

УДК 618.145-007.61-097.1

ВІЗІР К.П.<sup>1</sup>, ДУБІНІНА В.Г.<sup>2</sup>, НОСЕНКО О.М.<sup>1</sup>, КОШИК О.О.<sup>3</sup>

Одеський національний медичний університет,

<sup>1</sup>кафедра акушерства та гінекології № 1,

<sup>2</sup>кафедра онкології з курсом променевої діагностики,  
терапії та радіаційної медицини, м. Одеса;

<sup>3</sup>Патоморфологічна лабораторія «CSD Health Care», м. Київ

## ВИРАЖЕНІСТЬ ПРОЛІФЕРАЦІЇ В СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ МАТКИ У ПАЦІЄНТОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВІКУ З НЕАТИПОВОЮ ГІПЕРПЛАЗІЄЮ ЕНДОМЕТРІЯ

*Молекулярну основу патогенезу гіперпластичних процесів ендометрія становить клітинна проліферація та інші біологічні процеси, які зумовлюють перехід нормальних клітин ендометрія в трансформовані. В літературі чітко простежується суперечливість існуючих нині даних про рівень експресії маркеру Ki-67 у гіперплазованому ендометрії.*

*Метою дослідження стало імуногістохімічне визначення експресії Ki-67 в слизовій оболонці матки у пацієнток репродуктивного віку з неатиповою гіперплазією ендометрія.*

*Матеріал та методи. Проведено вивчення морфофункціонального стану ендометрія 120 пацієнток репродуктивного віку з неатиповою гіперплазією ендометрія і 30 умовно соматично та гінекологічно здорових фертильних пацієнток контрольної групи. Імуногістохімічне дослідження експресії Ki-67 проводили за допомогою мишачих моноклональних антитіл до Ki-67 (клон MIB-1, код F7268, DAKO, Данія).*

*Результати дослідження. В нормальному ендометрії фази проліферації вміст Ki-67 у стромі становив  $180,88 \pm 8,60$  %, в залозах –  $592,78 \pm 12,02$  %. Експресія Ki-67 була найвищою в зразках тканини з комплексною неатиповою гіперплазією ендометрія, при якій вміст Ki-67 у стромі становив  $290,12 \pm 2,53$  %, в залозах –  $862,43 \pm 2,67$  %. Рівень проліферативної активності в стромі ( $287,46 \pm 2,36$  %) при простій неатиповій гіперплазії ендометрія виявився вищим в 1,59 ( $p < 0,01$ ), в залозах ( $834,51 \pm 2,83$  %) – в 1,41 рази ( $p < 0,01$ ), ніж у нормальному ендометрії фази проліферації, але значуще не відрізнявся від такого в стромі і залозах ендометрія з комплексною гіперплазією*

*Висновки. Розвиток гіперпластичних процесів ендометрія відбувається на фоні підвищення нефізіологічної проліферативної активності клітин з переважанням експресії Ki-67 в залозистому епітелії, в деяких випадках інтенсивна експресія Ki-67 реєструється як в залозистому, так і стромальному компартменті ендометрія. В більшості спостережень експресія Ki-67 носить мозаїчний і нерівномірний характер в окремих залозах, ділянках і компартментах ендометрія.*

**Ключові слова:** неатипова гіперплазія ендометрія, проліферація, імуногістохімія, Ki-67.

Молекулярну основу патогенезу гіперпластичних процесів ендометрія становить клітинна проліферація та інші біологічні процеси, які зумовлюють перехід нормальних клітин ендометрія в трансформовані [1-2].

У процесі проліферації грають роль генетичні і епігенетичні чинники, запалення, різні поліпептидні ростові фактори, онкобілки та ін. Найбільш відомим фактором є антиген Ki-67. Фізіологічна роль цього антигену в житті клітини до сих пір залишається достеменно невідомою, проте внаслідок того, що він експресується практично у всіх фазах мітотично-

го циклу і, відповідно, відображає показник проліферативного пулу, цей білок використовується зараз в якості універсального маркеру проліферації [3].

Протягом нормального менструального циклу рівень експресії Ki-67 у слизовій оболонці матки змінюється відповідним чином: зростає в фазу проліферації та знижується в фазу секреції [4]. У 2014 р. Gurda et al. у своєму дослідженні прийшли до висновку, що індекс Ki-67 є дуже чутливим та специфічним (>90 %) маркером для проведення диференційної діагностики між секреторним ендоме-

трієм, неатиповою гіперплазією ендометрія, атиповою гіперплазією ендометрія та раком ендометрія. Показник цього маркера зростає від 2,6 % при секреторному ендометрії до 17 % при неатиповій гіперплазії та до 36 та 60 % при атиповій гіперплазії та аденокарциномі відповідно [5]. За іншими даними, показники маркера проліферації Ki-67 при простій гіперплазії ендометрія виявилися нижчими, ніж у жінок контрольної групи, як в клітинах епітелію, так і в стромі [6]. За результатами роботи C.R. Shevra et al. (2015), у пацієнок з карциномою ендометрія рівень Ki-67 виявився вищим порівняно з пацієнтками з простою неатиповою гіперплазією ендометрія, проте не було значної різниці між величиною показника при атиповій гіперплазії та раці ендометрія [7]. Тож з наведених джерел чітко простежується суперечливість існуючих нині даних про рівень експресії маркера Ki-67 у гіперплазованому ендометрії.

**МЕТОЮ** нашого дослідження стало визначення експресії Ki-67 в слизовій оболонці матки у пацієнок репродуктивного віку з неатиповою гіперплазією ендометрія.

## МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведено когортне проспективне клініко-лабораторно-інструментальне обстеження та імуногістохімічне дослідження морфофункціонального стану ендометрія 120 пацієнок репродуктивного віку з неатиповою гіперплазією ендометрія і 30 умовно соматично та гінекологічно здорових фертильних пацієнок контрольної групи К, які звернулися для консультування з приводу планування сім'ї для встановлення внутрішньоматкової системи з левоноргестрелом в Університетській клініці «Центр відновної та реконструктивної медицини» Одеського національного медичного університету.

Пацієнткам з неатиповою гіперплазією ендометрія виконували рідинну гістероскопію з роздільним діагностичним вишкрібанням слизової цервікального каналу та порожнини матки з використанням жорсткого гістероскопу фірми «Karl Storz» (Німеччина) під внутрішньовенним знеболенням. Пацієнткам контрольної групи проводилася пайпель-біопсія ендометрія з метою виключення його патології. Дослідження ендометрія усім жінкам проводилася в проліферативну фазу циклу.

Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження експресії Ki-67 проводили на депарафінізованих та дегідратованих зрізах відповідно рекомендацій фірми-виробника антитіл. Після блокування неспецифічного зв'язування білків протеїновим блоком (Diagnostic Biosystems, США), наносили первинні мишачі моноклональні антитіла (МАТ) до Ki-67 (клон МІВ-1, код F7268, ДАКО, Данія). Візуалізацію первинних антитіл проводили за допомогою системи детекції ДАКО EnVision FLEX+ (Dako, Данія). В якості позитивного контролю на кожне скло додавали зріз тканини мигдалини. На зрізи, які використовувалися для негативного контролю, замість первинних антитіл наносили буфер для розведення антитіл (Dako, Данія).

Вивчення препаратів у похідному світлі проводили на мікроскопі Olympus CX41 (Японія) з цифровою відеокамерою Olympus DP50, з'єднаною з персональним комп'ютером. Морфометричне вивчення препаратів виконане з використанням програми: Roduit, N.JMicrVision: Image analysis toolbox for measuring and quantifying components of high-definition images. Version 1.2.7. у відповідності з рекомендаціями виробника програмного забезпечення. Для визначення експресії маркерів Ki-67 визначали ядерну реакцію у клітинах епітелію залоз, окремо – у клітинах стромі. Оцінку реакції з МАТ до Ki-67 проводили кількісним методом з урахуванням кількості антиген-позитивних клітин на 1 000 епітеліальних клітин, у трьох репрезентативних полях зору при збільшенні мікроскопу Ч400.

Статистичну обробку отриманих даних проводили на індивідуальному комп'ютері з використанням програм Microsoft Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що рівень експресії Ki-67 зростає у ряду: незмінений ендометрій фази проліферації, проста неатипова гіперплазія ендометрія, комплексна неатипова гіперплазія ендометрія, як в стромі, так і у залозах (табл.). Найнижчим виявився рівень експресії Ki-67 в нормальному ендометрії. Вміст Ki-67 при гіперплазії ендометрія був достовірно вищим у порівнянні з незмінним ендометрієм фази проліферації як при простій, так і при комплексній гіперплазії.

Таблиця 1

Експресія Ki-67 при різних морфофункціональних станах ендометрія, %

Компартмент ендометрія	Ендометрій фази проліферації, n=30	Проста гіперплазія ендометрія без атипії, n=71	Комплексна гіперплазія ендометрія без атипії, n=30
Строма	180,88±8,60	287,46±2,36 <sup>к</sup>	290,12±2,53 <sup>к</sup>
Залози	592,78±12,02 <sup>*</sup>	834,51±2,83 <sup>*,к</sup>	862,43±2,67 <sup>*,к</sup>

Примітки: 1. \* – статистично значуща різниця експресії в залозах порівняно зі стромою; 2. к – статистично значуща різниця експресії порівняно з ендометрієм фази проліферації.

В нормальному ендометрії фази проліферації вміст Ki-67 у стромі становив 180,88±8,60 %, в залозах – 592,78±12,02 %. Експресія Ki-67 була найвищою в зразках тканини з комплексною неатиповою гіперплазією ендометрія, при якій вміст Ki-67 у стромі становив 290,12±2,53 %, в залозах – 862,43±2,67 %. Рівень проліфератив-

ної активності в стромі (287,46±2,36 %) при простій неатиповій гіперплазії ендометрія виявився вищим в 1,59 (p<0,01), в залозах (834,51±2,83 %) – в 1,41 рази (p<0,01), ніж у нормальному ендометрії фази проліферації, але значуще не відрізнявся від такого в стромі і залозах ендометрія з комплексною гіперплазією (рис. 1).

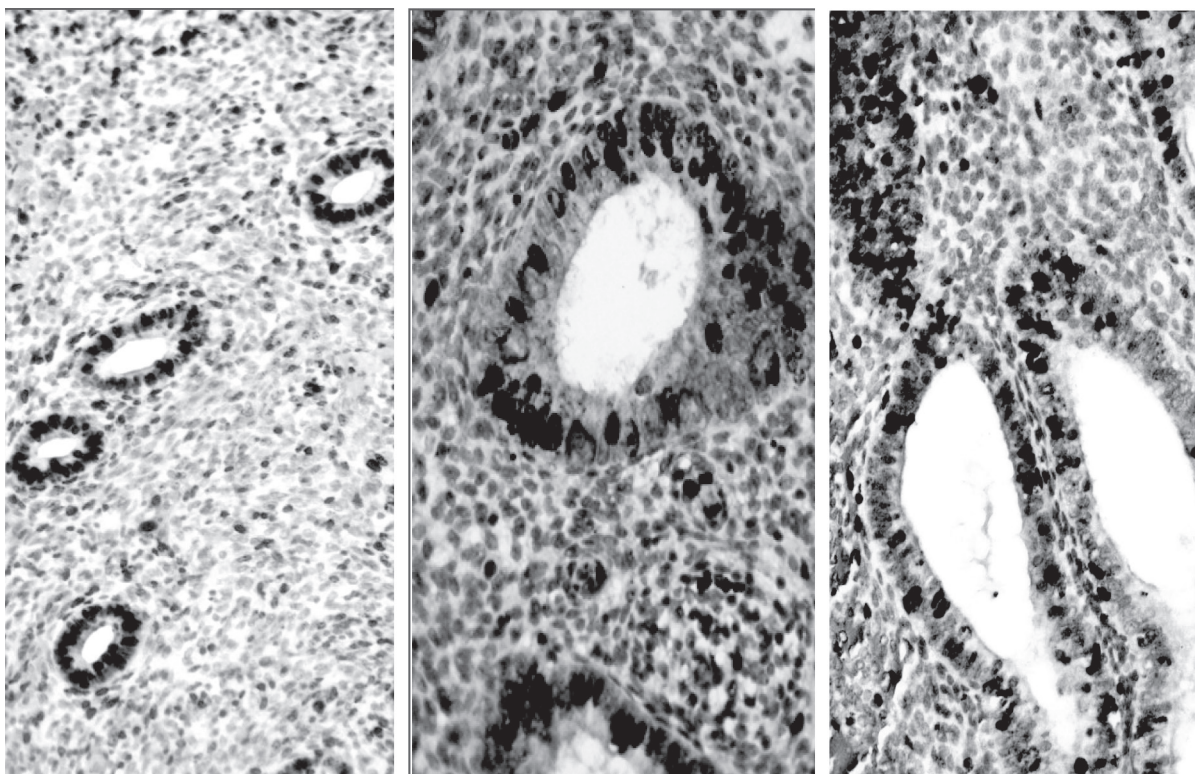


Рис. 1 Експресія Ki-67 в нормальному ендометрії фази проліферації (ліворуч), при простій (усередині) і комплексній неатиповій гіперплазії ендометрія (праворуч). ІГХ з МАТ до Ki-67. Ч 100.

Характерною рисою при гіперплазії була нерівномірна інтенсивність імунозabarвлення Ki-67 як в епітелії залоз, так і в клітинах стромы з більш інтенсивною експресією в епітелії залоз, ніж в клітинах стромы (рис. 2).

Слід відмітити, що імунозabarвлення Ki-67 у різних осіб в гіперплазованому ендометрії варіювало від слабкого до помірного та інтенсивного (рис. 3). Переважали випадки з помірним та інтенсивним імунозabarвленням. У пацієнток з простою неатиповою гіперплазією ендометрія

під час аналізу отриманих даних висока активність експресії Ki-67 була виявлена у 41 (57,74 %) випадку, помірна – у 26 (36,6%) і слабка – лише у 4 (5,6%). У жінок з комплексною гіперплазією ендометрія без атипії також переважали випадки з високим рівнем експресії Ki-67 – 37 (75,5 %) осіб, у 10 (20,4 %) пацієнток була помірна експресія й лише у 2 (4,08 %) реєструвалася слабка. У однієї й тієї ж особи могли реєструватися ділянки як слабкої, так помірної і вираженої експресії Ki-67.

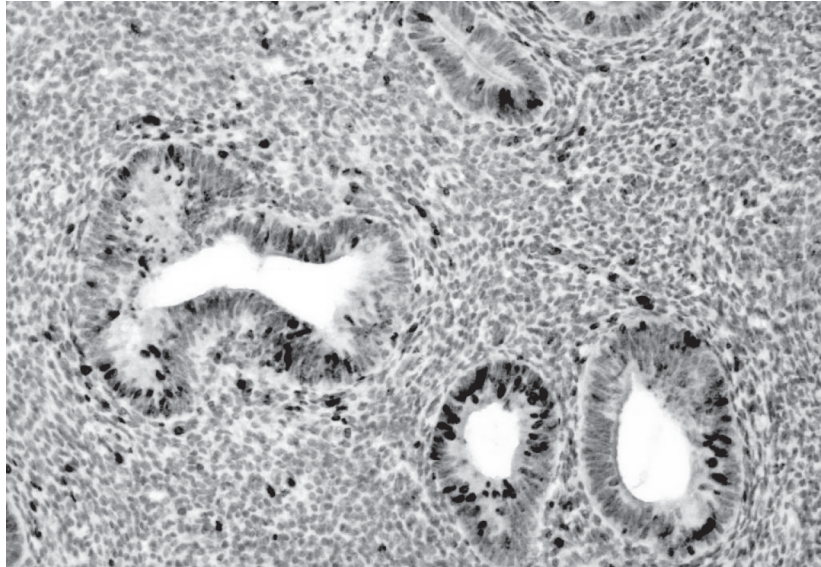


Рис. 2 Нерівномірна інтенсивність імунозabarвлення гіперплазованого ендометрія МАТ до Ki-67 як в епітелії залоз, так і в клітинах стромі з більш інтенсивною експресією в епітелії залоз, ніж в клітинах стромі. ІГХ з МАТ до Ki-67. Ч 100.

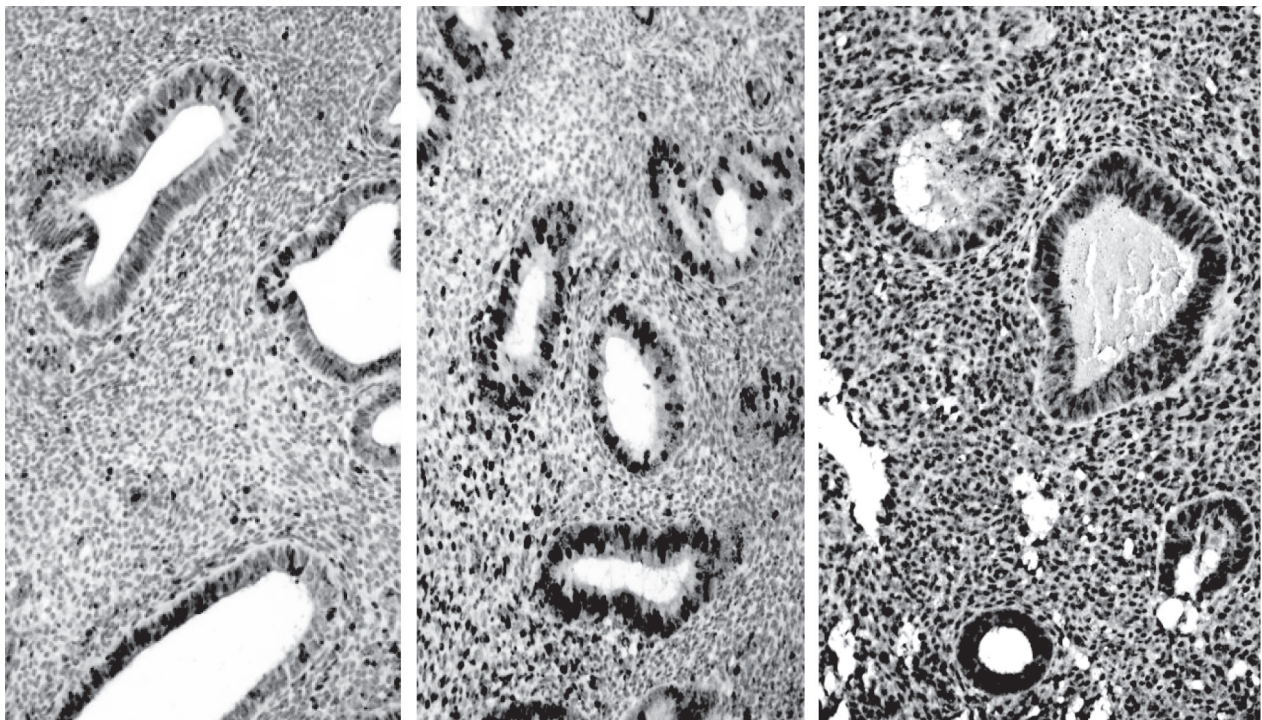


Рис. 3 Слабка (ліворуч), помірна (посередині) та виражена (праворуч) експресія Ki-67 в гіперплазованому ендометрії. ІГХ з МАТ до Ki-67. Ч 100.

Таким чином наше дослідження підтвердило підвищення активності проліферації при гіперплазії ендометрія на підставі вивчення експресії Ki-67, який є найбільш вивченим і, можливо, перспективним. Ген MKI67, що кодує ядерний білок Ki-67, розглядають як «золотий стандарт» оцінки проліферативної активності клітини. Він відображає кількість мітотично активних клітин, так як експресується у всіх фазах клітинного циклу (G1, S, G2, M), крім G0.

Експресія Ki-67 починається в кінці G1 фази клітинного циклу і досягає максимуму в його мітотичну фазу, тобто інтенсивність ядерного фарбування може бути вельми варіабельною. Білок Ki-67 в основному пов'язаний з хромосомами, виявляється в області теломер, центромер, в ядерцях. Для оцінки проліферативної активності клітин ендометрія найчастіше використовують саме маркер Ki-67, незважаючи на те, що справжня роль цього білка в регуляції

клітинного циклу до кінця не ясна. У зв'язку з цим не виключена можливість виявлення хибно-позитивних оцінок експресії Ki-67. Крім того, імунореактивність Ki-67 багато в чому залежить від давності фіксації зразків, умов їх зберігання і методів демаскування антигену [8].

Суперечливі дані літератури про інтенсивність проліферативних реакцій в залозистих епітеліоцитах при різних варіантах гіперплазій можуть пояснюватися вихідними індивідуальними відмінностями в групах спостережень і різними методичними підходами до оцінки даного параметра. Деякі автори вивчають не індекс мічення, а інтенсивність забарвлення клітин з обчисленням коефіцієнта експресії на основі напівкількісного морфометричного методу [8]. Слід зазначити, що для такого підходу необхідна висока стандартизація мікротомування і фарбування зрізів при проведенні ІГХ аналізу, а також використання фотоденситометричних приладів для об'єктивної оцінки інтенсивності фарбування. Напівкількісний метод визначення інтенсивності фарбування тих чи інших структур завжди носить виражений суб'єктивний характер.

#### ВИСНОВКИ

При гіперплазії ендометрія простежується чітка тенденція до посилення проліферативної активності у міру наростання структурних змін у слизовій оболонці, тобто розвиток гіперпластичних процесів ендометрія відбувається на фоні підвищення нефізіологічної проліферативної активності клітин з переважанням експресії Ki-67 в залозистому епітелії, в деяких випадках інтенсивна експресія Ki-67 реєструється як в залозистому, так і стромальному компартменті ендометрія. В більшості спостережень експресія Ki-67 носить мозаїчний і нерівномірний характер в окремих залозах, ділянках і компартментах ендометрія.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ordi J, Bergeron C, Hardisson D. Reproducibility of current classifications of endometrial endometrioid glandular proliferations: further evidence supporting a simplified classification. *Histopathology*. 2014. 64(2):284-92.
2. Демакова Н.А., Алтухова О.Б., Пахомов С.П., Орлова В.С. Молекулярно-генетические механизмы развития гиперпластических процессов эндометрия. *Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация*. 2014. 4 (175);25:177-182.
3. Чернышова А.Л., Коломиец Л.А., Бочкарева Н.В. Иммуногистохимические критерии прогноза при

раке эндометрия. *Сибирское медицинское обозрение*. 2010. 37:79-84.

4. Elhafey A.S, Papadimitriou J C, El-Hakim M S, et al. Computerized image analysis of p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in benign, hyperplastic, and malignant endometrium. *Arch Pathol Lab Med*. 2001. 125 (7): 872-879.
5. Gurda G T, Baras A S, Kurman R J. Ki-67 index as an ancillary tool in the differential diagnosis of proliferative endometrial lesions with secretory change. *Int J Gynecol Pathol*. 2014. 33 (2):. 114-119.
6. Чумак З. В., Зелинский А. А., Шаповал Н. В., Истерин Н. С. Оценка гормонально-рецепторного статуса и пролиферативной активности гиперплазированного эндометрия. *Одеський медичний журнал*. 2014. 2 (142): 66-70.
7. Shevra CR, Ghosh A, Kumar M. Cyclin D1 and Ki-67 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *J Postgrad Med*. 2015. 61:15-20.
8. Махина Е.В., Пичигина А.К., Колдышева Е.В., Молодых О.П., Лушникова Е.Л. Диагностическая и прогностическая значимость оценки пролиферативной активности клеточных популяций эндометрия при гиперпластических и неопластических процессах. *Фундаментальные исследования*. 2014. 10-2: 420-427.

#### РЕЗЮМЕ

#### ВЫРАЖЕННОСТЬ ПРОЛИФЕРАЦИИ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ МАТКИ У ПАЦИЕНТОК С НЕАТИПИЧЕСКОЙ ГИПЕРПЛАЗИЕЙ ЭНДОМЕТРИЯ

ВИЗИР Е.П., ДУБИНИНА В.Г., НОСЕНКО  
Е.Н., КОШИК Е.А.

Молекулярную основу патогенеза гиперпластических процессов эндометрия составляет клеточная пролиферация и другие биологические процессы, которые обуславливают переход нормальных клеток эндометрия в трансформированные. В литературе четко прослеживается противоречивость существующих в настоящее время данных об уровне экспрессии маркера Ki-67 в гиперплазированном эндометрии.

**Целью исследования** стало иммуногистохимическое определение экспрессии Ki-67 в слизистой оболочке матки у пациенток репродуктивного возраста с неатипической гиперплазией эндометрия.

**Материал и методы.** Проведено изучение морфофункционального состояния эндометрия 120 пациенток репродуктивного возраста с неатипической гиперплазией эндометрия и 30 ус-

ловно соматически и гинекологически здоровых фертильных пациенток контрольной группы. Иммуногистохимическое исследование экспрессии Ki-67 проводили с помощью мышиных моноклональных антител к Ki-67 (клон MIB-1, код F7268, DAKO, Дания).

**Результаты исследования.** В нормальном эндометрии фазы пролиферации содержание Ki-67 в строме составило  $180,88 \pm 8,60 \%$ , в железах -  $592,78 \pm 12,02 \%$ . Экспрессия Ki-67 была самой высокой в образцах ткани с комплексной неатипической гиперплазией эндометрия, при которой содержание Ki-67 в строме было  $290,12 \pm 2,53 \%$ , в железах -  $862,43 \pm 2,67 \%$ . Уровень пролиферативной активности в строме ( $287,46 \pm 2,36 \%$ ) при простой неатипической гиперплазии эндометрия оказался выше в 1,59 ( $p < 0,01$ ), в железах ( $834,51 \pm 2,83 \%$ ) - в 1,41 раза ( $p < 0,01$ ), чем в нормальном эндометрии фазы пролиферации, но значимо не отличался от такового в строме и железах эндометрия с комплексной гиперплазией

**Выводы.** Развитие гиперпластических процессов эндометрия происходит на фоне повышения нефизиологической пролиферативной активности клеток с преобладанием экспрессии Ki-67 в железистом эпителии, в некоторых случаях интенсивная экспрессия Ki-67 регистрируется как в железистом, так и стромальных компартаментах эндометрия. В большинстве наблюдений экспрессия Ki-67 носит мозаичный и неравномерный характер в отдельных железах, участках и компартаментах эндометрия.

**Ключевые слова:** неатипическая гиперплазия эндометрия, пролиферация, иммуногистохимия, Ki-67.

## SUMMARY

### EXPRESSIVENESS OF PROLIFERATION IN THE MUCOSA UTERI IN PATIENTS WITH NONATYPICAL ENDOMETRIAL HYPERPLASIA

VIZIR KP, DUBININA VG, NOSENKO OM,  
KOSHIK O.O.

Molecular basis of the pathogenesis of hyperplastic processes of the endometrium is cell proliferation and other biological processes

that cause the transition of normal endometrial cells to transformed ones. In the literature, the inconsistency of the currently existing data on the level of expression of the Ki-67 marker in hyperplastic endometrium is clearly discernible.

**The aim of the study** was the immunohistochemical determination of the expression of Ki-67 in the lining of the uterus in the reproductive age women with nonatypical endometrial hyperplasia.

**Material and methods.** The study of the morphofunctional state of the endometrium of 120 patients of reproductive age with non-atypical endometrial hyperplasia and 30 conditionally somatic and gynecologically healthy fertile patients in the control group was performed. The immunohistochemical study of Ki-67 expression was performed using murine monoclonal antibodies to Ki-67 (MIB-1 clone, F7268, DAKO, Denmark).

**Results of the study.** In the normal endometrium of the proliferation phase, the content of Ki-67 in the stroma was  $180.88 \pm 8.60 \%$ , in the glands -  $592.78 \pm 12.02 \%$ . The expression of Ki-67 was the highest in tissue samples with complex non-atypical endometrial hyperplasia, in which the Ki-67 content in the stroma was  $290.12 \pm 2.53 \%$ , in the glands -  $862.43 \pm 2.67 \%$ . The level of proliferative activity in the stroma ( $287.46 \pm 2.36 \%$ ) with simple non-atypical endometrial hyperplasia was higher in 1.59 ( $p < 0.01$ ), in glands ( $834.51 \pm 2.83 \%$ ) - in 1, 41 times ( $p < 0.01$ ) than in the normal endometrium of the proliferation phase, but did not significantly differ from that in the stroma and endometrial glands with complex hyperplasia

**Conclusions.** The development of hyperplastic endometrial processes occurs against the background of an increase in the non-physiological proliferative activity of cells with a predominance of Ki-67 expression in the glandular epithelium; in some cases, intensive expression of Ki-67 is recorded in both glandular and stromal compartments of the endometrium. In the majority of cases the expression of Ki-67 is a mosaic, and uneven in some glands areas and compartments of the endometrium.

**Keywords:** nonatypical endometrial hyperplasia, proliferation, immunohistochemistry, Ki-67.