

*Д. А. Давыдов<sup>1</sup>, Л. А. Мавричева<sup>2</sup>, Е. Д. Черствый<sup>1</sup>*

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА ПРОЛИФЕРАЦИИ КІ-67  
ПРИ СОЧЕТАНИИ ЛЕЙОМИОМЫ ТЕЛА МАТКИ  
С АДЕНОМИОЗОМ**

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»<sup>1</sup>,  
УЗ «Городская гинекологическая больница»<sup>2</sup>*

---

*Материалом исследования послужили операционные биоптаты 37 пациенток, которым была выполнена гистерэктомия по поводу лейомиом (Л) тела матки и/или аденомиоза (А) (группы: ЛА – 15 случаев, Л – 22 случая). При помощи иммуногистохимического метода*

определялась экспрессия маркера пролиферации Ki-67 в лейомиоматозных узлах с учетом их локализации в матке. Установлено, что пролиферативная активность в Л зависит от локализации опухоли в матке и коррелирует с клеточной плотностью. Наиболее высокая пролиферативная активность отмечалась при субмукозной локализации Л. Индекс пролиферативной активности в субмукозных Л при наличии сочетанного А статистически значимо выше, чем в узлах соответствующей локализации при отсутствии А. В группе ЛА выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между индексом пролиферативной активности в узлах Л без учета их локализации и промежутком времени с момента диагностирования Л до выполнения радикальной операции. Таким образом, высокая пролиферативная активность в Л может являться неблагоприятным прогностическим фактором.

**Ключевые слова:** лейомиома, аденомиоз, пролиферативная активность, Ki-67.

**D. A. Davydov, L. A. Mavricheva, E. D. Cherstvy**

### **IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF PROLIFERATION MARKER KI-67 EXPRESSION IN UTERINE LEIOMYOMA COMBINED WITH ADENOMYOSIS**

*During this study 37 operational biopsies obtained from female patients, which underwent hysterectomy due to uterine leiomyoma (L) and/or adenomyosis (A) were investigated (groups: LA – 15 cases, L – 22 cases). Proliferation marker Ki-67 expression was determined in leiomyomas of different locations by immunohistochemical assay. It was found that proliferative activity in L depends on its location and correlates with tumor cellularity. The highest level of proliferative activity was observed in submucosal L. The level of proliferative activity in submucosal L was significantly higher in LA group, than in L of similar location in L group. Statistically significant reverse correlation between the proliferative activity level in L regardless of the location and time period from diagnosis to hysterectomy was found in LA group. High proliferative activity level in L may be an unfavorable prognostic factor.*

**Key words:** leiomyoma, adenomyosis, proliferative activity, Ki-67.

Лейомиома (Л) и аденомиоз (А) являются наиболее часто встречающимися гормонозависимыми заболеваниями матки в репродуктивном возрасте. Обращает на себя внимание высокая распространенность сочетания Л и А [1, 5, 6]. Ключевой характеристикой Л, обуславливающей их пролиферативную активность, является гормонозависимость [3]. Известно, что очаги А, являясь, как и Л, гормонозависимыми структурами, обладают способностью к синтезу эстрогенов [7, 8]. Таким образом, сочетанная патология представляет собой своеобразный эксперимент природы по взаимному влиянию А и Л, опосредованному половыми стероидными гормонами. Проллиферативная активность – наиболее достоверный маркер роста опухоли, широко используемый в онкоморфологии для определения прогноза заболевания и дифференцированного выбора тактики лечения. К наиболее часто применяемым методам определения пролиферативной активности относятся: подсчет количества фигур митоза, подсчет клеток, в ядрах которых экспрессируются маркеры пролиферации PCNA или Ki-67. Ядерный белок Ki-67 преимущественно экспрессируется в поздней G1, S, G2 и M фазах клеточного цикла. В ядрах клеток, находящихся вне клеточного цикла (фаза G0), Ki-67 не выявляется.

В репродуктивном возрасте лишь около 30% пациенток с Л имеют симптомы, обуславливающие обращение за медицинской помощью. Значительная часть случаев Л тела матки являются случайными находками при ультразвуковом исследовании [1]. Оперативное вмешательство, по-прежнему, остается единственным радикальным методом лечения Л, в т. ч. при сочетании с А. Таким образом, Л неоднородны как по своим клиническим проявлениям,

так и по прогнозу относительно сохранения репродуктивного потенциала, что представляется весьма актуальным в популяции пациенток, не реализовавших свои репродуктивные планы. Резонно предполагать, что упомянутая клиническая гетерогенность Л связана с определенными морфологическими различиями между случаями с относительно благоприятным и неблагоприятным течением заболевания. Одним из основных факторов, определяющим тактику ведения пациенток с Л, а также с сочетанием Л и А, является темп роста Л, который, в первую очередь, связан с пролиферативной активностью опухолевых клеток. Сведения о пролиферативной активности в Л при сочетании с А, имеющиеся в литературе, характеризуются значительной противоречивостью. Вместе с тем, данные о взаимосвязи пролиферативной активности в Л с наличием А и другими факторами могут способствовать лучшему пониманию патоморфогенеза сочетанной гормонозависимой патологии матки, разработке новых подходов к выбору тактики ведения пациенток.

**Цель исследования:** выявить взаимосвязь пролиферативной активности в Л с наличием сочетанного А.

#### **Материалы и методы**

**Материал исследования:** операционные биоптаты 37 пациенток, которым выполнена гистерэктомия по поводу Л тела матки и/или А в гинекологическом отделении № 3 УЗ «Городская гинекологическая больница» г. Минска.

**Критерии включения в исследование:** морфологическая верификация диагноза Л и/или А, отсутствие у пациенток злокачественных новообразований половых органов, молочных желез, отсутствие в медицинской доку-

## □ Оригинальные научные публикации

ментации указаний на предшествующую гормональную терапию в течение 1 месяца перед операцией.

**Исследованные группы:** Л, А – 15 случаев сочетания Л с диффузным или очаговым А (средний возраст  $46,8 \pm 3,2$  лет), Л – 22 случая изолированной Л тела матки (средний возраст  $47,1 \pm 3,6$  лет). Значимых различий между группами по возрасту, фазе менструального цикла на момент выполнения операции не наблюдалось ( $p > 0,05$  для всех сравнений).

Иммуногистохимическое исследование проведено на серийных срезах парафиновых блоков ткани тела матки. В качестве первичного антитела использовали моноклональное мышиное антитело к Ki-67 (Daako) в разведении 1:150. Результат реакции визуализировался при помощи универсальной системы детекции (ThermoScientific). В качестве положительного контроля использована ткань глоточной миндалины. Отрицательный контроль – исключение стадии нанесения первичного антитела из процесса изготовления микропрепарата.

Результаты иммуногистохимической реакции оценивали путем подсчета клеток с позитивно окрашенными ядрами (экспрессирующими Ki-67). Индекс пролиферативной активности рассчитывался при помощи деления количества клеток с позитивно окрашенными ядрами на общее количество клеток в поле зрения при 400-кратном увеличении. Клеточная плотность определялась как количество всех клеток в поле зрения при 400-кратном увеличении. Статистическая обработка полученных данных выполнялась при помощи программного модуля Statistica 10.0. При распределении переменных, отличном от нормального, для проверки значимости различий между исследуемыми группами использованы U-критерий Манна-Уитни и H-критерий Краскелла-Уоллиса. Наличие взаимосвязи исследуемых параметров устанавливалось при помощи непараметрического корреляционного анализа Спирмана.

### Результаты и обсуждение

В обеих группах (Л+А, Л) наблюдался сходный характер экспрессии Ki-67. Ядерная экспрессия данного маркера пролиферации наблюдалась в ядрах опухолевых гладкомышечных клеток, фибробластов и эндотелиоцитов. Ki-67 в Л экспрессировался неравномерно, с тенденцией к периваскулярной локализации (рис. 1, а, б, в). Следует отметить, что наблюдаемые в данном исследовании индексы пролиферативной активности были невысокими и не превышали 12% при сочетании Л и А.

При сравнении исследованных групп по индексу пролиферативной активности в узлах Л без учета их локализации статистически значимые различия не были выявлены ( $U = 2991,5$ ;  $p = 0,133$ ). Однако при сравнении узлов соответствующих локализаций между группами Л и Л+А обнаружен статистически значимо более высокий индекс пролиферативной активности в субмукозных узлах при сочетании с А ( $U = 81,0$ ;  $p = 0,036$ ). Значимых различий между исследованными группами по индексу пролиферативной активности в интрамуральных и субсерозных узлах не наблюдалось ( $p > 0,05$  для обоих сравнений) (рис. 2, 3, 4).

Кроме того, индекс пролиферативной активности сравнивался между Лразличной локализации внутри исследованных групп (Л+Л+А). Максимальные значения индекса пролиферативной активности в обеих группах характерны для субмукозных узлов и были меньшими

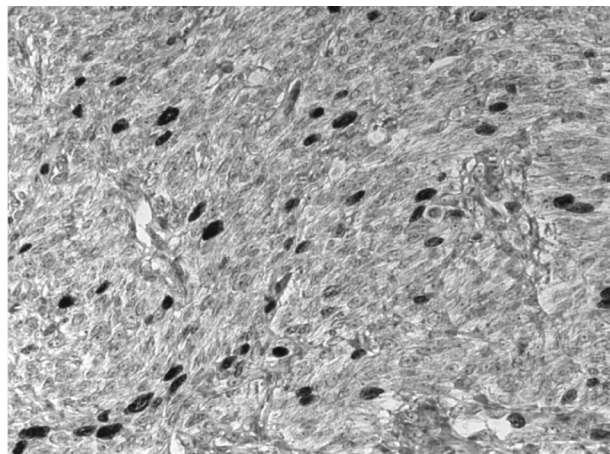


Рисунок 1, а. Лейомиома с высокой клеточной плотностью и высоким индексом пролиферативной активности. Окраска: первичное антитело против Ki-67, хромоген: диаминобензидин (DAB), контрокрашивание гематоксилин Майера. Увеличение:  $\times 400$  (ок.  $\times 10$ , об.  $\times 40$ )

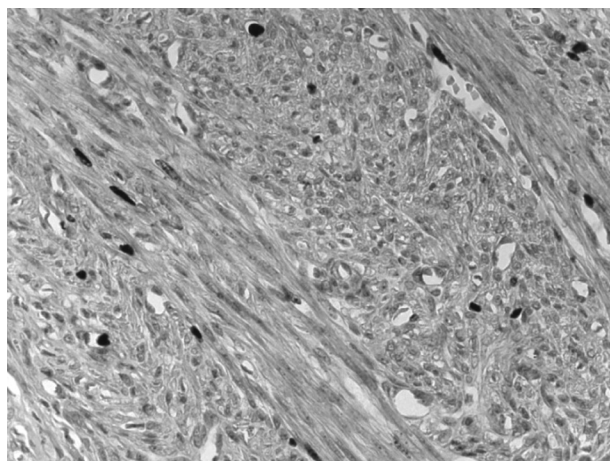


Рисунок 1, б. Лейомиома с умеренной клеточной плотностью и умеренным индексом пролиферативной активности. Окраска: первичное антитело против Ki-67, хромоген: диаминобензидин (DAB), контрокрашивание гематоксилин Майера. Увеличение:  $\times 400$  (ок.  $\times 10$ , об.  $\times 40$ )

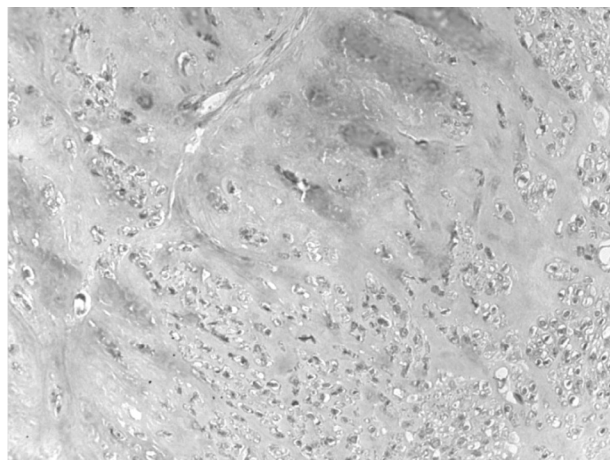


Рисунок 1, в. Лейомиома с низкой клеточной плотностью и отсутствием экспрессии Ki-67. Окраска: первичное антитело против Ki-67, хромоген: диаминобензидин (DAB), контрокрашивание гематоксилин Майера. Увеличение:  $\times 400$  (ок.  $\times 10$ , об.  $\times 40$ )

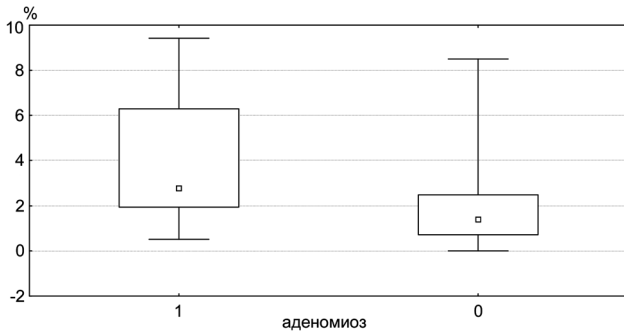


Рисунок 2. Индекс пролиферативной активности в субмукозных узлах, %  
Группы: 0 – Л, 1 – Л+А; ◻ – медиана, □ – 25–75%, τ – max, ⊥ – min

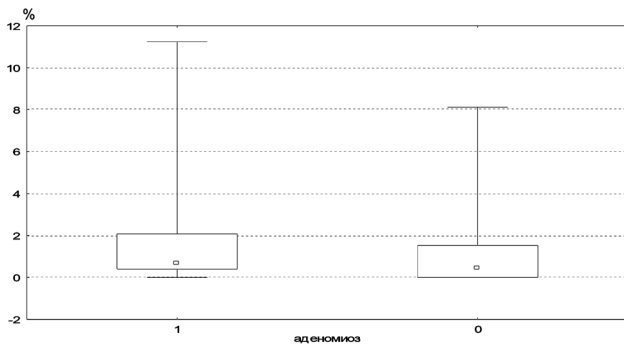


Рисунок 3. Индекс пролиферативной активности в интрамуральных узлах, %  
Группы: 0 – Л, 1 – Л+А; ◻ – медиана, □ – 25–75%, τ – max, ⊥ – min

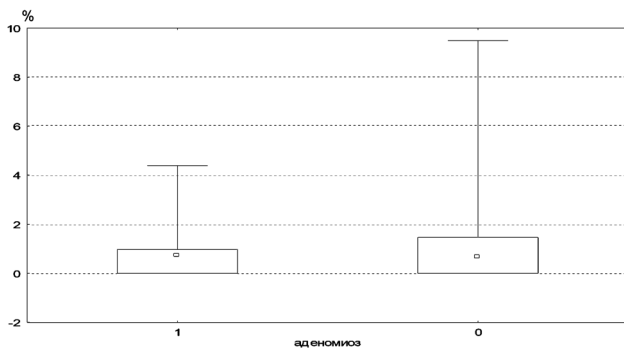


Рисунок 4. Индекс пролиферативной активности в субсерозных узлах, %  
Группы: 0 – Л, 1 – Л+А; ◻ – медиана, □ – 25–75%, τ – max, ⊥ – min

в интрамуральных и субсерозных узлах. Выявленные различия статистически значимы ( $N = 9,32$ ;  $p = 0,009$  для группы Л+А и  $N = 8,35$ ;  $p = 0,015$  для группы Л) (рис. 5, 6). Сходные закономерности наблюдались при сравнении показателей клеточной плотности. В обеих исследованных группах субмукозные Л характеризовались большей клеточной плотностью, чем интрамуральные и субсерозные узлы ( $p < 0,05$ ).

В ходе исследования также выполнен корреляционный анализ для всей исследованной популяции и отдельно для каждой группы. Для всей исследованной популяции выявлена значимая положительная корреляция индекса пролиферативной активности и клеточной плотности ( $r = 0,244$ ;  $p < 0,05$ ), а также значимая отрицательная корреляция индекса пролиферативной активности и возраста пациенток ( $r = -0,416$ ;  $p < 0,05$ ).

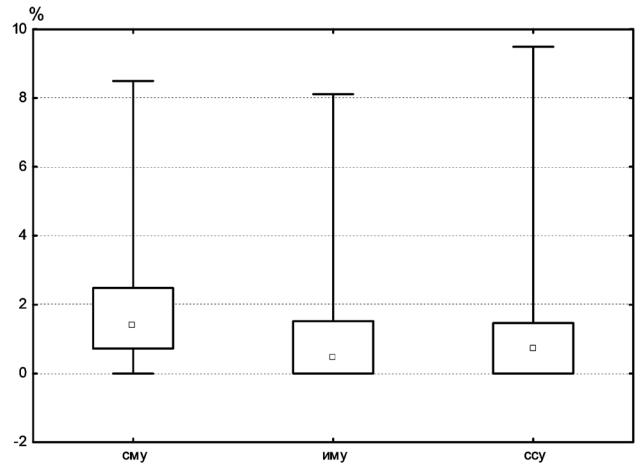


Рисунок 5. Индекс пролиферативной активности в узлах различной локализации при изолированной лейомиоме, %  
СМУ – субмукозные узлы, ИМУ – интрамуральные узлы, ССУ – субсерозные узлы, ◻ – медиана, □ – 25–75%, τ – max, ⊥ – min

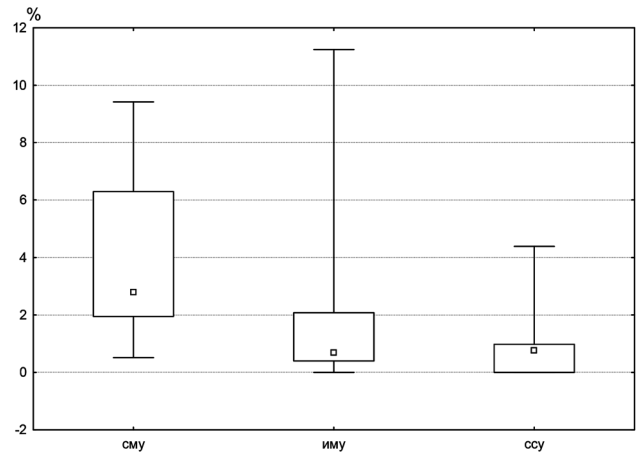


Рисунок 6. Индекс пролиферативной активности в узлах различной локализации при сочетании лейомиом с аденомиозом, %  
СМУ – субмукозные узлы, ИМУ – интрамуральные узлы, ССУ – субсерозные узлы, ◻ – медиана, □ – 25–75%, τ – max, ⊥ – min

Для группы Л+А выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между индексом пролиферативной активности в узлах Л без учета их локализации и промежутком времени с момента диагностирования Л до выполнения радикальной операции ( $r = -0,581$ ;  $p < 0,05$ ).

Для группы Л выявлены значимые положительные корреляции между индексом пролиферативной активности в узлах Л без учета локализации и клеточной плотностью ( $r = 0,297$ ;  $p < 0,05$ ), ИМТ ( $r = 0,489$ ;  $p < 0,05$ ), а также отрицательная корреляционная связь между средними значениями индекса пролиферативной активности и возрастом пациенток ( $r = -0,538$ ;  $p < 0,05$ ).

В исследованных группах значимые корреляции между показателями экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (по результатам предшествующих исследований) и индексом пролиферативной активности не выявлены.

В ходе настоящего исследования Ki-67 во многих случаях экспрессировался в ядрах клеток, расположенных периваскулярно. Данный факт согласуется с результатами исследований ряда авторов, которые также наблюдали преобладание пролиферирующих клеток в пе-

## □ Оригинальные научные публикации

риваскулярных зонах и по периферии лейомиоматозных узлов [2, 4]. В ранее проведенном нами исследовании было установлено, что EGFR в Л экспрессируется преимущественно периваскулярными клетками. Отсутствие значимой корреляционной связи между индексом пролиферативной активности и показателем экспрессии EGFR, очевидно, связано с множественностью факторов, влияющих на процессы пролиферации в Л. Данные литературы убедительно свидетельствуют о промитогенном эффекте системы EGF/EGFR, однако при этом следует учитывать кумулятивный эффект других факторов роста, гормонов, контактных межклеточных взаимодействий, которые имеют место при естественном течении заболевания.

В настоящем исследовании выявлены статистически значимые различия индекса пролиферативной активности в субмукозных Л между двумя группами исследования. Данный факт, вероятно, объясняется способностью очагов аденомиоза к синтезу эстрогенов за счет присущей им ароматазной активности, что обуславливает формирование феномена локальной гиперэстрогении [3, 7, 8]. Значимо более высокие индексы пролиферативной активности в субмукозных Л при сочетании с А, по-видимому, объясняются локальным эстрогенным воздействием очагов А, расположенных топографически ближе к узлам данной локализации, чем к интрамуральным и субсерозным Л. При сравнении индексов пролиферативной активности во всех узлах без учета их локализации статистически значимые различия между группами не обнаружены.

В настоящем исследовании для всей популяции (Л, Л+А) выявлена статистически значимая, но слабая положительная корреляция между индексом пролиферативной активности и клеточной плотностью. Слабость корреляции между индексом пролиферативной активности и клеточной плотностью, вероятно, объясняется следующим образом. Индекс пролиферативной активности – более динамично изменяющийся показатель по сравнению с клеточной плотностью, т. е. он может измениться в относительно короткие сроки под воздействием половых стероидных гормонов или при прекращении такого воздействия. В то же время, клеточная плотность более стабильный (медленно изменяющийся) показатель, зависящий не только от пролиферативной активности опухоли, но и от степени гипертрофии гладкомышечных клеток Л (которая также опосредована эффектами половых стероидных гормонов), характера и количества межклеточного вещества.

Выявленная для группы изолированных Л отрицательная корреляция индекса пролиферативной активности и возраста пациенток может отражать снижение гормональной активности яичников с приближением менопаузы. Следует отметить, что аналогичная отрицательная корреляционная связь возраста и пролиферативной активности в группе Л+А не была выявлена. Отсутствие такой связи может быть обусловлено наличием А, способствующего более длительному сохранению локального эстрогенного фона за счет синтеза эстрогенов *insitu* и, следовательно, более длительного поддержания уровня пролиферативной активности в Л.

Для группы Л+А выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между индексом пролиферативной активности в узлах Л без учета их локализации и промежутком времени с момента диагностирования Л до выполнения радикальной операции. Данная законо-

мерность может иметь прогностическое значение у пациенток с сочетанной патологией при подтверждении на выборке большего объема в условиях проспективного исследования.

### Выводы

1. Проллиферативная активность в Л зависит от локализации опухоли в матке и коррелирует с клеточной плотностью. Наиболее высокая пролиферативная активность отмечается при субмукозной локализации Л.

2. Индекс пролиферативной активности в субмукозных Л при наличии сочетанного А статистически значимо выше, чем в узлах соответствующей локализации при отсутствии А. Данный факт, вероятно, связан с топографической близостью субмукозных Л и очагов А, способных к локальному синтезу эстрогенов, а также с особенностями рецепторного статуса субмукозных узлов.

3. В группе Л выявлена значимая отрицательная корреляция между возрастом пациенток и индексом пролиферативной активности при отсутствии такой корреляции в группе ЛА, что может быть связано с поддержанием уровня пролиферативной активности в Л за счет синтеза эстрогенов в очагах А.

4. В группе ЛА выявлена статистически значимая отрицательная корреляция между индексом пролиферативной активности в узлах Л без учета их локализации и промежутком времени с момента диагностирования Л до выполнения радикальной операции. Данная взаимосвязь может отражать менее благоприятное клиническое течение (менометроррагии, боль, нарушение функции тазовых органов) Л с высокими индексами пролиферативной активности. Таким образом, высокая пролиферативная активность в Л может являться неблагоприятным прогностическим фактором.

### Литература

1. Гуриев, Т. Д., Сидорова И. С., Унанян А. Л. Сочетание миомы матки и аденомиоза. – М: ООО «Медицинское информационное агентство», 2012. – 256 с.
2. Коган, Е. А., Игнатова В. Е., Рухадзе Т. Н., Кудрина Е. А., Ищенко А. И. Роль ростовых факторов в развитии разных гистологических типов лейомиомы матки // Архив патологии. – 2005, № 3. – С. 34–38.
3. Савицкий, Г. А., Иванова Р. Д., Свечникова Ф. А. Роль локальной гипергормонемии в патогенезе темпа прироста массы опухолевых узлов при миоме матки // Акушерство и гинекология. – 1983. – Т. 4. – С. 13–16.
4. Сидоров, И. С., Леваков С. А., Коган Е. А., Унанян А. Л. Современный взгляд на патогенез миомы матки // Акушерство и гинекология. Приложение. – 2006. – с. 30–33.
5. Azziz, R. Adenomyosis: current perspectives // *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* – 1989. – Vol. 16 – P. 221–235.
6. Kairi-Vassilatou, E., Kontogianni K., Salamalekis M. et al. A clinicopathological study of the relationship between adenomyosis and other hormone-dependent uterine lesions // *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* – 2004. – Vol. 25. – P. 222–224.
7. Kitawaki, J., Kusuki I., Koshihara H. et al. Detection of aromatase cytochrome P-450 in endometrial biopsy specimens as a diagnostic test for endometriosis // *Fertil. Steril.* – 1999. – Vol. 72 (6). – P. 1100–1106.
8. Urabe, M., Yamamoto T., Kitawaki J. et al. Estrogen biosynthesis in human uterine adenomyosis // *Acta Endocrinol. (Copenh).* – 1989. – Vol. 121(2). – P. 259–264.

Поступила 4.09.2015 г.