

БІОМОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ У ПАТОГЕНЕЗІ РОЗВИТКУ ГІПЕРПЛАСТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ ЕНДОМЕТРІУ

Доц. Т. Л. ВЕСІЧ, проф. І. О. ТУЧКІНА, доц. І. А. ГУЗЬ, Р. Є. БЛАГОВЕЩЕНСЬКИЙ

Харківський національний медичний університет, Україна

Вивчено біомолекулярні маркери у 69 пацієток із гіперплазією ендометрію, що склали основну групу, та 20 жінок без гіперплазії. Для оцінки молекулярно-біологічних особливостей гіперплазії ендометрію за допомогою імуногістохімічного методу визначено експресію маркерів проліферації (Ki-67) та апоптозу (p53) і естрогенових (ER- α) та прогестеронових (PGR) рецепторів. Доведено, що визначення біомолекулярних маркерів Ki67, p53 та рецепторів статевих стероїдних гормонів ER- α і PGR дозволяє не тільки прогнозувати перебіг гіперплазії ендометрію, а й оцінити ефективність проведеного лікування. Імуногістохімічне дослідження дає змогу виділити групи ризику виникнення рецидиву гіперпластичних процесів і можливої малігнізації ендометрію та своєчасно призначити пацієткам хірургічне лікування.

Ключові слова: гіперплазія ендометрію, біомолекулярні маркери, рецептори статевих стероїдних гормонів.

Гіперпластичні процеси ендометрію (ГПЕ), які полягають у патологічній зміні слизової оболонки матки, є однією з важливих проблем гінекології [1]. ГПЕ стає фоном для розвитку злоякісних процесів матки, що трансформуються на тлі гістологічної перебудови залози строми ендометрію [2]. У патогенезі ГПЕ основне місце займають абсолютна або відносна гіперестрогенемія, а також комплекс нейроендокринних, метаболічних і імунних порушень [3]. Естрогенові рецептори в ендометрії стимулюють проліферативні процеси у матці, що зумовлює розвиток ГПЕ [4].

Найчастіше гіперплазію ендометрію (ГЕ) трактують як нефізіологічну проліферацію його залоз різної форми і розмірів, що супроводжується збільшенням залозисто-стромального співвідношення [5].

Етіологія та патогенез деяких типів гіперплазії до теперішнього часу залишаються не вивченими, що служить приводом для дискусій [6]. Дотепер ГПЕ розглядають як групу патологічних процесів, що характеризуються прогресуванням клініко-морфологічних проявів — від залозистої ГЕ (ЗГЕ) до атипових передракових станів [7].

Дослідження молекулярних механізмів ГПЕ і пошук їх фармакологічної корекції — одна з головних проблем ефективного підходу до управління і моніторингу проліферативної активності залоз ендометрію [8].

Активність ендометрію регулюється факторами проліферації, а саме — Ki-67 та маркером апоптозу p53 [9]. Ген Ki-67 кодує ядерний білок, який бере участь у мітотичному діленні клітин і сприяє їх проліферативній активності. Зміст маркера в незміненому ендометрії корелює з фазами менструального циклу: збільшується у стадії проліферації, досягаючи максимуму наприкінці фолікулярної фази, і знижується у стадії секреції. Цей маркер

взаємопов'язаний з експресією естрогенових (ER) і прогестеронових (PGR) рецепторів, що свідчить про гормональну залежність експресії Ki-67 [10].

Розуміння базисних основ індукції клітинного росту, особливо в умовах пухлинної трансформації тканин, є невід'ємною частиною грамотного підходу до тактики ведення пацієток із ГПЕ [11]. У зв'язку з цим перспективним напрямком зменшення частоти гіпер- і неопластичних процесів ендометрію є подальше вивчення патогенетичних і молекулярно-генетичних механізмів розвитку цього захворювання [12].

Мета дослідження — вивчити роль біомолекулярних маркерів у патогенезі розвитку гіперпластичних процесів і відповідність ступеня їх активності морфологічним змінам ендометрію.

Для проведення дослідження було обстежено 69 пацієток із ГПЕ у віці від 45 до 56 років (середній вік $48,4 \pm 2,8$ року), що склали основну групу. До контрольної групи увійшли 20 жінок того ж віку, які надійшли у клініку з матковою кровотечею для вишкрібання маткової порожнини, але без ГПЕ.

Залежно від результату гістологічного дослідження зіскрібків із порожнини матки пацієток основної групи було розподілено на дві підгрупи: 1-шу — 37 (53,6%) жінок з морфологічними ознаками простої ГЕ (ПГЕ) та 2-гу — 32 (46,4%) особи з ознаками складної ГЕ (СГЕ). Крім цього, залежно від фази менструального циклу, під час якої було отримано зіскрібок, кожна підгрупа жінок основної групи була розподілена ще на дві — а і б, тобто а — у фазі проліферації та б — у фазі секреції. При морфологічній діагностиці використувалися критерії відповідно до класифікації передракових змін ендометрію Б. І. Железнова [13].

Для оцінки молекулярно-біологічних особливостей ГЕ за допомогою імуногістохімічного (ІГХ)

методу визначалася експресія маркерів проліферації (Ki-67) та апоптозу p53, рецепторів статевих стероїдних гормонів — ER- α і PGR.

При оцінці результатів визначення Ki-67 та p53 методом ІГХ за позитивне приймалося інтенсивне забарвлення ядерних структур темно-коричневим кольором. Оцінка експресії Ki-67 здійснювалася за методикою підрахунку кількості забарвлених ядер на 100 клітин у трьох полях зору. Результат оцінювався за прийнятою шкалою: 1) 0–20% — низька проліферативна активність; 2) 21–50% — помірна; 3) 51–100% — висока.

Експресія рецепторів до стероїдних гормонів (ER- α і PGR) встановлювалася ядерним забарвленням переважно коричневого і темно-коричневого кольору. Забарвлення було більш інтенсивним при застосуванні антитіл до PGR. Експресія рецепторів до стероїдних гормонів оцінювалася за допомогою обчислення показника HISTOScore, розрахованого за формулою:

$$\text{HISTOScore} = 1a + 2b + 3c,$$

де *a* — слабо забарвлені клітини, *b* — помірно і *c* — сильно. Кількість ядер із різною інтенсивністю забарвлення розраховували на 500 клітин.

Імуноморфологічне дослідження було проведене на 95 зіскрібках ендометрію, отриманих при роздільному діагностичному вишкрібанні маткової порожнини.

Пацієнток у підгрупах було розподілено таким чином: до ПГЕ віднесено у 1а 21 (58,3%) і 1б — 16 (41,7% хворих); до СГЕ увійшли у 2а 19 (58,6%) і 2б — 13 (41,4%) осіб. При морфологічному дослідженні слизової оболонки матки жінок контрольної групи у 17 (85,0%) випадках виявлено ендометрій фази проліферації, а у 3 (15,0%) — секреції.

Кожна особа дала інформовану згоду на проведення діагностичного вишкрібання маткової порожнини і лікування. Тактику ведення пацієнток із ПГЕ детерміновано наказом МОЗ України від 31.12.2004 р. № 676 «Про затвердження клінічних протоколів із акушерської та гінекологічної допомоги», згідно з яким лікування ПГЕ включає два етапи: I — вишкрібання маткової порожнини з метою видалення зміненого ендометрію та з наступним його морфологічним дослідженням; II — підбір необхідної терапії, з'ясування соматичного і гінекологічного анамнезів, перенесених оперативних втручань та їх наслідків. Звертали увагу на стан менструальної і дітородної функцій, наявність тазового болю, характер і обсяг раніше перенесених оперативних втручань та їх наслідки.

Усім жінкам виконано гістероскопію або фракційне вишкрібання слизової матки з наступним гістологічним дослідженням зіскрібків. До проведення діагностичного видалення ендометрію з маткової порожнини кожна з пацієнток пройшла загальноклінічне та гінекологічне обстеження. Для визначення товщини і структури ендометрію використовували ультрасонографію за допомогою апарату Aloka 88B-1700 (Японія) з функцією ко-

льорового доплерівського картування та імпульсно-хвильової доплерометрії. Гістологічне дослідження ендометрію виконували за стандартною методикою серійних зрізів.

В обстежених основної групи зафіксовано високий індекс абортів (5–6 на одні пологи), однак кількість вагітностей, що закінчилися пологамі, істотно не відрізнялась від такої у жінок контрольної групи. Внутрішньоматкову контрацепцію використовували 17,2% пацієнток, оральні контрацептиви — 29,4%.

У 45 хворих основної групи з різними типами ПГЕ та у 12 жінок контрольної групи було виконано ІГХ-дослідження з визначенням рецепторів стероїдних гормонів (ER- α і PGR) та маркерів проліферативної активності — протеїну Ki-67 і апоптозу p53.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою Microsoft Excel та Statistica for Windows v. 10,0, StatSoft Inc. (США). За критичний рівень достовірності нульової гіпотези обирали $p < 0,05$ (95% рівень значущості). Усі отримані кількісні дані оброблено методом варіаційної статистики.

У результаті дослідження виявилось, що за даними ультразвукової діагностики (УЗД) малого таза у всіх обстежених жінок не було виявлено патології яєчників. Товщина ендометрію (середнє М-ехо) у пацієнток основної групи становила $14,2 \pm 2,1$ мм, а у жінок із контрольної групи — $5,2 \pm 1,1$ мм ($p < 0,05$).

Клініко-статистична характеристика основної групи підтверджує високу частоту гінекологічної та екстрагенітальної захворюваності. Незважаючи на те що захворювання органів репродуктивної системи було виявлено більш ніж у 55% усіх обстежених основної групи, хворі зі СГЕ у 3,3 рази частіше ($p < 0,05$) страждали на захворювання молочної залози, ніж пацієнтки з ПГЕ.

При ПГЕ слизова тіла матки характеризується чисельними, нерівномірно розподіленими залозами різної форми і величини, у тому числі кістозно-розширеними, на окремих ділянках зі слабо вираженими складками у напрямку просвіту залоз. СГЕ, на відміну від ПГЕ, характеризується глибокими порушеннями структури й архітектоники ендометрію, які спричиняються розростаннями елементів слизової оболонки по всій її поверхні (рис. 1).

ІГХ дослідження були проведені у 28 пацієнток 1-ї підгрупи (1а — 16 жінок та 1б — 12), 17 пацієнток 2-ї підгрупи (2а — 11 жінок та 2б — 6) та у 12 осіб контрольної групи.

Після проведення ІГХ досліджень щодо визначення рецепторів статевих гормонів ми дійшли висновку, що порівняно з контролем (рис. 2) у пацієнток підгрупи 1а експресія рецепторів до естрогенів була значно вищою (рис. 3), а до прогестерону була помірно виражена і майже не відрізнялася від контрольної групи (рис. 4).

У хворих на ПГЕ підгрупи 1б експресія статевих рецепторів була значно нижчою ($p < 0,05$),

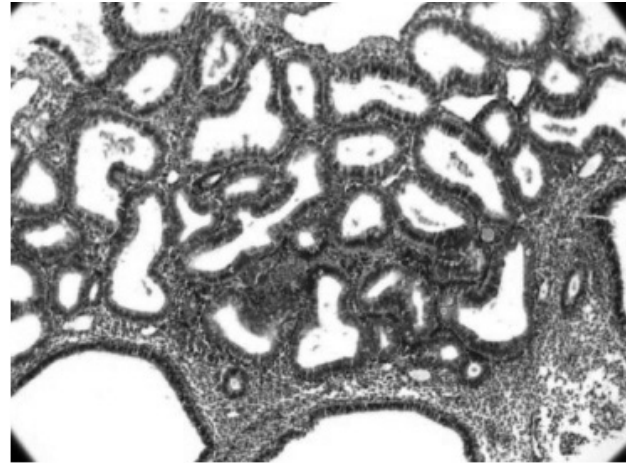
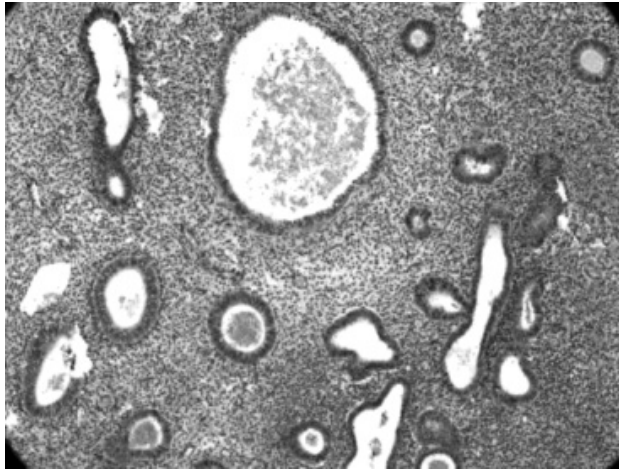


Рис. 1. Типи гіперплазії ендометрію: *а* – проста, *б* – складна (забарвлення гематоксилін-еозином, $\times 400$)

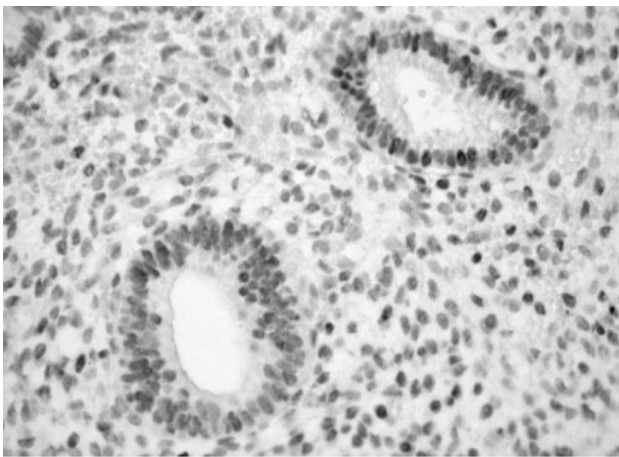


Рис. 2. Експресія ER- α в епітелії і стромі нормального ендометрію (контрольна група) у стадії проліферації (імуногістохімічний метод, імунопероксидазна реакція, $\times 400$)



Рис. 3. Експресія ER- α в епітелії і стромі при простій гіперплазії

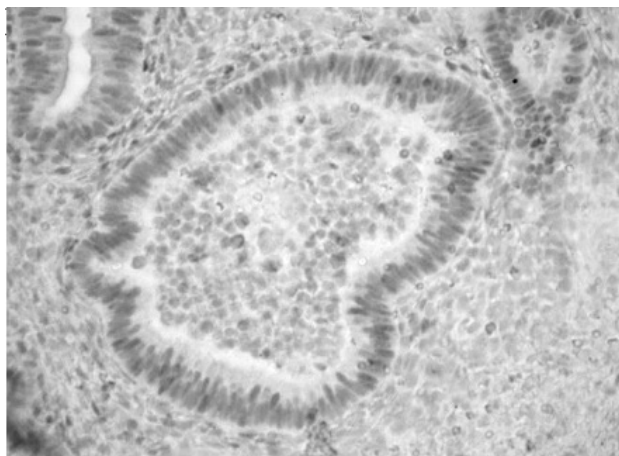


Рис. 4. Експресія PGR в епітелії та ендометрії при простій гіперплазії ендометрію (підгрупа 1а) (імуногістохімічний метод, імунопероксидазна реакція, $\times 400$)

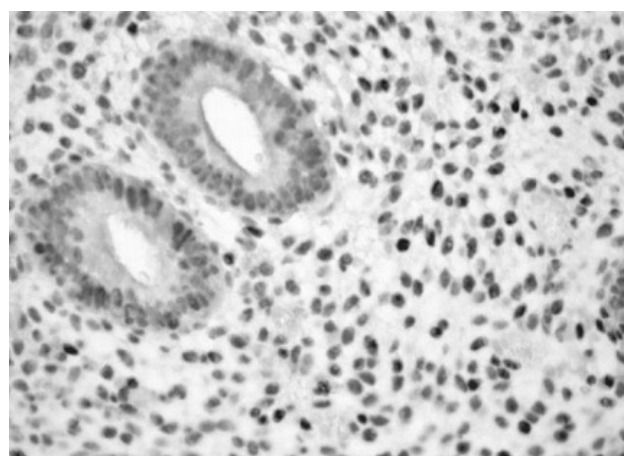


Рис. 5. Експресія PGR в епітелії і стромі нормального ендометрію (контрольна група) у стадії проліферації (імуногістохімічний метод, імунопероксидазна реакція, $\times 400$)

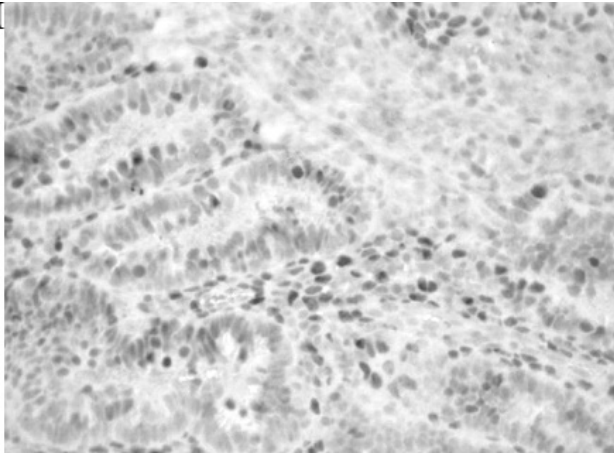


Рис. 6. Експресія PGR в епітелії і стромі при складній гіперплазії ендометрію (підгрупа 2б) (імуногістохімічний метод, імунопероксидазна реакція, $\times 400$)

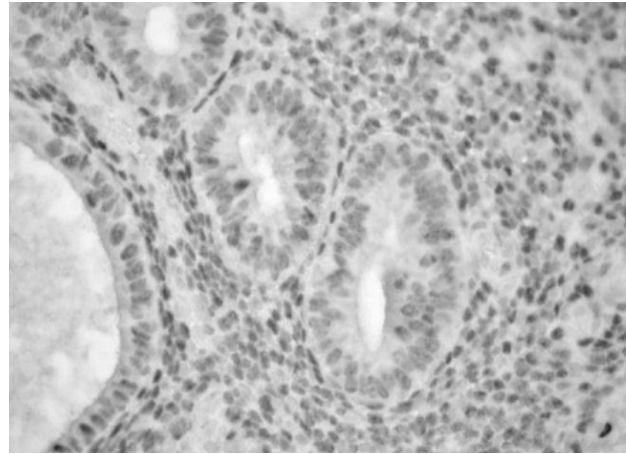


Рис. 7. Експресія PGR в епітелії і стромі при складній гіперплазії ендометрію (підгрупа 2б) (імуногістохімічний метод, імунопероксидазна реакція, $\times 400$)

ніж у контролі, що передбачає низьку ефективність гормональної терапії у цієї категорії пацієнток.

У пацієнток із СГЕ, навпаки, експресія рецепторів до прогестерону порівняно з контролем (рис. 5) була слабкою як у стромі, так і в епітелії залоз (рис. 6). Особливо слабка експресія в ендометрії і повна відсутність альфа-естроген-рецепторів у стромі спостерігалися у жінок підгрупи 2б, коли вишкрібання маткової порожнини здійснювалось на 21–23-й дні менструального циклу (рис. 7).

Результати дослідження свідчать про високу проліферативну активність клітин ендометрію у жінок із СГЕ, у яких відбувалося достовірне підвищення маркера проліферації Ki-67 від 11,1 до 23,4% ($p < 0,05$), тоді як при ПГЕ цей показник був значно меншим та практично не відрізнявся від контрольної групи (від 4,3 до 9,2% клітин епітелію).

Данні про експресію біомолекулярних маркерів в ендометрії у стадіях проліферації і секреції при ПГЕ та СГЕ наведено в таблиці.

Експресія антионкогенів білка p53 у пацієнток зі СГЕ була достовірно нижчою за показники у біоптатах ендометрію, ніж у жінок із ПГЕ. Маркер апоптозу p53 при СГЕ достовірно знижений (від 10,7 до 4,3%) відносно жінок із ПГЕ (відповідно від 13,4 до 6,8%, $p < 0,05$).

Проведені ІГХ дослідження поглибили наші уявлення про патогенез ГПЕ, зокрема, було встановлено низьку експресію рецепторів до стероїд-

них гормонів, високу — до проонкогенних і низьку — до антионкогенних білків у пацієнток із СГЕ. Ці дані підтверджують високий ризик розвитку онкологічної трансформації ендометрію при СГЕ і недоцільність проведення гормональної терапії у цієї категорії хворих.

Виявлені імуногістохімічні маркери розвитку ГПЕ дають змогу прогнозувати розвиток неопластичних змін і зумовлюють необхідність проведення цього дослідження.

Нами було запропоновано алгоритм обстеження пацієнток із гіперпластичними процесами, в основі якого лежить верифікація морфологічного діагнозу з використанням імуногістохімічних критеріїв: наявність/відсутність експресії до рецепторів стероїдних гормонів, білків Ki-67 та маркера апоптозу p53. З нашої точки зору, крім загально-визнаних класичних патогенетичних детермінант розвитку ГПЕ, однією з основних причин можна впевнено назвати переважання процесів проліферації над апоптозом на тлі зміненого рецепторного статусу ендометрію, особливо у жінок зі СГЕ.

Спроба комплексно впливати на зазначені патофізіологічні механізми, на наш погляд, дає змогу суттєво підвищити ефективність лікування ГПЕ, знизити ризик рецидиву і прогресування процесу.

Таким чином, можливими молекулярними і клітинними патогенетичними детермінантами ПГЕ можуть бути фактори проліферації і апоптозу, що підтверджується достовірним підвищенням

Експресія біомолекулярних маркерів у незміненому ендометрії та при його простій гіперплазії у стадії проліферації і секреції

| Показник | Контроль | ПГЕ (підгрупа 1а) | | СГЕ (підгрупа 1б) | |
|------------------------|---------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | | Ki-67 | p53 | Ki-67 | p53 |
| Стадія проліферації, % | 8,2 \pm 6,7 | 4,3 \pm 0,6 | 13,4 \pm 4,3* | 11,1 \pm 1,7* | 10,7 \pm 1,4* |
| Стадія секреції, % | 7,6 \pm 1,2 | 9,2 \pm 1,1 | 6,8 \pm 0,8 | 23,4 \pm 1,2* | 4,3 \pm 0,8* |

* $p < 0,05$ достовірність відмінностей відносно контрольної групи.

маркера проліферації Ki67 від 4,3 до 9,2% (клітини епітелію), при СГЕ в біоптатах ендометрію від 11,1 до 23,4%, а також зниженням маркера апоптозу p53 від 10,7 до 4,3% та від 13,4 до 5,8% відповідно.

Диференційований підхід до діагностики ГПЕ заснований на ІГХ визначенні біомолекулярних маркерів (Ki67, p53), що дає змогу не тільки прогнозувати перебіг гіперпластичного процесу, а й оцінити ефективність проведеного лікування.

Список літератури

1. Манухин И. Б. Современные представления о гиперплазии эндометрия и эндометриальной интраэпителиальной неоплазии (обзор литературы) / И. Б. Манухин, Ю. Ю. Табакман, А. Х. Биштави // Проблемы репродукции.— 2010.— № 6.— С. 52–58.
2. К вопросу о патогенезе гиперплазии эндометрия / А. Х. Биштави, О. А. Горных, В. Н. Гулиева [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы.— 2012.— № 3–4.— С. 108–112.
3. Аномальные маточные кровотечения: структура патологических изменений эндометрия, вопросы патогенеза и тактики ведения / Ю. Ю. Табакман А. Х. Биштави, О. А. Горных [и др.] // Проблемы репродукции.— 2013.— № 5.— С. 54–56.
4. Павловская М. А. Гиперплазия эндометрия у женщин репродуктивного возраста: иммуноморфологические особенности патологии / М. А. Павловская, Л. В. Гутикова // Медицинские новости.— 2015.— № 5.— С. 70–73.
5. Mills A. M. Endometrial hyperplasia / A. M. Mills, T. A. Longacre // Sem. Diagn. Pathol.— 2010.— Vol. 27.— P. 199–214.
6. Oncologic and reproductive outcomes with progestin therapy in women with endometrial hyperplasia and grade 1 adenocarcinoma: a systematic review / C. C. Gunderson, A. N. Fader, K. A. Carson [et al.] // Gynecol. Oncol.— 2012.— Vol. 125 (2)— P. 477–482.
7. Pathologic features associated with resolution of complex atypical hyperplasia and grade 1 endometrial adenocarcinoma after progestin therapy / C. C. Gunderson, S. Dutta, A. Nickles [et al.] // Gynecol. Oncol.— 2014.— Vol. 132 (1)— P. 33–37.
8. Пролиферативная активность и апоптоз в гиперплазированном эндометрии / Г. Т. Сухих, Г. Е. Чернуха, В. П. Сметник [и др.] // Акушерство и гинекология.— 2005.— № 5.— С. 25–29.
9. Computerized image analysis of p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in benign, hyperplastic, and malignant endometrium / A. S. Elhafey, J. C. Papadimitriou, M. S. El-Hakim M [et al.] // Arch. Pathol. Lab. Med.— 2001.— Vol. 125.— P. 872–879.
10. Biomarkers of progestin therapy resistance and endometrial hyperplasia progression / K. Upson, K. H. Allison, S. D. Reed [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol.— 2012.— Vol. 207.— P. 36–58.
11. Chen X. Aberrant survivin expression in endometrial hyperplasia: another mechanism of progestin resistance / X. Chen, Z. Zhang, Y. Feng [et al.] // Modern Pathology.— 2009.— Vol. 22.— P. 699–708.
12. Analytical Validation of the Oncotype DX Genomic Diagnostic Test for Recurrence Prognosis and Therapeutic Response Prediction in Node-Negative Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer / M. Cronin, C. Sangli, M. L. Liu [et al.] // Clin. Chem.— 2007.— Vol. 53, № 6.— P. 1084–1091.
13. Железнов Б. И. Некоторые итоги изучения проблемы предрака эндометрия / Б. И. Железнов // Акушерство и гинекология.— 1978.— № 1.— С. 10–17.

БИОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАЗВИТИЯ ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ЭНДОМЕТРИЯ

Т. Л. ВЕСИЧ, И. А. ТУЧКИНА, И. А. ГУЗЬ, Р. Е. БЛАГОВЕЩЕНСКИЙ

Изучены биомолекулярные маркеры у 69 пациенток с гиперплазией эндометрия, составивших основную группу, и 20 женщин без гиперплазии. Для оценки молекулярно-биологических особенностей гиперплазии эндометрия с помощью иммуногистохимического метода определялась экспрессия маркеров пролиферации (Ki-67) и апоптоза (p53) и эстрогеновых (ER- α) и прогестероновых (PGR) рецепторов. Доказано, что определение биомолекулярных маркеров Ki-67, p53 и рецепторов половых стероидных гормонов ER- α и PGR позволяет не только прогнозировать течение гиперплазии эндометрия, но и оценить эффективность проводимого лечения. Иммуногистохимическое исследование дает возможность выделить группы риска возникновения рецидива гиперпластических процессов и возможной малигнизации эндометрия и своевременно назначить пациенткам хирургическое лечение.

Ключевые слова: гиперплазия эндометрия, биомолекулярные маркеры, рецепторы половых стероидных гормонов.

**BIOMOLECULAR MARKERS IN PATHOGENESIS OF DEVELOPMENT
OF ENDOMETRIAL HYPERPLASIA**

T. L. VIESICH, I. O. TUCHKINA, I. A. GUZ, R. Ye. BLAHOVESHCHENSKIY

Biomolecular markers were studied in 69 patients with endometrial hyperplasia (EH), who made up the main group, and 20 women without endometrial hyperplasia. To assess the molecular biological features of endometrial hyperplasia, the expression of the proliferation markers (Ki-67), apoptosis (p53), estrogen (ER- α) and progesterone (PGR) receptors was determined using the immunohistochemical method. It has been proven that the determination of biomolecular markers Ki-67, p53 and sex steroid hormone receptors, i.e. ER- α and PGR, allows not only the prediction of the endometrial hyperplasia course, but also the assessment of the treatment effectiveness. The immunohistochemical method makes it possible to reveal the risk groups for the recurrence of hyperplastic processes, the development of possible endometrial malignancy, and to promptly appoint the patients with surgical treatment.

Key words: endometrial hyperplasia, biomolecular markers, sex steroid hormone receptors.

Надійшла 26.12.2018