

*Л.Г. Бучинська**Л.З. Полищук**В.П. Березнюк**Н.І. Ткаченко**У.А. Маллаєва**Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України**Територіальне медичне об'єднання Дарницького району м. Києва, Київ, Україна***Ключові слова:** гіперплазія ендометрія, гормонотерапія, цитологія, ядроце.

ЦИТОЛОГІЧНА ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ГОРМОНАЛЬНОЇ ТЕРАПІЇ ХВОРИХ ІЗ ЗАЛОЗИСТОЮ ГІПЕРПЛАЗІЄЮ ЕНДОМЕТРІЯ

Резюме. Проведено цитологічну оцінку ефективності гормональної терапії хворих із залозистою гіперплазією ендометрія. Критеріями ефективності були зміни клітин епітелію та їх ядерця, які виявляли за допомогою цитохімічної реакції. Терапевтичний ефект одержано у 61% хворих, його відсутність у решти хворих обумовлена морфологічною гетерогенністю залозистої гіперплазії ендометрія, пов'язаною з патогенезом цієї патології. Встановлено, що кількісна зміна морфофункціональних типів ядерця у клітинах гіперплазованого епітелію ендометрія є показником гормонального патоморфозу.

ВСТУП

Оскільки захворюваність на рак тіла матки в Україні протягом останніх 20 років збільшилась в 1,8 разу [1], важливим і актуальним є питання вторинної профілактики цієї патології, тобто своєчасне виявлення та лікування гіперпластичних процесів ендометрія, які є тлом для виникнення раку, особливо у жінок у постменопаузальний період, а також у хворих репродуктивного віку з тривалими та рецидивуючими дисфункціональними матковими кровотечами. Загальновідомо, що гіперплазія ендометрія (ГЕ) є гормонозумовленим і гормонозалежним процесом, тому у лікуванні хворих з ГЕ з достатньо високою ефективністю використовують гормональні препарати, які виявляють антипроліферативні та антиестрогенні властивості: медросипрогестерон, гестонорону капроат 17 α -оксипрогестерону капронат (17-ОПК) [2, 3].

Одним із методів, який використовують для оцінки ефективності гормонотерапії (ГТ), є цитологічне дослідження аспіратів із порожнини матки (АПМ). Перевага цього методу полягає в тому, що аспірат може бути отриманий в амбулаторних умовах і за необхідності — неодноразово, що дозволяє проводити динамічний контроль ефективності лікування. Проте труднощі, що виникають під час цитологічного дослідження АПМ, зумовлюють пошук додаткових показників, які б дозволили об'єктивізувати оцінку ефективності ГТ хворих з ГЕ і які можна було б використовувати під час диспансерного спостереження за ними.

Одним із таких показників є стан ядерця (Я), морфофункціональні особливості якого відображають інтенсивність метаболічних процесів, що відбуваються в клітині. Зміни Я — морфологічний прояв рівня експресії рибосомних генів. У клітинах, які активно функціонують і мають великий проліфера-

тивний потенціал, відбувається збільшення розміру та кількості Я, змінюються їх морфологія та інтенсивність забарвлення [4, 5]. Останніми роками і диференціальній діагностиці доброякісних і злоякісних новоутворень все ширше застосовують новий селективний метод виявлення асоційованих з Я аргентофільних білків, що відображають рівень активності рибосомних генів, поліпшують діагностичну точність досліджень та забезпечують індивідуальну оцінку ефективності терапії [6, 7]. У проведених нами раніше дослідженнях у незмінених і ракових клітинах ендометрія було виділено декілька типів Я, що найбільш часто зустрічаються, а саме нуклеолонемні, компактні та мікроядерця [8]. Мета роботи полягала в оцінці стану Я в епітеліальних клітинах ендометрія у хворих із залозистою ГЕ до лікування та під час ГТ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріалом дослідження були АПМ 18 хворих (віком 42–63 роки) з дисфункціональними матковими кровотечами, іноді рецидивного характеру, і кровотечами в менопаузальний період, а також АПМ 9 практично здорових жінок (віком 31–51 рік), які слугували контролем. ГТ проводили з використанням 12,5% розчину вітчизняного препарату 17-ОПК, який у дозі 250 мг вводили внутрішньом'язово на 14-й і 21-й день менструального циклу. Курс терапії тривав до 5 міс, а у деяких випадках — до 6–7 міс, загальна доза препарату складала 2,5–3,5 г. Для оцінки ефективності лікування через 3 міс після початку ГТ та протягом лікування (1–2 рази) отримували аспіраційний матеріал із порожнини матки, з якого виготовляли цитологічні препарати. Останні фарбували за методом Романовського — Гімзи, а подальший їх аналіз дозволяв визначити характер патологічного процесу в ендометрії до лікування і

зміни під час лікування. За результатами гістологічного дослідження зскребоків зі стінок матки, проведеного до початку лікування, верифікували дані цитологічного висновку і клінічний діагноз.

Кількісну оцінку Я проводили на цитологічних препаратах, забарвлених 50% розчином срібла нітрату за методом Хоуелла і Блека [9], на яких аналізували по 100 ядер епітеліальних клітин ендометрія. Оцінювали загальну кількість Я та кількість окремих їх типів на ядро. Серед останніх виділяли: нуклеолонемні — Я великих розмірів, переважно неправильної форми з довільним розташуванням аргентофільних гранул; компактні — Я середнього розміру, правильної форми, з аргентофільними гранулами по всій його площині; мікроядерця — Я малого розміру зі щільним розташуванням аргентофільних гранул. Враховували також розташування Я в ядрі, виділяючи периферійні Я, і оцінювали вміст останніх. У кожному випадку розраховували кількість різних типів Я на одне ядро та відсоток клітин з виділеними типами Я в залозистих клітинах ендометрія у здорових осіб і хворих до та під час застосування 17-ОПК. Достовірність різниці між числовими показниками визначали за допомогою t-критерію, достовірними вважали зміни при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час цитологічного дослідження АПМ виявляли фрагменти ендометрія із залозами різної форми і величини, в яких відзначали гіперплазію епітелію, що проявлялась його розташуванням у декілька рядів. Виявляли також групи, скупчення клітин, папілярні структури або розетки із залозистого епітелію зі збільшеними ядрами. Останні були округлої або овальної форми, тобто поліморфізм був нерізко вираженим. Секреторні вакуолі у цитоплазмі, яка тонким обідком обрамляла ядра, були відсутні. Описані цитологічні зміни характерні для залозистої ГЕ, що було підтверджено під час гістологічного дослідження зскребоків зі стінок матки. Виявлені зміни чітко відрізнялися від характеристики незміненого епітелію у залозах у фазу проліферації або секреції менструального циклу, коли епітелій розташовувався в один ряд і мав суб- або супрануклеарні вакуолі у фазі секреції.

В АПМ хворих після ГТ спостерігали поодинокі фрагменти ендометрія із децидуаподібною трансформацією стромы та із залозами, в яких ознаки гіперплазії епітелію були відсутні або наявні атрофічні зміни останнього. Клітини були менших розмірів у порівнянні з такими до лікування, ядра клітин мали овальну форму.

У практично здорових жінок під час оцінки вмісту Я в клітинах ендометрія встановлено, що загальна кількість Я на одну клітину у фазі проліферації і секреції була майже однаковою і дорівнювала $2,51 \pm 0,21$ та $2,33 \pm 0,22$ відповідно. При цьому середня кількість окремих типів Я на одну досліджену клітину в різних фазах менструального циклу також була однаковою. Слід зазначити, що в епітелії залоз

ендометрія здорових жінок переважали нуклеолонемні Я — $41,6 \pm 0,6\%$, а вміст компактних Я та мікроядерця був дещо нижчий (рис. 1). У хворих із залозистою ГЕ спостерігали перерозподіл кількості Я різних типів порівняно з контролем: частка нуклеолонемних Я зменшувалася до $32,2 \pm 0,3\%$, а найвищий вміст серед Я інших типів було відзначено в

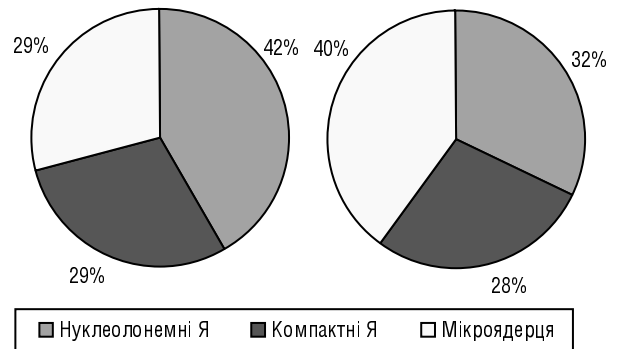


Рис. 1. Вміст Я різних типів в епітеліальних клітинах ендометрія у здорових жінок та хворих з залозистою ГЕ

мікроядерця — $40,3 \pm 0,4\%$. Оскільки морфологічні зміни Я пов'язані з рівнем його функціонування [4–6, 10], то отримані результати свідчать, що як у фазі проліферації, так і у фазі секреції клітини залоз ендометрія характеризуються значною білоксинтетичною активністю, що відображає розмноження клітин у фазі проліферації та їх секреторну трансформацію у фазі секреції. Зведені дані за вмістом Я в епітеліальних клітинах ендометрія хворих із залозистою ГЕ до і після ГТ наведені в табл. 1. Як свідчать дані, у хворих до лікування виявлено достовірне збільшення середньої кількості Я на 1 ядро порівняно з контролем. Ця різниця зумовлена достовірним збільшенням середньої кількості мікроядерця та компактних Я. При співставленні середньої кількості Я та їх окремих типів у хворих до і після ГТ достовірної різниці не виявлено. Збільшення кількості Я на ядро в епітеліальних клітинах ендометрія у хворих до і після ГТ порівняно з контролем відображає ще більш високий ступінь біосинтетичних процесів у цих клітинах, характерний для залозистої ГЕ, що підтверджують дані літератури [11].

Оскільки з активацією білкового синтезу у клітині відбувається міграція Я до мембрани ядра [12], то певне значення для характеристики метаболічних

Таблиця 1
Кількість Я в епітеліальних клітинах ендометрія у здорових жінок та хворих із залозистою ГЕ до та після ГТ

Група	Кількість Я на 1 ядро ¹			
	Всього	Нуклеолонемні	Компактні	Мікроядерця
Здорові	$2,39 \pm 0,16$ 1,56–3,14	$1,00 \pm 0,10$ 0,70–1,41	$0,70 \pm 0,04$ 0,54–0,86	$0,70 \pm 0,09$ 0,36–1,15
Хворі із залозистою ГЕ	До лікування	$3,13 \pm 0,23^*$ 1,79–4,73	$1,01 \pm 0,08$ 0,75–1,58	$0,86 \pm 0,07^*$ 0,55–1,34
	Після лікування	$3,14 \pm 0,18$ 2,02–4,92	$0,95 \pm 0,08$ 0,57–1,71	$1,26 \pm 0,20^*$ 0,50–2,52

Примітка: ¹ – в чисельнику – М ± m, у знаменнику – межі індивідуальних коливань; * – $p < 0,05$ порівняно з контролем.

процесів клітини має оцінка кількості периферійних Я, тобто Я, які, перебували у безпосередньому контакті з ядерною мембраною. Середня кількість таких Я на 1 ядро наведена у табл. 2. В епітелії залоз ендометрія хворих загальна кількість цих Я на 1 клітину збільшена у 2 рази, що є достовірно вищим за відповідний показник у здорових жінок. Найбільш важливим фактом є те, що виявлене збільшення кількості периферійних Я відбувається за рахунок достовірного збільшення нуклеолонемних і компактних Я, які вважаються найбільш метаболічно активними. При співставленні вмісту периферійних Я в епітелії залоз ендометрія у хворих до та після ГТ не виявлено достовірної різниці, хоча відзначено тенденцію до їх зменшення після лікування. Слід зазначити, що аналіз кількості клітин з периферійними нуклеолонемними та компактними Я виявив більш чітку залежність від ГТ. Встановлено, що кількість клітин з периферійними нуклеолонемними Я є порівняно меншою у здорових жінок ($16,1 \pm 1,2\%$), значно збільшується у хворих ($31,6 \pm 1,4\%$) та зменшується у пацієнок після ГТ ($23,8 \pm 1,03\%$). Аналогічно змінюється й вміст клітин з периферійними компактними Я: у здорових жінок їх кількість дорівнює $12,2 \pm 1,1\%$, у пацієнок до лікування – $26,6 \pm 1,4\%$ та після лікування 17-ОПК – $20,0 \pm 0,9\%$ (рис. 2). Зниження вмісту клітин з периферійними Я корелює з позитивним клінічним ефектом ГТ, який було одержано в 61% випадків.

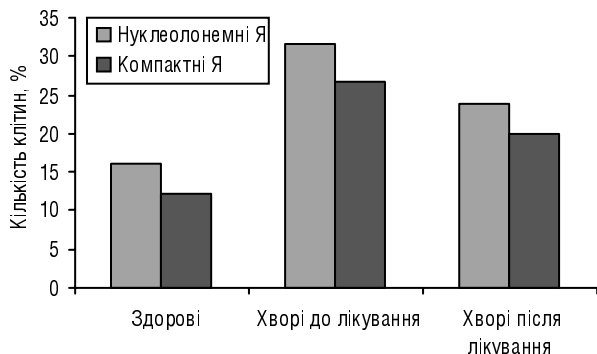


Рис. 2. Кількість клітин з периферійними компактними та нуклеолонемними Я у здорових та у пацієнок із залозистою ГЕ (%)

Результати дослідження, а саме збільшення як окремих типів, так і загальної кількості периферійних Я, заслуговують на особливу увагу, оскільки положення Я біля ядерної мембрани пов'язане з такою важливою функцією Я, як транспорт білків та рибосомних субодиниць з ядра до цитоплазми [13, 14]. У цьому транспорті важливу роль відіграє білок В23, який є одним із білків — переносників ядерних макромолекул і вступає в реакцію з азотнокислим сріблом. Як видно із даних, представлених в табл. 1 і 2, кількісні значення Я у хворих жінок характеризувались достатньо вираженою варіабельністю. Останнє спонукало нас розглянути їх індивідуальні значення в проаналізованих клітинах. Виявилось, що як загальна кількість Я, так і кожний їх тип під час лікування характеризується гетероген-

Таблиця 2
Кількість периферійних Я в епітеліальних клітинах ендометрію здорових жінок та хворих із залозистою ГЕ до та після ГТ

Група		Кількість периферійних Я на 1 ядро ¹			
		Всього	Типи периферійних Я		
			Нуклеолонемні	Компактні	Мікро-ядерця
Здорові		0,33 ± 0,05 0,24 – 0,55	0,18 ± 0,04 0,01 – 0,40	0,15 ± 0,01 0,05 – 0,20	0
Хворі із залозистою ГЕ	До лікування	0,74 ± 0,09* 0,36 – 1,18	0,37 ± 0,05* 0,19 – 0,61	0,34 ± 0,04* 0,14 – 0,65	0,03 ± 0,01* 0 – 0,09
	Після лікування	0,56 ± 0,06 0,24 – 1,16	0,31 ± 0,05 0,12 – 0,88	0,25 ± 0,02 0,08 – 0,38	0,02 ± 0,01 0 – 0,10

Примітка: ¹ — див. табл. 1; * — $p < 0,01$ порівняно з контролем.

ними змінами, що носять індивідуальний характер і відображають ефективність ГТ.

Наводимо два приклади (рис. 3). У хворій К. (52 роки, клінічний діагноз: залозиста ГЕ поліпозного типу) під час лікування за допомогою 17-ОПК вміст клітин з периферійними нуклеолонемними та компактними Я незначно підвищувався і складав відповідно $24,0 \pm 1,1$ та $21,0 \pm 0,9\%$ порівняно з $20,0 \pm 1,2$ та $13,0 \pm 1,1\%$ відповідно до лікування. У цієї хворої після ГТ продовжувалась маткова кровотеча, що свідчить про неефективність лікування. У хворій О. (46 років, клінічний діагноз: залозиста ГЕ), навпаки, спостерігалось чітке зниження показників після ГТ. Так, кількість клітин з периферійними нуклеолонемними Я до лікування становила $51,0 \pm 1,5$, а після лікування зменшилась у 2 рази — до $26,3 \pm 1,1\%$. Вміст клітин з периферійними компактними Я після лікування також достовірно знижувався порівняно з таким до лікування ($26,0 \pm 1,8$ та $34,0 \pm 1,1\%$ відповідно).

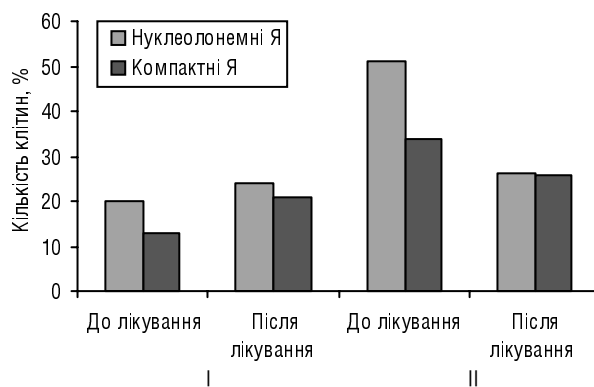


Рис. 3. Кількість клітин з периферійними нуклеолонемними та компактними Я у хворій К. (I) та хворій О. (II) до та після гормонотерапії 17-ОПК (%)

Отже, отримані результати дають підставу розглядати виділені типи Я та їх зміни перш за все як об'єктивний показник підвищеного функціонування клітин при залозистій ГЕ, про що свідчить збільшення кількості найбільш активних типів Я — нуклеолонемних і компактних, у тому числі периферійних Я. По-друге, зменшення кількості периферійних Я на 1 ядро з одночасним зменшенням кількості клітин, що містять периферійні нуклеолонемні і компактні Я, після ГТ залозистої ГЕ відображають зміни метаболізму гіперплазованих клітин під впливом 17-ОПК, що дає змогу вважати вивче-

ний ядерцевий показник цитологічним критерієм гормонального патоморфозу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Рак в Україні. Захворюваність, смертність, виживання, діагностика, лікування. Бюлетень національного канцер-реєстру України. Київ: Інститут онкології та радіології АМН України, 2000. 63 с.
2. **Бохман ЯВ, Прянишников ВА, Чепик ОФ.** Комплексное лечение при гиперпластических процессах и раке эндометрия. Москва: Медицина, 1979. 272 с.
3. **Бохман ЯВ, Лившиц МА, Винокуров ВЛ и др.** Новые подходы к лечению гинекологического рака. Санкт-Петербург: Гиппократ, 1993. 224 с.
4. **Trere D.** Quantitative analysis of AgNOR proteins: a reliable marker of the rapidity of cell duplication and significant prognostic parameter in tumour pathology. *Adv Clin Path* 1998; **2**: 261–70.
5. **Cia EM, Trevisan M, Metze K.** Argrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) technique: a helpful tool for differential diagnosis in urinary cytology. *Cytopathology* 1999; **10**: 30–9.
6. **Мамаев НН, Мамаева СЕ.** Структура и функции ядрышкообразующих районов хромосом: молекулярные, цитологические аспекты. *Цитология* 1992; **32**: 3–25.
7. **Vogomoletz WV, Pourny Ch, Didier B.** Argrophilic nuclear organizer region counts in locally advanced breast carcinoma treated by chemotherapy before surgery. *Eur J Cancer* 1990; **26**: 1042–4.
8. **Ганина КП, Полищук ЛЗ, Бучинская ЛГ.** Цитоморфология и цитогнетика железистой гиперплазии и рака эндометрия. Киев: Наук думка, 1990. 251 с.
9. **Howell WM, Black DA.** Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 1980; **36**: 1014–5.
10. **Зацепина ОВ.** Трехмерная организация и транскрипция рибосомных генов в ядрышке. *Цитология* 1997; **39**: 60–1.
11. **Максимов СЯ.** Минимальный рак эндометрия. Санкт-Петербург: Гиппократ, 1994. 152 с.

12. **Бажанова ЕД, Черниговская ЕВ, Данилова ОА, Бажанов ИА.** Характеристика ядрышкового аппарата нейросекреторных клеток гипоталамуса у крыс разного возраста при острой иммобилизации животных. *Цитология* 1998; **40**: 248–55.

13. **Smetana K, Jiraskova I, Sedla M, et al.** Preferential silver reaction of nucleolar regions adjacent to fibrillar centers in ring shaped nucleoli of leukemic lymphocytes. *Acta Histochem* 1998; **100**: 257–70.

14. **Zatsepina OV, Rousselet A, Chan PK, et al.** The nucleolar phosphoprotein B23 redistributes in part to the spindle poles during mitosis. *J Cell Sci* 1999; **112**: 455–66.

CYTOLOGICAL EVALUATION OF THE EFFICACY OF A HORMONAL THERAPY IN PATIENTS WITH ENDOMETRIAL GLANDULAR HYPERPLASIA

L.G. Buchinska, L.Z. Polishchuk, V.P. Berezniuk, N.I. Tkachenko, U.A. Mallayeva

Summary. *In patients with endometrial glandular hyperplasia, the efficacy of a hormonal therapy was evaluated cytologically. The effect was assessed on the basis of changes in epithelial cells and nucleoli detected cytochemically. A therapeutic effect was seen in 61% of patients. The lack of the effect in the remaining patients it attributable to the morphologic heterogeneity of the endometrial hyperplasia which is a peculiarity of the pathogenesis of this pathology. A conclusion is made that quantitative changes in morphofunctional types of nucleoli in hyperplastic cells of the endometrial epithelium may be reckoned as markers of hormonal pathomorphosis.*

Key Words: endometrial hyperplasia, hormonotherapy, cytology, nucleolus.