

УДК 618.145-006.6:618.145-007.61:618.145-002.17

## ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРИ ГИПЕРПЛАЗИИ И НЕОПЛАЗИИ ЭНДОМЕТРИЯ

ЧУМАК З.В., ЗЕЛИНСКИЙ А.А., ШАПОВАЛ Н.В., МАНАСОВА Г.С.

Одесский национальный медицинский университет  
Одесский городской центр по проблемам климактерия

*Проведено изучение экспрессии белков p53, bcl-2 и ER, PR в эндометрии 57 женщин с гиперпластическими процессами и аденокарциномой и у 14 – с двухфазным менструальным циклом. Выявлено увеличение уровней протеинов p53, bcl-2 при комплексной гиперплазии эндометрия с атипией, с установленным высоким уровнем ER, что свидетельствует о преобладании нарушения процессов апоптоза на фоне повышенной активности рецепторов эстрогенов и можно расценивать как пусковой фактор в развитии клеточной атипии. Самый высокий уровень PR был установлен при простой гиперплазии без атипии. При неоплазии эндометрия было выявлено относительное снижение протеинов p53, bcl-2, ER и PR, что требует дальнейших исследований для интерпретации результатов.*

**Ключевые слова:** гиперплазия эндометрия, апоптоз, иммуногистохимия, p53, bcl-2, ER, PR.

Диффузные гиперпластические процессы эндометрия (ГЭ) являются одной из наиболее распространенных патологий слизистой оболочки тела матки и представляют собой совокупность изменений стромального и железистого компонентов ткани. Интерес исследователей к этой проблеме обусловлен способностью данного патологического процесса, как к самостоятельному излечению, так и к малигнизации, в зависимости от степени морфологических изменений [1, 2].

Неоплазия ткани сопровождается преобладанием клеточного деления над элиминацией, либо за счет активации процессов пролиферации, либо угнетения процессов запрограммированной клеточной гибели или при их сочетанных нарушениях, образующих клон клеток способных в дальнейшем проявлять автономность и иммортализацию [1,3]. В проявлении этого процесса, могут иметь значение, как состояния гормонального гомеостаза в целом, так и состояние местных изменений клеточного метаболизма на тканевом уровне [4,5,6].

Несбалансированное гормональное влияние в развитии ГЭ освещено во многих исследованиях, уровень рецепторного аппарата изменяется не только от фазы менструального цикла [4], но и от наличия пролиферативного процесса, хотя данные о содержании рецепторов к эстрогенам (ER) и прогестерону (PR) крайне мозаичны и противоречивы.

При исследовании процессов апоптоза изучается роль проапоптозного белка p53, который обеспечивает генетическую однородность клеток и предотвращение селекции клеток, имеющих ростовые или прочие преимущества [3]. Утрата функции гена p53 и его белка наблюдается при злокачественных заболеваниях, и его недостаточность неминуемо приводит к развитию опухолей. Изучение функции белка p53 позволяет разрабатывать не только новые подходы к лечению онкологических заболеваний, но и определять стратегию профилактики ряда заболеваний [5]. Как антиапоптозных факторов ведутся работы по изучению гена Bcl-2 и его протеина bcl-2, [7], в результате активации которых, могут происходить процессы накопления генетических нарушений [5].

Цель исследования – изучение проявления и распределения маркеров апоптоза p53, bcl-2, рецепторов эстрогена и прогестерона в эпителии и строме эндометриальной ткани при гиперпластических процессах и неоплазии, определение их диагностической значимости.

### Материалы и методы исследования

В исследование вошли женщины возраст, которых находился в пределах от 36 до 57 лет и в среднем составил  $47,2 \pm 4,7$  лет. Под наблюдением находились 71 пациентка, из которых у 57, по данным гистологического исследования ткани эндометрия, был выявлен

гиперпластический процесс. 14 пациенток с двухфазным менструальным циклом, у которых был получен образец эндометрия в процессе подготовки к вспомогательным репродуктивным технологиям - составили группу контроля. Использовались данные анамнеза, результаты клинико-лабораторного обследования, эхография (УЗИ аппаратом Toshiba Xario с трансвагинальным датчиком частотой 6,5 МГц), гистологического исследования соскобов эндометрия и последующей оценкой экспрессии маркеров p53, bcl-2, ER и PR.

Иммуногистохимические реакции ставили на серийных парафиновых срезах. В качестве первичных специфичных антител использовали антитела к bcl-2, p53 (ДАКО-Германия), к рецепторам эстрогена (Moа-Hu Estrogen Receptor), рецепторам прогестерона (Moа-Hu Progesterone Receptor). Результаты иммуногистохимических реакций оценивались для bcl-2 в плюсах по интенсивности коричневой окраски. Оценка экспрессии p53, проводилась путем подсчета процента окрашенных ядер на 100 клеток. Интенсивность окрашивания оценивали в баллах следующим образом: (0) – отсутствие окрашивания, (+) - слабое окрашивание, (++) – умеренное окрашивание, (+++) – сильное окрашивание.

Для ER и PR оценку проводили в баллах по шкале Allred - сумма баллов количества иммуноокрашенных клеток и интенсивность окрашивания: (-) – негативная реакция, Н < 50, (+) – Н от 50 до 100, (++) – Н от 100 до 200, (+++) – Н от 200 до 300 единиц.

Результаты исследования обрабатывали статистически с помощью вариационной статистики с критерием Стьюдента с использованием стандартных компьютерных систем.

### Результаты исследования и их обсуждение

Экспрессия белков p53 и bcl-2 в клетках изучалась на образцах ткани эндометрия. Первую группу составили 11 женщин с простой гиперплазией эндометрия без атипии, вторую группу – 18 пациенток с комплексной гиперплазией без атипии, третью группу – 15 женщин с комплексной гиперплазией с атипичными процессами в эндометрии, четвертую группу – 8 женщин с аденокарциномой. В группу контроля (пятая группа) включены 14 женщин с морфологически неизменным эндометрием (стадия пролиферации - 6 пациенток, стадия секреции - 8 пациенток).

Полученные нами результаты исследований оценки экспрессии протеина p53 представлены рис. 1. Во II группе обнаружено появление экспрессии белка p53 преимущественно в ядрах эпителиальных клеток, и менее интенсивное - в стромальных клетках эндометрия. Усиленная экспрессия уровня p53 отмечается при появлении клеточной атипии в основном от 33% до 85% клеток эпителия и от 12% до 33% клеток стромы, что в среднем составило  $56,6 \pm 1,05\%$  и  $27,94 \pm 1,07\%$  соответственно. Показатели экспрессии данного белка у женщин IV группы были ниже чем в III группе: в препаратах с аденокарциномой эндометрия экспрессию белка p53 в ядрах эпителиальных клеток от 25% до 60%, и в стромальных клетках от 12% до 38%, что в среднем равнялось  $43,8 \pm 2,39\%$  в клетках эпителия, и  $21,4 \pm 3,13\%$  в клетках стромы, против  $56,6 \pm 2,05\%$  в клетках эпителия и  $27,94 \pm 1,07\%$  в клетках стромы при комплексной атипичной гиперплазии. Простая гиперплазия эндометрия (I группа), как и неизменный эндометрий стадии пролиферации и секреции (V группа) характеризовался отсутствием экспрессии протеина p53.

По мнению некоторых исследователей, активность p53 может полностью отсутствовать только в состоянии полного покоя, что практически невозможно в условиях функционирующего организма. Даже временная несбалансированность может индуцировать те или иные изменения уровня протеина p53 [3]. Протеин p53, как продукт немутированного гена P53, сохраняется не более 20 мин. в тканях и в дальнейшем быстро деградирует в протеосомах, и в клетках тканей в последующем крайне трудно выявляем [6]. В результате чего его определение с помощью иммуногистохимических методов практически невозможно. Установлено, что мутации гена P53 приводят к появлению долгоживущего, функционально неактивного протеина p53 с периодом его полураспада – до 24 ч. и его экспрессия свидетельствует о появлении способности клетки уклоняться от апоптоза [3,5].

Наряду с p53, как маркера апоптоза, мы изучали экспрессию протеина bcl-2. Полученные нами результаты отображены на рис. 1.

Умеренное окрашивание bcl-2 нами было выявлено в клетках эндометрии фазы пролиферации женщин контрольной группы в 4 (66,7%) случаях (++) , слабое в 2 (33,3%) (+). В

ендометрії фази секреції в 2 (14,3%) випадках експресії данного білка не було виявлено (0), в 1 - інтенсивність окрашування була умеренная (++) і в 5(62,5%) - слабая (+), що можна расценити як свідчення підвищення процесів апоптозу в секреторну фазу. Данні показателі суммарно по V групі склали: в 14,3% випадку відсутність експресії білка bcl-2 (0), в 50,0% - слабое окрашування (+), в 35,7% - умеренное окрашування (++) , максимальную інтенсивність окраски (+++) в ендометрії данної групи нам виявити не удалось.

В образцах ендометрії жінок I групи в 9,17% експресія bcl-2 протеїна була с максимальной окраской (+++) і виявлялась, в основному, в епітелії желез. В стромальних клітках данний показателі практично виявлен не був. У 9,1% жінок данної групи була виявлена умеренная інтенсивність окрашування (++) в епітелії кліток ендометрія, у 54,5% констатовано слабое окрашування (+), і у 27,3% - відсутність окрашування. При дослідженні ендометрія во II групі була виявлена следующая картина: у 5,6% - сильное окрашування (+++), в 16,7% - умеренное (++) , в 50,0% слабое (+), і відсутність окраски (0) - в 27,7±2,34%.

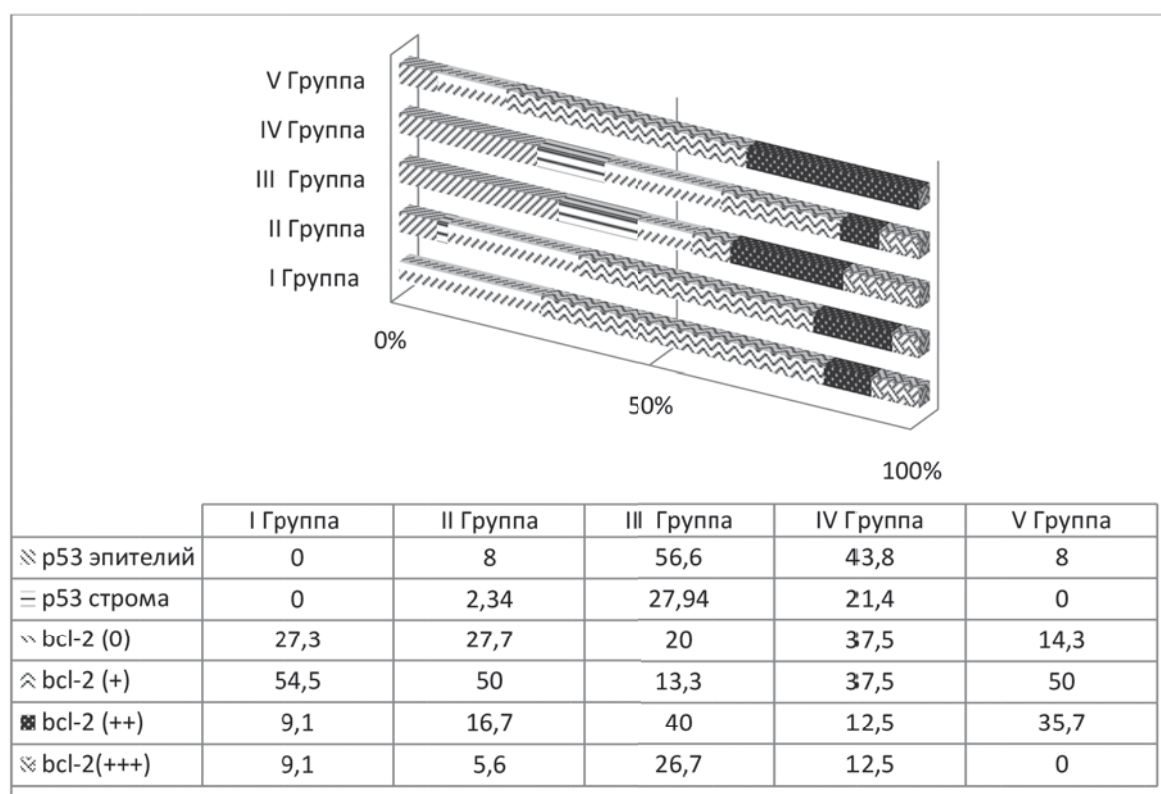


Рис.1. Уровень експресії білків p53 і bcl-2 в ендометриальних клітках (%)

Препарати с комплексной атипическою гіперплазією характеризувались експресією протеїна bcl-2 тільки в епітелії желез, в стромальних клітках данний показателі нами практично не наблюдався. У 26,7% експресія данного білка була сильная (+++), у 40,0% - умеренная (++) , у 13,3% - слабая (+). І в 20,0% жінок данної групи експресію протеїна виявити не удалось - (0).

У жінок IV групи протеїн bcl-2 не був обнаружен у 37,5% випадків (0), і в такому же количестві он був виявлен со слабой інтенсивністю окраски (+), в 12,5% - умеренная (++) , і в аналогічному количестві констатовано сильное окрашування (+++) білка.

В результаті аналізу отриманих результатів можна предположити, що експресія білка bcl-2 в ткани ендометрія змінюється як в залежності, так і от степені прогрессирования патологічного процесу. Змієння в експресії протеїна починають прослеживаться уже при комплексной гіперплазії без атипії, самі значиміє при атипическою комплексной гіперплазії і несколько ниже при аденокарциномі с прогрессированием

увеличения интенсивности окрашивания, что позволяет предположить существенное ослабление механизмов апоптоза при атипической комплексной гиперплазии.

Таблица 1

Экспрессия ER, PR в эндометриальной ткани (M±m)

| Группы       |   | I группа (n=11) | II группа (n=18) | III группа (n=15) | IV группа (n=8) | V группа (n=15) |
|--------------|---|-----------------|------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| ER (H-score) | Э | 215,01±8,33     | 243,26±7,85      | 263,05±9,34       | 185,51±7,03     | 269,02±13,21    |
|              | С | 165,33±9,01     | 174,85±8,37      | 210,47±6,34       | 149,64±4,31     | 213,10±7,35     |
| PR (H-score) | Э | 269,03±4,08     | 239,65±5,69      | 221,65±6,83       | 217,91±7,01     | 291,18±9,12     |
|              | С | 254,28±6,03     | 244,53±5,56      | 219,57±7,43       | 179,31±6,81     | 275,04±8,37     |

Анализ рецепторного статуса нормального, гиперплазированого и неоплазированого эндометрия показывает, что наибольший уровень экспрессии ER отмечался при атипической гиперплазии эндометрия, как простой так и комплексной: в эпителиальных клетках – 259,41±5,41 и 263,05±9,34 соответственно; в стромальных – 208,31±7,69 и 210,47±6,34. Самая низкая экспрессия ER была выявлена при АК, что составило в эпителии 185,51±7,03 и 149,64±4,31 в строме. Более выраженная экспрессия ER наблюдалась в эпителиальных клетках чем в стромальных не зависимо от формы ГЭ. Уровень экспрессии PR наиболее высокий был отмечен при ПГ (269,03±4,08 и 254,28±6,03 в эпителиальных и стромальных клетках соответственно), несколько ниже при КГ (239,65±5,69 и 244,53±5,56), значительно ниже при атипической как простой так и комплексной, что в эпителиальных клетках составило 234,43±9,81 и 221,65±6,83, а в стромальных – 225,43±6,45 и 219,57±7,43 соответственно и самый низкий при АК – 217,91±7,01 и 179,31±6,81. При ПГ, КГ, ПКА, КГА сохранялась преобладание выраженности рецепторного аппарата в эпителиальных клетках по сравнению со стромальными, в отличии от малигнизированого эндометрия, где данное распределение было произведено условно.

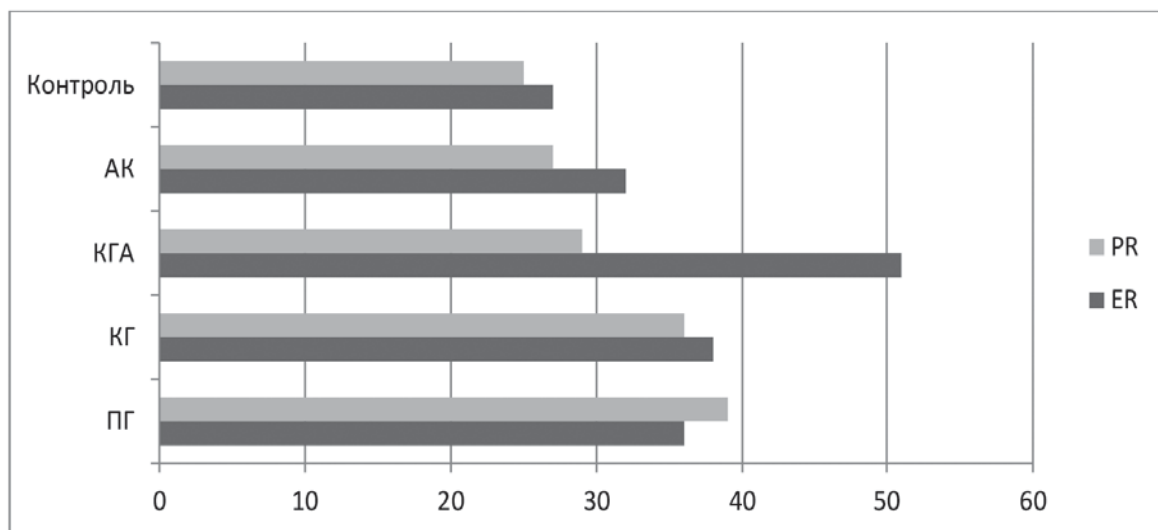


Рис.2. Экспрессия ER и PR в эпителиальных клетках эндометрия (%)

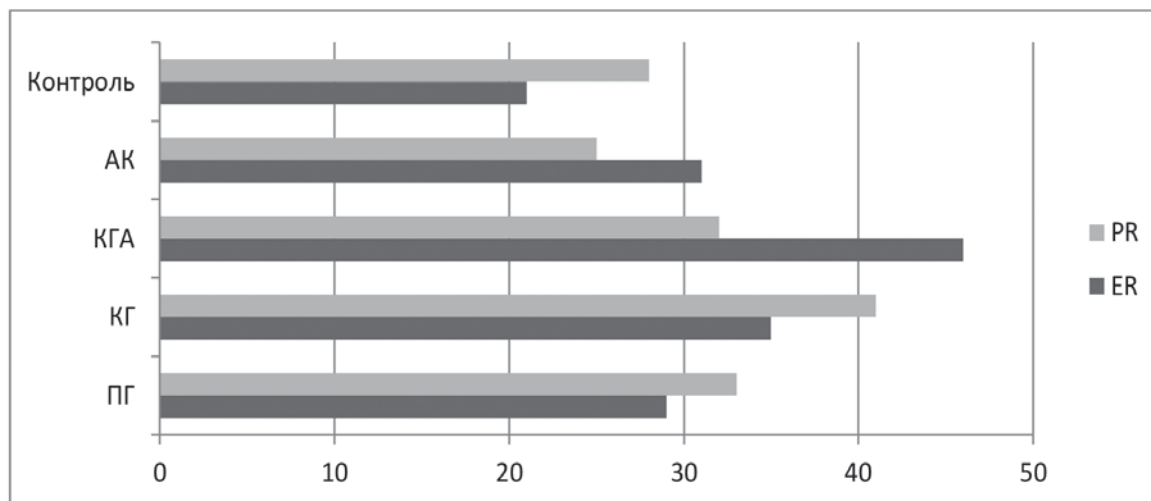


Рис. 3. Експресія ER і PR в стромальних клітках ендометрія (%)

Розподіл ER і PR в клітках ендометрія в процентному відношенні (рис. 2-3) представляє стан рецепторного апарату слизової і може характеризувати функціональну активність кожного виду рецепторів по відношенню до стану гормонального балансу.

### Висновки

При комплексній неатипичній гіперплазії в ендометриальних клітках спостерігається поява білка p53 і імуногістохімічно проявляючогося слабкої окраскою протеїна bcl-2, що підтверджує початкові порушення процесів запрограммованої клітинної смерті. При комплексній гіперплазії з атипією в клітках ендометрія виявляється значуще збільшення білка p53 з значущим посиленням інтенсивності окраски білка bcl-2. Дані свідчать про перевагу в ендометрії інгібіції процесів апоптозу, що нами розцінюється як пусковий механізм у розвитку клітинної атипії. При вивченні рецепторного статусу слід полагати, що естрогени в умовах переваги власних рецепторів над рецепторами прогестерону викликають неконтрольоване проліферативне діє.

Таким чином, визначення маркерів, що характеризують порушення процесу запрограммованої смерті p53 і bcl-2 та рецепторного статусу можливо враховувати для перспективи терапевтичного впливу і як предиктори онкологічного прогнозу при гіперпластичних процесах ендометрія.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Унанян А.Л. Прогнозування раку тіла матки у жінок з гіперпластичними процесами ендометрія в перименопаузальному віці / А.Л.Унанян, І.С.Сидорова, Е.А.Коган // Акушерство, гінекологія і репродукція. - 2012. - №2. - С.18-24.
2. Фролова І.І. Фактори ризику раку ендометрія / І.І.Фролова // Вопросы гінекології, акушерства і перинатології. - 2010. - Т.9, №1. - С.57-66.
3. Чумаков П.М. Білок p53 і його універсальні функції в багатоклітинному організмі / П.М.Чумаков // Успехи біологічної хімії. - 2007. - Т.47. - С.3-52.
4. Immunohistochemical analysis of steroid receptors, proliferation markers, apoptosid related molecules, and gelatinases in non-neoplastic and neoplastic endometrium. / С.Аmalinei, С.Сianga, R.Balan et al. // Ann. Anat. - 2011; 193(1): 43-45.

5. Preoperative evaluation of P53 and bcl-2 over expression in clinical stage 1 endometrial carcinoma and their correlation with surgico-pathological data and prognosis of patients/ A. F. Emad, A. H. Reda, I. A. Kamal et al. // Open Journal of Obstetrics and Gynecology.- 2011.- №1.- P.55-63.
6. Soussi T. p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. / T.Soussi, K.Dehouche, C.Beroud // Hum Mutat.- 2000.- V.15.- P.105-113.
7. The use of an immunocytochemical double-labeling staining can display the distribution of Bcl-2/Ki67 cells in endometrial adenocarcinomas as well as in normal endometrium/ A.Mourtzikou, K.Kosmas, A.Marouga et al. // Clin Lab.- 2012.- №58(1-2).- P.133-144.

## РЕЗЮМЕ

### ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ ПРИ ГІПЕРПЛАЗІЇ І НЕОПЛАЗИИ ЕНДОМЕТРІЯ

ЧУМАК З.В., ЗЕЛІНСЬКИЙ А.А., ШАПОВАЛ Н.В., МАНАСОВА Г.С.

Одеський національний медичний університет  
Одеський міський центр з проблем клімактерію

*Проведено вивчення експресії білків p53, bcl-2 і ER, PR в ендометрії 57 жінок з гіперпластичними процесами і аденокарциномою і у 14 - з двофазним менструальним циклом. Виявлено збільшені рівні протеїнів p53, bcl-2 при комплексній гіперплазії ендометрія з атипією, з установленим високим рівнем ER, що свідчить про переважання порушення процесів апоптозу на фоні підвищеної активності рецепторів естрогенів і можна розцінювати як пусковий фактор у розвитку клітинної атипії. Найвищий рівень PR був встановлений при простій гіперплазії без атипії. При неоплазії ендометрія було виявлено відносне зниження протеїнів p53, bcl-2, ER і PR, що вимагає подальших досліджень для інтерпретації результатів.*

**Ключові слова:** гіперплазія ендометрію, апоптоз, імуногістохімія, p53, bcl-2, ER, PR.

## SUMMARY

### DIAGNOSTIC VALUE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS IN HYPERPLASIA AND NEOPLASIA ENDOMETRIAL

CHUMAK Z.V., ZELINSKY O.O., SHAPOVAL M.V., MANASOVA G.S.

Odessa National Medical University  
Odessa siti Centr of Climacterical Problems

*The study of p53, bcl-2 and ER, PR in 57 women with endometrial hyperplasia and adenocarcinoma, and 14 - biphasic menstrual cycle. Showed increased levels of proteins p53, bcl-2 in complex endometrial hyperplasia with atypia, with a high level ER, suggesting the predominance of disturbances of apoptosis amid increased estrogen receptor activity and can be regarded as a trigger factor in the development of cellular atypia. The highest level of PR was established with a simple hyperplasia without atypia. When endometrial neoplasia was found a relative reduction of protein p53, bcl-2, ER and PR, which requires further study to interpret the results.*

**Key words:** endometrial hyperplasia, apoptosis, immunohistochemistry, p53, bcl-2, ER, PR.