 512.
9. Horn L.C. Neuroendocrine differentiated carcinoma of the cervix / L.C. Horn, U. Fisher, K. Bilek // *Zentralbl. Gynaecol.* — 1996. — Vol. 118, N 12. — P. 679 – 683.
10. Kaufman R.H. HPV-infection and cervical carcinoma / R.H. Kaufman, E. Adam, K. Vonka // *Clin. Obstet. Gynaecol.* — 2000. — Vol. 43 (2). — P. 363 – 380.
11. Small cell carcinoma of the uterine cervix with large cell neuroendocrine carcinoma component / M.H. Tsou, T.D. Tan, S.H. Cheng, Y.K. Chioi // *Gynaecol. Oncol.* — 1998. — Vol. 68, N 1. — P. 69 – 72.
12. Stoler M.H. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis / M.H. Stoler // *Int. J. Gynaecol. Pathol.* — 2000. — Vol. 19. — P. 16 – 28.