

## ИММУНОФЕНОТИП p53, Ki-67, p16 И SK17 СКЛЕРОАТРОФИЧЕСКОГО ЛИХЕНА ПОЛОВОГО ЧЛЕНА И ВУЛЬВЫ, ЕГО ЗАВИСИМОСТЬ ОТ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ДЕРМАТОЗА

<sup>1</sup>Кузьменко-Москвина Ю. А., <sup>2</sup>Бич Т. А.

<sup>1</sup>Городское клиническое патологоанатомическое бюро, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

*Введение.* Склероатрофический лихен (САЛ) – частый генитальный дерматоз, имеющий злокачественный потенциал. Иммуногистохимические предикторы малигнизации достаточно хорошо изучены в вульварном САЛ, в меньшей степени – в САЛ полового члена, без гендерного сравнения.

*Цель.* Установить возможные гендерные различия в иммунофенотипе генитального САЛ с использованием белков p53, Ki-67, p16, SK17.

*Материал и методы.* Исследована кожа и слизистая оболочка полового члена (n=40) и вульвы (n=57) с морфологически верифицированным САЛ. Проведена сравнительная гендерная ИГХ характеристика заболевания.

*Результаты.* Впервые установлено, что иммунофенотип САЛ не имеет существенных гендерных различий и часто характеризуется гиперэкспрессией p53 (индекс маркировки >70), низким индексом маркировки Ki-67, без экспрессии p16 и SK17.

*Выводы.* Вероятно, кожа и слизистая оболочка полового члена и вульвы при САЛ в равной степени могут подвергаться так называемому «ишемическому стрессу» с повышением p53 дикого типа.

**Ключевые слова:** половой член; вульва; склероатрофический лихен; p53; Ki-67; p16; SK17.

*Для цитирования:* Кузьменко-Москвина, Ю. А. Иммунофенотип p53, Ki-67, p16 и SK17 склероатрофического лихена полового члена и вульвы, его зависимость от морфологического строения дерматоза / Ю. А. Кузьменко-Москвина, Т. А. Бич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2020. Т. 18, № 2. С.124-128. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2020-18-2-124-128>

### Введение

Как известно, воспалительные заболевания кожи, или дерматозы, могут развиваться во всех частях тела, а также в слизистых оболочках полости рта и наружных половых органов. В генитальной локализации такие из них, как склероатрофический лихен (САЛ) и красный плоский лишай, могут служить фоном для развития облигатного предрака (интраэпителиальной неоплазии полового члена и плоскоклеточного интраэпителиального поражения вульвы) или карциномы. Последние требуют хирургического лечения – частичной или полной пен- и вульвэктомии. Выявление пациентов с высоким риском неопластической прогрессии таких дерматозов – актуальная задача во всем мире и в Республике Беларусь, поскольку способствует снижению риска развития инвазивной карциномы за счет длительного динамического наблюдения, выбора тактики лечения и выполнения повторных биопсий [1].

Наиболее частым из двух генитальных дерматитов является САЛ. Заболевание характеризуется хроническим прогрессирующим течением, возникает в любом возрасте и проявляется белыми атрофическими пятнами и бляшками. Наличие на его фоне таких гистологических признаков, как плоскоклеточная гиперплазия (ПГ) и базальноклеточная атипия многослойного плоского эпителия (МПЭ), по мнению исследователей, повышает вероятность его злокачественной трансформации [2]. В роли иммуногистохимических (ИГХ) предикторов неопластической

прогрессии САЛ обсуждаются такие маркеры, как p53, p16 и Ki-67 [1-6].

Нарушение регуляции клеточного цикла, как известно, играет важную роль в онкогенной трансформации клеток. В канцерогенезе полового члена и вульвы этот молекулярный механизм хорошо изучен на примере белков p53, p16 и Ki-67 (MIB1), и продолжает исследоваться в генитальном САЛ [2-4]. Белок p53 представляет собой транскрипционный фактор, выполняющий функцию супрессора развития злокачественных опухолей [5]. Избыточная экспрессия его возникает при мутации одноименного гена или увеличении содержания p53 «дикого» типа (при так называемом «ишемическом стрессе») [3, 5]. Белок p16 является ингибитором циклинзависимой киназы, замедляющим клеточный цикл и экспрессирующимся в поражениях, опосредованных вирусом папилломы человека (ВПЧ) [5]. Ki-67, он же негистоновый ядерный протеин 395 и 345 кДа, отсутствует в фазе G-0. Наиболее часто используется как пролиферативный маркер в тканях [5].

Сравнительно недавно в плоскоклеточных процессах аногенитальной области стала анализироваться экспрессия белка базального типа – SK17, регулирующего рост клеток путем связывания с адаптерным белком 14-3-3sigma. В нормальном МПЭ протеин не экспрессируется. Экспрессия в нижних отделах МПЭ указывает на активацию роста кератиноцитов [7].

Однако в доступной литературе отсутствуют публикации, посвященные сравнительной ген-

дерной ИГХ характеристике САЛ. Корреляция иммунофенотипа САЛ с особенностями морфологического строения у мужчин исследована недостаточно.

**Цель работы** – провести сравнительную гендерную ИГХ характеристику генитального САЛ с использованием p53, Ki-67, p16 и СК17, установить возможные различия и корреляцию иммунофенотипа с особенностями морфологического строения дерматоза.

#### Материал и методы

Объектом изучения послужил биопсийный и операционный материал кожи и слизистой оболочки полового члена (n=40, от 40 пациентов) и вульвы (n=57, от 57 пациентов) с ретро-спективным морфологическим диагнозом САЛ, отобранный на базе УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро» г. Минска за 2012-2016 гг. Кусочки ткани фиксированы в 10% растворе нейтрального забуференного формалина, залиты в парафиновые блоки, серийно срезаны, помещены на предметные стекла и окрашены гематоксилином и эозином. Критерии включения препаратов: правильная ориентация кусочков, отсутствие обширных везикуло-буллезных и артификальных изменений эпидермиса и облигатного предрака или рака. Выделены группы пациентов в зависимости от пола: 1 – «САЛ полового члена» (n=40), 2 – «САЛ вульвы» (n=57).

Гистологический диагноз САЛ выставлялся при наличии гидропической дистрофии базальных кератиноцитов, утолщенной базальной мембраны МПЭ и гомогенизации субэпителиального коллагена. Базальная мембрана считалась утолщенной, будучи гомогенной и эозинофильной, шире ядра лимфоцита. «Гомогенизированной» субэпителиальная ткань трактовалась при замещении аморфной «стекловидной» массой. Стадия САЛ считалась ранней при очаговой гомогенизации, поздней – диффузной. Выделялась очаговая (при вовлечении от одного до четырех эпидермальных гребней) и диффузная (более четырех гребней) гидропическая дистрофия по распространенности (алгоритм предложен авторами данной статьи). Под «ПГ» понималось увеличение толщины шиповатого слоя, часто за

счет эпидермальных гребней. Заостренный нижний край МПЭ назывался «пилообразной перестройкой». Базальные отделы МПЭ изучались на предмет атипичности клеток: гиперхромии, анизонуклеоза и кариомегалии [2].

Иммунофенотип генитального САЛ изучен с применением маркеров p53 (n=97), Ki-67 (n=33), p16 (n=9) и СК17 (n=20) (табл. 1). Ядерная иммунореактивность p53 оценивалась в позитивно окрашенных ядрах базальных кератиноцитов МПЭ [3]. Интенсивность окрашивания оценивалась от 0 до 3, где 0 – отсутствие окрашивания, 1 – слабое, 2 – умеренное, 3 – выраженное. Подсчет велся на 200 непрерывно расположенных клетках. Под индексом маркировки (ИМ) понималась доля позитивных ядер в клетках с выраженной и умеренной степенью интенсивности окрашивания. При ИМ <10% окрашивание считалось отрицательным [3]. Паттерны p53: положительный (непрерывное линейное, ИМ >70%) и «дикий» тип (прерывистое линейное, ИМ равен 10-69) (рис. 1) [1]. Дополнительно отмечалось супрабазальное окрашивание p53.

Иммунореактивность Ki-67 оценивалась по аналогии с p53 [5]. Случаи с ИМ Ki67, равном 0, были исключены из статистического анализа. Экспрессия p16 рассматривалась как положительная («block-type») при непрерывном линейном горизонтальном ядерно-цитоплазматическом окрашивании базальных и супрабазальных отделов МПЭ. Окрашивание отдельных групп клеток трактовалось как негативное [5]. Позитивной для СК17 считалась цитоплазматическая иммунореактивность в МПЭ [7].

Статистическая обработка проведена в программе «Statistica 10» с применением  $\chi^2$ , критерия Фишера, U-критерия Манна-Уитни. Подсчет экспрессии ИГХ маркеров осуществлен в программе Image J.

#### Результаты и обсуждение

При изучении иммунореактивности маркеров в генитальном САЛ установлен схожий иммунопрофиль у мужчин и женщин (табл. 1). Как видно из таблицы 1, гиперэкспрессия p53 отмечалась часто, примерно в половине случаев с ИМ p53 >70. Медиана ИМ p53 в наблюдениях с ПГ, базально-клеточной атипичией в обеих

**Таблица 1.** – Результаты иммуногистохимического исследования p53, Ki-67, p16 и СК17 в генитальном склероатрофическом лихене у мужчин (м) и у женщин (ж)

**Table 1.** – Immunohistochemical p53, Ki-67, p16 and CK17 findings in genital lichen sclerosis in males and females

Группы	p53				Ki-67				p16, n	СК17, n
	n	ИМ <sup>a</sup> p53 (паттерн %) <sup>b</sup>	p-уровень, критерий Манна-Уитни	U	n	ИМ <sup>a</sup> Ki-67	p-уровень, критерий Манна-Уитни	U		
М	40	68±32 (45%) 1,5-98	0,333	1007	10	46±43 0-99,5	0,033	49	6	8
Ж	57	69±28 (49%) 0-99			23	10±24 0-96				

Примечание: <sup>a</sup>Индекс маркировки (ИМ) – доля позитивных клеток/200 базальных кератиноцитов ± стандартное отклонение, диапазон значений. <sup>b</sup>Удельный вес случаев с положительным паттерном p53 (% наблюдений)

группах (76-82 и 79, соответственно) превышала таковую при отсутствии этих изменений (на 30-36 и 18 пунктов, соответственно) без статистической значимости ( $p=0,379$ ,  $U=225,0$ ). Индекс маркировки Ki-67 при САЛ полового члена был статистически значимо выше, нежели САЛ вульвы, в том числе в наблюдениях с ПГ и базальной атипией (на 40-60 пунктов;  $p=0,030$ ,  $U=0,0$ ), которые достоверно чаще встречались у мужчин ( $p<0,001$ ). Экспрессия p16 и СК17 в обеих группах главным образом отсутствовала ( $n=9$  и  $n=18$ , соответственно). В двух случаях САЛ полового члена было базально-супрабазальное окрашивание.

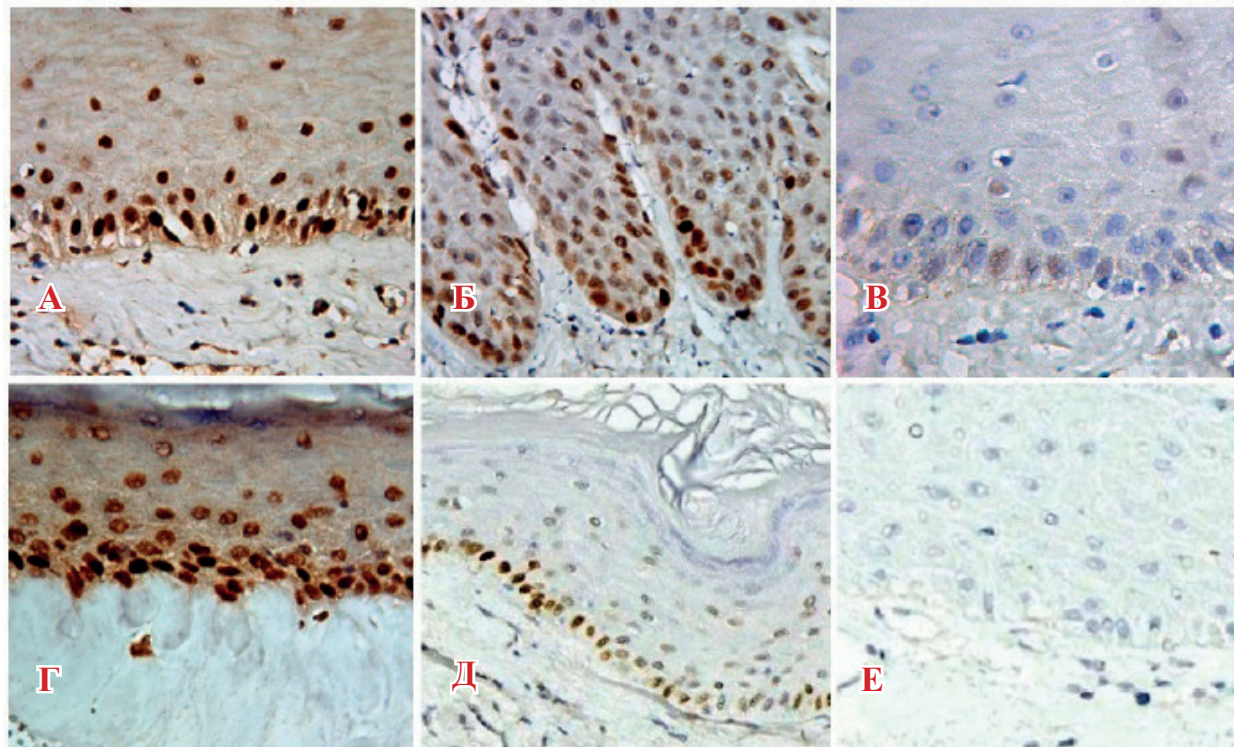
Общим для двух групп стала статистически значимая связь супрабазальной экспрессии p53 с ИМ  $p53>90$  (рис. 1 а, г), у женщин – при фибриноидном некрозе субэпителиального коллагена ( $p=0,014$ ).

Статистически значимые гендерные различия в p53 иммунофенотипе САЛ были установлены лишь по ряду гистологических признаков (табл. 2). Как видно из таблицы 2, вульварный дерматоз достоверно чаще демонстрировал высокий ИМ p53 при «пилообразной перестройке» МПЭ, с тенденцией к статистически значимому различию между двумя группами. Высокие значения ИМ p53 у мужчин достоверно чаще были при ранней стадии дерматоза с субэпителиальным воспалительным инфильтратом и очаговым характере гидропической дистрофии. Медиана ИМ p53 в наблюдениях вульварного САЛ без митозов в базальных и парабазальных отделах МПЭ

была достоверно выше, чем при их наличии (на 30 пунктов). Установлена тенденция к статистически значимому различию по этому параметру между группами пациентов (см. табл. 2).

Впервые в настоящей работе выполнены оценка иммунофенотипа изолированного САЛ полового члена, а также его сравнение с вульварным дерматозом. Несмотря на имеющиеся статистически значимые различия в морфологическом строении САЛ (у мужчин и женщин), заключающемся в более частом наличии гистологических признаков с высоким риском неопластической трансформации при поражении полового члена, принципиальных гендерных различий в экспрессии p53, p16 и СК17 между ними не выявлено. Дерматоз у обоих полов часто характеризуется гиперэкспрессией p53, в особенности при наличии ПГ и базальной атипии, и отсутствием экспрессии p16 и СК17. Впервые описана статистически значимая связь избыточной экспрессии p53 (более 85) у мужчин с ранней стадией САЛ с субэпителиальным воспалительным инфильтратом, очаговой гидропической дистрофией, у женщин – с пилообразной перестройкой МПЭ, у обоих полов также с супрабазальной экспрессией этого маркера. В основе такой взаимосвязи могут лежать гипоксия и воспаление. Связано ли наличие экспрессии СК17 у мужчин с большим риском последующей малигнизации дерматоза – неизвестно. Данная гипотеза требует дальнейшего исследования.

В целом результаты, полученные в группах САЛ полового члена и вульвы, согласуются с



**Рисунок 1. – Иммунофенотип p53 в генитальном склероатрофическом лихене у мужчин (а-в) и женщин (г-е): а, г – положительный паттерн с супрабазальной экспрессией; б, д – «дикий» тип; в, е – отрицательный паттерн. Окрашивание гематоксилином и эозином,  $\times 400$**

**Figure 1. – Genital lichen sclerosus p53 immunophenotype in men (a-c) and women (d-f): a, d – positive pattern with suprabasal extension; b, e – «wild» type; c, f – negative pattern. Hematoxylin and eosin staining,  $\times 400$**

**Таблица 2.** – Результаты иммуногистохимического исследования p53 в зависимости от морфологического строения склероатрофического лишая у мужчин (м) и женщин (ж)**Table 2.** – Immunohistochemical p53 findings in dependence with histological features of lichen sclerosus in males and females

Гистологический признак	Группа	p53			
		n	ИМ <sup>a</sup> p53 (паттерн %) <sup>b</sup>	p-уровень, критерий Манна-Уитни (значение U)	
Ранняя гистологическая стадия САЛ	М	9	86±6 (88,9%) 5,8-95,5	0,018 (66,0)	0,647 (67,5)
	Ж	17	82±41 (58,8%) 4,5-99	0,351 (286,0)	
Очаговая гидропическая дистрофия кератиноцитов	М	16	85±33 (68,8%) 4-95	0,043 (118,5)	0,360 (186)
	Ж	28	59±11 (39,3%) 0-99	0,389 (351,5)	
Пилообразные изменения покровного эпителия	М	24	68±31 (50%) 1,5-98	0,825 (183,5)	0,065 (170,5)
	Ж	21	86±19 (57,1%) 19,4-99	0,028 (245,5)	
Митотическая активность базальных кератиноцитов	М	11	84±98 (63,6%) 0-99	0,262 (122,0)	0,067 (510,0)
	Ж	10	46±29 (30,0%) 4,5-89	0,035 (134,0)	
Супрабазальная экспрессия p53	М	3	90±5 (100%) 89,5-98	0,012 (6,0)	1,0 (21,0)
	Ж	14	93±14 (100%) 13,7-99	<0,001 (43,0)	

Примечание: <sup>a</sup>Индекс маркировки (ИМ) – доля позитивных клеток/200 базальных кератиноцитов ± стандартное отклонение, диапазон значений. <sup>b</sup>Удельный вес случаев с положительным паттерном p53(% наблюдений)

ранее опубликованными в доступной литературе. Гиперэкспрессия p53 и Ki-67 на фоне изолированного вульварного САЛ описывается часто, нередко в сочетании с ПГ и базальной атипией кератиноцитов (Rolfe и соавт., 2001; Scurtu и соавт., 1998) и считается предиктором повышенной восприимчивости к злокачественным изменениям САЛ [1-5]. Другие авторы высказывают предположение о гипоксической природе избыточной экспрессии p53, поскольку она не связана с мутацией гена TP53 [3, 6]. Несмотря на то, что в настоящее время существуют публикации, описывающие положительный паттерн p16 в ряде случаев изолированного генитального САЛ, чаще всего дерматоз не связан с ВПЧ [4].

### Литература

- Concordant p53 and mdm-2 Protein Expression in Vulvar Squamous Cell Carcinoma and Adjacent Lichen Sclerosus / J. A. Carlson [et al.] // Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology. – 2001. – Vol. 9, № 2. – P. 150-163. – doi: 10.1097/00129039-200106000-00008.
- Chiesa-Vottero, A. Histopathologic study of thin vulvar squamous cell carcinomas and associated cutaneous lesions: a correlative study of 48 tumors in 44 patients with analysis of adjacent vulvar intraepithelial neoplasia types and lichen sclerosus / A. Chiesa-Vottero, P. M. Dvoretzky, W. R. Hart // American Journal of Surgical Pathology. – 2006. – Vol. 30, № 3. – P. 310-318. – doi: 10.1097/01.pas.0000180444.71775.1a.
- Liegl, B. p53 immunostaining in lichen sclerosus is related to ischaemic stress and is not a marker of differentiated vulvar intraepithelial neoplasia (d-VIN) / B. Liegl, S. Regauer // Histopathology. – 2006. – Vol. 48, № 3. – P. 268-274. – doi: 10.1111/j.1365-2559.2005.02321.x.
- Cell cycle regulation and proliferation in lichen sclerosus / T. Gambichler [et al.] // Regulatory Peptides. – 2011. – Vol. 167, № 2-3. – P. 209-214. – doi: 10.1016/j.reg-pep.2011.02.003.
- A comparative analysis of lichen sclerosus of the vulva and lichen sclerosus that evolves to vulvar squamous cell carcinoma / M. R. Raspollini [et al.] // American Journal of Obstetrics and Gynecology. – 2007. – Vol. 197, № 6. – P. 592. – doi: 10.1016/j.ajog.2007.04.003.
- Inactivation of the CDKN2A and the p53 tumour suppressor genes in external genital carcinomas and their precursors / N. Soufir [et al.] // British Journal of Dermatology. – 2007. – Vol. 156, № 3. – P. 448-453. – doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07604.x.

7. Assessment of CK17 as a Marker for the Diagnosis of Differentiated Vulvar Intraepithelial Neoplasia / M. B. Podoll [et al.] // International Journal of Gynecological Pathology. – 2017. – Vol. 36, № 3. – P. 273-280. – doi: 10.1097/PGP.0000000000000317.
- References**
1. Carlson JA, Amin S, Malfetano J, Tien AT, Selkin B, Hou J, Goncharuk V, Wilson VL, Rohwedder A, Ambros R, Ross JS. Concordant p53 and mdm-2 Protein Expression in Vulvar Squamous Cell Carcinoma and Adjacent Lichen Sclerosus. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2001;9(2):150-163. doi: 10.1097/00129039-200106000-00008.
  2. Chiesa-Vottero A, Dvoretzky PM, Hart WR. Histopathologic study of thin vulvar squamous cell carcinomas and associated cutaneous lesions: a correlative study of 48 tumors in 44 patients with analysis of adjacent vulvar intraepithelial neoplasia types and lichen sclerosus. *American Journal of Surgical Pathology*. 2006;30(3):310-318. doi: 10.1097/01.pas.0000180444.71775.1a.
  3. Liegl B, Regauer S. p53 immunostaining in lichen sclerosus is related to ischaemic stress and is not a marker of differentiated vulvar intraepithelial neoplasia (d-VIN). *Histopathology*. 2006;48(3):268-274. doi: 10.1111/j.1365-2559.2005.02321.x.
  4. Gambichler T, Kammann S, Tigges C, Kobus S, Skrygan M, Meier JJ, Köhler CU, Scola N, Stücker M, Bechara FG, Altmeyer P, Kreuter A. Cell cycle regulation and proliferation in lichen sclerosus. *Regulatory Peptides*. 2011;167(2-3):209-214. doi: 10.1016/j.regpep.2011.02.003.
  5. Raspollini MR, Asirelli G, Moncini D, Taddei GL. A comparative analysis of lichen sclerosus of the vulva and lichen sclerosus that evolves to vulvar squamous cell carcinoma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2007;197(6):592. doi: 10.1016/j.ajog.2007.04.003.
  6. Soufir N, Queille S, Liboutet M, Thibaudeau O, Bachelier F, Delestaing G, Balloy BC, Breuer J, Janin A, Dubertret L, Vilmer C, Basset-Seguin N. Inactivation of the CDKN2A and the p53 tumour suppressor genes in external genital carcinomas and their precursors. *British Journal of Dermatology*. 2007;156(3):448-453. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07604.x.
  7. Podoll MB, Singh N, Gilks CB, Moghadamfalahi M, Sanders MA. Assessment of CK17 as a Marker for the Diagnosis of Differentiated Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2017;36(3):273-280. doi: 10.1097/PGP.0000000000000317.

## IMMUNOPHENOTYPES P53, KI-67, P16 AND CK17 OF PENILE AND VULVAR LICHEN SCLEROSUS AND THEIR ASSOCIATION WITH MORPHOLOGICAL FEATURES OF DERMATOSIS

<sup>1</sup>Kuzmenka-Maskvina Y. A., <sup>2</sup>Bich T. A.

<sup>1</sup>City Clinical Pathology Bureau, Minsk, Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

*Background.* Lichen sclerosus (LS) is a common genital dermatosis with a malignant potential. Immunohistochemical predictors of malignancy in vulva and to a lesser extent in penile LS have been fairly well studied, but no gender comparison has been performed.

*The aim was to establish possible gender IHC differences in genital LS using p53, Ki-67, p16 and CK17 proteins.*

*Material and methods.* Biopsy and surgical material of penis (n=40) and vulva (n=57) with a morphological diagnosis of LS was examined. A comparative analysis of gender LS IHC characteristics was performed.

*Results.* For the first time it was found out that LS does not have any significant gender IHC differences and is often associated with p53 overexpression (labeling index >70), low Ki-67, and negative p16 and CK17 patterns.

*Conclusions.* It is likely that the skin and the mucous membranes of penis and vulva in LS may undergo so-called «ischemic stress» of the similar degree, reflecting an increase of wild-type p53.

**Keywords:** penis, vulva, lichen sclerosus, p53, Ki-67, p16, CK17.

**For citation:** Kuzmenka-Maskvina YA, Bich TA. Immunophenotype p53, Ki-67, p16 and CK17 of penile and vulvar lichen sclerosus, and its association with the morphological features of the dermatosis. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2020;18(2):124-128. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2020-18-2-124-128>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the local ethics committee

**Об авторах / About the author**

\*Кузьменко-Москвина Юлия Александровна / Kuzmenka-Maskvina Yuliya, e-mail: yuliya.k.moskvina@gmail.com, ORCID: 0000-0002-1663-0096

Бич Татьяна Александровна / Bich Tatjana, e-mail: bichtatjana@gmail.com, ORCID: 0000-0001-6487-8662

\* – автор, ответственный за переписку / corresponding author

Поступила / Received: 19.02.2020

Принята к публикации / Accepted for publication: 20.03.2020