

Л.Г. Бучинська
О.О. Білик
Н.П. Юрченко
Л.І. Воробйова

Інститут експериментальної
патології, онкології
та радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України

Інститут онкології
АМН України, Київ, Україна

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ БІЛКІВ p53, p21^{WAF1/CIP1}, p16^{INK4a} ТА Ki-67 В ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИНАХ ХВОРИХ НА ЗАЛОЗЕВУ ТА АТИПОВУ ГІПЕРПЛАЗІЮ ЕНДОМЕТРІЯ

Ключові слова: ендометрій,
залозева гіперплазія, атипова
гіперплазія, Ki-67, p53,
p21^{WAF1/CIP1}, p16^{INK4a}.

Резюме. У матеріалі зскребків слизової оболонки матки та в операційному матеріалі хворих на залозеву та атипову гіперплазію ендометрія досліджено рівень експресії білків Ki-67, p53, p21^{WAF1/CIP1} та p16^{INK4a}. Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що клітини гіперплазованого ендометрія характеризуються високою проліферативною активністю, негативною експресією p53 і переважно негативною експресією p21^{WAF1/CIP1}. У той же час, встановлено гіперекспресію p16^{INK4a} у хворих на залозеву й атипову гіперплазію ендометрія. Показники рівня експресії p53, p21^{WAF1/CIP1}, p16^{INK4a} та Ki-67, у сукупності з морфологічними характеристиками, можуть бути використані як критерії визначення проліферативного потенціалу у гіперплазіях ендометрія.

ВСТУП

Загальновідомо, що своєчасне виявлення та лікування передпухлинних процесів важливе для попередження розвитку новоутворень, тобто є ключовим етапом вторинної профілактики раку [1]. На сьогодні багато положень щодо передпухлинних станів зазнають перегляду, доповнюються новими даними з урахуванням досягнень цитології, молекулярної біології, цитогенетики. Підтверджено, що розвиток пухлини відбувається як багатостадійний процес, де кожному етапу відповідають певні генетичні зміни клітин, які є відображенням особливостей різних гістологічних форм пухлин. Це зазвичай множинні зміни, які включають експресію кількох онкогенів та інактивацію двох або більше супресорних генів. Такі події є критичним кроком у трансформації нормальної клітини у злоякісну [2]. Все наведене вище стосується і новоутворень ендометрія, який є високооновлюваною тканиною і характеризується високим проліферативним потенціалом у нормі, що зумовлює складність морфологічної діагностики патологічних процесів слизової оболонки матки, особливо диференційної діагностики між атиповою гіперплазією та високодиференційованим раком [3]. Відомо, що гіперпластичні процеси представляють собою гетерогенну групу захворювань з різною потенцією до малігнізації. Так, тільки 2,0% гіперплазій без атипії зазнають малігнізації, і в той же час близько 25,0% атипових гіперплазій трансформуються у рак. Цю закономірність відзначають при типовій ендометріальній карциномі, але вона не є характерною для серозної карциноми [4]. Таким чином, безсумнівно важливою є оцінка моле-

кулярного профілю епітеліальних клітин при залозевій гіперплазії ендометрія та виділення процесів із високим проліферативним потенціалом, що є суттєвим фактором ризику малігнізації.

Важливу роль у регулюванні клітинного циклу і, відповідно проліферативної активності відіграють інгібітори циклін-залежних кіназ, зокрема, p21^{WAF1/CIP1} та p16^{INK4a}, вивченню яких при гіперплазії ендометрія присвячені поодинокі роботи [5, 6]. Проте, значення цих біомолекулярних маркерів для верифікації характеру патологічного процесу до цього часу залишається дискусійним. Наведене вище стало підґрунтям для комплексного вивчення ряду маркерів (p53, p21^{WAF1/CIP1}, p16^{INK4a} та Ki-67) при гіперпластичних процесах ендометрія.

Мета роботи — зіставлення проліферативного потенціалу гіперплазій з експресією білків пухлинних-супресорів p53, p21^{WAF1/CIP1} та p16^{INK4a} у епітеліальних клітинах хворих на залозеву й атипову гіперплазію ендометрія.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженні використані зскребки слизової оболонки порожнини матки та операційний матеріал від 41 пацієнтки, віком від 30 до 69 років, із дисфункціональними матковими кровотечами та кровотечами у період менопаузи. Операційний матеріал фіксували у 10,0% розчині нейтрального забуференого формаліну. Гістологічні зрізи товщиною 4–5 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином. При верифікації клінічного діагнозу у 25 хворих виявлено залозеву гіперплазію (ЗГЕ): у 9 — фаза проліферації менструального циклу, у 11 — фаза секретії, у 5 — менопаузальний період; у 11 випадках — атипову гіперплазію

ендометрія (АГЕ). Контролем були зразки слизової оболонки порожнини матки, отримані у 5 жінок віком 31–69 років із поліпами цервікального каналу, із гістологічно незмінним ендометрієм, який відповідає фазі секреції менструального циклу. Усі пацієнтки знаходились на лікуванні у відділенні онкогінєкології Інституту онкології АМН України.

Імуногістохімічне виявлення р53, p21^{WAF1/CIP1}, p16^{INK4a} та маркера проліферації Ki-67 проводили на депарафінованих зрізах товщиною 4–5 мкм, із попередньою демаскірувкою антигену у цитратному буфері (рН 6,0) у мікрохвильовій печі протягом 10 хв. Для візуалізації продуктів реакції застосовували систему EnVision. В якості первинних антитіл використовували МкАТ до p21^{WAF1/CIP1} WAF1/Cip1 (клон SX118), p53 (клон DO-7), p16^{INK4a} (клон DCS-50) та Ki-67 (клон MIB) фірми «DAKO Сytomation». Оцінку результатів імуногістохімічного забарвлення проводили за допомогою світлового мікроскопа (збільшення $\times 1250$, масляна імерсія). Результати імуногістохімічної реакції оцінювали напівкількісним методом, шляхом підрахунку відсотка позитивнозбарвлених клітин (індекс мітки — ІМ) із різною інтенсивністю, яку оцінювали візуально. У кожному випадку аналізували від 800 до 1000 епітеліальних клітин. Отримані дані оцінювали за такими параметрами: для p53 ІМ < 10,0% — низький рівень експресії, 10,0% ≤ ІМ < 30,0% — високий рівень, ІМ ≥ 30,0% — гіперекспресія; для p21^{WAF1/CIP1} ІМ < 7,0% — низький рівень експресії, 7,0 ≤ ІМ < 15,0% — високий рівень, ІМ ≥ 15,0% — гіперекспресія; для p16^{INK4a} ІМ ≤ 10,0% — низький рівень експресії, 10,0% ≤ ІМ < 20,0% — високий рівень, ІМ ≥ 20,0% — гіперекспресія.

Проліферативний потенціал (індекс проліферації — ІП) визначали при підрахунку кількості клітин, експресуючих Ki-67: ІП < 10,0% — низька, ІП ≥ 10,0% — висока проліферативна активність

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У контрольній групі пацієнок із незмінним ендометрієм встановлено його низьку проліферативну активність, негативну експресію p53, низький рівень експресії p21^{WAF1/CIP1} (ІМ $1,4 \pm 0,3\%$) та високий рівень експресії p16^{INK4a} ($19,2 \pm 0,5\%$).

На відміну від цього, при ЗГЕ високу проліферативну активність було виявлено у ендометрії 50,0% хворих у фазі проліферації менструального циклу, 54,5% — у фазі секреції. У хворих на ЗГЕ менопаузального періоду та при АГЕ висока проліферативна активність встановлена у 55,5 та 40,0% випадків відповідно. Слід зазначити, що експресія антигену Ki-67 відповідала високому рівню проліферації в усіх групах хворих, але при ЗГЕ у менопаузальному періоді та АГЕ цей показник досягав максимальних значень, відповідно $18,2 \pm 0,8$ та $15,0 \pm 0,5\%$ (рис. 1). Звертає увагу гетерогенність експресії Ki-67 при ЗГЕ, яка була найбільш виражена у хворих репродуктивного віку (індивідуальні коливання становили 1,5–37,1%). Важливо відмітити, що у деяких ви-

падках ЗГЕ у хворих репродуктивного та особливо менопаузально віку виявлено збільшення проліферативної активності до рівня такої у високодиференційованих аденокарциномах [7]. При АГЕ гетерогенність експресії Ki-67 була менш виражена.

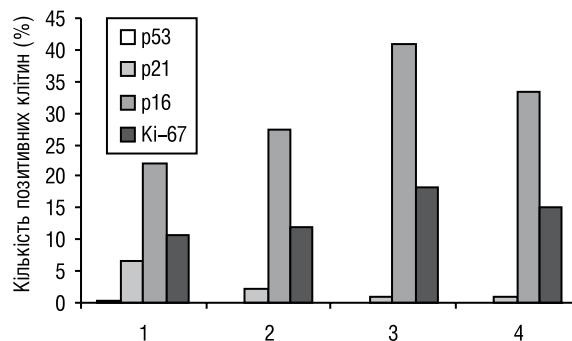


Рис. 1. Експресія біомолекулярних маркерів у клітинах гіперплазованого ендометрія: 1 — залозева гіперплазія (фаза проліферації менструального циклу); 2 — залозева гіперплазія (фаза секреції менструального циклу); 3 — залозева гіперплазія (менопауза); 4 — атипова гіперплазія.

Експресія p53 при усіх досліджених патологічних процесах була негативною, за виключенням двох випадків ЗГЕ у фазі секреції та проліферації (0,2 та 4,5%, відповідно).

ІМ при визначенні p21^{WAF1/CIP1} у хворих на ЗГЕ становив $4,3 \pm 0,2\%$, що свідчить про низький рівень експресії цього маркера. Слід відмітити варіабельність показника від негативної до гіперекспресії у групі хворих на ЗГЕ у фазі проліферації менструального циклу; тобто спостерігалась тенденція до підвищення експресії p21^{WAF1/CIP1} у порівнянні з такою при ЗГЕ у фазі секреції та менопаузі, де маркер слабо експресувався лише в окремих випадках. У жодному із зразків АГЕ експресію p21^{WAF1/CIP1} не виявлено.

Результат аналізу експресії p16^{INK4a} показав, що найбільш високі показники відзначали при ЗГЕ менопаузального періоду та АГЕ, де у 100,0% випадків встановлена гіперекспресія цього маркера. У хворих на ЗГЕ у фазі проліферації та у фазі секреції менструального циклу гіперекспресія p16^{INK4a} виявлена у 44,4 та 90,0%, відповідно.

Цікавим є факт, що у спостереженнях ЗГЕ, яким був властивий високий рівень експресії p21^{WAF1/CIP1} ($7,0 \leq \text{ІМ} < 15,0\%$), була виявлена низька проліферативна активність (до 10,0% експресуючих клітин) та гіперекспресія p16^{INK4a}. Отримані результати, можливо, відображають тандемну дію представників двох родин інгібіторів циклін-залежних кіназ (CIP/KIP та INK4), яка і приводить до зменшення проліферації. Враховуючи виявлену нами негативну експресію антигену p53, природним є питання, яким чином стимулюється експресія p21^{WAF1/CIP1} у цих випадках. Відомо, що ген p21^{WAF1/CIP1} може активуватись двома шляхами: p53-залежним та p53-незалежним, тобто на рівень його експресії можуть безпосередньо впливати і інші фактори (а саме фактор росту фібробластів, епідермальний фактор росту) та мітогенні сигнали,

але тільки у клітинах із немутованим геном TP53 [8]. Прогестерон також може безпосередньо активувати інгібітори p21^{WAF1/CIP1} та p27^{KIP1} і таким чином гальмувати клітинний цикл і значно зменшувати кількість проліферуючих клітин [9]. Враховуючи той факт, що 60,0–70,0% ЗГЕ виникають на фоні гіперпродукції естрогенів і зниження рівня прогестерону імовірніше за все виявлене підвищення експресії p21^{WAF1/CIP1} в епітеліальних клітинах гіперплазованого ендометрія відображає комплексну дію багатьох факторів, але на нашу думку, в даному випадку переважна роль належить гормональному впливу [10].

На особливу увагу заслуговують результати дослідження рівня експресії біомаркерів у двох спостереженнях АГЕ (хвора К., 51 рік, хвора М., 47 років). В одному із них (хвора К.), у гістологічному препараті на фоні АГЕ виявлено вогнища початкової малігнізації, у другому (хвора М.) — у матеріалі зскребоків були виявлені розростання аденоматозної карциноми, проте у операційному матеріалі було визначено діагноз — АГЕ. У матеріалі цих хворих встановлена низька проліферативна активність епітеліальних клітин (ІП < 10,0%) із одночасно високою експресією антигену p16^{INK4a} (рис. 2). При аналізі p53 та p21^{WAF1/CIP1} у цих хворих виявлена різна спрямованість змін їх експресії, а саме, у хворої М. встановлена гіперекспресія p53 (ІМ = 91,0%) та p21^{WAF1/CIP1} (ІМ = 28,5%), а у хворої К. виявлено низький рівень експресії p53 (ІМ < 10,0%) та негативну експресію p21^{WAF1/CIP1} з одночасно достовірно більш високим рівнем експресії p16^{INK4a}. На наш погляд, отримані дані відображають різні шляхи регуляції проліферативної активності епітеліальних клітин ендометрія. Якщо у хворої М. цей процес відбувається за механізмом p53→p21^{WAF1/CIP1} та p16^{INK4a}, то у хворої К. інгібування проліферації забезпечується лише p16^{INK4a}-залежним механізмом (Rb/cyclinD/cdk4/p16^{INK4a}) і можливо іншими шляхами. При цьому гіперекспресія білків p53 та p21^{WAF1/CIP1} може бути результатом гормонального впливу, оскільки їх гени є мішенями дії естрогену та прогестерону [9]. Підтвердженням чутливості ендометрія до гормональної дії у цьому випадку є виявлена нами **висока експресія** у матеріалі естрогенових та прогестеронових рецепторів. Таким чином, наведені приклади ілюструють різні кооперації генів, що визначають проліферативний потенціал ендометрія.

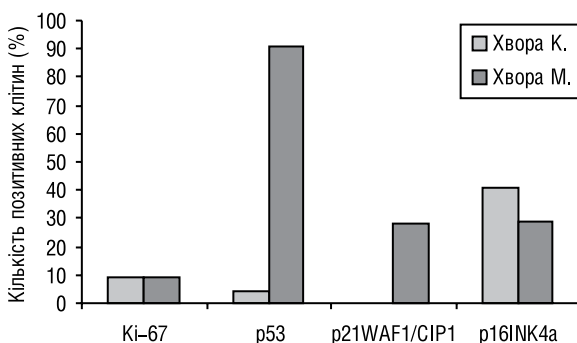


Рис. 2. Зіставлення рівнів експресії маркерних білків у двох хворих на АГЕ.

Окремо слід проаналізувати значення виявленого нами у хворої К. високого рівня експресії білку p16^{INK4a}. За даними літератури недостатність або втрата експресії гена INK4a асоціюється з агресивним фенотипом, а висока експресія p16^{INK4a} є позитивною прогностичною ознакою [11]. У той же час, на наш погляд при визначенні прогнозу перебігу захворювання, некоректно орієнтуватися на значення лише одного показника, оскільки такий підхід може привести до хибно-позитивних результатів. Доказом цього є, по-перше, виявлена у цієї пацієнтки при морфологічному дослідженні початкова малігнізація, а по-друге, наявність в анамнезі рецидивуючих маткових кровотеч. Тобто ця хвора потребує подальшого лікування у закладі онкологічного профілю.

ВИСНОВКИ

1. Ki-67 є об'єктивним показником темпу росту епітеліальних клітин ендометрія, який можна використовувати як уточнюючу характеристику при визначенні інтенсивності проліферативних процесів у хворих на ЗГЕ та АГЕ.

2. Хворі на ЗГЕ менопаузального періоду та АГЕ з високим рівнем експресії Ki-67 складають групу ризику по малігнізації і підлягають подальшому динамічному спостереженню. У той же час у деяких хворих на гіперплазію відзначають низький рівень проліферативної активності епітелію, що може свідчити про позитивний прогноз захворювання.

3. Показники експресії p53, p21^{WAF1/CIP1} та p16^{INK4a} можуть бути використані в якості характеристик для оцінки шляхів регуляції проліферативного потенціалу при гіперпластичних процесах ендометрія.

ЛІТЕРАТУРА

1. Чернышова АЛ, Коломиец ЛА, Крицкая НГ, Суходоло ИВ. Прогностические критерии онкологического риска при пролиферативных процессах эндометрия. Росс онкол журнал 2000; (3): 23–5.
2. Держанова ИС. Эволюция представлений о предопухольных процессах и возможности их морфологической верификации. В: Тезисы доклада IV Конференции российских патологоанатомов “Новые методы и разработки в онкоморфологии”. Москва, 2005: 46–9.
3. Новикова ЕГ, Чулкова ОВ, Пронин СМ. Лечение атипической гиперплазии эндометрия. Практ онкология 2004; 5 (1): 52–9.
4. Ambros RA. Simple hyperplasia of endometrium. Estimation proliferative activity on level Ki-67. Int J Gyn Path 2000; (19): 206–11.
5. Ioachim E, Kitsiou E, Mitselou A, et al. p21(WAF1/Cip1) protein expression in normal, hyperplastic and malignant endometrium. Correlation with hormone receptor status, C-ERBB-2 oncoprotein, BCL-2 and other cell cycle related proteins (RB, P53, Ki-67, PCNA). Experimental Oncology 2003; 25 (3): 200–5.
6. Pallazo JP, Mercer WE, Kovatich MS, Hugh M. Immunohistochemical Localization of p21 WAF1/Cip1 in Normal, Hyperplastic, and Neoplastic Uterine Tissues. Human Pathol 2004; 28 (1): 60–6.
7. Бучинская ЛГ, Полищук ЛЗ, Воробьева ЛИ и др. Экспрессия маркеров пролиферации в клетках аденокарциномы эндометрия. Онкология 2004; 6 (4): 265–8.

8. Michieli P, Chetid M, Lin JH, et al. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent Pathway. *Cancer Res* 1994; 54 (13): 3391–5.

9. Donghai D, Wolf DM, Litman SE, et al. Progesterone inhibits human endometrial cancer cell growth and invasiveness: Down-Regulation of cellular adhesion molecules through progesterone B receptors. *Cancer Res* 2002; 62 (1): 881–6.

10. Бохман ЯВ. Руководство по онкогинекологии. Л.: Медицина, 1989. 463 с.

11. Salvesen HB, Das S, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis. *ClinCancer Res* 2000; (6): 153–59.

IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF THE EXPRESSION OF p53, p21^{WAF1/CIP1}, p16^{INK4A}, AND Ki-67 IN EPITHELIAL CELLS OF PATIENTS WITH GLANDULAR AND ATYPICAL ENDOMETRIAL HYPERPLASIA

*L.G. Buchynska, O.O. Bilyk,
N.P. Yurchenko, L.I. Vorobjova*

Summary. *On the material of uterus mucosa scrapes and surgery material from patients with glandular and atypical endometrial hyperplasia, the expression levels of*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
a number of protein, including Ki-67, p53, p21^{WAF1/CIP1}, and p16^{INK4a} were analyzed. The findings of this analysis suggest that cells of hyperplastic endometrium feature a high proliferative activity, negative p53 expression, and mainly negative expression of p21^{WAF1/CIP1}. At the same time, p16^{INK4a} features hyperexpression in patients with glandular and atypical endometrial hyperplasia. The expression levels of p53, p21^{WAF1/CIP1}, p16^{INK4a}, and Ki-67, along with morphological characteristics, can be used as criteria to define the proliferative capacity in endometrial hyperplasia.

Key Words: endometrial, glandular hyperplasia, atypical endometrial hyperplasia, Ki-67, p53, p21^{WAF1/CIP1}, p16^{INK4A}.

Адреса для листування:

Бучинська ЛГ.

03022, Київ, вул. Васильківська 45

Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

E-mail: lubov@onconet.kiev.ua