

І.Ю. Ганжий

## Імуногістохімічні особливості структур яєчників при синдромі полікістозних яєчників залежно від вікових аспектів

МСЧ «Мотор Січ», м. Запоріжжя,

ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України»

**Ключові слова:** синдром полікістозних яєчників, строма, PCNA, Ki-67, проліферація, андрогенні рецептори.

Проаналізовано особливості експресії факторів проліферації та рецепторів до андрогенів у жінок з синдромом полікістозних яєчників залежно від віку. Виявлено виражену експресію PCNA, цитокератину та рецепторів андрогенів у стромі, а також посилення експресії PCNA з віком. Раковомембрональний антиген і Ki-67 не виявлено у жодної жінки.

### Иммуногистохимические особенности структур яичников при синдроме поликистозных яичников в зависимости от возрастных аспектов

И.Ю. Ганжий

Проанализированы особенности экспрессии факторов пролиферации и рецепторов к андрогенам у женщин с синдромом поликистозных яичников в зависимости от возраста. Выявлена выраженная экспрессия PCNA, цитокератина и рецепторов андрогенов в строме, а также усиление экспрессии PCNA с возрастом. Раковомембрональный антиген и Ki-67 ни у одной женщины не обнаружены.

**Ключевые слова:** синдром поликистозных яичников, строма, PCNA, Ki-67, пролиферация, рецепторы к андрогенам.**Патология.** – 2012. – №3 (26). – С. 55–58

### Immunohistochemical features of ovarian structure at polycystic ovary syndrome depending on the age

I.Yu. Ganzhiy

Peculiarities of proliferation factors and androgens receptors expression in women with PCOS, depending on age were analyzed. It was revealed that pronounced expression of PCNA, cytokeratin and androgen receptors in stroma and intensification of PCNA expression increase with age. Carcinoembryonic antigen and Ki-67 were not found in any woman.

**Key words:** polycystic ovary syndrome, PCNA, Ki-67, proliferation, androgen receptors.**Pathologia.** 2012; №3 (26): 55–58

Синдром полікістозних яєчників (СПКЯ) є найчастішою ендокринопатією у жінок репродуктивного віку як в Україні, так і за кордоном, становлячи гетерогенну групу порушень з широкою клінічною і біохімічною варіабельністю. За даними різних авторів, частота СПКЯ в популяції складає від 4 до 15% [1–4].

На сьогодні полікістозні яєчники розглядаються як поліетіологічна та полісимптомна патологія, патогенез якої може бути зумовлений порушеннями в центральних і периферичних ланках репродуктивної системи [2,5]. У спеціалізованій літературі широко дискутуються питання походження і сутності СПКЯ. Незважаючи на численні дослідження, присвячені пошуку причин розвитку СПКЯ, на жаль, і сьогодні немає досить чіткого його визначення, він залишається діагнозом виключення. Ґрунтуючись на варіабельності клінічних і біохімічних проявів, більшість клініцистів встановлюють діагноз СПКЯ на підставі трьох головних критеріїв: хронічної ановуляції, гіперандрогенії та ехографічних ознак полікістозних яєчників, закріплених Роттердамським консенсусом в 2003 році [6]. Відповідно до цього документу, наявність 2 з 3 перерахованих критеріїв дозволяє встановити діагноз СПКЯ при виключенні інших патологічних станів, що мають подібні клінічні та лабораторні симптоми.

Численні дослідження показали, що у патогенезі СПКЯ велике значення відіграють андрогени. Імуногістохімічні дослідження продемонстрували, що рецептори до андрогенів (АР) у яєчниках людини знаходяться у преантральних та антральних фолікулах, теці та стромі [7]. У дослідженнях на приматах продемонстровано кількість рецепторів до андрогенів позитивно корелює

з проліферацією клітин та негативно з їх апоптозом [8]. Ця знахідка вказує, що андрогени теки можуть впливати на зростання фолікулів у приматів. Автори припустили, що андрогени стимулюють ініціацію росту фолікулу одним з двох механізмів: або прямо через АР на примордіальних фолікулах, або опосередковано через фактори росту. Саме ці механізми порушуються при синдромі полікістозних яєчників.

Пошкодження мікрооточення яєчника у жінок з фолікулярними кістами може впливати на нормальний процес проліферації та програмованої загибелі клітин яєчника [9]. Останнім часом розроблені нові, інформативніші методичні підходи до з'ясування особливостей проліферації клітин. Все частіше використовується метод імуногістохімічного виявлення в ядрах клітин білків, що беруть участь у процесі поділу клітин: білка Ki-67, ядерного антигену проліферуючих клітин (PCNA), раковомембронального антигену (PEA), цитокератину тощо [10].

PCNA – білок, що відіграє ключову роль у процесі редуплікації ДНК. Експресія PCNA починає виявлятися у ядрі клітини, що ділиться, у фазі G1, досягає максимуму у фазі S і поступово знижується до кінця фази G2. Незважаючи на деякі проблемні питання щодо приуроченості PCNA до певних фаз мітотичного циклу і можливості його участі в репарації ДНК, він знайшов широке застосування в онкоморфології [11].

На сьогодні можна впевнено говорити, що PCNA є свого роду платформою, яка встановлюється на ДНК і координує багато реакцій під час реплікації або репарації ДНК. Рівень PCNA в цитоплазмі досить високий і не змінюється залежно від фази циклу. Однак рівень його в

хроматині та ядерному матриксі зростає до 12 разів при переході від G0-до S-фази. Слід зазначити, що PCNA акумулюється в ядерному матриксі в середині фази G1 ще до того, як перейти в хроматин на межі фаз G1/S, що вказує на можливу участь PCNA не тільки в синтезі, але й у преініціації синтезу ДНК [12].

Клітинна трансформація супроводжується значним збільшенням (до 6 разів) кількості PCNA без появи будь-яких його додаткових форм. Підвищений рівень PCNA в ракових клітинах, очевидно, пов'язаний не з клітинною проліферацією і синтезом ДНК, а з якимись іншими функціями. Цей список включає білки реплікації ДНК, репарації ДНК, контролю клітинного циклу, ремоделювання хроматину, епігенезу, когезії хроматид, транскрипції тощо. Виявилось, що хоча PCNA і є в основному ядерним білком, значна частина його може бути наявна і в цитоплазмі [13]. Слід зазначити, що цитоплазматична частина популяції PCNA може бути дуже значною й, імовірно, може мати функції, що досі не відомі. Наприклад, виявлено зв'язок PCNA з гліколізом [14].

Оптимальним і специфічнішим проліферативним маркером для широкого використання в патологоанатомічній практиці є Ki-67 [15]. Антиген Ki-67, вперше описаний Gerdes і співавт. в 1983 р., складається з 2 поліпептидних ланцюгів з молекулярною масою 345 і 395 кДа. Це основна частина нуклеарного матриксу протягом інтерфази, що асоціюється з хромосомами фази мітозу [10]. Ki-67 є димерною молекулою, що має тісний зв'язок з 10 хромосомами, конкретна роль цього протеїну в процесі клітинного поділу досі не відома [13]. Експресія Ki-67 дозволяє виділити пухлинні клітини, що перебувають в активній фазі протягом усього клітинного циклу (G1-, S-, G2-і M-фази), крім G0-періоду [10,11,13].

Ще однією групою білків, що беруть участь у клітинній проліферації, є цитокератини. Кератини – добре відомі білки з групи проміжних філаментів. Як і актинові, кератінові філаменти гнучкі, але утворюють міцний цитоскелет. Цитокератини типу 2 специфічно експресуються в простому епітелії, що покриває внутрішню поверхню органів, залоз внутрішньої секреції і кровоносних судин.

Отже, досягнення сучасної науки дозволяють проникнути у досі не відомі процеси життя та загибелі клітин.

Для жінок з СПКЯ характерний розвиток гіперплазії клітинних і стромальних елементів, але майже не відомі причини та механізми їх розвитку.

**Мета роботи**

Вивчення імуногістохімічних структур яєчників при СПКЯ залежно від вікових аспектів.

**Матеріали і методи дослідження**

Для реалізації поставленої мети вивчено імуногістохімічні особливості структури яєчників у 30 пацієнток з СПКЯ різного віку (основна група). У контрольну групу зразки відбирали за принципом випадок-контроль (за ключовий показник взято вік жінок). Зразки в основній і контрольній групах розподілені на 3 підгрупи залежно від віку жінок: 1 підгрупа – від 18 до 25 років (7 зразків), 2 підгрупа – від 26 до 35 років (12); 3 підгрупа – від 36 до 49 років (11).

Матеріал для дослідження – гістологічні препарати операційно-біопсійного матеріалу. Зразки тканини фіксували і заливали в парафін за стандартною методикою. Гістологічні препарати забарвлювали звичайними способами і проводили імуногістохімічні дослідження. Використовували імуногістохімічний метод дослідження, зокрема непрямий стрептавидін-пероксидазний метод виявлення рівня експресії антигенів раково-ембріонального антигену (PEA), проліферативно-клітинно-нуклеарного антигену (PCNA), цитокератину та рецепторів андрогенів за допомогою моноклональних антитіл (MKAT, «Novocastra» і «Dako»). Для оцінки індексу проліферації розраховували відсоток клітин, в ядрах яких виявляли експресію досліджуваного антигену. Розповсюдженість та інтенсивність реакції оцінювали напівкількісним методом у балах (від 0 до 3):

- розповсюдженість: 0 – немає забарвлення; 1 – менше 10% позитивно забарвлених клітин; 2 – більше 10% і менше 50% позитивно забарвлених клітин; 3 – гомогенне забарвлення більше 50% клітин;
- інтенсивність реакції: 0 – немає видимого забарвлення; 1 – слабе забарвлення; 2 – помірне забарвлення; 3 – виразне забарвлення.

Дослідження виконано у лабораторії патоморфології Інституту педіатрії, акушерства та гінекології (м. Київ), зав. – професор Т.Д. Задорожня.

Статистичну обробку даних виконано у програмі Excel. Дані наведено у вигляді пропорцій і середніх величин. Застосовано критерій Стьюдента та  $\chi^2$ . Різницю вважали достовірною в разі  $p < 0,05$ .

Таблиця 1

**Експресія PCNA в ядрах стромальних клітин (n/%)**

Бали	Групи					
	Основна			Контрольна		
	1, n=7	2, n=12	3, n=11	1, n=7	2, n=12	3, n=11
Розповсюдженість						
0	0	0	0	7/100 <sup>1</sup>	10/83,33 <sup>2</sup>	7/63,64 <sup>3</sup>
1	2/28,57	1/8,33	0	0	2/16,67	3/27,27
2	4/57,14 <sup>3к</sup>	3/25,0	0	0	0	1/9,09
3	1/14,29	8/66,67 <sup>к</sup>	11/100 <sup>к</sup>	0	0	0
Інтенсивність забарвлення						
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	2/16,67	4/36,36 <sup>3</sup>
2	5/71,43 <sup>к</sup>	6/50,0 <sup>к</sup>	1/9,09 <sup>1</sup>	0	0	0
3	2/28,57	6/50,0 <sup>к</sup>	10/90,91 <sup>1,к</sup>	0	0	0

Примітки: <sup>к</sup> – різниця вірогідна відносно контрольної групи,  $p < 0,05$ ; <sup>1</sup> – різниця вірогідна відносно 1 основної підгрупи,  $p < 0,05$ ; <sup>2</sup> – різниця вірогідна відносно 2 основної підгрупи,  $p < 0,05$ ; <sup>3</sup> – різниця вірогідна відносно 3 основної підгрупи,  $p < 0,05$ .

**Експресія PCNA в ядрах епітеліальних клітин (n/%)**

Бали	Групи					
	Основна			Контрольна		
	1, n=7	2, n=12	3, n=11	1, n=7	2, n=12	3, n=11
Розповсюдженість (PI)						
0	0	0	0	0	3/25,0	2/18,18
1	4/57,14	4/25,0	7/63,67	2/28,57	2/16,67	5/45,45
2	3/42,86	8/75,0	4/36,36	5/71,43	7/58,33	4/36,36
3	0	0	0	0	0	0
Інтенсивність забарвлення						
0	0	0	0	0	3/25,0	2/18,18
1	7/100,0	11/91,67	8/72,73	7/100,0	8/66,67	9/81,82
2	0	1/8,33	3/27,27	0	1/8,33	0
3	0	0	0	0	0	0

**Результати та їх обговорення**

Вивчення експресії білків проліферації (PCNA, Ki-67, PEA та цитокератину) у гістопрепаратах жінок з і без СПКЯ показало суперечливі результати.

Імуногістохімічне дослідження моноклональних антитіл (МКАТ) до ядерного антигену клітин, що проліферують (PCNA), виявило виражену експресію в ядрах стромальних структур при гіперплазії і вогнищах гіпертекозу.

Як видно з *таблиці 1*, у жінок з СПКЯ кількість клітин з PCNA в ядрах і його кількість зростали з віком. Треба зазначити, що в контрольній групі PCNA негативних ядер клітин строми було вірогідно менше ( $p < 0,05$ ), а в тих поодиноких випадках, коли реакція була позитивною, кількість клітин була меншою 10%, а інтенсивність забарвлення – мінімальною.

Експресію PCNA в 1 основній підгрупі здебільшого відзначено у фолікулярних кістах, в осередках ядер епітелію кіст і безпосередньо в стінці під епітелієм.

Ті ж тенденції відзначено в епітеліальних клітинах інших підгруп основної та контрольної груп (*табл. 2*). Отже, вірогідних відмінностей між групами за цим показником не виявлено ( $p > 0,05$ ).

Імуногістохімічне дослідження МКАТ до раковоембріонального антигену (PEA) виявило негативну реакцію у більшості спостережень усіх вікових груп; мікрвогнище експресії PEA виявлено лише в одному випадку у жінки 3 основної групи поблизу стінки фолікулярної кісти в поєднанні з ендометріюїдною кістою.

Дослідження експресії PEA та Ki-67 у контрольній групі, а також Ki-67 в основній не дало позитивних результатів.

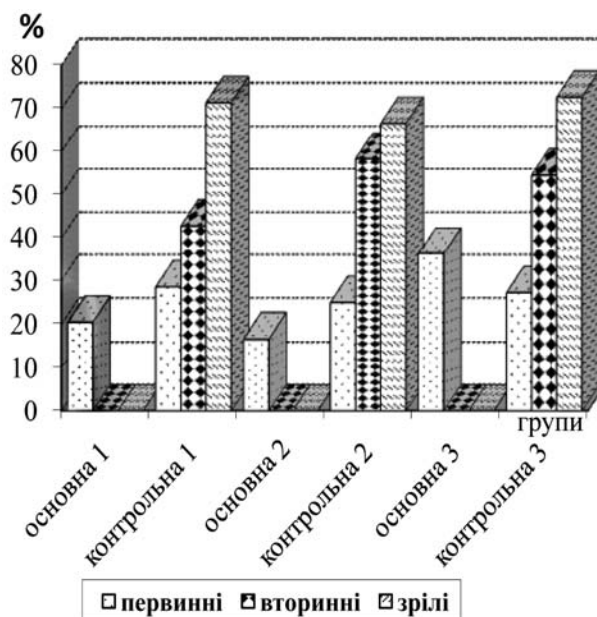
При імуногістохімічному дослідженні цитокератину виявлено осередки позитивної експресії в стромі у 8 (72,72%) жінок 3 основної групи. У всіх жінок контрольної групи зареєстровано слабку реакцію в цитоплазмі крупних і дрібних гранульозних лютеїнізованих клітин, що мала розповсюджений характер (PI більше за 50%).

Отже, дослідження білків проліферації показало негативну експресію до PEA та Ki-67 в стромі й епітеліальних клітинах жінок з та без СПКЯ. Водночас зареєстровано позитивну експресію до PCNA та цитокератину в стромі пацієнток з СПКЯ віком 36–49 років. Беручи до уваги, що специфічні білки проліферації клітин відсутні, можна припустити, що підвищення PCNA у жінок старшої віко-

вої категорії з СПКЯ може свідчити про інтенсифікацію інших процесів, які контролює цей білок. Результати попередніх досліджень дають можливість припустити, що це можуть бути процеси гліколізу [12,13].

Експресію до рецепторів андрогенів виявлено у всіх спостереженнях в обох досліджуваних групах. Однак зареєстровано вірогідні відмінності у їх локалізації. У всіх жінок з СПКЯ експресію відзначено в клітинах строми, а їх розповсюдженість зростала з віком ( $18,35 \pm 1,42\%$ ;  $44,27 \pm 3,19\%$  та  $61,33 \pm 2,67\%$  відповідно у групах), але вірогідна різниця була лише між молодими (1 група) та жінками старшої вікової категорії (3 група) ( $p < 0,05$ ). У жінок групи контролю рецептори до андрогенів траплялись лише в поодиноких випадках в окремих клітинах строми ( $1,16 \pm 0,31\%$ ;  $1,97 \pm 0,25\%$  та  $3,26 \pm 0,77\%$  відповідно до груп) ( $p > 0,05$ ). Отже, зареєстровані статистично вірогідні відмінності між всіма віковими категоріями жінок з та без СПКЯ у кількості AR рецепторів у стромі яєчників ( $p < 0,05$ ).

Щодо епітеліальних клітин фолікулярного апарату, ситуація протилежна (*рис. 1*).



*Рис. 1.* Розповсюдженість AR в епітеліальних клітинах фолікулів різних стадій.

Отже, рецептори до андрогенів виявлено лише в осередках ядер епітелію первинних фолікулів, їх кількість зростала з віком, але різниця не вірогідна ( $p > 0,05$ ). У здорових жінок кількість АР зростала з дозріванням фолікулів у всіх вікових категоріях. Треба зазначити, що у більшості випадків АР візуалізувались не дифузно, а вогнищево (рис. 2).

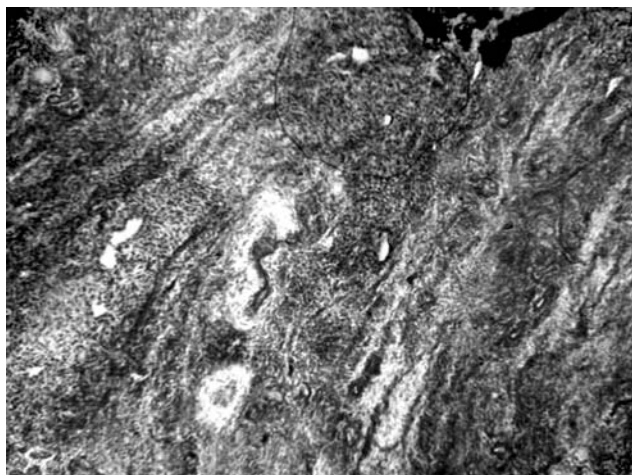
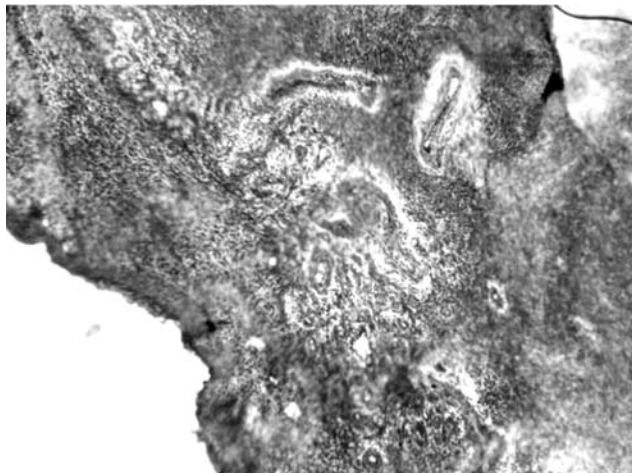


Рис. 2. Непрямий стрептовидин-пероксидазний метод виявлення інтенсивності та поширеності реакції з МКАТ до рецепторів андрогенів (імуногістохімічне дослідження). Мікрофотографія. Ок 10 об.10.

Отримані дані свідчать, що при СПКЯ змінюється локалізація АР, і це може бути однією з причин розвитку СПКЯ. З іншого боку, не зрозуміло, чому кількість АР максимальна у жінок старшої вікової категорії, оскільки, за даними досліджень, рівень андрогенів з віком знижується [5]. Можливо, їх кількість збільшується компенсаторно у відповідь на вікове зниження концентрації андрогенів або це є відображенням зміненої чутливості АР при СПКЯ.

#### Висновки

Вивчення гістоархітектоники яєчників при СПКЯ виявило наступні характерні риси:

1. Виражену експресію PCNA, цитокератину та рецепторів андрогенів у стромі.

2. Посилення експресії PCNA з віком.

Ці знахідки дають можливість припустити важливу роль стромальних елементів яєчника у формуванні СПКЯ.

#### Список літератури

1. Запорожан В.М. Зв'язок низького рівня відповіді на стимуляцію овуляції у пацієнток з синдромом полікістозних яєчників із функціональним генетичним поліморфізмом / Запорожан В.М., Борис О.М. // Медико-соціальні проблеми сім'ї. – 2011. – Т. 16, №3. – С. 25–30.
2. Грищенко В.И. Синдром поликистозных яичников как причина эндокринного бесплодия / Грищенко В.И., Грищенко Н.Г., Загребельная И.В., Абузайд С.С., Кузьмина И.Ю., Лупояд В.С. // Медицинские аспекты здоровья женщины. – 2010. – №1 (28). – С. 5–12.
3. Уварова Е.В. Проблема гиперпролактинемий и гормональная контрацепция (обзор литературы) / Уварова Е.В., Болдырева Н.В. // Репродуктивное здоровье детей и подростков. – 2006. – №1. – С. 55–70.
4. Геряк С.М. Корекція метаболічних порушень у хворих з ановуляторним синдромом / Геряк С.М., Петренко Н.В., Багній Н.І., Корда І.В., Стельмах О.Є // Збірник наукових праць Асоціації акушерів-гінекологів України. – К.: Інтермед, 2011. – С. 153–155.
5. Синдром поликистозных яичников: Руководство для врачей / Под ред. И.И. Дедова, Г.А. Мельниченко. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2007. – 368 с.
6. Consensus on Women's Health Aspects of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) // Human Reproduction. – 2012. – Vol. 27 (1). – P. 14–24.
7. Saunders P.T. Differential expression of estrogen receptor and androgen receptor in the ovaries of marmosets and humans / Saunders P.T., Millar M.R., Williams K., Macpherson S., Harkiss D., Anderson R.A., Orr B., Groome N.P., Scobie G., Fraser H.M. // Biol Reprod. – 2000. – Vol. 63. – P. 1098–1105.
8. Weil S.J. Androgen receptor gene expression in the primate ovary: cellular localization, regulation, and functional correlations / Weil S.J., Vendola K., Zhou J., Adesanya O.O., Wang J., Okafor J., Bondy C.A. // J Clin Endocrinol Metab. – 1998. – Vol. 83. – P. 2479–2485.
9. Miyachi K. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells / Miyachi K., Fritzler M. J., et al. // J Immunol. – 1978. – Vol. 121 (6). – P. 2228–2234.
10. Isobe N. Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle / Isobe N., Yoshimura Y. // J Reprod Dev. – 2007. – Vol. 53. – P. 1119–1124.
11. Нарыжный С.Н. Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA): координатор клеточных функций в норме и патологии / Нарыжный С.Н. – Гатчина, 2010. – 226 с.
12. Naryzhny S.N. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) may function as a double homotrimer complex in the mammalian cell / Naryzhny S. N., Zhao H. et al. // J Biol Chem. – 2005. – Vol. 280 (14). – P. 13888–13894.
13. Naryzhny S.N. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view / Naryzhny S.N. // Cell Mol Life Sci. – 2008. – Vol. 65 (23). – P. 3789–3808.
14. Naryzhny S.N. Characterization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) isoforms in normal and cancer cells: there is no cancer-associated form of PCNA / Naryzhny S.N., Lee H. // FEBS Lett. – 2007. – Vol. 581 (25). – P. 4917–4920.
15. Salvetti N.R. An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats / Salvetti N.R., Panzani C.G., Gimeno E.J., Neme L.G., Alfaro N.S., Ortega H.H. // Reproductive Biology and Endocrinology. – 2009. – Vol. 7. – P. 68.

#### Відомості про автора:

Ганжий І.Ю., к. мед. н., доцент каф. акушерства та гінекології ДЗ «ЗМАПО», зав. гінекологічним відділення МСЧ «Мотор Січ».

Надійшла в редакцію 22.10.2012 р.