

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 атии. Самый высокий уровень PR был установлен при простой гиперплазии без атии. При неоплазии эндометрия было выявлено относительное снижение протеинов p53, bcl-2, ER и PR, что требует дальнейших изучений 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 клиничко-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 (DAKO- Германия), к рецепторам эстрогена (Moa-Hu Estrogen Receptor), рецепторам прогестерона (Moa-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 атипическими процессами в эндометрии, четвертую группу – 8 женщин с аденокарциномой. В группу контроля (пятая группа) включены 14 женщин с морфологически неизмененным 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 атипической гиперплазии. Простая гиперплазия эндометрия (I группа), как и неизмененный 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 белка не було виявлено (0), в 1 - інтенсивність окрашивания була умеренная (++) і в 5 (62,5%) - слабая (+), що можна расценивать як свідчення підвищення процесів апоптозу в секреторну фазу. Данні показателі суммарно по V групі склали: в 14,3% випадку відсутність експресії белка bcl-2 (0), в 50,0% - слабое окрашивание (+), в 35,7% - умеренное окрашивание (++) , 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 максимальної окраскою (+++) і виявлялась, в основному, в епітелії заліз. В стромальних клітках даний показателі практично виявлен не був. У 9,1% жінок данної групи була виявлена умеренная інтенсивність окрашивания (++) в епітелії кліток ендометрія, у 54,5% констатовано слабое окрашивание (+), і у 27,3% - відсутність окрашивания. При дослідженні ендометрія во II групі була виявлена наступна картина: у 5,6% - сильне окрашивание (+++), в 16,7% - умеренное (++) , в 50,0% слабое (+), і відсутність окраски (0) - в 27,7±2,34%.

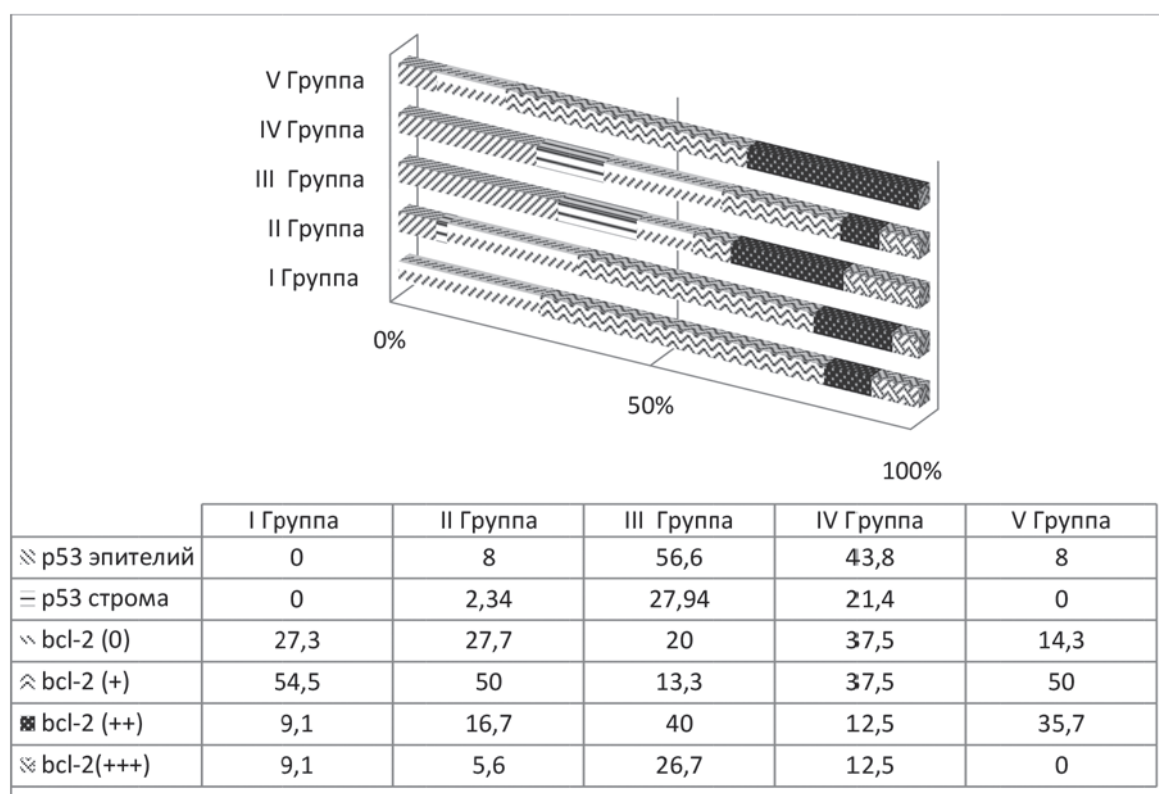


Рис.1. Уровень експресії белків p53 і bcl-2 в ендометриальних клітках (%)

Препарати с комплексної атипическою гіперплазією характеризувались експресією протеїна bcl-2 тільки в епітелії заліз, в стромальних клітках даний показателі нами практично не спостерігався. У 26,7% експресія данного белка була сильна (+++), 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 виявлений у 37,5% випадків (0), і в такому ж кількості він був виявлений со слабой інтенсивністю окраски (+), в 12,5% - умеренная (++) , і в аналогічному кількості констатовано сильне окрашивание (+++) белка.

В результаті аналізу отриманих результатів можна передположити, що експресія белка bcl-2 в ткани ендометрія змінюється як в залежності, так і от ступені прогресування патологічного процесу. Змієніє в експресії протеїна починають прослідковуватися уже при комплексній гіперплазії без атипії, саміє значиміє при атипическою комплексній гіперплазії і нескількоє нижє при аденокарциномє с прогресуєнієм

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

Таблиця 1

Експресія ER, PR в ендометриальній ткани ( $M \pm m$ )

Групи		I група (n=11)	II група (n=18)	III група (n=15)	IV група (n=8)	V група (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 –  $259,41 \pm 5,41$  и  $263,05 \pm 9,34$  соответственно; в стромальных –  $208,31 \pm 7,69$  и  $210,47 \pm 6,34$ . Самая низкая экспрессия ER была выявлена при АК, что составило в эпителии  $185,51 \pm 7,03$  и  $149,64 \pm 4,31$  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 ( $269,03 \pm 4,08$  и  $254,28 \pm 6,03$  в эпителиальных и стромальных клетках соответственно), несколько ниже при КГ ( $239,65 \pm 5,69$  и  $244,53 \pm 5,56$ ), значительно ниже при атипической как простой так и комплексной, что в эпителиальных клетках составило  $234,43 \pm 9,81$  и  $221,65 \pm 6,83$ , а в стромальных –  $225,43 \pm 6,45$  и  $219,57 \pm 7,43$  соответственно и самый низкий при АК –  $217,91 \pm 7,01$  и  $179,31 \pm 6,81$ . При ПГ, КГ, ПКА, КГА сохранялась преобладание выраженности рецепторного аппарата в эпителиальных клетках по сравнению со стромальными, в отличии от малигнизированного эндометрия, где данное распределение было произведено условно.

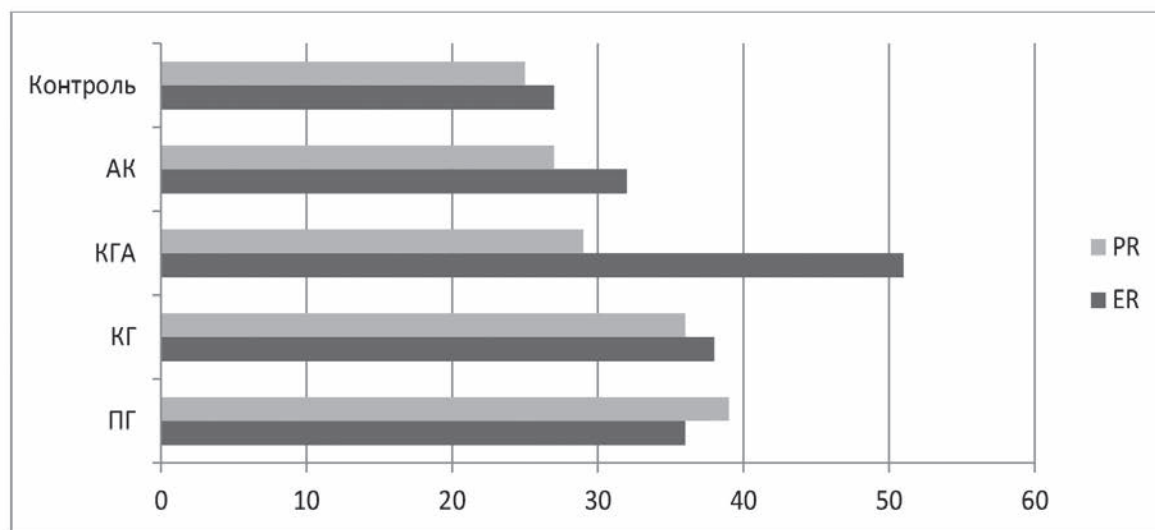


Рис.2. Експресія ER та PR в епітеліальних клітках ендометрія (%)

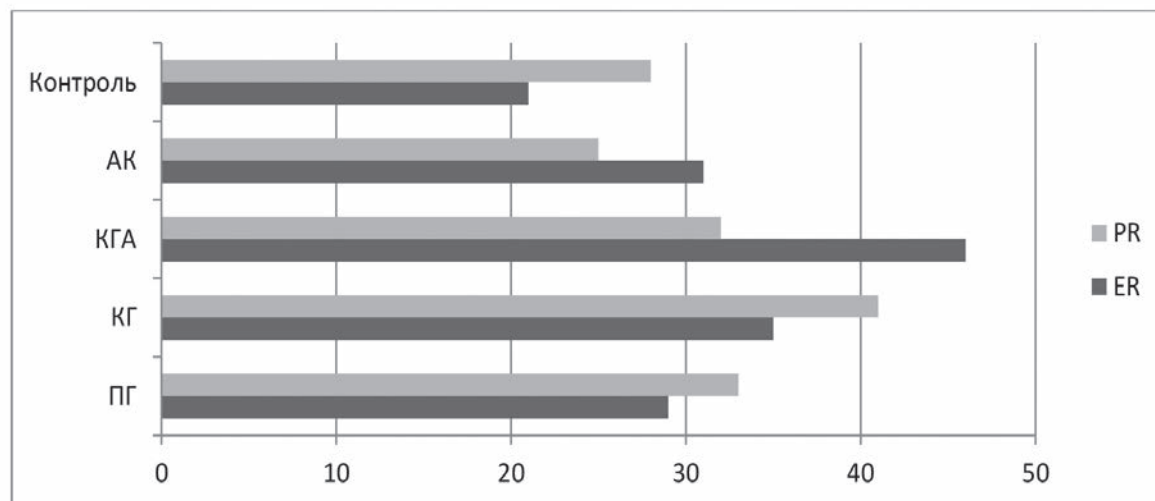


Рис. 3. Экспрессия ER и PR в стромальных клетках эндометрия (%)

Распределение ER и PR в клетках эндометрия в процентном отношении (рис.2-3) представляет состояние рецепторного аппарата слизистой и может характеризовать функциональную активность каждого вида рецепторов по отношению к состоянию гормонального баланса.

### Выводы

При комплексной неатипической гиперплазии в эндометриальных клетках наблюдается появление белка p53 и иммуногистохимически проявляющегося слабой окраской протеина bcl-2, что подтверждает начальные нарушения процессов запрограммированной клеточной гибели. При комплексной гиперплазии с атипией в клетках эндометрия обнаруживается значительное увеличение белка p53 со значительным усилением интенсивности окраски белка bcl-2. Данные свидетельствуют о преобладании в эндометрии ингибции процессов апоптоза, что нами расценивается как пусковой механизм в развитии клеточной атии. При изучении рецепторного статуса следует полагать, что эстрогены в условиях преобладания собственных рецепторов над рецепторами прогестерона оказывают неконтролируемое пролиферативное действие.

Таким образом, определение маркеров, характеризующих нарушение процесса запрограммированной гибели p53 и bcl-2 и рецепторного статуса возможно учитывать для перспективы терапевтического воздействия и как предикторы онкологического прогноза при гиперпластических процессах эндометрия.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Унанян А.Л. Прогнозирование рака тела матки у женщин с гиперпластическими процессами эндометрия в пременопаузальном возрасте / А.Л.Унанян, И.С.Сидорова, Е.А.Коган // Акушерство, гинекология и репродукция. - 2012. - №2. - С.18-24.
2. Фролова И.И. Факторы риска рака эндометрия / И.И.Фролова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.- 2010.- Т.9, №1. - С.57-66.
3. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме / П.М.Чумаков // Успехи биологической химии.- 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./ C.Amalinei, C.Cianga, 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 НЕОПЛАЗІИ 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 рівнів 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.