

## Молекулярно-биологические профили гиперплазии эндометрия и эндометриальной интраэпителиальной неоплазии

С.А. Леваков, Н.А. Шешукова, А.Г. Кедрова, А.С. Федотова, Е.А. Обухова

Кафедра акушерства и гинекологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Анна Генриховна Кедрова kedrova.anna@gmail.com

**Цель исследования** — изучение молекулярно-биологических параметров гиперплазии эндометрия и эндометриальной интраэпителиальной неоплазии.

**Материалы и методы.** Проведено ретроспективное исследование, в которое были включены 77 пациенток с морфологически верифицированным диагнозом «гиперпластический процесс эндометрия»: 34 — с гиперплазией эндометрия, 33 — с эндометриальной интраэпителиальной неоплазией. Группу сравнения составили 30 пациенток, у которых по данным гистологического исследования не было выявлено патологии эндометрия.

**Результаты.** Пациентки с эндометриальной интраэпителиальной неоплазией относятся к группе высокого риска по возможной малигнизации. Высокая ангиогенная активность, выраженная васкуляризация, гипоксические нарушения в эндометрии являются важными факторами, способствующими прогрессированию пролиферативных процессов и дальнейшей опухолевой трансформации. Белки-ингибиторы апоптоза сурвивин и Bcl-2 более активно экспрессируются при появлении клеточной атипичности, что может указывать на их участие в процессах злокачественной трансформации клеток и инвазивного роста.

**Выводы.** Полученные нами данные еще раз подтверждают важную роль сурвивина и Bcl-2 в формировании гиперпластических процессов в эндометрии.

**Ключевые слова:** гиперплазия эндометрия, эндометриальная интраэпителиальная неоплазия, ингибиторы апоптоза, сурвивин, Bcl-2

**Для цитирования:** Леваков С.А., Шешукова Н.А., Кедрова А.Г. и др. Молекулярно-биологические профили гиперплазии эндометрия и эндометриальной интраэпителиальной неоплазии. Опухоли женской репродуктивной системы 2018;14(2):76–81.

DOI: 10.17650/1994-4098-2018-14-2-76-81

### Molecular profiles of endometrial hyperplasia and endometrial intraepithelial neoplasia

S.A. Levakov, N.A. Sheshukova, A.G. Kedrova, A.S. Fedotova, E.A. Obukhova

Department of Obstetrics and Gynecology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

**Objective:** to assess molecular profiles of endometrial hyperplasia and endometrial intraepithelial neoplasia.

**Materials and methods.** We conducted a retrospective study that included 77 patients with a morphologically verified hyperplastic process in the endometrium. Of them, 34 patients had endometrial hyperplasia and 33 patients had endometrial intraepithelial neoplasia. The control group comprised 30 women with no endometrial disorders according to the results of histological examination.

**Results.** Patients with endometrial intraepithelial neoplasia are at high risk of developing cancer. High angiogenic activity, pronounced vascularization, and endometrial hypoxia are believed to be important risk factors contributing to tumor proliferation and transformation. The expression of inhibitors of apoptosis, such as survivin and Bcl-2, is usually increased in atypical cells, which may indicate their involvement in malignant transformation of cells and tumor invasive growth.

**Conclusion.** Our findings confirm the important role of survivin and Bcl-2 in hyperplastic processes in the endometrium.

**Key words:** endometrial hyperplasia, endometrial intraepithelial neoplasia, inhibitors of apoptosis, survivin, Bcl-2

**For citation:** Levakov S.A., Sheshukova N.A., Kedrova A.G. et al. Molecular profiles of endometrial hyperplasia and endometrial intraepithelial neoplasia. Opuhohi zhenskoy reproduktivnoy systemy = Tumors of female reproductive system 2018;14(2):76–81.

Гиперпластические процессы эндометрия (ГПЭ) представляют собой гетерогенную группу преимущественно доброкачественных морфо-

функциональных изменений в слизистой оболочке тела матки. При появлении в ткани эндометрия клеточной атипичности разной степени выраженности

ГПЭ приобретают характер предракового заболевания.

Новая классификация патологии эндометрия (Всемирная организация здравоохранения, 2014) основана на выделении 2 категорий его изменений: доброкачественной, неатипической гиперплазии эндометрия (endometrial hyperplasia, EH) и эндометриальной (эндометриоидной) интраэпителиальной неоплазии (endometrial intraepithelial neoplasia, EIN), или атипической гиперплазии.

Сегодня продолжают активно изучать молекулярно-биологические механизмы развития гиперплазий эндометрия. В литературе обсуждается целый ряд теорий возникновения ГПЭ: роль несбалансированной длительной эстрогенной стимуляции, нарушение рецептивности эндометрия, неадекватная реакция эндометрия на оказываемые воздействия, зависимые от экспрессии различных факторов местной регуляции (факторы роста, маркеры пролиферации и апоптоза), нарушение функции иммунной системы и др.

Комплексный подход к изучению проблемы ГПЭ является наиболее правильным, позволяет повысить качество диагностики данного патологического состояния, провести правильную оценку факторов прогноза ГПЭ и представить патогенетические обоснования для лечения и профилактики.

**Целью** настоящего исследования явилось изучение молекулярно-биологических параметров EH и EIN.

#### Материалы и методы

Проведено ретроспективное исследование, в которое были включены 77 пациенток с морфологически верифицированным диагнозом ГПЭ: 34 – с EH, 33 – с EIN. Группу сравнения составили 30 пациенток, у которых по данным гистологического исследования не было выявлено патологии эндометрия. Средний возраст пациенток –  $48,2 \pm 2,9$  года. Показаниями для госпитализации в стационар и проведения раздельного диагностического выскабливания под контролем гистероскопии явились аномальные маточные кровотечения и/или наличие патологии эндометрия по данным ультразвукового исследования.

В исследование не были включены пациентки с онкологическими заболеваниями, острыми воспалительными процессами органов малого таза, миомой матки больших размеров и эндометриозом.

Комплексное обследование женщин включало сбор анамнеза, оценку соматического статуса, менструальной и репродуктивной функций.

Морфологическое исследование проводили в Московском городском центре патологоанатомических исследований при Городской клинической больнице № 5 и кафедре патологической анатомии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова»

Минздрава России. Иммуноморфологические исследования уровней продукции фермента лизилоксидазы (LOX), белков сурвивина и его антагониста SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases – вторичный митохондриальный активатор каспаз) проводили в ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН». Материалом для морфологического исследования служили соскобы эндометрия, полученные при раздельном диагностическом выскабливании матки.

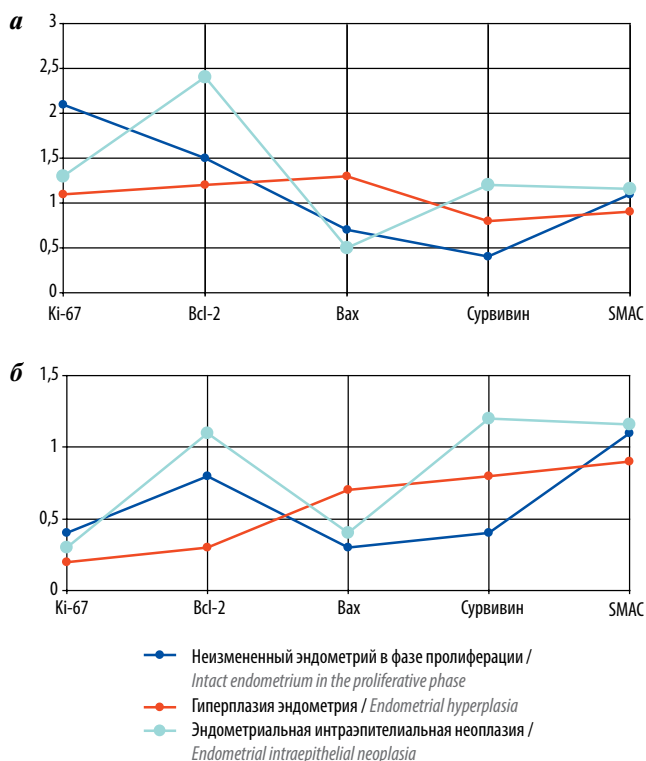
Использовали иммунопероксидазный и иммунофлуоресцентный методы исследования и 14 первичных специфических моно- и поликлональных антител производства DAKO (Германия) и Lab Vision (США) к рецепторам эстрогенов альфа (ER- $\alpha$ , клон SP1), рецепторам прогестерона (PgR, клон SP2), маркеру пролиферирующих клеток, ядерному белку Ki-67, ингибитору апоптоза Bcl-2, индуктору апоптоза Bax, сосудисто-эндотелиальному фактору роста (VEGF, клон G153-694), трансформирующему фактору роста бета-1 (TGF- $\beta$ 1), фибронектину, иммуноглобулинам M (IgM), иммуноглобулинам G (IgG). Экспрессию LOX – компонента внеклеточного матрикса – определяли с помощью иммуногистохимического исследования, которое проводили методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием специфических поликлональных антител к LOX на парафиновых срезах. Уровень продукции белка-ингибитора апоптоза сурвивина (митохондриальная форма) и его антагониста – белка SMAC определяли в тех же образцах эндометрия. Использовали лизаты полученного тканевого материала, взятие которого проводили согласно стандартной процедуре. Образцы лизатов хранили при температуре от  $-20$  до  $-80$  °C в течение 4 сут в условиях отсутствия микробной контаминации. Образцы подвергали замораживанию – оттаиванию только однократно. После размораживания образцы тщательно перемешивали. Не использовали образцы с повышенным содержанием липидов и с признаками бактериального заражения. В данной работе для исследования образцов эндометрия был использован диагностический набор «Пептосурвим».

#### Результаты и обсуждение

Комплексное иммуногистохимическое исследование позволило дать характеристику ключевых молекулярно-биологических особенностей EH и EIN и представить их профили (рис. 1).

При EIN отмечается максимально высокое содержание белка-ингибитора апоптоза сурвивина (табл. 1). Его экспрессия в 3 раза ( $1,2 \pm 0,1$ ) выше, чем в группе сравнения ( $0,40 \pm 0,06$ ), а также достоверно больше показателя при EH ( $0,80 \pm 0,02$ ),  $p < 0,05$ .

Параллельное исследование продукции антагониста сурвивина – белка SMAC показало, что его



**Рис. 1.** Молекулярно-биологические профили неизмененного эндометрия в фазе пролиферации, при гиперплазии эндометрия и эндометриальной интраэпителиальной неоплазии: а – эпителиальные клетки желез эндометрия; б – стромальные клетки и экстрацеллюлярный матрикс эндометрия

**Fig. 1.** Molecular profiles of the intact endometrium in the proliferative phase, endometrial hyperplasia, and endometrial intraepithelial neoplasia: а – endometrial gland epithelial cells; б – stromal cells and endometrial extracellular matrix

концентрация при изученных патологических процессах статистически достоверно не меняется, в том числе и по сравнению с контрольными наблюдениями ( $p > 0,05$ ).

Изучение экспрессии другого ингибитора апоптоза – Bcl-2 показало, что по сравнению с неизмененным эндометрием в фазе пролиферации его экспрессия достоверно ниже при ЕН как в эпителии желез ( $1,5 \pm 0,03$  и  $1,2 \pm 0,02$ ), так и в строме ( $0,8 \pm 0,02$  и  $0,3 \pm 0,01$ ). При EIN экспрессия Bcl-2 достоверно больше контрольных показателей и показателей при ЕН и составляет  $2,4 \pm 0,6$  (в эпителии) и  $1,1 \pm 0,4$  (в строме).

Экспрессия индуктора апоптоза Вах по сравнению с неизмененным эндометрием группы сравнения достоверно выше при ЕН в эпителии желез ( $1,3 \pm 0,4$  и  $1,1 \pm 0,08$ ) и в строме ( $0,7 \pm 0,05$  и  $0,5 \pm 0,06$ ) ( $p < 0,05$ ), однако при EIN она ниже и практически не отличается от контрольных показателей.

Результаты иммуноморфологического исследования маркера пролиферации показали, что экспрессия Ki-67 по сравнению с неизмененным эндометрием в фазе пролиферации ( $2,1 \pm 0,03$  – в эпителии;  $0,4 \pm 0,01$  – в строме) достоверно ниже при ЕН как в эпителии клеток желез ( $1,1 \pm 0,04$  и  $1,2 \pm 0,03$ ), так и в строме ( $0,2 \pm 0,01$  и  $0,2 \pm 0,01$ ). При EIN, в сравнении с гиперплазией эндометрия, она несколько повышается в эпителии ( $1,3 \pm 0,08$ ), уже достоверно не отличаясь от стромального уровня в группе контроля ( $0,3 \pm 0,02$ ).

Иммуноморфологическое исследование факторов роста (VEGF и TGF- $\beta$ 1) также показало их разное накопление при различных вариантах ГПЭ. Экспрессия VEGF по сравнению с неизмененным эндометрием контрольной группы была достоверно ниже при разных видах гиперплазии эндометрия как в эпителии желез, так и в строме ( $p < 0,05$ ). Экспрессия VEGF несколько повышалась в строме ( $0,8 \pm 0,13$ ) и в эпителии желез ( $1,9 \pm 0,14$ ) при EIN. Однако в наших исследованиях эти различия оказались статистически недостоверными ( $p > 0,05$ ). При EIN также была характерна

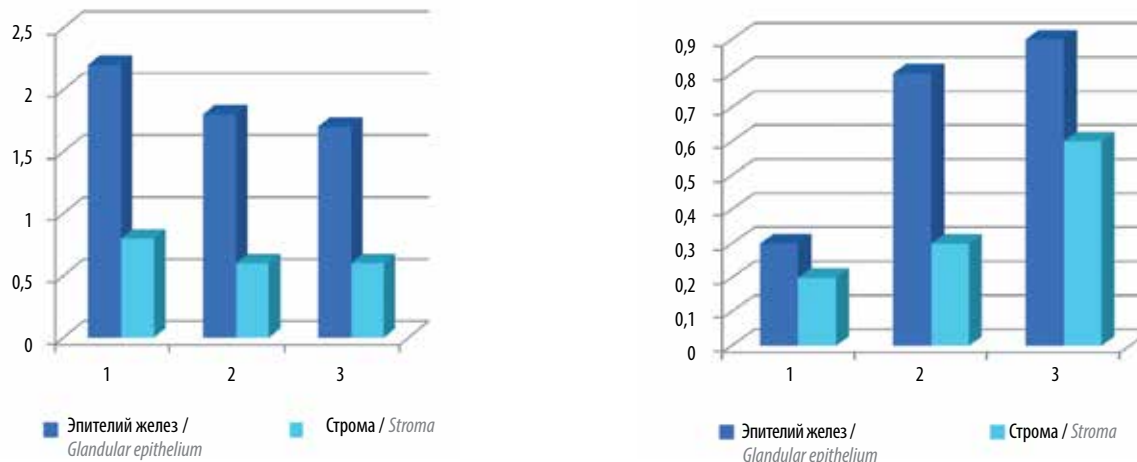
**Таблица 1.** Результаты определения относительного количества белков сурвивина и SMAC в клетках неизмененного эндометрия в фазе пролиферации, при гиперплазии эндометрия и эндометриальной интраэпителиальной неоплазии

**Table 1.** Relative levels of survivin and SMAC in the intact endometrium in the proliferative phase, endometrial hyperplasia, and endometrial intraepithelial neoplasia

Показатель Parameter	Эндометрий, фаза пролиферации (n = 30) Endometrium in the proliferative phase (n = 30)	Гиперплазия эндометрия (n = 34) Endometrial hyperplasia (n = 34)	Эндометриальная интраэпителиальная неоплазия (n = 33) Endometrial intraepithelial neoplasia (n = 33)
Суммарный белок в образце, мг/мл Total protein in the sample, mg/mL	2,5	2,5	2,5
Титр антител к сурвивину* Level of anti-survivin antibodies*	$0,40 \pm 0,06$	$0,80 \pm 0,02$	$1,2 \pm 0,1$
Титр антител к SMAC** Level of anti-SMAC antibodies*	$1,107 \pm 0,05$	$0,90 \pm 0,04$	$1,16 \pm 0,04$

\*Оптическая плотность при длине волны 492 нм. \*\*SMAC – вторичный митохондриальный активатор каспаз.

\*Absorbance at a wavelength of 492 nm. \*\*SMAC – second mitochondria-derived activator of caspases.



**Рис. 2.** Уровень экспрессии VEGF и TGF-β1: 1 – неизменный эндометрий в фазе пролиферации; 2 – гиперплазия эндометрия; 3 – эндометриальная интраэпителиальная неоплазия

**Fig. 2.** Levels of VEGF and TGF-β expression: 1 – intact endometrium in the proliferative phase; 2 – endometrial hyperplasia; 3 – endometrial intraepithelial neoplasia

неравномерная экспрессия VEGF в разных железах и в участках стромы (рис. 2).

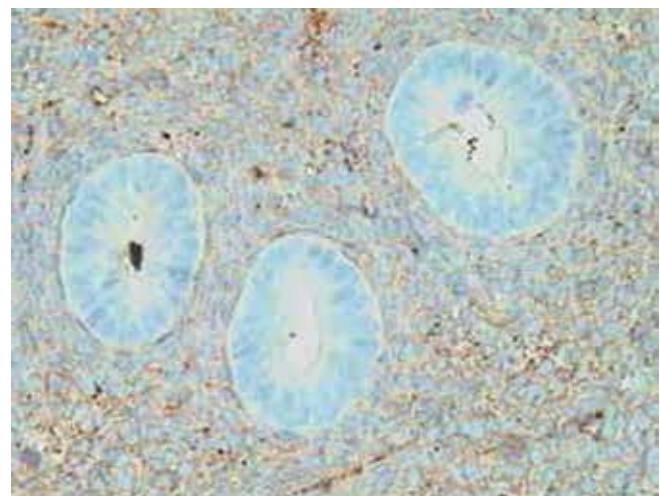
Продукция и накопление TGF-β1 по сравнению с неизменным эндометрием в фазе пролиферации ( $0,3 \pm 0,2$ ) были достоверно выше в эпителии желез при ЕН ( $0,9 \pm 0,05$ ) и EIN ( $0,6 \pm 0,07$ ) ( $p < 0,05$ ). В строме экспрессия TGF-β1 повышена в 2 раза при ЕН ( $0,5 \pm 0,03$ ) и в 5 раз – при EIN ( $1,1 \pm 0,08$ ).

В наших исследованиях экспрессия ароматазы цитохрома P450 в группе сравнения не выявлялась. Слабовыраженная экспрессия была обнаружена в эпителии желез в единичных наблюдениях при ЕН и EIN.

Исследование экспрессии фибронектина показало, что она минимальна и равномерно выражена в наблюдениях с неизменным эндометрием в фазе пролиферации и при ЕН. При EIN экспрессия фибронектина также была слабой или местами умеренной (рис. 3–5).

Нами определена экспрессия компонента внеклеточного матрикса – LOX у пациенток с неизменным и гиперплазированным эндометрием. Мы не выявили достоверных различий между эндометрием в фазу пролиферации ( $37 \pm 3$ ), ЕН ( $29 \pm 3$ ) и продукцией и накоплением LOX ( $p > 0,05$ ). Между нормальным эндометрием и ЕН не существует принципиальной разницы в количестве клеток, содержащих LOX (табл. 2).

В неизменном эндометрии секреция LOX составляет в среднем 30 клеток в поле зрения, снижаясь в зависимости от фазы менструального цикла от пролиферативной к секреторной фазе от 37 до 31. Локализация LOX преимущественно цитоплазматическая, незначительное содержание LOX отмечено в стромальном компоненте. При ЕН число клеток, содержащих LOX, составило 17–48, в среднем 30 клеток на единицу поля  $0,0384 \text{ мм}^2$ . При ЕН имеет место тенденция



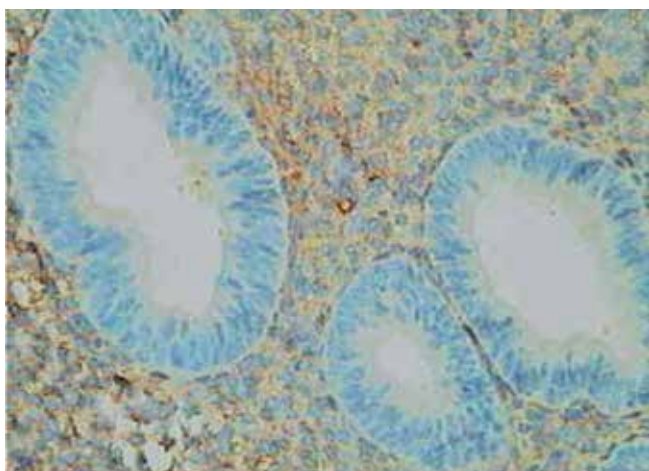
**Рис. 3.** Неизменный эндометрий в фазе пролиферации. Слабая равномерная экспрессия фибронектина в строме. Непрямой иммунопероксидазный метод с антителами к фибронектину,  $\times 400$

**Fig. 3.** Intact endometrium in the proliferative phase. Weak homogeneous expression of fibronectin in the stroma. Indirect immunoperoxidase staining using anti-fibronectin antibodies,  $\times 400$

к повышению секреции цитоплазматической LOX в стромальном компоненте и в небольшом количестве – в железистом. Однако результаты нашего исследования показали, что экспрессия LOX при EIN составляет  $68 \pm 6$ , а число клеток с положительной реакцией на LOX в поле зрения микроскопа площадью  $0,0384 \text{ мм}^2$  при EIN эндометрия составляет более 67 % по отношению к норме, что можно использовать как один из диагностических признаков EIN. При этом число таких клеток увеличивалось как в железах, так и в строме эндометрия.

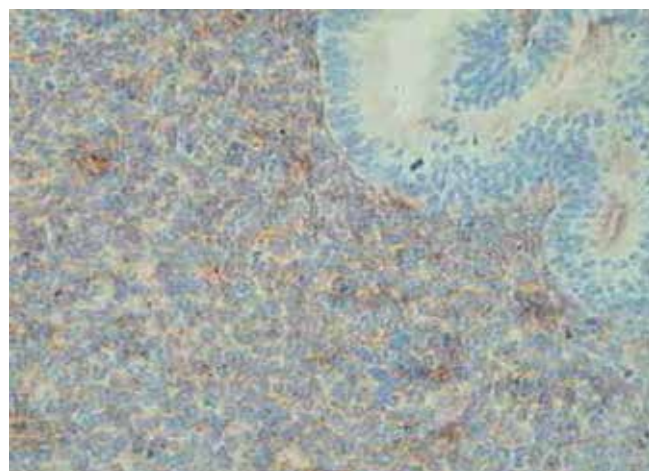
Оценка функционального потенциала гиперплазированного эндометрия указала на сходство





**Рис. 4.** Гиперплазия эндометрия. Умеренная равномерная экспрессия фибронектина в строме. Непрямой иммунопероксидазный метод с антителами к фибронектину, ×400

**Fig. 4.** Endometrial hyperplasia. Moderate homogeneous expression of fibronectin in the stroma. Indirect immunoperoxidase staining using anti-fibronectin antibodies, ×400



**Рис. 5.** Эндометриальная интраэпителиальная неоплазия. Умеренная равномерная экспрессия фибронектина в строме. Непрямой иммунопероксидазный метод с антителами к фибронектину, ×400

**Fig. 5.** Endometrial intraepithelial neoplasia. Moderate homogeneous expression of fibronectin in the stroma. Indirect immunoperoxidase staining using anti-fibronectin antibodies, ×400

нарушения экспрессии PgR и ER-α. Так, экспрессия ER-α и PgR по сравнению с неизменным эндометрием в фазе пролиферации достоверно ниже при ЕН (соответственно либо в эпителии желез, либо в строме), а при EIN – и в эпителии желез, и в строме.

Соотношение ER-α/PgR в эпителии желез и строме при ЕН составило 0,95, при EIN – 1,46 (в эпителии) и 0,53 (в строме). В группе сравнения в эндометрии в фазе пролиферации соотношение ER-α/PgR в эпителиальном компоненте составило 1,12, в строме – 1,13.

Таким образом, ЕН и EIN принципиально отличаются по ряду молекулярно-биологических параметров. При наличии ЕН активность пролиферативных процессов в эпителиальных клетках эндометрия и его стромальном компоненте остается невысокой, а уровень апоптоза позволяет в достаточной мере сдерживать пролиферативные процессы.

Повышение уровня сурвивина при ЕН связано именно с наличием быстро делящихся или находящихся в процессе противостояния апоптозу клеток. На начальных этапах формирования патологических процессов в эндометрии (ЕН) имеют место низкая ангиогенная активность и тенденция к усилению активности процессов склерозирования (повышенный уровень TGF-β1) как в эпителии желез, так и во внеклеточном матриксе. Сниженный уровень экспрессии VEGF у пациенток с ЕН свидетельствует о недостаточной активности процессов ангиогенеза в растущей ткани эндометрия и наряду с тромбозом сосудов является причиной его очаговой ишемии. Повышенная продукция TGF-β1 при угнетенном апоптозе сдерживает пролиферативную активность и дает возможность предположить, что ЕН на данном этапе остается подконтрольным процессом и может

**Таблица 2.** Экспрессия лизилоксидазы в клетках неизменного эндометрия в фазе пролиферации, при гиперплазии эндометрия и эндометриальной интраэпителиальной неоплазии

**Table 2.** Lysyl oxidase expression in the intact endometrium in the proliferative phase, endometrial hyperplasia and endometrial intraepithelial neoplasia

Показатель Parameter	Эндометрий, фаза пролиферации (n = 30) Endometrium in the proliferative phase (n = 30)		Гиперплазия эндометрия (n = 34) Endometrial hyperplasia (n = 34)		Эндометриальная интраэпителиальная неоплазия (n = 33) Endometrial intraepithelial neoplasia (n = 33)	
	Разброс значений Range	M ± σ	Разброс значений Range	M ± σ	Разброс значений Range	M ± σ
Экспрессия лизилоксидазы Lysyl oxidase expression	37–44	37 ± 3	17–48	29 ± 3	52–80	68 ± 6

**Примечание.** M ± σ – среднее значение ± стандартное отклонение.  
**Note.** M ± σ – mean ± standard deviation.

регрессировать после лечения или даже самостоятельно.

При EIN имеет место дисбаланс между процессами пролиферации и запрограммированной гибелью клеток – апоптоз резко угнетается. Повышенный синтез белков-ингибиторов апоптоза сурвивина и Bcl-2 и одновременное снижение экспрессии индуктора апоптоза Вах (что можно рассматривать как один из метаболических признаков гипоксии) приводят к устойчивости патологических очагов эндометрия к апоптозу и резистентности клеток к гипоксии, что может явиться дополнительными факторами, в сочетании с которыми EIN прогрессирует в аденокарциному.

На ранних стадиях прогрессии патологического процесса (EIN) в строме эндометрия отмечаются активные процессы стромообразования и неоангиогенеза, приводящие к формированию состояния гипоксии, наблюдается высокая экспрессия LOX, Ki-67, VEGF, TGF- $\beta$ 1, фибронектина.

### Выводы

Таким образом, пациентки с EIN относятся к группе высокого риска по возможной малигнизации. Высокая ангиогенная активность, выраженная васкуляризация, гипоксические нарушения в эндометрии являются важными факторами, способствующими прогрессированию пролиферативных процессов в ткани эндометрия и дальнейшей опухолевой трансформации.

Белки-ингибиторы апоптоза сурвивин и Bcl-2 более активно экспрессируются при появлении клеточной атипии, что может указывать на их участие в процессах злокачественной трансформации клеток и инвазивного роста.

Полученные нами данные еще раз подтверждают важную роль изучаемых белков в формировании ГПЭ и подтверждают правильность современных представлений о ГПЭ как о результате нарушения равновесия между процессами пролиферации и апоптоза клеток, которые регулируются клеточными и внеклеточными компонентами на молекулярном уровне.

### Вклад авторов

С.А. Леваков: разработка дизайна исследования;

Н.А. Шешукова: непосредственный отбор пациентов и анализ архивных данных;

А.Г. Кедрова: обзор литературы;

А.С. Федотова: морфологический и клинический анализ;

Е.А. Обухова: статистическая обработка и корреляционный анализ морфологических и клинических данных.

### Authors' contributions

S.A. Levakov: developing the research design;

N.A. Sheshukova: direct selection of patients and analysis of archival data;

A.G. Kedrova: review of literature;

A.S. Fedotova: morphological and clinical analysis;

E.A. Obukhova: statistical processing and correlation analysis of morphological and clinical data.

### ORCID авторов

С.А. Леваков: <https://orcid.org/0000-0002-4591-838X>

А.Г. Кедрова: <https://orcid.org/0000-0003-1031-9376>

### ORCID of authors

S.A. Levakov: <https://orcid.org/0000-0002-4591-838X>

A.G. Kedrova: <https://orcid.org/0000-0003-1031-9376>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Информированное согласие.** Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Informed consent.** All patients gave written informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 17.04.2018. **Принята к публикации:** 21.05.2018.

**Article received:** 17.04.2018. **Accepted for publication:** 21.05.2018.