

Я. А. Гончарова, И.В.Василенко Ю.М.Винников

Сравнительный анализ гистологических и иммуногистохимических признаков доброкачественных эпителиальных новообразований кожи, обусловленных вирусом папилломы человека

Донецкий национальный медицинский университет им.М.Горького

Ключові слова: бородавки, кондиломы, иммуногістохімія

Ключевые слова: бородавки, кондиломы, иммуногистохимия

Key words: warts, condylomata acuminata, immunohistochemistry

У статті проведено порівняльний аналіз головних гістологічних (гіперкератоз, паракератоз, акантоз, папіломатоз, наявність дермального клітинного інфільтрату, судинна реакція), та імунгістохімічних (індекс проліферації, наявність CD1a, CD4, CD8 - позитивних лімфоцитів, експресія цитокератину 17) ознак доброякісних епітеліальних новоутворень шкіри, обумовлених вірусом папіломи людини. Вищезазначені ознаки проаналізовано в залежності від тривалості та характеру перебігу папіломавірусної інфекції. Встановлено, що у випадку тривалого перебігу в новоутвореннях збільшується вірусна навантаження та одночасно зменшується інтенсивність проліферації та вираженість клітинного дермального інфільтрату. Наведені зміни можливо розцінювати як ознаки зниження місцевої реактивності.

В статті проведено порівняльний аналіз основних гистологических (гиперкератоз, паракератоз, акантоз, папилломатоз, выраженность дермального клеточного инфильтрата, сосудистая реакция) и иммуногистохимических (индекс пролиферации, наличие CD1a, CD4, CD8-позитивных лимфоцитов, экспрессия цитокератина 17) признаков доброкачественных эпителиальных новообразований кожи, обусловленных вирусом папилломы человека. Вышеуказанные признаки проанализированы в зависимости от длительности и характера течения папилломавирусной инфекции. Установлено, что при длительном течении процесса в образованиях увеличивается вирусная нагрузка и одновременно уменьшается интенсивность пролиферации и выраженность клеточного дермального инфильтрата. Данные изменения можно расценивать как признаки снижения местной реактивности.

In the article the comparative analysis of histologic, (hyperkeratosis, parakeratosis, akantosis, papillomatosis, degree of cellular infiltrate, vascular reaction) and immunohistologic (index of proliferation, presence of CD 1a, CD4, CD8 positive lymphocytes, expression of citokeratin 17) aspects of benign epithelial skin tumours caused by human papillomavirus is effected. Aspects mentioned above are studied depending on the duration and the character of papillomavirus infection. We concluded that in the case of long duration in the epithelial tumours of HPV the virus charge is increased and in the same time the index proliferation and degree of dermal infiltrate are decreased. This changes may confirm the decrease of local reactivity.

Папилломавирусная инфекция (ГТВИ) характеризуется продолжительным развитием, ассоциированным в большей или меньшей степени с клиническими проявлениями. Одним из самых частых проявлений ГТВИ являются бородавки и кондиломы, которые по сути представляют собой доброкачественную гиперплазию кожи.

По данным американских исследователей кожные бородавки составляют около 8% всего дерматологического приема [8]. В общей популяции они наблюдаются с частотой 7-10%, преимущественно у детей школьного возраста и молодых людей [10].

Кондиломы («генитальные бородавки») являются самой распространенной инфекцией, передающейся по-

ловым путем, и встречаются в 2 раза чаще, чем генитальный герпес [6,9].

Вирус папилломы человека ДНК-овый и имеет особый тропизм к мальпигиевому слою эпидермиса, что и обуславливает эпителиальную локализацию новообразований.

С точки зрения современной теории иммунопатогенеза ГТВИ, после инфицирования вирусом кератиноцитов базального слоя существует 3 возможности дальнейшего развития процесса: 1) вирус может остаться персистировать в латентном состоянии в своей эписомальной форме (свободная ДНК вируса). В этом случае это будет здоровое носительство или латентная инфекция; 2) вирус может начать репликацию, используя пролиферацию клетки хозяина; 3) вирус может интегрироваться в геном клетки, вызывая онкогенный рост [1].

В том, по какому пути пойдет развитие ПВИ в том или ином случае, основная роль отводится местной иммунной реакции тканей [4].

Специфического лечения бородавок и кондилом в настоящее время не существует. Цель лечения: исчезновение макроскопически видимых поражений кожи, что достигается различными деструктивными методами, а именно химической деструкцией и различными аблятивными методами (хирургическое иссечение, криодеструкция, лазер, диатермокоагуляция).

Установлено, что после деструкции видимых высыпаний вирус персистировать во внешне здоровом эпидермисе, приводя к частым рецидивам (около 30%) [2,5].

По данным зарубежных авторов, затраты на лечение бородавок и кондилом внушительны поскольку как минимум 20% всех пациентов для достижения желаемого результата от лечения посещают врача более 10 раз. Эти же авторы полагают, что именно начальное количество образований является лучшим критерием для лечебного прогноза [3].

Многие авторы обращают внимание на возможный спонтанный регресс высыпаний, который может наблюдаться как при бородавках, так и при кондиломатозе. По некоторым данным спонтанный регресс кондилом может иметь место в 20-30% случаев свежего заражения, т.е. в течение первых 6 месяцев существования активных проявлений [7].

Цель исследования - проанализировать выраженность основных гистологических и иммуногистохимических признаков доброкачественных эпителиальных новообразований, обусловленных вирусом папилломы человека в зависимости от длительности и характера течения процесса.

Материалы и методы

Исучено 70 биоптатов бородавок и кондилом, взятых у 54 больных (31 женщина, 23 мужчины в возрасте от 8 до 69 лет). Из них 16 кондилом, 54 бородавки.

Забор материала был произведен хирургическим пу-

тем под местной анестезией 2% лидокаином с предварительным информированным согласием пациента на проведение процедуры.

Все гистологические препараты были проанализированы на стандартной окраске гематоксилин-эозином. Клинические диагнозы во всех случаях были подтверждены гистологически.

Анализ гистологических препаратов был проведен с учетом следующих признаков: степень выраженности гиперкератоза, паракератоза, акантоза, папилломатоза. Количественным способом определяли цитопатогенный эффект (койлоцитоз), оценивалась сосудистая реакция стромы и степень выраженности воспалительного инфильтрата. Оценка всех вышеперечисленных признаков за исключением койлоцитоза, проводилась на увеличении $\times 80$. Подсчет койлоцитов производился на увеличении $\times 200$.

При анализе 36 биоптатов из 70 были использованы иммуногистохимические методики. Данный материал был взят у 33 больных.

Для иммуногистохимического исследования использовали парафиновые блоки. Материал предварительно фиксировали в 10% формалине или мягком цинковом фиксаторе без содержания формалина (Pharmingen).

Использовались следующие маркеры: эпителиальные (цитокератин 17), гемопозитических клеток (CD1a, CD4, CD8), маркеры пролиферации (Ki-67).

Во всех 36 биоптатах изучали степень пролиферации. С этой целью использовали экспрессию моноклональных антител Ki-67 (Dako M7240). Производился подсчет Ki-67 позитивных клеток в 10 полях при ув. $\times 400$ с последующим выведением процента пролиферирующих клеток (индекс пролиферации).

В этих же биоптатах был проанализирован состав клеточного стромального инфильтрата. Клетки Лангерганса идентифицировали по экспрессии маркеров Cda (Dako M3571), Т-лимфоциты-хелперы – по экспрессии CD4 (Novokastra), цитотоксические Т-лимфоциты - по экспрессии CD8 (Dako M7103).

Подсчет CD1a, CD4, C08-позитивных клеток производился путем выведения средней арифметической клеток в 5 полях при ув. $\times 200$. Была разработана шкала степеней по количеству позитивных клеток в поле зрения новообразования, согласно которой 0- среднее число клеток от 0 до 5, 1-я степень - 5-25 клеток, 2-я степень - 25-50 клеток, 3-я степень - 50 клеток и более.

Степень экспрессии цитокератина 17 (ЦК 17) оценивалась по характеру распределения: 1 степень - экспрессия исключительно в роговых массах; 2 степень - экспрессия в роговых массах и парабазальном слое; 3 степень - экспрессия во всех слоях, включая базальный.

Был проведен сравнительный анализ гистологических и иммуногистохимических признаков в следующих трех группах, образованных в зависимости от длительности процесса: I-я - длительность заболевания до 3-х месяцев, II-я - длительность заболевания от 4-х до 12 месяцев, III-я - длительность заболевания больше 12 месяцев.

По характеру течения процесса все пациенты были разделены на 2 группы: I-я группа - больные со стабильным течением и отсутствием новых образований (стационарное течение); 2-я группа - больные с постоянным появлением новых образований (прогрессирующее течение). Больные этих двух групп были разделены на подгруппы в

зависимости от длительности данного состояния - «до 6 месяцев» и «свыше 6 месяцев».

Статистическая обработка данных проведена с помощью программы Statistica®. Корреляционный анализ проводился с вычислением коэффициента Спирмена (r). Учитывая небольшое количество наблюдений, применен непараметрический анализ с расчетом критерия Манна-Уитни (U-критерий У и л-кинсона-Манна-Уитни).

Результаты и их обсуждение

Сравнительный анализ гистологических и иммуногистохимических признаков в трех группах пациентов, разделенных по длительности существования активных клинических проявлений (кондилом или бородавок) показал статистически достоверные различия в выраженности вирусной нагрузки (среднее количество койлоцитов). При этом оказалось, что во II-й группе вирусная нагрузка образований ПВИ выше по сравнению с I-й ($p < 0,05$). В дальнейшем с «хронизацией» процесса (III-я группа) вирусная нагрузка уменьшалась, но сохранялась высокой по сравнению с I-й группой (см. таб. 1).

Обращал на себя внимание и характер распределения койлоцитов в эпидермисе, который был в основном очаговым и крайне редко равномерным (Рис. 1). Возможно помимо других факторов, именно неравномерностью распределения койлоцитов можно объяснить частые рецидивы образований после их деструкции, так как в поле деструкции могут попасть не все очаги вирусной пролиферации.

В I-й группе также обращал на себя внимание высокий индекс пролиферации (см. таб. 1), что с другой стороны естественно для активно растущего образования (Рис. 2). В процессе перехода во II-ю, а затем и в III-ю группу индекс пролиферации поступательно уменьшался ($p < 0,05$) (Рис. 3). Одновременно с уменьшением интенсивности пролиферации отмечалось уменьшение выраженности паракератоза ($p < 0,05$), что логично.

Одновременно с увеличением среднего числа койлоцитов во II-й группе уменьшалась выраженность клеточного дермального инфильтрата по сравнению с I-й группой ($p < 0,05$) (см. таб. 1). При этом уменьшалась выраженность всех трех основных составляющих реактивного клеточного инфильтрата - клеток Лангерганса (CD1a), CD4 и C08-позитивных лимфоцитов (см. таб. 1).

Мы не встретили подобных данных в уже опубликованной литературе по данной тематике, однако заключения, которые следуют из полученных нами данных вполне укладываются в общую концепцию иммунопатогенеза ПВИ.

Так уменьшение выраженности дермального инфильтрата в процессе перехода из I-й группы во II-ю и III-ю можно трактовать как снижение местной иммунной реакции. В частности подтверждением этого могут быть данные по количеству клеток Лангерганса в трех группах (Рис. 4,5). Установлено, что именно дендритические клетки Лангерганса играют важную роль в формировании тканевой иммунной реакции [1,8].

Несмотря на то, что согласно данным литературы в неизменном эпидермисе экспрессия ЦК 17 не наблюдается и чаще трактуется как показатель преанкроза эпидермального происхождения или карциномы, в исследованном нами материале лишь один биоптат не об-

наружил экспрессии ЦК 17. В большинстве случаев отмечалась высокая экспрессия ЦК 17 в поверхностных слоях эпидермиса при отсутствии ее в базальном и парабазальном слоях, что расценивалось как «нормальная» кератинизация. Однако, нередко наблюдалось нарушение созревания эпидермиса, когда высокая экспрессия ЦК 17 отмечалась в большинстве клеток средних слоев эпидермиса и в единичных клетках базального и парабазального слоя (Рис. 6). Другой наблюдаемый нами характер распределения с локализацией ЦК 17

преимущественно в базальном и парабазальном слоях и с низкой экспрессией в верхних слоях, трактуется большинством авторов как проявление

нарушений дифференцировки эпидермиса. В одном случае экспрессия ЦК 17 наблюдалась в клетках акантоэпителиальных тяжей, демонстрируя связь ее с разрастанием эпителия, пролиферацией клеток, в процессе которой возможна их мутация с нарушением дифференцировки.

Несмотря на наличие столь разнообразных проявлений, экспрессия ЦК 17 была постоянной во всех группах и не обнаруживала различий ни в зависимости от длительности, ни от характера течения процесса. *Таблица 1*

Наличие статистически достоверных различий по учитываемым гистологическим и иммуногистохимическим признакам в трех группах пациентов в зависимости от давности процесса

Признак	I группа	II группа	III группа
Гиперкератоз	2,27±0,24	2,50±0,15	2,42±0,12
Паракератоз	2,00±0,23 ³	1,92±0,17	1,47±0,11 ²
Акантоз	2,09±0,25	1,81±0,15	1,3±0,12
Папилломатоз	2,09±0,21	2,12±0,17	1,79±0,13
Койлоцитоз	4,59±1,44	16,77±3,08 ¹	10,88±2,54
Сосуд.р-ция	2,27±0,27	1,92±0,15	2,02±0,11
Клет.инф-т	1,91±0,28	1,23*0,10 ¹	1,53±0,11
Ki-67	46,33±15,73 ³	30,01±7,94	13,27±3,63 ²
CD1a	3,00±0,0P	1,23±0,33 ¹	1,45±0,28
CD4	2,50±0,50 ³	0,70±0,30 ^{>}	1,23±0,25
CD8	2,75±0,25 ³	0,70±0,30 ^{>}	1,42±0,36
ЦК17	2,00±0,58	2,00±0,26	1,80±0,22

Примечание: наличие статистически достоверных различий ¹ - с группой пациентов с давностью процесса до 3 месяцев; ² - с группой пациентов с давностью процесса от 4 до 12 месяцев; ³ - с группой пациентов с давностью процесса свыше 12 месяцев

Сравнительный анализ больных в группах со стационарным и прогрессирующим течением выявил достоверные отличия лишь по двум признакам - среднему числу койлоцитов и выраженности клеточной реакции (см. таб.2). Среднее число койлоцитов увеличивалось при стационарном течении процесса с увеличением длительности процесса ($p < 0,05$). При прогрессирующем течении среднее число койлоцитов также увеличивалось, в т.ч. по сравнению со стационарным течением ($p < 0,05$). При этом реактивность стромы в группе с прогрессиру-

ющим течением процесса по сравнению с группой со стационарным течением в подгруппах с длительностью больше 6 месяцев падала ($p < 0,05$).

По остальным учитываемым гистологическим и иммуногистохимическим признакам отличия оказались статистически не значимыми.

В целом деление по характеру течения процесса продемонстрировало те же тенденции, которые имели место при делении на группы по длительности течения ПВИ, но в менее выраженной форме (см. таб.2).

Таблица 2

Сравнительная характеристика групп со стационарным и прогрессирующим течением ПВИ

	Стационарное течение		Прогрессирующее течение	
	до 6 мес.	больше 6 мес.	до 6 мес. ч	больше 6 мес.
Койлоцитоз	5,08±1,47	14,22±2,70 ¹	7,41±6,28*	12,09±3,38
Клеточная реакция	1,53±0,19	1,48±0,12	1,67±0,29	1,14±0,13 ²

Примечание: наличие статистически достоверных различий ¹ - с первой подгруппой, ² - с второй подгруппой

Выводы

1. При наличии доброкачественных новообразований кожи, обусловленных ВПЧ, целесообразным является выделение трех групп в зависимости от длительности процесса (I-я - длительность до 3-х месяцев, II-я - длительность от 4-х до 12 месяцев, III-я - длительность больше 12 месяцев).

2. В процессе перехода ПВИ от I-й ко II-й и III-й группам, достоверно меняются вирусная нагрузка, выраженность стромальной клеточной реакции и интенсивность пролиферации.

3. Характер течения ПВИ (стационарное и прогрессирующее) отличается по учитываемым гистологическим и иммуногистохимическим признакам не так явно, так что, по-видимому, обособленное выделение характера течения процесса не имеет смысла.

4. Характерным признаком доброкачественных новообразований кожи, обусловленных вирусом папилломы человека, является экспрессия ЦК 17, которая нередко обнаруживает нарушение дифференцировки эпидермиса.

Перспективы дальнейших исследований в данном направлении предусматривают разработку адекватного подхода к лечению ПВИ с учетом длительности процесса и выраженности значимых гистологических и иммуногистохимических критериев.

Литература

1. Aubin F., Humbay O., Guirini J.-S. et al. Cancers cutanes non melaniques et papillomavirus humain//Ann.Dermatol.Venereol.-2003.-Vol. 130.-P. 1131-1138.
2. Aubin F., Pretret J.-L., Mougin C. et al. Infection a papillomavirus humain //Ann/Dermatol.Venereol.-2007.-N.134.-P.94-99.
3. Bouscarat F., Mahe E., Descamps V. Condylomes externs// Ann.Dermatol.Venereol.-2002.-Vol.129.-P.1013-1022.
4. Coleman N., Birley H.D.L., Renton A.M. et al. Immunological events in regressing genital warts.//Am.J.Clin.Pathol.- 1994.-Vol.102.-P.768-774.
5. Colver G.B. The infrared coagulation in dermatology// Dermatol.Clin.-1989.-Vol.7-P.155-167.
6. Fenton K.F., Korovessis C, Johnson A.M. et al. Sexual behaviour in Britain: reported sexually transmitted infections and prevalent genital Chlamidia trachomatis infection//Lancet.-2001 .-Vol.358.-P. 1851-1854.
7. Halioua B. Reconnatre, explorer, traiter les condylomes acumines chez rhomme//bedc.-2000.-Vol.8.-N.7.-P.215-218.
8. Horn T.D., Johnson S.M., Helm R.M., Roberson P.K. Intralesional immunotherapy of warts with mumps, Candida, and trichophyton skin test antigens// Arch.Dermatol.-2005.-Vol.141.-P.589-594.
9. Laurent R. Infections genitales a papillomavirus. Rev.Prat. - 1996.- N46-P.1961-1968.
10. Streit M., Braathen L.R., Perroud H.M. Virus papillome humain et le spectre clinique des vermes// Forum Med.Suisse. 2001.-N32/33.-P.814-819.