

Soltanova İ.F.

SERVİKAL NEOPLAZİYA ZAMANI PROQRAMLAŞDIRILMIŞ HÜCEYRƏ ÖLÜMÜ LİQANDI-1 VƏ TSİKLOOKSİGENAZA-2 RESEPTORLARININ İMMUNOHİSTOKİMYƏVİ DİAQNOSTİKASI: DİFFERENSIAL YANAŞMA

Azərbaycan Tibb Universitetinin Onkologiya klinikası, Bakı

Xülasə. Məqalədə müxtəlif dərəcəli uşaqlıq boynu displaziyaları zamanı proqramlaşdırılmış hüceyrə ölümü liqandi-1 (PD-L₁) və tsiklooksigenaza-2 (COX-2) reseptorları arasında əlaqəni araşdırmaq məqsədilə aparılmış tədqiqat işi haqqında məlumat verilmişdir. Xəstəliyin hər üç ağırlıq dərəcəsi (CIN I, II və III) ilə müraciət etmiş 35 xəstənin biopstatlarında PD-L₁ və COX-2 reseptorlarına qarşı anticisimlərdən istifadə etməklə immunhistokimyəvi müayinə icra edilmişdir. PD-L₁ səviyyəsi boyanmış hüceyrələrin ümumi populyasiyada pay hesabına əsasən təyin edilmişdir – 1%-dən aşağı neqativ, 1%-dən yuxarı pozitiv kimi qəbul edilmişdir. COX-2 səviyyəsi isə boyanmadan asılı olaraq 0, yaxud neqativ; 1+ (zəif), 2+(mülayim) və 3+ (şiddətli) kimi dəyərləndirilmişdir. Tədqiqat nəticəsində məlum olmuşdur ki, PD-L₁ və COX-2 səviyyəsi displaziya dərəcəsindən asılı olaraq dəyişir. Belə ki, CIN I zamanı PD-L₁ pozitiv (+) hallar qeyd edilmədiyi halda, CIN III zamanı əksər xəstələrdə müsbət olmuşdur. COX-2 boyanma nəticələri göstərmişdir ki, displaziya dərəcəsi artıqca şiddətli boyanma müşahidə olunan halların payı da artır. Beləliklə, aparılan araşdırmada yüksək dərəcəli displaziyaların PD-L₁-pozitivlik və şiddətli COX-2-ekspressiyası ilə səciyyələndiyi məlum olur. Alınan nəticələr müalicəvi yanaşma alqoritminin formalaşmasında və cərrahi ekssiziya həcmnin təyininə istifadə edilməklə yanaşı, servikal neoplaziyaların proqnostik qiymətləndirilməsini optimallaşdırmağa imkan verir.

Açar sözlər: uşaqlıq boynu xərçəngi, uşaqlıq boynu displaziyası, CIN (servikal intraepitelial neoplaziya), PDL-1 (proqramlaşdırılmış hüceyrə ölümü liqandi), COX-2 (tsiklooksigenaza-2)

Ключевые слова: рак шейки матки, дисплазия шейки матки, CIN (цервикальная интраэпителиальная неоплазия), ПДЛ-1 (лиганд запрограммированной клеточной гибели), ЦОГ-2 (циклооксигеназа-2)

Key words: cervical cancer, cervical dysplasia, CIN (cervical intraepithelial neoplasia), PDL-1 (programmed death-ligand), COX-2 (cyclooxygenase)

Солтанова И.Ф.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИГАНДА ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ КЛЕТочНОЙ ГИБЕЛИ-1 И ЦИКЛООКСИГЕНАЗА-2- РЕЦЕПТОРОВ ПРИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЯХ: ВОЗМОЖНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ПОДХОДА

Онкологическая клиника Азербайджанского медицинского университета, Баку

Изучена взаимосвязь между различными степенями дисплазии шейки матки (3 степени – CIN I, II и III), рецепторами лиганда-1 программируемой клеточной смерти (PD-L₁) и циклооксигеназы-2 (COX-2). Иммуногистохимическое исследование с использованием антител к рецепторам PD-L₁ и COX-2 выполнено в биоптатах 35 пациентов с диагнозами CIN I, II и III. Оценка результатов реакции PD-L₁ определялась на основании доли окрашенных клеток

в общей популяции – менее 1% отрицательных, более 1% положительных. Результаты реакции COX-2 равны 0 или отрицательны, в зависимости от окрашивания; оценено на 1+ (слабая), 2+ (легкая) и 3+ (тяжелая). Исследование показало, что уровни рецепторов PD-L₁ и COX-2 варьируются в зависимости от степени дисплазии. Таким образом, хотя во время CIN I не было зарегистрировано ни одного случая PD-L₁ (+), большинство пациентов дали положительный результат на CIN III. Результаты окрашивания COX-2 показали, что доля случаев, когда дисплазия уже имеет выраженное окрашивание, увеличивается. Таким образом, исследование показало, что дисплазии высокой степени характеризуются PD-L₁-положительностью и тяжелой экспрессией COX-2. Полученные результаты могут быть использованы при формировании алгоритма терапевтического подхода к ДШМ и определении объема хирургического иссечения, а также для оптимизации прогностической оценки новообразований шейки матки.

Несмотря на активно внедряемый скрининг и определённые успехи в диагностике и лечении рака шейки матки (РШМ), заболеваемость во многих регионах мира остаётся высокой. Широкое применение целого комплекса диагностических процедур, среди которых ведущим остаётся цитологическое исследование шеечного мазка, позволило многократно снизить заболеваемость в развитых странах, однако говорить о стабилизации прироста пока представляется невозможным, тем более, если учесть, что более 80% случаев РШМ приходится на развивающиеся страны, в которых отсутствует или слабо организован целевой скрининг [1]. Так, использование скрининга в США привело к более чем 50%-ному снижению смертности от РШМ, наряду с этим ежегодный прирост заболеваемости колеблется в пределах 0,7%. В Российской Федерации 10-летний прирост заболеваемости составил 24,28%, причём прирост случаев РШМ у молодых женщин в возрасте до 29 лет за этот же период составил около 150%; в Великобритании за последние 10 лет проявляется тенденция увеличения возраст-специфической заболеваемости в пределах 4% [2]. Приведённые цифры говорят о существовании пробелов в программе ранней диагностики РШМ и необходимости изучения возможностей её расширения. Кольпоскопия, цитологическое исследование и биопсия шейки матки позволяют выделить группы высокого риска, требующих хирургического вмешательства и последующего серьёзного наблюдения [3]. Однако, если для негативных результатов принципы наблюдения предельно ясны, то в группе высоко-

го риска (CIN II и CIN III) чёткие ориентиры не сформулированы и в каждом конкретном случае основываются на клинических данных и заключении гистологического исследования [4]. В большинстве развитых стран наряду с цитологическим методом широко применяется также тестирование на папилломавирусную инфекцию (ПЦР-тест, диген-тест). Обнаружение вирусного генома является индикатором высокого риска рецидива CIN II и III, но необходимо иметь в виду возможность транзитного или персистирующего вирусоносительства, особенно у молодых женщин, которое может быть причиной гипердиагностики [5]. Отсутствие специфических прогностических критериев при каждом типе дисплазии затрудняет оценку риска и индивидуальный подход к больным. В этом плане представляется интересным и перспективным направлением иммуногистохимическое определение в биоптатах шейки матки уровня экспрессии рецепторов PD-L₁ и COX-2. PD-L₁-лиганд, при контакте со своим рецептором PD-1 (белок, выявляется на поверхности иммунокомпетентных клеток, в основном Т-лимфоцитов) запускает механизм супрессии опухоль-ориентированного иммунного ответа посредством индуцирования анэргии и апоптоза Т-лимфоцитов [6]. Подавление иммунной реакции при дисплазиях на фоне активной HPV-инфекции, по-видимому, имеет немаловажное значение в прогрессировании заболевания и злокачественной трансформации шеечного эпителия [7]. Переход от дисплазии к раку – это довольно долгий и многоступенчатый процесс, скорость которого зависит от

многих сопутствующих факторов, основными из которых считаются степень атипии эпителия, возраст пациентки и наличие папилломавируса [8]. Как известно, HPV-инфицирование сопровождается длительным хроническим воспалением, провоцирующим канцерогенез [9]. С этой точки зрения определение в дисплазированной эпителии активности COX-2, являющегося одним из главных модуляторов хронического воспаления, может служить прогностическим индикатором развития РШМ [10].

Целью исследования явилось определение экспрессии PD-L₁ и COX-2 при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях различной степени тяжести.

Материал и методы исследования. Проведено иммуногистохимическое исследование (ИГХ) экспрессии PD-L₁ и COX-2 в биоптатах шейки матки 35 больных с CIN I, II и III. Был использован стандартный режим ИГХ обработки (VENTANA Bench Mark Ultra) с помощью кроличьих моноклональных антител к COX-2 (SP21) и PD-L₁ (VD21R) фирмы Mediasis. Уровень экспрессии PD-L₁ оценивался по количеству тропных к антителам клеток – при окрашивании менее 1,0% от общей популяции результат считался негативным, при окрашивании более 1,0% – позитивным. По уровню экспрессии COX-2 в плоском эпителии были выделены четыре группы с цитоплазматическим окрашиванием: 0 (негативная реакция), 1+ (слабая степень экспрессии), 2+ (средняя) и 3+ (выраженная). Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с применением дискриминантного (χ^2 -Pearson) и непараметрического вариационного анализа (H-Kruskal-Wallis), на базе программы SPSS-26. Разница считалась достоверной при вероятности не менее 95% (уровень $p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение. Всем больным было проведено клинико-инструментальное обследование в

стандартном объеме – гинекологический осмотр, цитологическое исследование шеечного мазка, кольпоскопия, биопсия. Возраст больных колебался в пределах 28-61 года. Средний возраст женщин составил 37,3 года. Подавляющее большинство случаев дисплазий шейки матки (ДШМ) отмечалось среди женщин в возрасте 28-49 лет – 32 случая (91,4%), из них значительная доля приходится на группу 28-39 лет – 20 женщин, 57,1%. В возрасте 50-59 и 60-69 лет наблюдалось по 1 случаю с ДШМ. 3 (8,6%) пациентки находились в менопаузе, 2 (5,7%) – в пременопаузе и 30 (85,7%) – были активно менструирующими. 88,6% женщин (31 случай) при обращении к врачу не предъявляли каких-либо жалоб. Поводом для визита к врачу послужило желание профилактического осмотра или контроль за уже имеющимися гинекологическими заболеваниями (фибромиомы матки, кольпиты, цервициты, эрозии, нарушения менструального цикла, кисты яичников и др.). Интерпретация заключений цитологического исследования осуществлялась по системе Bethesda. ASC-US обнаружено в 2 (5,7%), ASC-H – в 3 (8,6%), LSIL – в 4 (11,4%) и HSIL – в 26 (74,3%) случаях. Всем больным была проведена кольпоскопия, при которой были выявлены участки белого эпителия (19 случаев), йодонегативные участки (21 случай), мозаика и пунктация (5), патологическая зона трансформации (22 случая), извитые сосуды (9 случаев). Согласно гистологическому заключению у 7 (20,0%) женщин была диагностирована CIN I, у 13 – CIN II (37,1%), и у 15 (42,9%) – CIN III. Результаты иммуногистохимического выявления рецепторного статуса COX-2 в тканевом материале представлены в таблице 1.

Таблица 1. Уровень экспрессии COX-2 при CIN разной степени тяжести

Уровень экспрессии	CIN I	CIN II	CIN III	Всего
COX-2 (1+)	5 (14,3%)	2 (5,7%)	----	7 (20,0%)
COX-2 (2+)	2 (5,7%)	9 (25,7%)	5 (14,3%)	16 (45,7%)
COX-2 (3+)	----	2 (5,7%)	10 (28,6%)	12 (34,3%)
Всего	7 (20,0%)	13 (37,1%)	15 (42,9%)	35 (100%)

Таблица 2. *Уровень экспрессии PD-L₁ при CIN разной степени тяжести*

Уровень экспрессии	CIN I	CIN II	CIN III	Всего
PD-L ₁ negative	7 (20,0%)	9 (25,7%)	4 (11,4%)	20 (57,1%)
PD-L ₁ positive	---	4 (11,4%)	11 (31,4%)	15 (42,9%)
Всего	7 (20,0%)	13 (37,1%)	15 (42,9%)	35 (100%)

Как видно из таблицы, в подгруппе с CIN I в 5 (14,3%) случаях из 7 наблюдалось слабое окрашивание и в 2-х (5,7%) умеренное. Выраженного окрашивания (3+) не было обнаружено, $p < 0,05$. В подгруппе с CIN II преобладали пациенты с умеренной реакцией COX-2 – 9 случаев из 13, экспрессия COX-2 (1+) и COX-2 (3+) наблюдалась у 4-х женщин, по 2 в каждом случае, что составило соответственно 25,7, 5,7 и 5,7% от общего числа больных с дисплазиями, $p < 0,05$. В подгруппе с CIN III у 10 больных (28,6%) степень выраженности COX-2-реакции соответствовала 3+ и у 5-и (14,3%) – 2+, $p < 0,05$.

Слабовыраженное (1+) окрашивание COX-2 отмечалось в 7 (20,0%) случаях, 5 (14,3%) из них пришлось на группу с CIN I и 2 (5,7%) на группу с CIN II, $p < 0,05$. Умеренное (2+) окрашивание выявлено у 16 (45,7%) женщин, из них 2 случая (5,7%) было в группе с CIN I, 9 (25,7%) – с CIN II и 5 (14,3%) в группе с CIN III. 3+ (выраженная) реакция была обнаружена у 12 (34,3%) женщин, у 10 (28,6%) из которых была CIN III и у 2-х (5,7%) – CIN II, $p < 0,05$.

PD-L₁-позитивность (таблица 2) была выявлена в 15 (42,9%) случаях с дисплазиями шейки матки. Положительная реакция была выявлена в 11 (31,4%) случаях с CIN III и 4-х (11,4%) с CIN II, $p < 0,05$. У больных с CIN I окрашивания не наблюдалось, таким образом, все случаи с CIN I были PD-L₁-негативны. Из 13 женщин с диагнозом CIN II 9 (25,7%) были PD-L₁-негативны и лишь 4 (11,4%) PD-L₁-позитивны, $p < 0,05$. Несколько иная картина наблюдается при дисплазии шейки матки III степени тяжести. В этой группе интенсивное окрашивание наблюдалось у 11 из 15 больных (31,4%), PD-L₁-негативная реак-

ция отмечалась у 4-х (11,4%).

Анализ полученных данных позволяет констатировать факт различной экспрессии рецепторов COX-2 и PD-L₁ в зависимости от степени тяжести дисплазии шейки матки. Так, для CIN I характерно отсутствие реакции на PD-L₁ и преимущественно слабовыраженная реакция на COX-2 (14,3% против 5,7% умеренного окрашивания, $p < 0,05$), в то время как COX-2 (3+) клеток не выявлялось. Среди женщин с CIN II преобладали больные с умеренной степенью окрашивания COX-2 (2+) и PD-L₁-негативные варианты, по 25,7% в каждом случае, $p < 0,05$. В группе больных с CIN III отмечалось преимущественное преобладание PD-L₁-позитивных вариантов (31,4%, $p < 0,05$) и случаев с выраженной (3+) реакцией на COX-2, 28,6% ($p < 0,05$). Таким образом, по мере прогрессирования дисплазии наблюдается увеличение плотности рецепторов COX-2 и PD-L₁, и как следствие этого, усиление выраженности иммуногистохимического окрашивания. Существенным является факт слабой (1+) реакции на COX-2 и её отсутствие для PD-L₁ при CIN I, что подтверждает низкую степень злокачественности данного вида дисплазии. Наблюдающаяся при CIN III выраженная (3+) реакция на COX-2 и преобладание среди них PD-L₁-позитивных форм может служить эффективным предиктивным критерием злокачественной трансформации и способствовать отбору больных с высокой степенью риска РШМ. Дальнейшие работы в этом направлении могут быть перспективны, с этой точки зрения считаем целесообразным постановку иммуногистохимической реакции на COX-2 и PD-L₁ при обнаружении у женщин CIN II и CIN III.

Литература

1. Зароченцева Н.В., Джиджихия Л.К. Цервикальные интраэпителиальные неоплазии: современный взгляд на проблему и пути решения // Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение, 2016, №4, с. 92-101.
2. Пак Р.В. Эпидемиологические особенности рака шейки матки в мире // Вестник КазНМУ, Алматы, 2019, №1, с. 675-677.
3. Горяева А.Э., Петров Ю.А. Скрининг рака шейки матки // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2018, № 4, с. 171-175.
4. Межевитинова Е.А., Абакарова П.Р., Хлебкова Ю.С. Предраковые поражения шейки матки. Тактика ведения. // Медицинский совет, 2016, №12, с. 112-118.
5. Каприн А.Д., Новикова Е.Г., Трушина О.И., Грецова О.П. Скрининг рака шейки матки – нерешённые проблемы. // Исследования и практика в медицине, 2015, т. 2, № 1, с. 36-41.
6. Солтанова И.Ф., Мехдиева Н.И., Казиев А.Ю. PD-1 как предиктор противоопухолевого иммунитета перспективы определения и возможности коррекции при раке шейки матки // Azerbaijan Medical Journal, 2019, №4 - с 155-160.
7. Hyeyoon Ch., J. H. Hong, J. Lee. Programmed death-1 (PD-1) expression in cervical intraepithelial neoplasia and its relationship with recurrence after conization // J. Gynecol.Oncol. 2018 May; 29(3): e27. Published online 2018 Jan 29. doi: 10.3802/jgo.2018.29.e27.
8. Xiangzhi L., Wenhan W., Chuanxi F. Prokaryotic expression, purification and characterization of human cyclooxygenase-2 // Int. J. Mol. Med. 2017, Jul; 40(1): 75-82.
9. Козырев К.М., Козырева С.М., Лолаева А. Ю., Шериева А. Ю. Некоторые современные тенденции лечения рака шейки матки (обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий – 2016 – Т. 23, № 2 – с. 224-232.
10. Səfərova İ.A. Uşaqlıq boynu xərçəngi zamanı metastazların proqnozlaşdırılmasında onkomarkerlərin rolu // Azərbaycan Onkologiya jurnalı, 2019, №1- s. 120-124.

References

1. Zarochentseva N.V., Dzhidzhikhiya L.K. Tservikal'nyye intraepitelial'nyye neoplazii: sovremennyy vzglyad na problemu i puti resheniya // Akusherstvo i ginekologiya: novosti, mneniya, obucheniye, 2016, vol. 4, p. 92-101 [In Russian].
2. Pak R.V. Epidemiologicheskiye osobennosti raka sheyki matki v mire // Vestnik KazNMU, Almaty, 2019, vol. 1, p. 675-677 [In Russian].
3. Goryayeva A.E., Petrov YU.A. Skrininying raka sheyki matki // Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy, 2018, vol. 4, p. 171-175 [In Russian].
4. Mezhevitinova Ye.A., Abakarova P.R., Khlebkova YU.S. Predrakovyye porazheniya sheyki matki. Taktika vedeniya. // Meditsinskiy sovet, 2016, vol. 12, p. 112-118 [In Russian].
5. Kaprin A.D., Novikova Ye.G., Trushina O.I., Gretsova O.P. Skrininying raka sheyki matki – nereshonnyye problemy. // Issledovaniya i praktika v meditsine, 2015, Issue 2, № 1, s. 36-41 [In Russian].
6. Soltanova I.F., Mekhdiyeva N.I., Kazyev A.YU. PD-1 kak prediktor protivopukholevogo immuniteta perspektivy opredeleniya i vozmozhnosti korrektsii pri rake sheyki matki // Azerbaijan Medical Journal, 2019, vol. 4, p. 155-160 [In Russian].
7. Hyeyoon Ch., J. H. Hong, J. Lee. Programmed death-1 (PD-1) expression in cervical intraepithelial neoplasia and its relationship with recurrence after conization // J. Gynecol.Oncol. 2018 May; 29(3): e27. Published online 2018 Jan 29. doi: 10.3802/jgo.2018.29.e27.
8. Xiangzhi L., Wenhan W., Chuanxi F. Prokaryotic expression, purification and characterization of human cyclooxygenase-2 // Int. J. Mol. Med. 2017, Jul; 40(1): 75-82.
9. Kozyrev K.M., Kozyreva S.M., Lolayeva A. YU., Sheriyeva A. YU. Nekotoryye sovremennyye tendentsii lecheniya raka sheyki matki (obzor literatury) // Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy, 2016, vol. 23, № 2 – p. 224-232 [In Russian].
10. Səfərova İ.A. Uşaqlıq boynu xərçəngi zamanı metastazların proqnozlaşdırılmasında onkomarkerlərin rolu // Azərbaycan Onkologiya jurnalı, 2019, vol. 1, p. 120-124 [In Azerb.].

Soltanova I.F.

**IMMUNOHISTOCHEMICAL DIAGNOSTICS OF PROGRAMMED
DEATH-LIGAND-1 AND CYCLOOXYGENASE-2 RECEPTORS IN CERVICAL
NEOPLASIA: POSSIBILITIES OF A DIFFERENTIATED APPROACH**

Oncology Department, Azerbaijan Medical University, Baku

Summary. The article examines the relationship between different degrees of cervical dysplasia (3 severity - CIN I, II and III), programmed cell death ligand-1 (PD-L1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) receptors. was informed about. Immunohistochemical examination using antibodies against PD-L1 and COX-2 receptors was performed in the biopsies of 35 patients with CIN I, II and III diagnoses. Evaluation of PD-L1 reaction results was determined on the basis of the share of stained cells in the total population - less than 1% negative, more than 1% positive. The results of the COX-2 reaction are 0 or negative, depending on the staining; Rated as 1+ (weak), 2+ (mild) and 3+ (severe). The study found that PD-L1 and COX-2 receptor levels vary depending on the degree of dysplasia. Thus, while no PD-L1-positive (+) cases were reported during CIN I, the response was positive in most patients during CIN III. The results of COX-2 staining showed that the proportion of cases where dysplasia is already severe staining is increasing. Thus, the study found that high-grade dysplasias are characterized by PD-L1-positivity and severe COX-2-expression. The obtained results can be used in the formation of the algorithm of the therapeutic approach to UBD and in determining the volume of surgical excision, as well as to optimize the prognostic assessment of cervical neoplasms.

Müəlliflə əlaqə üçün:

Soltanova İradə Fəxrəddin qızı – Azərbaycan Tibb Universitetinin Onkologiya klinikasının həkim-onkoloqu, Bakı, Azərbaycan

E-mail: ira_dass@hotmail.com