

© Т. И. Дзюбий¹, А. Э. Протасова²,
Г. А. Раскин³, А. А. Цыпурдеева⁴,
Н. И. Тапильская⁵

¹Городская поликлиника №109, г. Санкт-Петербург;

²ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург;

³Клиническая больница №122 им. Л. Г. Соколова, г. Санкт-Петербург;

⁴ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург;

⁵Государственный педиатрический медицинский университет, г. Санкт-Петербург

ЗНАЧЕНИЕ МЕТОДА ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ПРЕДРАКА ЭНДОМЕТРИЯ

УДК: 618.145-006-007.61]-07

■ Метод жидкостной цитологии с последующим иммуноцитохимическим исследованием эндометрия может быть использован для дифференциальной диагностики патологических процессов эндометрия при применении неинвазивного метода забора материала для исследования. Уровень экспрессии гена PTEN, рецепторов стероидных гормонов выше при простой гиперплазии и при отсутствии атипии. Усиление экспрессии маркёров p53 и Ki67 отмечается только при атипической гиперплазии эндометрия. Положительная реакция на CD138 характеризует воспалительный процесс.

■ Ключевые слова: гиперплазия эндометрия; жидкостная цитология; иммуноцитохимическое исследование эндометрия.

Введение

Пролиферативные процессы эндометрия проявляются рядом последовательных состояний, которые предшествуют эндометриальной интраэпителиальной неоплазии (ЭИН или последняя имеет собственный генез развития опухолевого процесса [1].

Доброкачественная эндометриальная гиперплазия (ЭГ) развивается на фоне пролиферативного эндометрия с нарушениями в результате более длительного дисбаланса эстрогенов и прогестерона. Плотность расположения желез эндометрия непостоянна во всем объеме. В некоторых участках железы по отношению к строме превышают соотношение 1:1. Появление фокусов эндометрия, в которых объем желез больше объема стромы, отличает доброкачественную эндометриальную гиперплазию от эндометрия с беспорядочной пролиферацией. Сложную гиперплазию от простой отличает наличие тесного расположения желез распространенного или очагового характера, с просветами часто неправильной формы, и имеющие сложное строение [4].

ЭИН является моноклональной неинвазивной генетически измененной неоплазией, которая развивается локально. В отличие от вышеописанных вариантов патологии эндометрия ЭИН рассматривается как предраковый процесс, который может приобретать злокачественный фенотип при дополнительных генетических повреждениях, трансформируясь в эндометриоидную аденокарциному (тип 1) [4,8]. ЭИН характеризуется локальным изменением желез. Величина фокуса должна быть не менее 1 мм в диаметре. В пределах зоны неоплазии строма составляет менее 45% от общей площади измененной ткани. Это первый ключевой диагностический признак ЭИН. Вторым признаком — атипия эпителия неопластических желез. Термин «атипия» при ЭИН предполагает любые цитологические отличия эпителия желез неопластического фокуса от эпителия желез «эндометриального типа», который может отражать любой вариант вышеописанных изменений.

В настоящее время основным методом диагностики, а также верификации диагноза злокачественной опухоли и большин-

ства доброкачественной патологии эндометрия остается рутинно выполняемое раздельное диагностическое выскабливание. Трудно недооценить степень риска и недостатки метода: травматичность, недостаточная абластика, необходимость госпитализации и анестезиологического пособия, вероятность ложно-отрицательного заключения именно при начальных формах рака эндометрия, отсутствие возможности иммуногистохимического исследования. Слепое выполнение манипуляции не дает возможности определения локализации опухоли, глубины ее инвазии в миометрий, состояния придатков матки. Методы ранней диагностики: такие как цитологическое исследование аспирата, пайпель-биопсия эндометрия, используются недостаточно в связи с их низкой чувствительностью, а обзорная гистероскопия с прицельной биопсией — по причине высокой стоимости исследования, необходимости стационарных условий и анестезиологического пособия.

Внедрение современных, высокотехнологичных методов обследования эндометрия (методики жидкостной цитологии с последующим иммуноцитохимическим исследованием) принципиально увеличивает возможности цитологической диагностики патологии эндометрия и приводит к более четкой постановке диагноза и сокращению периода обследования. Использование метода жидкостной цитологии обеспечивает стандартизацию забора материала, в 2 раза повышает чувствительность и специфичность цитологического исследования [6, 5, 7]. Чувствительность жидкостной цитологии достигает 95 %, а специфичность 66 % [2] именно при диагностике доброкачественной эндометриальной гиперплазии, эндометриальной интраэпителиальной неоплазии и рака эндометрия. Благодаря тому, что материал не сразу наносится на стекло, а вначале вносится в жидкую транспортную среду, из которой в дальней-

шем при помощи цитоцентрифуги формируются клеточные мазки, повышается чувствительность и специфичность цитологического исследования, становится возможным выполнение иммуноцитохимического исследования (ИЦХИ).

При ИЦХИ эндометрия определяется экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона; белка p53, накопление которого в клетке обусловлено нарушением функции гена-супрессора опухолевого роста TP53, ассоциированного с серозным вариантом РЭ (тип 2), (положительной считается реакция при цитоплазматической и мембранной окраске более 10 % опухолевых клеток); показателя пролиферативной активности опухолевых клеток Ki-67 (положительной считается реакция при цитоплазматической и мембранной окраске более 12–14 % опухолевых клеток); белка — опухолевого супрессора PTEN, который задерживает клеточное деление и облегчает апоптоз (негативная реакция); маркера плазматических клеток CD138 (показателя воспалительного процесса эндометрия). Использование иммуноцитохимического метода исследования эндометрия позволяет дифференцировать следующие нозологии: воспалительные процессы эндометрия, гиперплазию эндометрия (простую, сложную), атипическую гиперплазию эндометрия (простую, сложную), рак эндометрия [3, 7, 9, 10]. Сравнительная характеристика жидкостной цитологии и иммуноцитохимического исследования со стандартной цитологией эндометрия представлена в таблице 1. Как видно из таблицы 1 чувствительность и специфичность метода жидкостной цитологии превышают соответствующие критерии стандартного цитологического исследования. Кроме того, результаты жидкостной цитологии коррелируют с гистологическим исследованием в 99 %, по сравнению с 60 % при выполнении общепринятого цитологического анализа эндометрия.

Таблица 1

Сравнительная характеристика жидкостной цитологии и иммуноцитохимического исследования со стандартной цитологией эндометрия

Оценка метода	Стандартная цитология	Жидкостная цитология + ИЦХ
Чувствительность	60 %	95 %
Специфичность	40 %	66 %
Корреляция с гистологическими результатами	60 %	99 %
Информативность материала в сравнении с гистологическим методом	Ниже	Выше
Формирование мазка	«Ручной» способ, стандартизовать невозможно	Автоматическое, стандартизованное
Использование в скрининге рака эндометрия	Не имеет смысла	Возможно

Таблица 2

Список антител, использованных для иммуноцитохимического исследования эндометрия

Название антитела	Клон	Характер антител	Разведение	Фирма-производитель
PTEN	17.A	Мышиные, моноклональные	1 : 100	LabVision
Рецепторы эстрогенов	SP1	Кроличьи, моноклональные	1 : 100	LabVision
Рецепторы прогестерона	SP2	Кроличьи, моноклональные	1 : 100	LabVision
Ki-67	SP6	Кроличьи, моноклональные	1 : 200	LabVision
P53	SP5	Кроличьи, моноклональные	1 : 100	LabVision
CD138	M115	Мышиные, моноклональные	1 : 50	Dako

Цель исследования

Изучить возможность использования метода жидкостной цитологии и последующего иммуноцитохимического исследования с целью диагностики предрака эндометрия.

Материалы и методы

В исследование было включено 94 женщины репродуктивного периода, возраст которых варьировал от 28 до 44 лет, медиана 34 ± 2 с ультразвуковыми признаками гиперплазии эндометрия (несоответствие величины эндометрия фазе менструального цикла, повышенная эхогенность, неоднородность и губчатость эхоструктуры эндометрия с множественными мелкими анэхогенными включениями и эффектом акустического усиления). Пациентки с ультразвуковой картиной полипов эндометрия и субмукозных миоматозных узлов исключались. Всем больным проводились следующие диагностические мероприятия: аспирация эндометрия на 21–22-й день менструального цикла, цитологическое исследование методом жидкостной цитологии, последующее иммуноцитохимическое исследование. Забор материала из полости матки осуществляли методом аспирации эндометрия шприцем-аспиратором в амбулаторных условиях, что не требовало расширения цервикального канала и обезболивания. Эндометрий помещался в адаптированную жидкую транспортную среду Thermo Shandon, материал обрабатывался на цитоцентрифуге Cytospin 4. Полученные монослойные цитопрепараты окрашивались гематоксилином и эозином. Оценивалась цитологическая картина, затем формировалось 6 цитопрепаратов, соответствующих числу используемых антител

(рецепторы эстрогенов и прогестерона, PTEN, p53, Ki67, CD138). Для иммуноцитохимического исследования использовался CINtec Cytology Kit («MTM Laboratories», Германия). Мазки в виде центрифугата диаметром 7–8 мм высушивались на воздухе, фиксировались в этиловом 95%-м спирте в течение 10 минут. Далее проводилась демаскировка антигенов в цитратном буфере pH 6,0, при температуре 95 °C в течение 10 минут с последующим остыванием в течение 20 минут. После чего смачивались в трис-буфере с твином (BioOptica) и обводились парафиновым карандашом. Первым этапом проводили подавление эндогенной пероксидазы при помощи 3%-й перекиси водорода в течение 5 минут. Все последующие этапы исследования осуществлялись во влажной бане при температуре 28 °C. Первые антитела инкубировались в течение 30 минут. Список антител, использованных для иммуноцитохимического исследования эндометрия, представлен в таблице 2.

Для визуализации реакции антиген-антитело применялась полимерная система детекции UltraVision компании LabVision, в качестве хромогена использовался диаминобензидин. После каждого из этапов до окрашивания диаминобензидином стекла со срезами промывались в трис-буфере с твином pH 7,1. Ядра окрашивали при помощи гематоксилина Майера, препараты заключались в среду BioMaunt.

Значимость различий оценивалась с помощью критерия χ^2 Пирсона.

Результаты исследования

Результаты проведенной жидкостной цитологии и иммуноцитохимического исследования эндоме-

Таблица 3

Результаты оценки цитологических препаратов эндометрия, приготовленных методом жидкостной цитологии

Цитологическое заключение	Количество больных
Простая гиперплазия без атипии	54 (57,4 \pm 1,8%)
Простая гиперплазия с атипией	10 (10,6 \pm 0,4%)
Сложная гиперплазия без атипии	8 (8,6 \pm 0,3%)
Сложная гиперплазия с атипией	7 (7,4 \pm 0,3%)
Воспалительный процесс	15 (16,0 \pm 0,8%)
Всего	94 (100%)

Таблица 4

Результаты иммуноцитохимического исследования эндометрия, выполненного на цитологических препаратах, приготовленных методом жидкостной цитологии

Цитологическое заключение	ER	PR	PTEN	Ki67	p53	CD138
Простая гиперплазия без атипии	83,1±3,5%	64,0±2,8%	95,0±4,7%	6,1±0,4%	0	0
Простая гиперплазия с атипией	54,0±2,1%	33,2±1,8%	78,0±3,9%	10,2±0,6%	7,1±0,2%	0
Сложная гиперплазия без атипии	71,1±2,8%	52,1±2,3%	90,0±4,5%	6,1±0,4%	0	0
Сложная гиперплазия с атипией	32,2±1,8%	20,1±1,4%	74,0±3,7%	11,0±0,7%	9,0±0,4%	0
Воспалительный процесс	86,0±3,8%	91,0±3,9%	97,0±4,8%	4,0±0,3%	0	94,3±1,3%

трия пациенткам с ультразвуковыми признаками гиперплазии эндометрия с целью дифференциальной диагностики представлены в таблицах 3, 4.

На основании выполненного цитологического исследования методом жидкостной цитологии наибольшую группу составили 54 женщины (57,4±1,8%), цитологическая картина эндометрия у которых соответствовала простой гиперплазии эндометрия без признаков атипии. Простая гиперплазия эндометрия с признаками клеточной атипии по цитологическим препаратам диагностирована 10 пациенткам, что составило — 10,6±0,4%. Признаки сложной гиперплазии эндометрия без атипии выявлены у 8 больных (8,6±0,3%). Цитологическая картина у 7 женщин (7,4±0,3%) соответствовала сложной гиперплазии эндометрия с клеточной атипией. У группы пациенток, составившей 15 человек (16,0±0,8%), на фоне соответствия цитологической картины эндометрия дню менструального цикла и отсутствия данных за простую или сложную гиперплазию эндометрия были выявлены плазматические клетки и лейкоцитарная инфильтрация, что характеризовало наличие хронических воспалительных изменений (табл. 3). В нашем исследовании не встретилось случая сочетания гиперплазии эндометрия и признаков хронического эндометрита, что, по данным литературы, может вызвать наибольшие затруднения дифференциальной диагностики данных процессов.

Методика жидкостной цитологии с формированием необходимого числа монослойных клеточных препаратов по количеству используемых антител (1 цитологический препарат — 1 антитело) позволила провести последующее иммуноцитохимическое исследование с целью оценки экспрессии рецепторов стероидных гормонов (эстрогенов и прогестерона), опухолевого супрессора PTEN, маркеров пролиферации — p53 и Ki67, маркера плазматических клеток — CD138. Всем пациенткам, не зависимо от цито-

логического заключения проводился весь спектр иммуноцитохимического исследования.

При проведении иммуноцитохимических реакций с антителами к рецепторам стероидных гормонов — экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона составила при простой гиперплазии эндометрия без признаков клеточной атипии наибольшие значения среди всех видов гиперпластических процессов эндометрия: 83,1±3,5% и 64,0±2,8%. В группе женщин с цитологической картиной простой гиперплазии эндометрия с атипией экспрессия стероидных гормонов значительно снижалась до 54,0±2,1% и 33,2±1,8% — соответственно в 1,6 и 1,9 раза. Среди пациенток с диагностированной сложной гиперплазией эндометрия без атипии, экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона составила 71,1±2,8% и 52,1±2,3%, а в случаях сложной гиперплазии эндометрия с атипией прослеживалось снижение уровня экспрессии гормонов более чем в 2 раза — до 32,2±1,8% и 20,1±1,4%. При выявленных признаках хронического воспалительного процесса (хронического эндометрита), уровень экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона составил 86,0±3,8% и 91,0±3,9% и существенно не отличался от соответствующих показателей в неизменном пролиферативном эндометрии.

Выраженная экспрессия белка PTEN выявлена в группах женщин с цитологическими признаками простой и сложной гиперплазии эндометрия без атипии — соответственно 95,0±4,7% и 90,0±4,5%. Среди пациенток с хроническим воспалительным процессом — экспрессия PTEN приближалась к 100% и составила — 97,0±4,8%.

Уровень экспрессии PTEN у больных с атипической простой и атипической сложной гиперплазией эндометрия снижается в 1,2 раза по сравнению с группами пациенток, не имеющих атипические изменения, и достигает 78,0±3,9% и 74,0±3,7% (табл. 4).

Экспрессия маркера пролиферации Ki67 в группе больных простой гиперплазией эндометрия без атипии составила $4,0 \pm 0,3\%$, а в случаях выявленной простой гиперплазии эндометрия с атипией возросла в 2,5 раза — до $10,2 \pm 0,6\%$. Подобная корреляция отмечена и в группе пациенток со сложной гиперплазией без атипии, в которой уровень экспрессии Ki67 не превышал $6,1 \pm 0,4\%$, а в случаях сложной гиперплазии с атипией — возрастал почти в 2 раза — до показателя $11,0 \pm 0,7\%$.

Экспрессия маркера p53 выявлена только у женщин с атипической простой и сложной гиперплазией эндометрия и составила — $7,1 \pm 0,2\%$ и $9,0 \pm 0,4\%$ соответственно.

В группе больных, включавшей 15 женщин, цитологическая картина эндометрия у которых свидетельствовала о признаках хронического воспаления реакция на CD138 была положительной в $94,3 \pm 1,3\%$ (табл. 4).

Полученные результаты иммуноцитохимического исследования различных групп пациенток с УЗ признаками гиперплазии эндометрия и использованные нами маркеры можно рассматривать в качестве дифференциально-диагностических критериев патологических состояний эндометрия, а также использовать их с целью формирования иммуноцитохимического профиля гиперпластических состояний эндометрия.

Так, простая гиперплазия эндометрия без атипии иммуноцитохимически характеризуется высокой экспрессией рецепторов стероидных гормонов — эстрогенов и прогестерона, высоким уровнем PTEN и низким показателем Ki67.

В случаях простой гиперплазии эндометрия с атипией снижается уровень экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона, PTEN, повышается уровень Ki67, а также определяется экспрессия p53.

Для сложной гиперплазии эндометрия с атипией иммуноцитохимический профиль характеризуется низким уровнем экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона, PTEN, высокая экспрессия Ki67 и p53.

Выводы

Анализ результатов выполненного исследования показал следующее:

1. Метод жидкостной цитологии эндометрия информативен с целью дифференциальной диагностики патологических процессов эндометрия.
2. Иммуноцитохимическое исследование эндометрия расширяет возможности проведения дифференциальной диагностики патологических состояний эндометрия.

3. Уровень экспрессии гена супрессора опухолевого роста PTEN, экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона снижается в ряду: простая гиперплазия без атипии, сложная гиперплазия без атипии, простая гиперплазия с атипией, сложная гиперплазия с атипией.
4. Усиление экспрессии маркеров пролиферации p53 и Ki67 отмечается только при атипической простой и сложной гиперплазии эндометрия.
5. Положительная реакция на CD138 характеризует воспалительный процесс эндометрия.
6. Иммуноцитохимическое исследование эндометрия открывает возможность проведения патогенетического лечения женщин с гиперпластическими процессами эндометрия.

Литература

1. Дасаи Ф.Дж., Крисмана У.Т. Клиническая онкогинекология. — М.; 2012. — Т. 2.
2. Имянитов Е.Н. Скрининг для лиц с наследственной предрасположенностью к раку // Практическая онкология. — 2010. — Т. 11(2). — С. 102–109.
3. Новикова Е.Г., Чулкова О.В., Пронин С.М. Предрак и начальный рак эндометрия у женщин репродуктивного возраста. М.: МИА. — 2005.
4. Перельмутер В.М. Морфологические изменения эндометрия при гиперэстрогении и эндометриальной интраэпителиальной неоплазии // Сибирский онкологический журнал. — 2008. — № 5. — С. 5–10.
5. Mohan H., Baak J. P. Morphometrical analysis in endometrial hyperplasia: predictive of progression to cancer // Indian J. Pathol. Microbiol. — 2006. — Vol. 49(1). — P. 21–22.
6. Moore R. G. et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass // Gynaecol. Oncol. — 2009. — Vol. 112. — P. 40–46.
7. Mutter G. L. Endometrial intraepithelial Neoplasia (EIN): will it bring order to chaos? // Gynecol. Oncol. — 2000. — 76(3). — 287–290.
8. Mutter G. L. et al. Benign endometrial hyperplasia sequence and endometrial intraepithelial neoplasia // Int. J. Gynecol. Pathol. — 2007. — Vol. 26(2). — P. 103–14.
9. Mutter G. L. Histopathology of genetically defined endometrial precancers // Int. J. Gynecol. Pathol. — 2000. — Vol. 19(4). — P. 301–309.
10. Pavlidis N., Hansen H., Stahel R. ESMO Clinical practice guidelines: development, implementation and dissemination // Ann. Oncol. — 2010. — Vol. 21 (suppl. 5).

Статья представлена И. М. Кветным,
ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

IMMUNOCYTOCHEMISTRY IN DIAGNOSTICS
OF ENDOMETRIAL PRECANCER

Dzyubiy T. I., Protasova A. E., Raskin G. A.,
Tsypurdeyeva A. A., Tapilskaya N. I.

■ **Summary:** Use of the method liquid-based cytology with next immunocytochemical study of endometrium is expedient for the differential diagnosis of endometrial pathology processes. The level of the gene *PTEN* and steroid receptors expression is higher in cases of simple hyperplasia and hyperplasia without atypia. Increase of the markers p53 and Ki67 expression was found only by atypical endometrial hyperplasia. Positive reaction on CD138 determines the inflammatory process.

■ **Key words:** endometrial hyperplasia; liquid-based cytology; immunocytochemical study of endometrium.

■ Адреса авторов для переписки

Дзюбий Татьяна Ивановна — врач онкогинеколог. Городская поликлиника №109, Санкт-Петербург. 194291, Россия, Санкт-Петербург, ул. Олеко Дундича, д. 8/2.

Протасова Анна Эдуардовна — д. м. н., профессор. ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Минздрава РФ. 193015, Россия, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41. **E-mail:** rectorat@spbmapo.ru.

Раскин Григорий Александрович — к. м. н. Клиническая больница № 122 им. Л. Г. Соколова. 194291, Россия, Санкт-Петербург, пр. Культуры, д. 4. **E-mail:** infomed@med122.com .

Цыпурдеева Анна Алексеевна — к. м. н., старший научный сотрудник отделения оперативной гинекологии. ФБГУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** Tsypurdeeva@mail.ru.

Тапильская Наталья Игоревна — д. м. н., профессор кафедры акушерства и гинекологии, кафедры онкологии с курсом лучевой диагностики. Государственный педиатрический медицинский университет. 194100, Россия, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2.

Dzyubiy Tatyana Ivanovna — doctor. City Polyclinic N 109, St. Petersburg. 194291, St. Petersburg, Oleko Dundicha St., 8/2, Russia.

Protasova Anna Eduardovna — professor. I. I. Mechnikov North-Western State Medical University, Ministry of Public Health of Russian Federation. 193015, Saint-Petersburg, Kirochnaya St., 41, Russia. **E-mail:** rectorat@spbmapo.ru.

Raskin Grigoriy Aleksandrovich — L. G. Sokolov Clinical Hospital N 122. 194291, Saint-Petersburg, Kultury prospect, 4, Russia. **E-mail:** infomed@med122.com .

Tsypurdeyeva Anna Alekseyevna — assistant professor of Operative Gynecology Department. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034, St. Petersburg, Mendeleyevskaya Line, 3, Russia. **E-mail:** Tsypurdeeva@mail.ru.

Tapilskaya Natalya Igorevna — M.D., professor. Department of obstetrics and gynecology, department of oncology. State Pediatric Medical University. 194100, St. Petersburg, Litovskaya St, 2, Russia.