

В. А. Туманский, А. В. Чепец

Сравнительная иммуногистохимическая характеристика экспрессии рецепторов эстрогена- α и прогестерона, p16 и p53, Ki-67 и каспазы 3 в инвазивной эндометриоидной аденокарциноме тела матки и в пролиферативном эндометрии

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: карцинома эндометрия, рецепторы эстрогена- α , рецепторы прогестерона, p53, p16, Ki-67, каспаза 3.

Рак эндометрия занимает шестое место в мире по числу ежегодно регистрируемых новых случаев болезни и при поздней диагностике имеет непредсказуемый прогноз. В прогнозировании течения рака эндометрия большое значение имеют иммуногистохимические исследования опухоли.

Цель работы – сравнительная характеристика экспрессии рецепторов эстрогена- α и прогестерона, p16 и p53, Ki-67 и каспазы 3 клетками эндометриоидной аденокарциномы эндометрия и нормального пролиферативного эндометрия.

Материалы и методы. Иммуногистохимическими и морфометрическими методиками изучена инвазивная $pT_{1-4}N_xM_x$ эндометриоидная аденокарцинома в удаленной матке у 56 больных перименопаузального возраста, а также биоптаты эндометрия 30 женщин с нормальным пролиферативным эндометрием.

Результаты. Установлено, что уровень экспрессии рецепторов эстрогена- α и прогестерона в клетках желёз и стромы эндометриоидной аденокарциномы достоверно ниже, чем соответствующие показатели в нормальном пролиферативном эндометрии: медиана уровня экспрессии рецепторов эстрогенов- α в опухолевых железах – 6,0 (5,0; 7,0) балла, в железах пролиферативного эндометрия – 7,0 (6,0; 8,0) балла ($p < 0,05$); медиана уровня экспрессии рецепторов эстрогена- α в опухолевой строме – 5,0 (4,0; 6,0) балла, а в строме пролиферативного эндометрия – 7,0 (6,0; 7,0) балла ($p < 0,05$). Уровень экспрессии рецепторов прогестерона в опухолевых железах и опухолевой строме достоверно ниже, чем соответствующие показатели в нормальном пролиферативном эндометрии: медиана уровня экспрессии рецепторов прогестерона в опухолевых железах – 7,0 (6,0; 8,0) балла, в железах пролиферативного эндометрия – 8,0 (7,0; 8,0) балла ($p < 0,05$); медиана уровня экспрессии рецепторов прогестерона в опухолевой строме – 6,0 (4,0; 6,0) балла, а в строме пролиферативного эндометрия – 7,0 (7,0; 7,0) ($p < 0,05$). Характерным отличием эндометриоидной аденокарциномы эндометрия от нормального пролиферативного эндометрия является более высокая величина соотношения уровней экспрессии рецепторов эстрогена- α и прогестерона в железах и строме опухоли: медиана соотношения уровней экспрессии рецепторов эстрогена- α и прогестерона в железах и строме опухоли составляет 1,17 и 1,33, соответствующие показатели в пролиферативном эндометрии для обоих типов рецепторов составляют 1,00. В клетках желёз эндометриоидной аденокарциномы эндометрия имеет место статистически достоверно более высокий уровень экспрессии Ki-67 (медиана уровня экспрессии – 2,0 балла), p53 (медиана уровня экспрессии – 11,50%), p16 (медиана уровня экспрессии – 57,08 УЕОП) и более низкий уровень экспрессии каспазы 3 (медиана уровня экспрессии – 48,54 УЕОП), в сравнении с уровнями экспрессии этих маркеров в клетках желёз нормального пролиферативного эндометрия (медиана уровней экспрессии Ki-67 – 1 балл, p53 – 3,00%, p16 – 33,46 УЕОП, каспазы 3 – 65,02 УЕОП). В клетках опухолевой стромы медиана уровня экспрессии p16 и каспазы 3 составляет 3,22 и 43,87 УЕОП, что статистически достоверно ниже этих показателей стромы пролиферативного эндометрия (10,33 и 53,50 УЕОП соответственно).

Выводы. Инвазивная эндометриоидная аденокарцинома эндометрия отличается от нормального пролиферативного эндометрия утратой чувствительности клеток опухолевых желёз и стромы к гармонизирующим регуляторным сигналам эстрогена и прогестерона; повышенной экспрессией p53 и p16, свидетельствующей о нарушениях p53- и p16-ассоциированных механизмов контроля клеточного цикла; а также повышенным уровнем пролиферации и пониженным уровнем апоптоза опухолевых клеток.

Порівняльна імуногістохімічна характеристика експресії рецепторів естрогену- α та прогестерону, p16 і p53, Ki-67 і каспази 3 в інвазивній ендометріоїдній аденокарциномі тіла матки та в проліферативному ендометрії

В. О. Туманський, О. В. Чепець

Рак ендометрію посідає шосте місце у світі за кількістю зареєстрованих нових випадків хвороби та при пізній діагностиці має непередбачуваний прогноз у жінок. У прогнозуванні перебігу раку ендометрію велике значення має імуногістохімічне дослідження пухлини.

Мета роботи – порівняльна характеристика експресії рецепторів естрогену- α та прогестерону, p16 і p53, Ki-67 і каспази 3 клітинами ендометріоїдної аденокарциноми ендометрію та нормального проліферативного ендометрію.

Матеріали та методи. Імуногістохімічними та морфометричними методиками досліджена інвазивна $pT_{1-4}M_xN_x$ ендометріоїдна аденокарцинома у видаленій матці 56 хворих перименопаузального віку, а також біоптати ендометрію 30 жінок із нормальним проліферативним ендометрієм.

Результати. Встановили, що рівень експресії рецепторів естрогену- α та прогестерону у клітинах залоз і стромі ендометріоїдної аденокарциноми є вірогідно нижчим за відповідні показники в нормальному проліферативному ендометрії: медиана рівня експресії рецепторів естрогенів- α в пухлинних залозах – 6,0 (5,0; 7,0) бала, у залозах проліферативного ендометрію – 7,0 (6,0; 8,0) бала ($p < 0,05$); медиана рівня експресії рецепторів естрогену- α в пухлинній стромі – 5,0 (4,0; 6,0) бала, а в стромі проліферативного ендометрію – 7,0 (6,0; 7,0) бала ($p < 0,05$). Рівень експресії рецепторів прогестерону в пухлинних залозах і в пухлинній стромі вірогідно нижчий за відповідні показники в нормальному проліферативному ендометрії: медиана рівня експресії

рецепторів прогестерону в пухлинних залозах – 7,0 (6,0; 8,0) бала, у залозах проліферативного ендометрію – 8,0 (7,0; 8,0) бала ($p < 0,05$); медіана рівня експресії рецепторів прогестерону в пухлинній стромі – 6,0 (4,0; 6,0) бала, а в стромі проліферативного ендометрію – 7,0 (7,0; 7,0) ($p < 0,05$). Характерною відмінністю ендометріодної аденокарциноми ендометрію від нормального проліферативного ендометрію є вища величина співвідношення рівнів експресії рецепторів естрогену- α та прогестерону в залозах і стромі пухлини: медіана співвідношення рівнів експресії рецепторів естрогену- α та прогестерону в залозах і стромі пухлини становить 1,17 і 1,33, відповідні показники в проліферативному ендометрії для обох типів рецепторів становлять 1,00. У клітинах залоз ендометріодної аденокарциноми ендометрію відзначено статистично вірогідно вищий рівень експресії Ki-67 (медіана рівня експресії – 2,0 бала), p53 (медіана рівня експресії – 11,50%), p16 (медіана рівня експресії – 57,08 УООЩ) і нижчий – експресії каспази 3 (медіана рівня експресії – 48,54 УООЩ) у порівнянні з рівнями експресії цих маркерів у клітинах залоз нормального проліферативного ендометрію (медіана рівнів експресії Ki-67 – 1 бал, p53 – 3,00%, p16 – 33,46 УООЩ, каспази 3 – 65,02 УООЩ). У клітинах пухлинної стромі медіана рівня експресії p16 і каспази 3 становить 3,22 і 43,87 УООЩ, що статистично вірогідно нижче за ці показники стромі проліферативного ендометрію (10,33 та 53,50 УООЩ відповідно).

Висновки. Інвазивна ендометріодна аденокарцинома ендометрію відрізняється від нормального проліферативного ендометрію втраатою чутливості клітин пухлинних залоз і стромі до гармонізуючого впливу регуляторних сигналів естрогену та прогестерону, підвищеною експресією p53 та p16, що свідчить про порушення в p53 та p16-асоційованих механізмах контролю клітинного циклу; а також підвищеним рівнем проліферації та зниженим рівнем апоптозу пухлинних клітин.

Ключові слова: карцинома ендометрію, рецептори естрогену- α , рецептори прогестерону, p53, p16, Ki-67, каспаза 3.

Патологія. – 2016. – №1 (36). – С. 22–28

Comparative immunohistochemical characteristics of expression of estrogen receptors-alpha, progesterone receptors, p16, p53, Ki-67 and caspase 3 in invasive endometrial adenocarcinoma and normal proliferative endometrium

V. A. Tumanskiy, A. V. Chepets

Endometrial cancer occupies the sixth place among newly diagnosed neoplasms in women. In late stage it has unpredictable prognosis. Immunohistochemical studies of the tumor are very important for prognosis of tumor course.

The aim. To characterize the expression of the estrogen receptors-alpha, progesterone receptors, p53, p16, ki-67 and caspase 3 in the invasive endometrioid endometrial adenocarcinoma compared with the normal proliferative endometrium.

Materials and methods. The uterus of 56 women with the verified diagnosis of endometrial cancer (stage pT₁₋₄M_xN_x) and biopsies of 30 women with normal proliferative endometrium were analyzed. For this purpose, immunohistochemical and morphometrical studies were used.

Results: It was established that level of expression of estrogen receptors-alpha was significantly lower in tumor glands and stroma compared with normal proliferative endometrium: the median was 6.0 (5.0; 7.0) points for tumor glands and 7.0 (6.0; 8.0) points for glands of normal proliferative endometrium ($p < 0,05$); for stromal compartment medians were 5.0 (4.0; 6.0) points and 7.0 (6.0; 7.0), respectively ($p < 0,05$). The level of expression of progesterone receptors showed the similar pattern and also was significantly lower in tumor glands and stroma compared with normal tissue. Medians were 7.0 (6.0; 8.0) points for tumor glands and 8.0 (7.0; 8.0) points for normal proliferative endometrium ($p < 0,05$). Medians of expression of progesterone receptors in stroma were 6.0 (4.0; 6.0) points for tumor and 7.0 (7.0; 7.0) for normal endometrial tissue ($p < 0,05$). The distinctive feature of endometrial adenocarcinoma was significantly higher ratio of expression of estrogen receptors-alpha and progesterone receptors in tumor glands and stroma (medians were 1.17 and 1.33, respectively) compared with normal proliferative endometrium (medians for glands and stroma were the same and equaled 1.00). Also it was shown that levels of expression of Ki-67 (the median was 2.0 points), p53 (the median – 11.50%), p16 (the median – 57.08 CUOD) were statistically significantly higher and caspase 3 expression level was statistically significantly lower (the median – 48.54 CUOD) in cells of adenocarcinoma of endometrium compared with normal proliferative endometrium, where the medians for these markers were as follows: the median for Ki-67 was 1.0 point, p53 – 3.00%, p16 – 33.46 CUOD and caspase 3 – 65.02 CUOD. In the stromal component of tumor medians of expression of p16 and caspase 3 were 3.22 and 43.87 CUOD. This was statistically significantly lower than in normal endometrial tissue (the median for p16 – 10.33 CUOD and for caspase 3 – 53.50 CUOD respectively).

Conclusions. Invasive endometrioid adenocarcinoma of the endometrium loses the sensitivity of tumor glandular and stromal cells to harmonizing regulatory signals of estrogen and progesterone in comparison with normal proliferative endometrium. Endometrioid adenocarcinoma has increased expression levels of p53 and p16, elevated level of proliferation and a reduced level of apoptosis of tumor cells compared to cells of normal endometrium.

Key words: Endometrial Neoplasms, Estrogen Receptor Alpha, Progesterone Receptors, Tumor Suppressor Protein p53, Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p16, Ki-67 Antigen, Caspase 3.

Pathologia. 2016; №1 (36): 22–28

По числу ежегодно регистрируемых в мире новых случаев болезни рак эндометрия занимает среди онкологических заболеваний у женщин шестое место [1]. По данным глобальной статистики GLOBOCAN, в 2012 году зарегистрировано 320 тысяч новых случаев рака эндометрия, при этом он стал причиной смерти 76 тысяч пациенток, что составило 2,1% всех случаев смерти женщин, страдавших злокачественными новообразованиями [2]. При ранней диагностике и радикальном

лечении рака эндометрия в его неинвазивной стадии уровень 5-летней выживаемости женщин составляет около 95%, при более поздней диагностике заболевание имеет непредсказуемый прогноз [3].

К биологическим сывороточным маркерам аденокарциномы эндометрия относят раковоэмбриональный антиген, муциноподобные гликопротеины CA 19-9, CA 72-4, CA 125, CA 15-3, гликопротеин SCC, хорионический гонадотропин человека, фактора роста эндотелия

сосудов (VEGF), специфический полипептид TPS, фрагмент цитокератина Cyfra 21-1 [4]. Учитывая последние достижения протеомики, рекомендуют также определение уровней сывороточных белков, кодируемых генами *ORM1*, *HP*, *SERPINC1*, *SERPINA3*, *ApoA4*, *ITIH4*, *HRG*, которые рассматриваются в качестве потенциальных биомаркеров рака эндометрия [5]. Однако единого мнения о прогностической роли вышеперечисленных маркеров пока не сложилось. I. B. Engelsen et al. [6] при анализе биомаркеров эндометриального рака, таких как уровни экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона, рецепторов эпителиального фактора роста (EGFR) и фактора роста фибробластов (FGFR2), E/P-кадгерина и бета-катенина, а также изменений генов *K-ras*, *HER2/neu*, *PTEN*, *p53*, *p21*, *CDKN2A*, *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, *PMS1*, *PMS2*, пришли к выводу о том, что они напрямую не ассоциированы с прогнозом рака эндометрия.

В последние годы большое внимание уделяется иммуногистохимическому (ИГХ) определению уровней экспрессии опухолевыми клетками рецепторов к эстрогену и прогестерону, регуляторных белков *p53* и *p16*, маркеров клеточной пролиферации и апоптоза, которые дают основание прогнозировать течение аденокарциномы эндометрия [7–10, 12, 13]. Для объективной оценки прогностической роли этих маркеров в прогрессировании аденокарциномы эндометрия большое значение имеет сравнительный ИГХ анализ их экспрессии в инвазивной опухоли и в нормальном пролиферативном эндометрии.

Цель работы

Охарактеризовать экспрессию рецепторов эстрогена- α и прогестерона, регуляторных белков *p16* и *p53*, маркера клеточной пролиферации *Ki-67* и фермента апоптотического каскада каспазы 3 клетками инвазивной эндометриальной аденокарциномы эндометрия в сравнении с нормальным пролиферативным эндометрием.

Материалы и методы исследования

У 56 женщин 43–69 лет, больных инвазивной $pT_{1-4}N_xM_x$ эндометриальной аденокарциномой эндометрия (ЭАЭ), в удалённой матке проведены патогистологические и ИГХ исследования опухоли. Вырезанные кусочки из основного массива ЭАЭ и из зоны её инвазии в миометрий фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине и заливали в парафин. В гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, определяли гистологический вариант и степень распространённости опухоли в матке. Группу сравнения составили соскобы эндометрия 30 женщин перименопаузального возраста, у которых на основании клинических и морфологических данных был диагностирован эндометрий фазы пролиферации.

ИГХ исследование проводили по стандартной методике [14] с использованием первичных моноклональных кроличьих антител против рецептора эстрогена- α (ER- α) *Clone SP1* (фирмы «Thermo Scientific», США), против рецептора прогестерона (PR) *Clone SP2* (фирмы «Thermo Scientific», США), моноклональных мышинных антител против *Ki-67 Clone MIB-1* (фирмы «DAKO», Дания),

каспазы 3 *Clone 3CSP* (фирмы «Thermo Scientific», США), *p16 Clone G175-405* (фирмы «BioGenex», США), *p53 Clone DO-7* (фирмы «DAKO», Дания), а также системы детекции EnVision FLEX с диаминобензидином («DAKO», США). Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в бальзам.

Уровень ядерной экспрессии рецепторов эстрогена- α (РЭ- α) и рецепторов прогестерона (РП) оценивали по шкале D. C. Allred [15] как сумму баллов количества иммунопозитивных (ИПЗ) клеток и интенсивности окрашивания их ядер: наличие 0,1–1% ИПЗ клеток = 1 баллу, 2–10% клеток = 2 баллам, 11–33% клеток = 3 баллам, 34–66% клеток = 4 баллам, 67–100% клеток = 5 баллам; отсутствие ИГХ-окрашивания ядер = 0 баллов, слабое окрашивание = 1 баллу, умеренное = 2 баллам, выраженное ИГХ-окрашивание ядер = 3 баллам.

Пролиферативную активность клеток ЭАЭ определяли по ядерной экспрессии *Ki-67* в баллах по B. Risberg et al. [16]: 0 баллов = 0–5% клеток с ИПЗ ядрами, 1 балл = 6–25%, 2 балла = 26–50%, 3 балла = 51–75%, 4 балла = 76–100% клеток с ИПЗ ядрами. Низкий уровень экспрессии соответствовал 1 баллу, умеренный – 2–3 баллам, высокий уровень экспрессии – 4 баллам.

Низкий уровень экспрессии *p53* регистрировали при наличии <10% клеток ЭАЭ с ИПЗ ядрами, высокий уровень – при наличии 11–29% ИПЗ клеток, свидетельством гиперэкспрессии *p53* было наличие $\geq 30\%$ ИПЗ клеток [17].

Экспрессию *p16*, каспазы 3 опухолевыми клетками оценивали методом фотоцифровой морфометрии [18] с использованием программы ImageJ [19] в стандартизованной площади фотоцифрового изображения гистологического среза опухоли в фотокамере Camedia C5060WZ («Olympus», Япония), снятого в микроскопе Axioplan 2 («Carl Zeiss», ФРГ) при увеличении $\times 200$, и градуировали в условных единицах оптической плотности (УЕОП) на 4 уровня: негативная реакция – 0–20 УЕОП; низкий уровень экспрессии – 21–50 УЕОП; умеренный уровень экспрессии – 51–100 УЕОП; высокий уровень экспрессии – более 100 УЕОП.

Результаты исследования статистически обработали при помощи статистического пакета «Statistica® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., лицензия №АХХR712D833214FAN5). Вычисляли медиану уровня экспрессии (Me), нижнюю и верхнюю квартили (Q_1 , Q_3). Для анализа различий экспрессии прогностических ИГХ маркеров в ЭАЭ и нормальном пролиферативном эндометрии рассчитывали непараметрический U-критерий Манна-Уитни для несвязанных групп. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что в нормальном пролиферативном эндометрии экспрессия РЭ- α и РП наблюдается в ядрах железистого и покровного эпителия, а также в ядрах фибробластов стромы эндометрия; в ЭАЭ экспрессия РЭ- α и РП определяется в клетках опухолевых желёз и фибробластах опухолевой стромы.

Сравнительная характеристика экспрессии прогностических иммуногистохимических маркеров в инвазивной эндометриальной аденокарциноме эндометрия и в нормальном пролиферативном эндометрии

ИГХ маркер	Локализация экспрессии	Уровень экспрессии		p
		В эндометриальной аденокарциноме эндометрия	В нормальном пролиферативном эндометрии	
		Me _{ЭАЭ} (Q ₁ ; Q ₃)	Me _{ПЭ} (Q ₁ ; Q ₃)	
РЭ- α	железы	6,0 (5,0; 7,0) балла	7,0 (6,0; 8,0) балла	0,00422*
	стромы	5,0 (4,0; 6,0) балла	7,0 (6,0; 7,0) балла	0,00001*
	железы/стромы	1,17 (0,86; 1,60)	1,00 (1,00; 1,14)	0,04537*
РП	железы	7,0 (6,0; 8,0) балла	8,0 (7,0; 8,0) балла	0,00922*
	стромы	6,0 (4,0; 6,0) балла	7,0 (7,0; 7,0) балла	0,00001*
	железы/стромы	1,33 (1,00; 1,50)	1,00 (1,00; 1,14)	0,03698*
p53	железы	11,50 (4,00; 28,50)%	3,00 (2,00; 4,00)%	0,00037*
p16	железы	57,08 (40,87; 72,45) УЕОП	33,46 (10,93; 49,46) УЕОП	0,00201*
	стромы	3,22 (2,12; 4,04) УЕОП	10,33 (4,81; 57,59) УЕОП	0,01428*
Ki-67	железы	2,0 (2,0; 3,0) балла	1,0 (1,0; 1,0) балла	0,00001*
	стромы	1,0 (1,0; 1,0) балла	1,0 (0,0; 1,0) балла	0,04071*
Каспаза 3	железы	48,54 (38,88; 57,26) УЕОП	65,02 (37,28; 74,05) УЕОП	0,04579*
	стромы	43,87 (30,36; 67,46) УЕОП	53,50 (47,22; 56,02) УЕОП	0,43994*

Примечания: Me_{ЭАЭ} – медиана уровня экспрессии иммуногистохимического маркера в ЭАЭ; Me_{ПЭ} – медиана уровня экспрессии иммуногистохимического маркера в нормальном пролиферативном эндометрии; * – p<0,05 – уровни экспрессии отличаются со статистической вероятностью 95%.

Уровень экспрессии РЭ- α в клетках инвазивной ЭАЭ статистически достоверно ниже уровня его экспрессии в клетках пролиферативного эндометрия: медиана уровня экспрессии РЭ- α составила 6,0 (5,0; 7,0) балла в опухолевых клетках и 5,0 (4,0; 6,0) балла в клетках опухолевой стромы, тогда как соответствующие показатели в пролиферативном эндометрии составили 7,0 (6,0; 8,0) балла в железах и 7,0 (6,0; 7,0) балла в клетках стромы (p<0,05) (табл. 1). Уровень экспрессии РП в клетках ЭАЭ также статистически достоверно ниже, чем в нормальном пролиферативном эндометрии: медиана уровней экспрессии РП в опухолевых железах составила 7,0 (6,0; 8,0) балла, в клетках опухолевой стромы 6,0 (4,0; 6,0) балла; соответствующие показатели в нормальном пролиферативном эндометрии составили 8,0 (7,0; 8,0) балла в железах и 7,0 (7,0; 7,0) балла в строме (p<0,05) (табл. 1).

Снижение экспрессии рецепторов к эстрогену и прогестерону в ЭАЭ по сравнению с пролиферативным эндометрием, по мнению В. Bender et al. [8], отражает нарушения внутриклеточной регуляции сигнальных путей из-за мутаций или эпигенетических модификаций в генах опухолевых клеток, которые приводят к снижению или утрате регуляторного влияния стероидных гормонов на опухоль и к автономизации её роста.

По сравнению с пролиферативным эндометрием в ЭАЭ определяется более высокое соотношение уровней экспрессии РЭ- α и РП в железах и в строме: медиана соотношений уровней экспрессии РЭ- α в опухолевых и в стромальных клетках составляет 1,17 (0,86; 1,60); данный показатель экспрессии РП в опухолевых и в стромальных клетках равен 1,33 (1,00; 1,50). В нормальном пролиферативном эндометрии медиана соотношений уровней экспрессии РЭ- α в клетках желез и в клетках

стромы равна 1,00 (1,00; 1,14); соответствующий показатель соотношений уровней экспрессии РП также составляет 1,00 (1,00; 1,14) (табл. 1). Сходные данные были получены Н. Kreizman-Shefer et al. [21]. Таким образом, в ЭАЭ наблюдается более значительное снижение уровней экспрессии РЭ- α и РП в клетках стромы, чем в опухолевых клетках, что свидетельствует о разобщении взаимосвязанных паракринных регуляторных сигналов стероидных гормонов, влияющих на развитие опухолевых желез и стромы.

Установлено, что в 89,28% ЭАЭ (50 наблюдений) определяется экспрессия рецепторов обоих стероидных гормонов (РЭ- α +/РП+), в 7,14% карцином (4 наблюдения) экспрессия гормональных рецепторов не обнаружена (РЭ- α -/РП-), в 1,79% ЭАЭ определяется моноэкспрессия рецепторов только эстрогена- α (РЭ- α + /РП-), в 1,79% карцином выявляется моноэкспрессия рецепторов только прогестерона (РЭ- α -/РП+). На значительные различия стероид-рецепторного статуса ЭАЭ также указывают А. А. Zidan et al. [7] В. А. Туманский и др. [12], А. D. Stănescu et al. [13], наблюдавшие 40–50% РЭ-позитивных аденокарцином эндометрия, 50–90% РП-позитивных опухолей и около 10% РЭ- и РП-негативных ЭАЭ. В рекомендациях ESMO-ESGO-ESTRO консенсус-конференции по эндометриальному раку 2016 года [3] подчёркнуто, что уровень экспрессии РЭ- α коррелирует с выживаемостью больных, и его высокие показатели являются благоприятным прогностическим фактором, в то время как отсутствие РП даже на ранних стадиях опухоли является предиктором неблагоприятного исхода, а низкий уровень РП является предиктором метастазов в лимфатические узлы. Утрата экспрессии РЭ- α предполагает выраженные молекулярные повреждения в клетках

опухоли, приводящие к дерегуляции внутриклеточных сигнальных путей из-за инактивации или мутации гена PTEN [17], метилирования гена РЭ-а и aberrантного метилирования CpG-островков ДНК [20].

Проведённые исследования показали, что экспрессия p53 в клетках желёз нормального пролиферативного эндометрия ИГХ методиками не выявляется или определяется менее чем в 5% клеток. Негативная или крайне низкая экспрессия протеина p53 обусловлена быстрой его деградацией в нормальных условиях. Медиана уровня экспрессии p53 в нормальном пролиферативном эндометрии составляет всего 3,00 (2,00; 4,00)% (табл. 1).

Позитивная экспрессия p53 обнаружена в 89,29% инвазивных ЭАЭ, p53-негативные опухоли составили 10,71% наблюдений, что соответствует данным М. М. Баударбековой [22]. Медиана уровня экспрессии p53 в клетках ЭАЭ достоверно выше, чем в клетках желёз нормального пролиферативного эндометрия и составляет 11,50 (4,00; 28,50)% ($p < 0,05$). В 35,71% ЭАЭ наблюдается низкий уровень экспрессии p53, в 33,93% опухолей – высокий уровень экспрессии p53. В 19,65% ЭАЭ выявляется гиперэкспрессия протеина p53, которая связывается с мутацией гена TP53 [23] и синтезом нефункционирующего белка p53, устойчивого к воздействию внутриклеточных протеаз, ответственных за его деградацию.

Установлено, что в ядре и в цитоплазме железистых и стромальных клеток ЭАЭ и пролиферативного эндометрия обнаруживается очаговая экспрессия регуляторного белка клеточного цикла p16. Экспрессия p16 выявлена в 87,50% ЭАЭ, 12,5% ЭАЭ были p16 негативными. В p16-позитивных опухолях в железах ЭАЭ уровень экспрессии p16 выше, чем в железах нормального пролиферативного эндометрия: медиана уровня экспрессии p16 в опухолевых железах составляет 57,08 (40,87; 72,45) УЕОП, а в пролиферативных железах эндометрия – 33,46 (10,93; 49,46) УЕОП ($p < 0,05$) (табл. 1). Одновременно установлено, что в клетках стромы ЭАЭ медиана уровня экспрессии p16 достоверно ниже, чем в стромальных клетках пролиферативного эндометрия (3,22 (2,12; 4,04) УЕОП и 10,33 (4,81; 57,59) УЕОП соответственно ($p < 0,05$)). Известно, что увеличение уровня экспрессии белка p16 характеризует нарушение p16-ассоциированного механизма контроля клеточного цикла, ведущего к подавлению активации апоптоза генетически изменённых опухолевых клеток [17]. А. К. Milde-Langosch et al. [24] выявили увеличение экспрессии всех компонентов этого механизма в опухолевых клетках большинства злокачественных новообразований тела матки.

При ИГХ исследовании экспрессии Ki-67 обнаружен умеренный уровень клеточной пролиферации в инвазивной ЭАЭ: медиана уровня экспрессии Ki-67 в опухолевых клетках составляет 2,0 (2,0; 3,0) балла, а в строме 1,0 (1,0; 1,0) балла ($p < 0,05$) (табл. 1). Однако он почти в 2 раза превышал низкий уровень клеточной пролиферации в нормальном пролиферативном эндометрии, в котором медиана экспрессии Ki-67 в железах и в клетках стромы равна 1,0 (1,0; 1,0) балла. А. D. Stănescu et al.

[13] и Н. Kreizman-Shefer et al. [21] также подтвердили повышенный уровень клеточной пролиферации в аденокарциномах эндометрия, в которых Ki-67-позитивные клетки составляют от 15% до 80% опухолевых клеток.

Экспрессия каспазы 3 обнаруживается в цитоплазме и в ядрах клеток желёз и стромы ЭАЭ и нормального пролиферативного эндометрия. Выявлено, что уровень экспрессии каспазы 3 в клетках желёз и стромы ЭАЭ достоверно более низкий, чем в соответствующих клетках нормального пролиферативного эндометрия: медиана уровня экспрессии каспазы 3 в опухолевых железах составляет 48,54 (38,88; 57,26) УЕОП, а в железах нормального эндометрия – 65,02 (37,28; 74,05) УЕОП, ($p < 0,05$) (табл. 1). Медиана уровня экспрессии каспазы 3 в клетках стромы ЭАЭ составляет 43,87 (30,36; 67,46) УЕОП, а в клетках стромы нормального эндометрия – 53,50 (47,22; 56,02) УЕОП (табл. 1). Это свидетельствует о снижении каспазы 3-ассоциированного апоптоза опухолевых клеток в ЭАЭ и соответствует данным Z. L. Guo et al. [25], также обнаружившим более низкий уровень экспрессии каспазы 3 в опухолевых клетках аденокарциномы эндометрия по сравнению с нормальным эндометрием.

Таким образом, результаты проведённых исследований свидетельствуют о том, что инвазивная эндометриоидная аденокарцинома эндометрия отличается от нормального пролиферативного эндометрия утратой чувствительности клеток опухолевых желёз и стромы к гармонизирующим регуляторным сигналам эстрогена-а и прогестерона; повышенной экспрессией p53 и p16, свидетельствующей о нарушениях p53- и p16-ассоциированных механизмов контроля клеточного цикла; а также повышенным уровнем пролиферации и пониженным уровнем апоптоза опухолевых клеток.

Выводы

1. В клетках опухолевых желёз и стромы инвазивной эндометриоидной аденокарциномы эндометрия имеет место статистически достоверно более низкий уровень ядерной экспрессии рецепторов эстрогена-а и рецепторов прогестерона (в сравнении с соответствующими параметрами нормального пролиферативного эндометрия) и одновременно более высокая величина соотношения уровней экспрессии рецепторов эстрогена-а и прогестерона в железах и строме: для рецепторов эстрогена-а данное соотношение составляет 1,17, а для рецепторов прогестерона – 1,33 (в пролиферативном эндометрии данное соотношение уровней экспрессии обоих типов рецепторов в железах и строме равно 1,00).

2. В клетках опухолевых желёз инвазивной эндометриоидной аденокарциномы эндометрия имеет место статистически достоверно более высокий уровень экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67, p53, p16 и более низкий уровень экспрессии фермента каспазы 3, а также более низкий уровень экспрессии p16 и каспазы 3 в клетках опухолевой стромы (в сравнении с уровнями экспрессии этих маркеров в соответствующих клетках нормального пролиферативного эндометрия).

Конфликт интересов: отсутствует.

Список литературы

- Stewart B.W. World cancer report 2014: IARC / B.W. Stewart, Ch.P. Wild. – Geneva : WHO Press., 2014. – 630 p.
- Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 / J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit et al. // *International Journal of Cancer*. – 2015. – Vol. 136. – №5. – P. 359–E386.
- Colombo N. ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer. Diagnosis, Treatment and Follow-up. / N. Colombo, C. Creutzberg, F. Amant et al. // *International Journal of Gynecologic Cancer*. – 2016. – Vol. 26. – №1. – P. 1–30.
- Ютака Уеда. Сывороточные маркеры для раннего выявления гинекологического рака / Ютака Уеда, Такаюки Еномото, Тошихиро Кимура и др. // *Репродуктивная эндокринология*. – 2013. – №6(14). – С. 73–80.
- Молекулярные маркеры рака эндометрия (обзор литературы) / Н.Е. Левченко, К.П. Лактионов, М.А. Таипов и др. // *Опухоли женской репродуктивной системы*. – 2013. – Т. 3–4. – С. 86–89.
- Engelsen I.B. Biologic markers in endometrial cancer treatment / I.B. Engelsen, L.A. Akslen, H.B. Salvesen // *APMIS*. – 2009. – Vol. 117(10). – P. 693–707.
- Selected immunohistochemical prognostic factors in endometrial hyperplasia versus carcinoma / A.A. Zidan, A.A. Hassan, Sh. Abu Seadah et al. // *Journal of American Science*. – 2015. – Vol. 11(4). – P. 14–22.
- Bender D. Hormone receptors and endometrial cancer / D. Bender, T. Buekers, K.K. Leslie // *Proc Obstet Gynecol*. – 2011. – Vol. 2(1). – P. 1–25.
- Диагностическая и прогностическая значимость оценки пролиферативной активности клеточных популяций эндометрия при гиперпластических и неопластических процессах (обзор литературы) / Е.В. Махина, А.К. Пичигина, Е.В. Колдышева и др. // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – №10. – С. 420–427.
- Иммуногистохимические критерии прогноза при раке эндометрия (обзор литературы) / А.Л. Чернышова, Л.А. Коломиец, Н.В. Бочкарева и др. // *Сибирский онкологический журнал*. – 2010. – №1(37). – С. 79–84.
- Захарцева Л.М. Морфологические и иммуногистохимические критерии прогноза при раке эндометрия (обзор литературы) / Л.М. Захарцева, Л.И. Воробьева, Е.П. Манжура // *Онкология*. – 2001. – Т. 3. – №4. – С. 252–256.
- Туманский В.А. Исследование рецепторов эстрогенов и прогестерона при железистой гиперплазии, атипичной гиперплазии и аденокарциноме эндометрия / В.А. Туманский, М.М. Баударбекова // *Патология*. – 2009. – Т. 6. – №2. – С. 111–113.
- Prognostic biomarkers in endometrial adenocarcinoma / A.D. Stanescu, I. Nistor, A.G. Poteca, D. Ditescu, M. Comanescu // *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. – 2014. – Vol. 55(4). – P. 1339–1344.
- Diagnostic Immunohistochemistry / Ed. by D.J. Dabbs. – 3rd ed. – Philadelphia : Saunders/Elsevier, 2010. – 951 p.
- Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis / D.C. Allred, J.M. Harvey, M. Berardo, G.M. Clark // *Mod. Path.* – 1998. – Vol. 11. – P. 155–168.
- Dissociated expression of Bcl-2 and Ki-67 in endometrial lesions: diagnostic and histogenetic implications / B. Risberg, K. Karlsson, V. Abeler et al. // *International Journal of Gynecological Pathology*. – 2002. – Vol. 21(2). – P. 155–160.
- Buchynska L. G. Expression of the cell cycle regulators p53, p21WAF1/CIP1 and p16INK4A in human endometrial adenocarcinoma / L.G. Buchynska, I.P. Nesina // *Experimental Oncology*. – 2006. – №28(2). – P. 152–155.
- Патент України на корисну модель № 99314 Україна, МПК (2015) G01N 21/00, G06K 9/00. Спосіб фотоцифрової морфометрії імуногістохімічних препаратів / В.О. Туманський, А.В. Євсєєв, І.С. Коваленко, М.Д. Зубко; заявник та патентовласник Запорізький держ. мед. ун-т. – №u 2014 14 103; заявл. 29.12.2014; опубл. 25.05.1 // *Бюлетень*. – №10.
- Rasband W.S. National Institutes of Health [Электронный ресурс] / W.S. Rasband, J. Image. – Bethesda, Maryland. – Режим доступа: USA – <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2016.
- Methylation analysis of tumor suppressor genes in endometrial carcinoma of endometrium using MS-MLPA / E. Dvorakova, M. Chmelarova, J. Laco et al. // *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký*. – Olomouc, Czechoslovakia. – 2013. – Vol. 157. – P. 298–303.
- Distribution of estrogen and progesterone receptors isoforms in endometrial cancer. [Электронный ресурс] / H. Kreizman-Shefer, J. Pricop, S. Goldman et al. // *Diagnostic Pathology*. – 2014. – №77. – Режим доступа: <http://diagnosticpathology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-1596-9-77>.
- Баударбекова М.М. Особливості імуногістохімічного профілю інвазивних аденокарцином ендометрія / М.М. Баударбекова // *Патологія*. – 2011. – Т. 8. – №3. – С. 62–64.
- Reproducibility of histological cell type in high-grade endometrial carcinoma / G. Han, D. Sidhu, M.A. Duggan et al. // *Modern Pathology*. – 2013. – №26. – P. 1594–1604.
- Expression of cell-cycle regulatory proteins in endometrial carcinomas: correlations with hormone receptor status and clinicopathologic parameters / K. Milde-Langosch, A. Bamberger, C. Goemann et al. // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2001. – Vol. 127. – P. 537–44.
- Expression and relationship of Ezh2, Runx3 and caspase-3 in endometrial adenocarcinoma / Z. L. Guo, K. Chen, X.Q. Wang, W. Hu // *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. – 2011. – Vol. 40(6). – P. 387–391.

References

- Stewart, B. W., & Wild, Ch. P. (2014). *World cancer report 2014: IARC*. Geneva: WHO Press.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers C., Rebelo, M., et al. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), 359–386. doi: 10.1002/ijc.29210.
- Colombo, N., Creutzberg, C., Amant, F., Bosse, T., González-Martín, A., Ledermann, J., et al. (2016). ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer. Diagnosis, Treatment and Follow-up. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 26(1), 1–30. doi: 10.1097/IGC.0000000000000609.
- Yutaka, Ueda, Takayuki, Enomoto, Toshihiro, Kimura, Takashi, Miyatake, Kiyoshi, Yoshino, Masami, Fujita, & Tadashi, Kimura. (2013). Syvorochnye markery dlya rannego vyyavleniya ginekologicheskogo raka [Serological markers for early detection of gynecological cancer]. *Reproduktivnaya endokrinologiya*, 6(14), 73–80. [in Ukrainian].
- Levchenko, N. E., Laktionov, K. P., Taipov, M. A., Titova, M. S., & Shevchenko, V. E. (2013). Molekulyarnye markery raka endometriya (Obzor literatury) [Molecular markers of endometrial cancer (review of literature)]. *Opukholi zhenskoj reproductivnoj sistemy*, 3–4, 86–89. [in Russian].
- Engelsen, I. B., Akslen, L. A., & Salvesen, H. B. (2015). Biologic markers in endometrial cancer treatment. *APMIS*, 117(10), 693–707. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02467.x.
- Zidan, A. A., Hassan, A. A., Seadah, Sh. Sh. A., Ibrahim, E. H., & Attiah, S. M. (2015). Selected immunohistochemical prognostic factors in endometrial hyperplasia versus carcinoma. *Journal of American Science*, 11(4), 14–22.
- Bender, D., Buekers, T., & Leslie, K.K. (2011). Hormone receptors and endometrial cancer. *Proceedings in Obstetrics and Gynecology*, 2(1), 1–25.
- Makhina, E. V., Pichigina, A. K., Koldysheva, E. V., Molodykh,

- O. P., & Lushnikova, E. L. (2014). Diagnosticheskaya i prognosticheskaya znachimost' ocenki proliferativnoj aktivnosti kletochnykh populyacij e'ndometriya pri giperplasticheskikh i neoplasticheskikh processakh (obzor literatury) [Diagnostic and prognostic value of assessment of endometrial cell proliferative activity in hyperplastic and neoplastic processes (Review)]. *Fundamental'nye issledovaniya*, 10, 420–427. [in Russian].
10. Chernyshova, A. L., Kolomic, L. A., Bochkareva, N. V., & Krickaya, N. G. (2010). Immunogistokhimicheskie kriterii prognoza pri rake e'ndometriya (obzor literatury) [Immunohistochemical prognostic criterias in endometrial cancer (Review)]. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal*, 1(37), 79–84. [in Russian].
11. Zakhareva, L. M., Vorob'eva, L. I., & Manzhura, E. P. (2001). Morfologicheskie i immunogistokhimicheskie kriterii prognoza pri rake e'ndometriya (Obzor literatury) [Morphological and immunohistochemical prognostic criterias in endometrial cancer (Review)]. *Onkologiya*, 3(4), 252–256. [in Ukrainian].
12. Tumanskiy, V. A., & Baudarbekova, M. M. (2009). Issledovanie receptorov e'strogenov i progesterona pri zhelezistoj giperplazii, atipichnoj giperplazii i adenokarcinome e'ndometriya [Research of the estrogen-receptors and progesterone-receptors in cases of simple hyperplasia, atypical hyperplasia and adenocarcinoma of endometrium]. *Patologiya*, 6(2), 111–113. [in Ukrainian].
13. Stanescu, A. D., Nistor, I., Poteca, A. G., Ditescu, D., & Comanescu, M. (2014). Prognostic biomarkers in endometrial adenocarcinoma. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 55(4), 1339–1344.
14. Dabbs D. J. (Ed.) (2010). *Diagnostic Immunohistochemistry*. Philadelphia: Saunders/Elsevier.
15. Allred, D. C., Harvey, J. M., Berardo, M., & Clark, G. M. (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern Pathology*, 11, 155–168.
16. Risberg, B., Karlsson, K., Abeler, V., Lagrelius, A., Davidson, B., & Karlsson, M. G. (2002). Dissociated expression of Bcl-2 and Ki-67 in endometrial lesions: diagnostic and histogenetic implications. *International Journal of Gynecological Pathology*, 21(2), 155–160. doi: 10.1097/00004347-200204000-00008.
17. Buchynska, L. G., & Nesina, I. P. (2006). Expression of the cell cycle regulators p53, p21 WAF1/CIP1 and p16INK4A in human endometrial adenocarcinoma. *Experimental Oncology*, 28(2), 152–155.
18. Tumanskiy, V. O., Yevsieiev, A. V., Kovalenko, I. S., Zubko, M. D., & Zaporizkyi derzhavnyi medychnyi universytet (patentee) (2015) Patent Ukrainy na korysnu model №99314 Ukrayina, MPK (2015) G01N 21/00, G06K 9/00. Sposib fototsyfrovoy morfometrii imunohistokhimichnykh preparativ №u 2014 14 103 [Ukraine patent for utility model №99314 Ukraine, IPC (2015) G01N 21/00, G06K 9/00. Method of photo digital morphometrical study of immunohistochemical micropreparations]. *Biuletyn*, 10. [in Ukrainian].
19. Rasband, W. S., & Image J, U. S. (1997–2016). National Institutes of Health. Bethesda, Maryland. – Retrieved from <http://imagej.nih.gov/ij/>.
20. Dvorakova, E., Chmelarova, M., Laco, J., & Spacek J. (2013). Methylation analysis of tumor suppressor genes in endometroid carcinoma of endometrium using MS-MLPA. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky*. Olomouc, Czechoslovakia, 157, 298–303.
21. Kreizman-Shefer, H., Pricop, J., Goldman, S., Elmalah, I., & Shalev, E. (2014). Distribution of estrogen and progesterone receptors isoforms in endometrial cancer. *Diagnostic Pathology*, 77, Retrieved from <http://diagnosticpathology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-1596-9-77>. doi: 10.1186/1746-1596-9-77.
22. Baudarbekova, M. M. (2011). Osoblyvosti imunohistokhimichnoho profilu invazyvnykh adenokartsynom endometrii [Features of immunohistochemical profile of invasive endometrial adenocarcinomas]. *Patologiya*, 8(3), 62–64. [in Ukrainian].
23. Han, G., Sidhu, D., Duggan, M. A., Arseneau, J., Cesari, M., Clement, P. B., et al. (2013). Reproducibility of histological cell type in high-grade endometrial carcinoma. *Modern Pathology*, 26, 1594–1604. doi:10.1038/modpathol.2013.102.
24. Milde-Langosch, K., Bamberger, A. M., Goemann, C., Rössing, E., Rieck, G., Kelp, B., & Löning, T. (2001). Expression of cell-cycle regulatory proteins in endometrial carcinomas: correlations with hormone receptor status and clinicopathologic parameters. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 127, 537–44. doi: 10.007/s004320100256.
25. Guo, Z. L., Guo, Z. L., Chen, K., Wang, X. Q., & Hu, W. (2011). Expression and relationship of Ezh2, Runx3 and caspase-3 in endometrial adenocarcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 40(6), 387–391.

Сведения об авторах:

Туманский В. А., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, директор Института клинической патологии человека.

Чепец А. В., аспирант каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: aleksandr-chepec@rambler.ru.

Відомості про авторів:

Туманський В. О., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний університет, директор Інституту клінічної патології людини.

Чепець О. В., аспірант каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний університет, E-mail: aleksandr-chepec@rambler.ru.

Information about authors:

Tumanskiy V. A., MD, PhD, DSci, Professor, Zaporizhzhia State Medical University, Head of the Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine.

Chepets A. V., Postgraduate Student, Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, E-mail: aleksandr-chepec@rambler.ru.

Надійшла в редакцію 11.04.2016 р.