

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ АПОПТОЗА В ЖЕЛЕЗИСТЫХ КЛЕТКАХ НОРМАЛЬНОГО ПРОЛИФЕРАТИВНОГО, ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКОГО И НЕОПЛАСТИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИЯ

В.А. КОВЯЗИН, И.И. БАБИЧЕНКО

Кафедра патологической анатомии РУДН. Москва. 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.8.

Медицинский факультет

И.А. КОСТЯНЯН, С.Н. ДРАНИЦЫНА

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Москва.

117871, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10

В статье представлены результаты исследования про- (HLDF, BAX, P53) и антиапоптозных (BCL-2) факторов в железистых клетках нормального пролиферативного, гиперпластического и неопластического эндометрия.

Результаты иммуногистохимических исследований показали, что антитела к фактору HLDF позволяют провести дифференциальную диагностику между доброкачественными и злокачественными процессами в эндометрии человека и могут быть использованы в качестве нового маркера для выявления ранних стадий анапластических процессов. Использование HLDF фактора в роли специфического маркера апоптоза дает возможность оценить уровень апоптотических процессов, происходящих в эндометрии. Онкомаркер опухолевого роста P53 позволяет провести дифференциальную диагностику атипической гиперплазии эндометрия и высокодифференцированной аденокарциномы эндометрия. Белки BCL-2 и BAX являются менее надежными онкомаркерами при проведении дифференциальной диагностики между нормально пролиферирующим, гиперпластическим и неопластическим эпителием эндометрия.

Комплексное исследование про- (HLDF, BAX, P53) и антиапоптозных (BCL-2) факторов свидетельствует об относительном увеличении процессов апоптоза при неопластической трансформации клеток.

Ключевые слова: Гиперплазия эндометрия – Аденокарцинома эндометрия – Апоптоз – Апоптотический индекс – HLDF – BCL-2 – BAX – P53

В структуре злокачественных опухолей рак эндометрия занимает третье место, а темпы роста показателей заболеваемости раком эндометрия значительно выше таковых при других злокачественных опухолях репродуктивной системы у женщин [3]. На долю рака тела матки приходится 6,5% всех случаев злокачественных новообразований, выявленных среди женского населения России [10]. Необходимо учитывать и тот факт, что, лечение рака эндометрия, как правило, проводится с опозданием, поскольку у 47% больных правильный диагноз ставится только через год после появления первых признаков заболевания; при этом до 30-40% больных умирают от прогрессирования болезни [5]. Реальные успехи практической онкологии почти исключительно определяются «удельным весом» ранних форм злокачественных опухолей, их надежным выявлением и своевременным адекватным лечением [7].

Центральное место среди предраковых состояний занимает атипическая гиперплазия эндометрия. Большинство исследователей рассматривает ее как пограничное состояние между типичной (железисто-кистозной) гиперплазией и начальной высокодифференцированной аденокарциномой эндометрия [8].

В качестве основных признаков атипической гиперплазии эндометрия выделены цитологическая атипия, преимущественно с ядерными изменениями, и отсутствие стромальной инвазии, свойственной аденокарциноме. Атипическую железистую гиперплазию эндометрия при исследовании соскобов сложно отличить от высокодифференцированных форм рака эндометрия. Поскольку для железистого рака характерен рост вместе с базальными мембранами [9], особенно трудно бывает выявить наличие инвазии, даже при импрегнации желез по Футу или при использовании иммуногистохимических методик. Это обстоятельство делает необходимым поиск новых морфологических критериев дифференциальной диагностики опухолей эндометрия.

При решении подобных задач наиболее перспективным направлением является исследование экспрессии факторов, контролирующих развитие процесса апоптоза [1]. К таким факторам относятся белки BCL-2, BAX, P53, а также новый фактор дифференцировки клеток HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor), молекулярной массой 8,2

кДа, обладающий ДНК/РНК-гидролизующей активностью. HLDF первоначально был выделен из среды культивирования промиелоцитарных лейкоэмических клеток человека HL-60, обработанных ретиноевой кислотой, и играет важную роль в процессе апоптоза клеток [6].

Результаты иммуногистохимических исследований предстательной железы человека позволяют сделать заключение, что HLDF может являться маркером апоптоза [2].

Целью настоящего исследования явилось выявление ранних изменений, происходящих на молекулярном уровне в гиперпластических и анапластических железистых клетках эндометрия для улучшения дифференциальной диагностики предраковых и раковых заболеваний эндометрия.

Материалы и методы.

Было исследовано 36 пациенток с нормальным пролиферативным эндометрием (НПЭ), 45 - с гиперплазией эндометрия (ГЭ) и 34 - с высокодифференцированной аденокарциномой эндометрия (ВАК). Средний возраст пациентов с патологиями эндометрия составлял 48 лет. За период с октября 2001 г. по ноябрь 2004 г. были отобраны соскобы эндометрия 115 пациентов, не получавших гормонального лечения.

В настоящем исследовании была использована классификация гиперпластических процессов эндометрия, предложенная в 1994 году Международным обществом гинекологов-патологов и ВОЗ, основанная на структурных и цитологических изменениях эндометрия.

У женщин с гиперплазиями эндометрия были выявлены следующие виды патологии: типичная железистая (железисто-кистозная) гиперплазия эндометрия (ТГЭ) (32 случая) и атипическая железистая гиперплазия эндометрия (АГЭ) (13 случаев).

Средний возраст больных с ТГЭ составлял 55 лет, АГЭ 50 лет, с ВАК 57 лет. Наибольшее количество выявленных случаев АГЭ приходилось на предменопаузальный период, тогда как ВАК была обнаружена у пациенток в постменопаузальном периоде.

Гистологический материал исследовали иммуногистохимическим методом [4]. Из фиксированных в нейтральном формалине и залитых в парафин кусочков ткани делали срезы толщиной 4-5 мкм и помещали по 3-4 на стекла, покрытые поли-L-лизинном, или обработанные раствором яичного альбумина.

Выявление тканевых антигенов проводили авидин-биотиновым методом, в котором биотинилированные вторичные антитела реагируют с соответствующими молекулами пероксидазно-конъюгированного стрептовицина. Метод обладает высокой чувствительностью и позволяет визуально обнаружить места расположения определяемых антигенов.

Для иммуногистохимического исследования эндометрия в качестве первичных иммунных сывороток использовали: 1) кроличьи поликлональные антитела к HLDF (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова); 2) мышинные моноклональные антитела к белку BCL-2 («Dako», USA); 3) мышинные моноклональные антитела к BAX («Dako», USA); 4) мышинные моноклональные антитела к P53 («Dako», USA). На каждом стекле один срез (контрольный) обрабатывали соответствующей немимунной сывороткой («Dako», USA). В качестве вторичных сывороток использовали антимышинные биотинилированные антитела козы («Dako», USA) и конъюгированную со стрептовидином полипероксидазу («Dako», USA).

Подсчет апоптотического индекса производили под световым микроскопом при увеличении объектива х20. Апоптотический индекс (АИ) был рассчитан по следующей формуле: $АИ = (Na/No) * 100$, где Na – количество апоптотических телец, No – общее количество ядер клеток (No=500).

Экспрессию фактора HLDF оценивали по его локализации в эпителиальных клетках эндометрия, P53 - по числу окрашенных пероксидазным методом ядер железистых клеток на 100 учтенных: (-) – отсутствие реакции, (+) – до 10% окрашенных ядер, (++) – более 10% окрашенных ядер. Экспрессия BCL-2 и BAX наблюдалась в цитоплазме кле-

ток, отличалась по интенсивности окрашивания и оценивалась плюсах: (-) – отсутствие реакции, (+) – слабая реакция, (++) – умеренная реакция, (+++) – сильная реакция.

Результаты исследований и их обсуждение.

В настоящей работе была впервые исследована экспрессия HLDF фактора в эндометрии человека при гиперпластических и неопластических процессах.

Проведенное иммуногистохимическое исследование с антителами к фактору HLDF в НПЭ и ТГЭ выявило его локализацию только на поверхности эпителиальных клеток в виде коричневой полоски (рис.1). В свою очередь, при АГЭ и ВАК фактор выявлялся в цитоплазме железистых клеток, апоптозных тельцах и некоторых ядрах. На рис.2 представлено иммуногистохимическое окрашивание ядер, цитоплазмы и апоптозных тел при АГЭ.

Различная локализации продуктов диаминобензидиновой реакции (ДАБ) в железах эндометрия объясняется особыми свойствами фактора HLDF, который обладает как дифференцирующей активностью, так и проявляет свойства неспецифической нуклеазы, гидролизующей молекулы нуклеиновых кислот по свободнорадикальному механизму. В пролиферативную фазу нормального менструального цикла, а также в случаях гиперплазии без атипии клеток в эндометрии HLDF выявляется на их поверхности. При атипической гиперплазии эндометрия и высокодифференцированной аденокарциноме продукты ДАБ окрашивают ядра, цитоплазму и апоптозные тельца в коричневый цвет.



Рис.1. Экспрессия HLDF фактора на поверхности железистых клеток эндометрия в виде полоски при типичной гиперплазии эндометрия (x250).

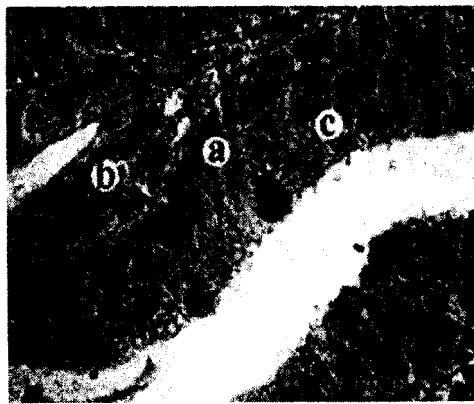


Рис.2. Экспрессия HLDF фактора в цитоплазме железистых клеток (а), в некоторых ядрах (b) и апоптозных тельцах (с) при атипичной гиперплазии эндометрия (x400).

Факт окрашивание и апоптозных телец, и ядер с цитоплазмой железистых клеток, по-видимому можно объяснить тем фактом, что экспрессия HLDF фактора происходит при запуске апоптоза в клетках при этом фактор достаточно стоек и сохраняется в цитоплазме после завершения нуклеосомальной фрагментации ДНК клеток.

На основании окрашивания апоптозных телец в коричневый цвет был произведен подсчет апоптотического индекса в нормальном пролиферативном, гиперпластическом и неопластическом эндометрии.

Апоптотический индекс в ТПЭ был близок к НПЭ, $5,4 \pm 2$ и $4,6 \pm 3$ соответственно ($p < 0,05$), но ниже чем при АГЭ ($16,9 \pm 2$, $p < 0,05$) и значительно ниже, чем в ВАК ($24,7 \pm 2$, $p < 0,05$). Результаты подсчетов представлены в таблице 1.

В исследованиях других авторов также отмечено, что количество апоптотических клеток при аденокарциноме эндометрия выше по сравнению с гиперплазиями эндометрия и нормальным эндометрием.

Иммуногистохимическая реакция с антителами к белкам BCL-2 и BAX показала, что их экспрессия наблюдается во всех исследованных нами случаях (см. табл.1). При этом интенсивность иммуногистохимического окрашивания белков BCL-2 была наиболее высокой в НПЭ и ТГЭ, а в случаях АГЭ и ВАК сильно варьировала. Напротив, экспрессия белков BAX была незначительной или отсутствовала в НПЭ и ТГЭ и возрастала в анапластическом эндометрии. На рис. 3 представлено распределение продуктов ДАВ реакции с антителами к белкам BCL-2 в цитоплазме железистого эпителия ВАК. В свою очередь, на рис. 4 проиллюстрирована иммуногистохимическая реакция с антителами к белку BAX при ТГЭ.

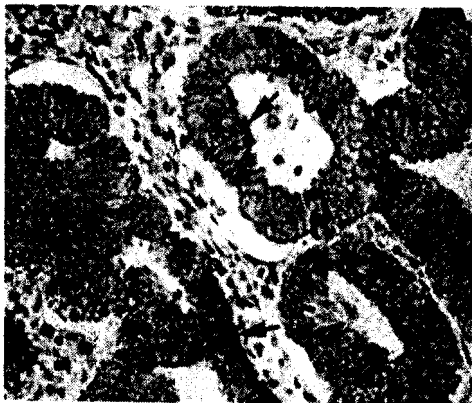


Рис.3. Экспрессия белка BCL-2 в высокодифференцированной аденокарциноме эндометрия в виде диффузной окраски цитоплазмы эпителия (x250).

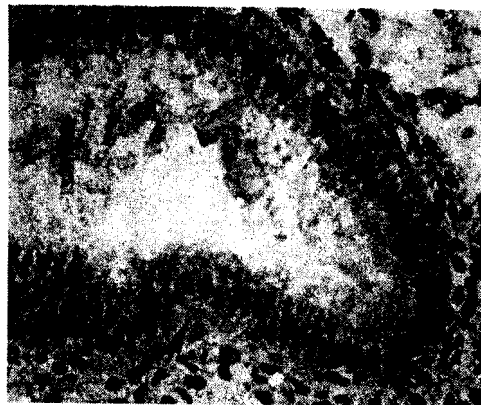


Рис.4. Слабая иммуногистохимическая реакция экспрессии белка BAX при типичной гиперплазии эндометрия (x400).

Белок BAX гомологичен BCL-2, но имеет проапоптозный эффект. Вероятно, факт обнаружения во всех случаях экспрессии BCL-2 и BAX с разной интенсивностью иммуногистохимического окрашивания объясняется тем, что в процессе онкогенеза BAX взаимодействует с BCL-2 и образует гетеродимеры, обладающие антиапоптозным эффектом. В работе S. Krajewski и соавт. подобный механизм проапоптозного действия BAX рассматривается как физиологический и описан в нормальных тканях.

В программированной смерти клеток ключевая роль принадлежит не только белкам группы BCL-2, но и проапоптотическому фактору P53.

В результате проведенного исследования мы не выявили белки P53 иммуногистохимическим методом в НПЭ и ТГЭ. На рис.5 представлена отрицательная иммуногистохимическая реакция с антителами к белку P53 в ядрах клеток ТГЭ. В свою очередь, в 5 случаях АГЭ (38%) и 23 случаях ВАК (72%) была обнаружена экспрессия продуктов мутантного гена p53 (см. табл.1). На рис.6 проиллюстрировано распределение продуктов диаминобензидиновой реакции с антителами к белку P53 в ядрах клеток ВАК.

Мутация опухолевого гена-супрессора p53 является наиболее частым генетическим повреждением в опухолях человека. В эндометрии человека экспрессия данного фактора была выявлена преимущественно в аденокарциномах эндометрия, и только немногими авторами отмечена экспрессия P53 в АГЭ. По сведениям A.S. Elhafey и соавт., в случаях с АГЭ структура окрашивания была локальной и слабой.

Поскольку экспрессия фактора P53 в случаях с АГЭ наблюдается крайне редко с достаточно слабой интенсивностью окрашивания, можно предположить, что мутация гена P53 является достаточно поздним этапом в злокачественной трансформации эндометрия.

Таблица 1

Апоптотический индекс (АИ) и экспрессия факторов апоптоза (HLDF, BAX, BCL-2, P53) в нормальном пролиферативном эндометрии при гиперпластических процессах и в высокодифференцированных аденокарциномах

Показатель	N	АИ (M±σ)	HLDF	BCL-2	BAX	P53
Нормальный пролиферативный эндометрий	36	4,6±3	полоска на поверхности	+++	- +	-
Типичная (железисто-кистозная) гиперплазия	32	5,4±2*	полоска на поверхности	+++	+	-
Атипичная железистая гиперплазия	13	16,9±2*	цитоплазма	- + ++	++	+
Высокодифференцированная аденокарцинома	34	24,7±2*	цитоплазма	- + ++	++	++

Примечание: АИ (апоптотический индекс) – отношение апоптотических клеток к общему количеству клеток, * $p < 0,05$; HLDF: полоска – коричневая полоска на поверхности эпителиальных клеток эндометрия, цитоплазма – коричневое окрашивание цитоплазмы эпителиальных клеток эндометрия; BAX и BCL-2: (-) – отсутствие реакции, (+) – слабая реакция, (++) – умеренная реакция, (+++) – сильная реакция; P53: (-) – отсутствие реакции, (+) – до 10% окрашенных ядер, (++) – более 10% окрашенных ядер.

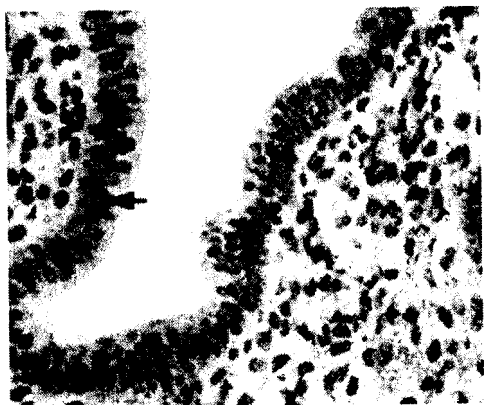


Рис.5. Отсутствие экспрессия P53 в ядрах железистого эпителия типичной гиперплазии эндометрия (Ув. x400).

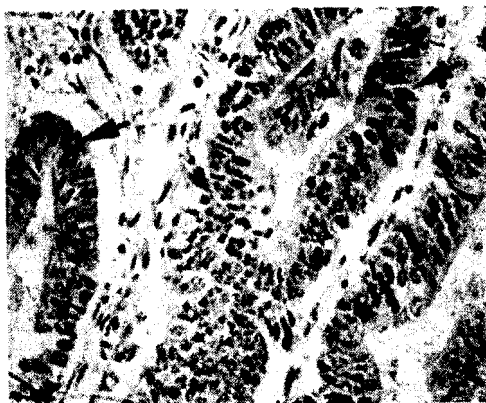


Рис.6. Экспрессия P53 в ядрах железистого эпителия высокодифференцированной аденокарциномы (Ув. x250).

Выводы.

Комплексное иммуногистохимическое исследование экспрессии про- (HLDF, BAX, P53) и антиапоптозных (BCL-2) факторов в железистых клетках эндометрия позволяет провести морфофункциональную оценку состояния эндометрия при его неопластической трансформации.

Антитела к фактору HLDF позволяют провести дифференциальную диагностику между доброкачественными и злокачественными процессами в эндометрии человека и могут быть использованы в качестве нового маркера для выявления ранних стадий анапластических процессов. Онкомаркер опухолевого роста P53 позволяет провести дифференциальную диагностику атипичной гиперплазии эндометрия и высокодифференцированной аденокарциномы эндометрия. Белки BCL-2 и BAX являются менее надеж-

ными онкомаркерами при проведении дифференциальной диагностики между нормально пролиферирующим, гиперпластическим и неопластическим эпителием эндометрия.

Использование HLDF фактора в роли специфического маркера апоптоза дает возможность оценить уровень апоптотических процессов, происходящих в эндометрии. Исследование про- (HLDF, BAX, P53) и антиапоптотических (BCL-2) факторов свидетельствует об относительном увеличении процессов апоптоза при неопластической трансформации клеток.

Литература

1. Бабиченко И.И. Молекулярные основы диагностики опухолевого роста//Материалы Всероссийской научной конференции по патологической анатомии, посвященной памяти профессоров И.К. Есиповой и В.Н. Галанкина 1-2 февраля 2001 г., «Актуальные вопросы патологии человека». М. Изд-во РУДН. 2001. – С. 129-131.
2. Бабиченко И.И., Костанян И.А., Липкин В.М. HLDF - новый маркер анапластических процессов в предстательной железе человека. В кн.: Рак предстательной железы. /Под ред. Н.Е. Кушлинского, Ю.Н. Соловьева, М.Д. Трапезниковой/ М. Изд. РАМН. 2002. - С. 289-305
3. Берштейн Л.М. Эпидемиология, патогенез и пути профилактики рака эндометрия: стабильность или эволюция? // Практическая онкология. - 2004 - Т.5, №1 - С.1-8
4. Гуревич Л.Е., Исаков В.А. Использование в иммуногистохимических исследованиях метода восстановления антигенной специфичности воздействием микроволн на ткани, фиксированные формалином и заключенные в парафин. // Арх. Пат. - 1999. - Т.61, №1. - С. 48-50
5. Кондриков Н.И. Структурно-функциональные изменения эндометрия под воздействием стероидных гормонов. // Практическая гинекология. - 1999. - Т.1, №1. - С. 20-25.
6. Костанян И.А., Астапова М.В., Старовойтова Е.В. и др. Выделение и изучение механизма действия пептидно-белковых факторов дифференцировки, вырабатываемых активированными клетками HL-60// Цитология. - 1994. - Т.36, №6. - С.525
7. Новикова Е.Г., Чулкова О.В., Пронин С.М. Лечение атипичной гиперплазии эндометрия // Практическая онкология – 2004. - Т.5, №1 - С. 52-59.
8. Франк Г.А., Белоус Т.А., Соколова Н.И. Направленность дифференцировки и метаплазия эпителия при раке эндометрия // Акушерство и гинекология. - 1990. - №1. - С. 43-45
9. Челик О.Ф. Морфогенез гиперпластических процессов эндометрия. // Практическая онкология – 2004. - Т.5, №1 - С. 9-15
10. Чиссов В.И., Старинский В.В. Злокачественные новообразования в России в 2000 году (заболеваемость и смертность). - М. МНИОИ им. П.А. Герцена 2002. - 264 с.

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION ANALYSIS OF APOPTOTIC FACTORS IN GLANDULAR CELLS OF NORMAL PROLIFERATIVE, HYPERPLASTIC, AND NEOPLASTIC ENDOMETRIUM

V.A. KOVYAZIN, I. I. BABICHENKO

University of Peoples' Friendship, st. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia

I. A. KOSTANYAN, S. M. DRANITSYNA

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, st. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia

Complex immunohistochemical examination was carried out to investigate the expression of proteins, which characterize the apoptosis process in cell: HLDF, BAX, P53, BCL-2 in normal proliferative, hyperplastic and neoplastic endometrium.

The results of immunohistochemical researches have shown, that the antibodies to the factor HLDF allow to lead differential diagnostics between benign and malignant processes in human endometrium, and could be used as a new immunohistochemical marker for detection of early stages of anaplastic processes at biopsies. The factor P53 may be helpful in differentiating of atypical hyperplasia from well-differentiated adenocarcinoma of the endometrium. The proteins BCL-2 and BAX are not the reliable oncomarkers for of differential diagnostics between normally proliferating, hyperplastic and neoplastic epithelium of endometrium.

Complex approach of studying proapoptotic (HLDF, BAX, P53) and unapoptotic (BCL-2) factors indicate the relative increasing apoptotic process during neoplastic transformation of endometrium.

Keywords: Endometrial hyperplasia – Endometrial adenocarcinoma – Apoptosis – Apoptotic index – HLDF – BCL-2 – BAX – P53