



ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРА *Ki-67* ПРИ ПРЕНАТАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ЭСТРОГЕНОВ НА ЯИЧНИКИ ПОТОМСТВА

Р.Т. СУЛАЙМАНОВА

Университет «Реавиз», ул. Калинина, д. 8, корп. 2, г. Санкт-Петербург, 198099, Россия

Аннотация. Актуальность. Для регуляции овариально-менструального цикла, зачатия, поддержания, разрешения и предупреждения беременности применяют эстрогены. В связи со значительными успехами молекулярной биологии у морфологов появилась возможность иммуноцитохимически маркировать клетки при различных фазах клеточного цикла. Большое внимание уделяется изучению молекулярно-биологическому маркеру, характеризующий пролиферацию – белок *Ki-67*, который является наиболее информативным, адекватным, удобным в использовании. **Цель исследования** – изучение прогностического значения маркера *Ki-67* при пренатальном воздействии различных доз синтетического аналога эстрогена синэстрола на яичники потомства лабораторных мышей. **Материалы и методы исследования.** Эксперимент выполнен на потомстве лабораторных мышей, матерям которых на стадии гестации E11.5 внутримышечно однократно вводили экспериментальные дозы синтетического аналога эстрогена синэстрола. Иммуногистохимический анализ проводили на срезах с парафиновых блоков яичников потомства, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Оценку окрашенных препаратов проводили с использованием светового микроскопа *Leica*. В 10 полях зрения каждого образца при увеличении $\times 400$ производили подсчет иммунопозитивных клеток с положительной реакцией по коричневому окрашиванию ядра. Среднее число *Ki-67* иммунопозитивных клеток вычисляли соотношением позитивно окрашенных клеток к негативно окрашенным клеткам (на 100 просчитанных клеток). Экспрессию маркера определяли в следующих показателях яичников потомства: в первичных, вторичных, третичных фолликулах; в желтом теле; в строме органа. **Результаты и их обсуждение.** В первой экспериментальной группе «С-25» во всех исследуемых показателях наблюдалось снижение митотической активности клеток при экспрессии маркера *Ki-67*, свидетельствующее об ускоренной физиологической гибели клеток. Во второй экспериментальной группе «С-40» уровень экспрессии белка *Ki-67* в желтых телах достоверно уменьшился, но вместе с тем увеличение экспрессии произошло в остальных показателях, демонстрирующие о снижении процесса естественной гибели клеток. В третьей экспериментальной группе «С-50» наблюдался однонаправленный процесс роста количества иммунопозитивно-окрашенных клеток во всех исследуемых показателях, свидетельствующие о снижении процесса естественной гибели клеток. **Заключение.** Веденные исследуемые дозы синтетического эстрогена синэстрола в пренатальный период вызывают морфофункциональные нарушения в яичниках потомства. Дозозависимость эстрогенов может служить фоном для развития структурных изменений в яичниках потомства, о чем свидетельствует экспрессия маркера *Ki-67*.

Ключевые слова: маркер *Ki-67*, эстрогены, яичники, лабораторные мыши, потомство, пренатальное введение.

EXPRESSION OF THE *Ki-67* MARKER DURING PRENATAL ADMINISTRATION OF ESTROGENS TO THE OVARIES OF OFFSPRING

R.T. SULAYMANOVA

University «REAVIZ», Kalinina str., 8, bldg. 2, St. Petersburg, 198099, Russia

Abstract. Relevance. Estrogens are used to regulate the ovarian-menstrual cycle, conception, maintenance, resolution and prevention of pregnancy. Due to significant advances in molecular biology, morphologists have the opportunity to immunocytochemically label cells at various phases of the cell cycle. Much attention is paid to the study of the molecular biological marker that characterizes proliferation - the protein *Ki-67*, which is the most informative, adequate, and convenient to use. **The research purpose** was to study the prognostic value of the *Ki-67* marker during prenatal exposure of various doses of synthetic estrogen analog synestrol to the ovaries of offspring of laboratory mice. **Materials and methods.** The experiment was performed on the offspring of laboratory mice, whose mothers at the stage of gestation E11.5 were intramuscularly administered experimental doses of the synthetic analogue of estrogen synestrol once. Immunohistochemical analysis was performed on sections from paraffin blocks of ovaries of offspring intended for standard morphological examination. The

stained preparations were evaluated using a Leica light microscope. In 10 fields of view of each sample, at an increase of $\times 400$, immune-positive cells with a positive reaction to the brown staining of the nucleus were counted. The average number of Ki-67 immunopositive cells was calculated by the ratio of positively colored cells to negatively colored cells (per 100 calculated cells). The expression of the marker was determined in the following indicators of the ovaries of the offspring: in primary, secondary, tertiary follicles; in the corpus luteum; in the stroma of the organ. **Results and its discussion.** In the first experimental group "C-25", a decrease in mitotic activity of cells was observed in all the studied parameters with the expression of the Ki-67 marker, indicating accelerated physiological cell death. In the second experimental group "C-40", the expression level of the Ki-67 protein in yellow bodies significantly decreased, but at the same time, an increase in expression occurred in the remaining indicators, demonstrating a decrease in the process of natural cell death. In the third experimental group "C-50", a unidirectional process of increasing the number of immunopositive-stained cells was observed in all the studied indicators, indicating a decrease in the process of natural cell death. **Conclusion.** The studied doses of synthetic estrogen synestrol in the prenatal period cause morphofunctional disorders in the ovaries of offspring. The dose dependence of estrogens can serve as a background for the development of structural changes in the ovaries of offspring, as evidenced by the expression of the Ki-67 marker.

Key words: marker Ki-67, estrogens, ovaries, laboratory mice, offspring, prenatal administration.

Актуальность (введение). Высокое развитие вспомогательных репродуктивных технологий привело к применению эстрогенов: для регуляции овариально-менструального цикла, зачатия, поддержания, разрешения и предупреждения беременности. Уровень гормонов у беременных должен поддерживаться путем воздействия экзогенных гормонов до формирования плаценты [2, 3, 5].

С периода внутриутробного развития и на протяжении всей жизни эстрогены и их аналоги сопровождают современного человека. Благополучие постнатального развития и репродуктивная адаптивность во взрослой жизни непосредственно зависят от внутриутробных условий. Все факторы – уровень плацентарных, материнских и экзогенных гормонов в период становления жизненно важных органов, являются ключевыми регуляторами репродуктивного здоровья потомства [6].

Изучение пролиферации клеток различных тканей составляет одну из фундаментальных задач морфологии [10]. В связи со значительными успехами молекулярной биологии у морфологов появилась возможность иммуноцитохимически маркировать клетки при различных фазах клеточного цикла. Большое внимание уделяется изучению молекулярно-биологическому маркеру, характеризующий пролиферацию – белок *Ki-67* [8]. Ген, кодирующий белок *Ki-67*, расположен на длинном плече 10-й хромосомы. *Ki-67*-ядерный антиген, относится к регуляторным белкам. Маркер присутствует только в ядрах клеток фазах *G1*, *S*, *G2* и *M*, после митоза во время перехода клеток в фазу *G0* белок *Ki-67* быстро подвергается катаболизму и не определяется в клетках, находящихся в состоянии покоя. Поэтому его используют в качестве универсального маркера пролиферации при оценке роста злокачественных опухолей [4].

Цель исследования – изучение прогностического значения маркера *Ki-67* при пренатальном воздействии различных доз синтетического аналога эстрогена синэстрола на яичники потомства лабораторных мышей.

Материалы и методы исследования. Эксперимент выполнен на потомстве лабораторных мышей, матерям которых на стадии гестации *E11.5* внутримышечно однократно вводили экспериментальные дозы синтетического аналога эстрогена синэстрола в виде 2% масляного раствора. Полученное потомство разделили на группы по 5 животных в каждой: интактная группа – без воздействия, контрольная группа – *оливковое масло* в дозе 0,2 мг/кг («МО»), первая экспериментальная группа – синэстрол в дозе 25 мг/кг («С-25»), вторая экспериментальная группа – синэстрол в дозе 40 мг/кг («С-40»), третья экспериментальная группа – синэстрол в дозе 50 мг/кг («С-50»). Расчеты эффективности доз препарата производили в соответствии с коэффициентами для перерасчета доз веществ в мг/кг для мышей [1, 7, 9].

Лабораторных животных на 90 сутки выводили из эксперимента в фазу диэструса. Фазу эстрального цикла определяли с использованием влагилищных мазков, окрашенных по Романовскому и по критериям *M.C. Cora* и соавт. [12]. Исследованию подвергались яичники потомства лабораторных мышей, фиксация и проводка тканей осуществлялась по стандартной схеме.

Экспериментальная часть исследования выполнена в соответствии с Женевской конвенцией (*Geneva*, 1990) и Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации о гуманном отношении к животным (редакция 2000 г.). Протоколы экспериментов в разделах выбора, содержания животных и выведения их из опыта был составлен в соответствии с принципами биоэтики и правилами лабораторной практики, представленными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и приказе МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». На работу получено разрешение Экспертного совета по биомедицинской этике ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» БГМУ (протокол №3 от 17.03.2014).

Иммуногистохимический анализ проводили на срезах с парафиновых блоков яичников потомства, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Определение экспрессии *Ki-67* иммуногистохимическим методом осуществлялся с использованием непрямого стрептавидин-биотин-системой детекции *Leica BOND (Novocastra™, Германия)* для мыши (*Mouse Monoclonal Antibody Ki-67 Antigen. Клон MIB-1; разведение: 1:300*) по рекомендации производителя *Santa Cruz Biotechnology (США)*. Гистологические срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера *Leica Microsystems Bond™ (Германия)*. Оценка окрашенных препаратов проводили с использованием светового микроскопа *Leica*. В 10 полях зрения каждого образца при увеличении $\times 400$ производили подсчет иммунопозитивных клеток с положительной реакцией по коричневому окрашиванию ядра. Среднее число *Ki-67* иммунопозитивных клеток вычисляли соотношением позитивно окрашенных клеток к негативно окрашенным клеткам (на 100 просчитанных клеток) [11].

Экспрессию маркера определяли в следующих показателях яичников потомства: в первичных, вторичных, третичных фолликулах; в желтом теле; в строме органа.

Статистическую обработку осуществляли с использованием программы *Statistica 7.0 (StatSoft, США)*. По каждому параметру вычисляли среднее арифметическое значение и его стандартную ошибку ($M \pm SD$). Достоверность изменений оценивали с помощью метода Краскела-Уолиса, различия определяли при достигнутом уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Результаты морфометрического анализа ИГХ-маркера *Ki-67* при введении доз эстрогенов представлены на рис. 1-4 и в табл.

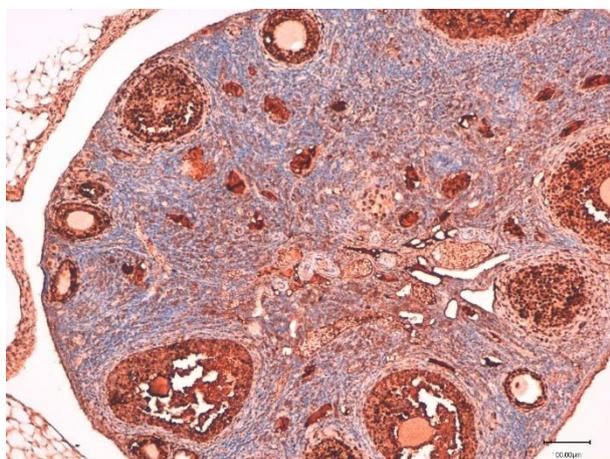


Рис. 1. Экспрессия белка *Ki-67* на яичник потомства интактной группы. Докраска ядер гематоксилином. $\times 100$

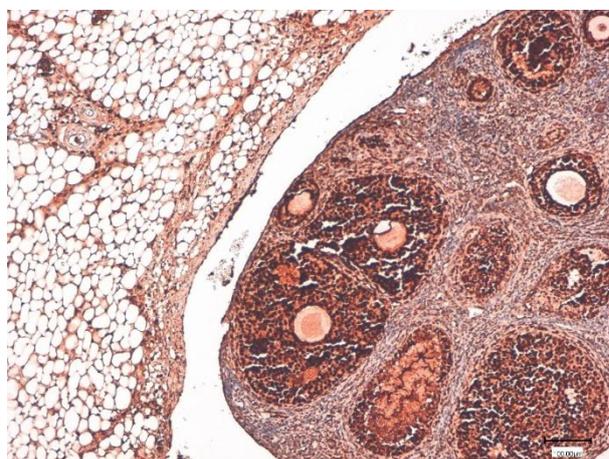


Рис. 2. Экспрессия белка *Ki-67* на яичник потомства экспериментальной группы С-25. Докраска ядер гематоксилином. $\times 100$

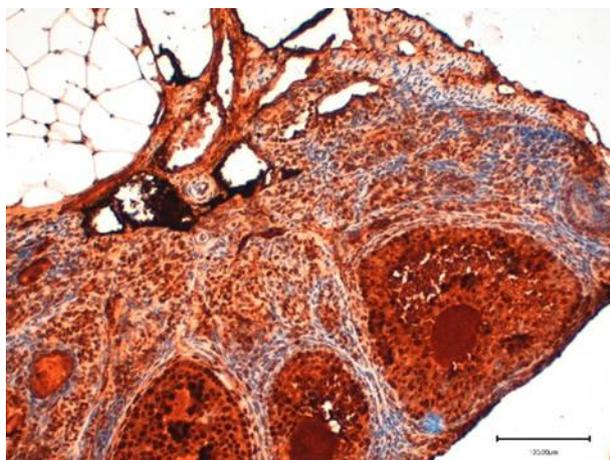


Рис. 3. Экспрессия белка *Ki-67* на яичник потомства экспериментальной группы С-40. Докраска ядер гематоксилином. $\times 100$

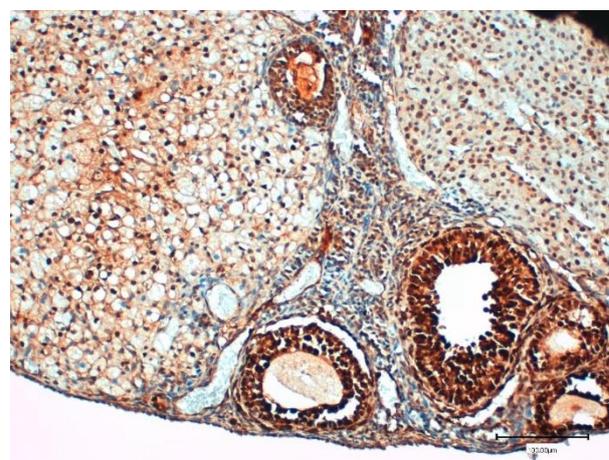


Рис. 4. Экспрессия белка *Ki-67* на яичник потомства экспериментальной группы С-50. Докраска ядер гематоксилином. $\times 100$

**Иммуногистохимическое влияние маркера Ki-67 на морфологию яичников
 потомства при пренатальном введении эстрогенов**

Показатели	Интактная	Контроль (МО)	С-25	С-40	С-50
Первичные фолликул	80,2±3,7	73,6±5,2	66,8±5,8*	81,0±3,2	91,0±2,7*
Вторичные фолликул	74,0±6,1	76,2±3,7	70,6±5,5	82,2±4,8	83,8±3,8
Третичные фолликул	79,0±2,5	69,8±5,8*	61,6±3,0*	85,0±4,7	87,0±4,2
Желтые тела	59,8±2,4	68,4±3,9*	60,6±1,1	44,2±3,5*	80,8±12,9*
Строма	56,0±3,5	60,8±3,2	53,0±4,1	77,0±2,1*	64,2±3,7*

Примечание: * – в сравнении с интактной группой выявлены различия со значимостью $p \leq 0,05$

Степень экспрессии белка Ki-67 в первичных фолликулах органа в экспериментальной группе «С-25» была меньше, чем в интактной группе на 16,7% ($p \leq 0,05$), в экспериментальных группах «С-40» и «С-50» экспрессия белка увеличилась на 0,9% на 13,5% ($p \leq 0,05$) соответственно. Во вторичных фолликулах значимых изменений не выявлено, но наблюдалась тенденция к увеличению содержания Ki-67-положительных окрашенных клеток. Экспрессия Ki-67 в третичных фолликулах контрольной «МО» и экспериментальной «С-25» группах была сравнительно низкая, чем в интактной группе (на 11,6% ($p \leq 0,05$) и 22,0% ($p \leq 0,05$) соответственно), однако, увеличение количества позитивно окрашенных клеток Ki-67 произошло в таких группах, как «С-40» мкг/кг на 7,6% и «С-50» мкг/кг на 10,1%. Уровень экспрессии белка Ki-67 в желтых телах органа увеличился в контрольной группе «МО» на 14,4% ($p \leq 0,05$), в экспериментальных группах «С-25» на 1,3% и «С-50» на 35,1% ($p \leq 0,05$). Уменьшение количества позитивно окрашенных клеток в желтом теле произошло только в экспериментальной группе «С-40» на 26,1% ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. Показатель экспрессии белка Ki-67 достоверно увеличился в экспериментальных группах «С-40» и «С-50» на 37,5% ($p \leq 0,05$) и 14,6% ($p \leq 0,05$) соответственно, по сравнению с интактной группой. В первой экспериментальной группе «С-25» во всех исследуемых показателях наблюдалось снижение митотической активности клеток при экспрессии маркера Ki-67, свидетельствующее об ускоренной физиологической гибели клеток. Во второй экспериментальной группе «С-40» уровень экспрессии белка Ki-67 в желтых телах достоверно уменьшился, но вместе с тем увеличение экспрессии произошло в остальных показателях, демонстрирующие о снижении процесса естественной гибели клеток. В третьей экспериментальной группе «С-50» наблюдался однонаправленный процесс роста количества иммунопозитивно-окрашенных клеток во всех исследуемых показателях, свидетельствующие о снижении процесса естественной гибели клеток.

Заключение. Таким образом, введенные исследуемые дозы синтетического эстрогена синестрола в пренатальный период вызывают морфофункциональные нарушения в яичниках потомства. Дозозависимость эстрогенов может служить фоном для развития структурных изменений в яичниках потомства, о чем свидетельствует экспрессия маркера Ki-67.

Литература

1. Григорян А.Н. Физическое и половое развитие детей, рожденных женщинами, принимавшими во время беременности гормональную терапию: автореф. дис. ... к.м. н. Москва, 2017. 27 с.
2. Гуськова Т.А. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований // Токсикологический вестник. 2010. № 5 (104). С. 2–6.
3. Корсак В.С., Смирнова А.А., Шурыгина О.В. Регистр ВРТ Российской ассоциации репродукции человека. Отчет за 2017 год // Проблемы репродукции. 2019. Т. 25, № 6. С. 9–21.
4. Никогосян С.О., Барышников А.Ю., Степанова Е.В., Кузнецов В.В., Карапетян В.Л. Клиническое значение индекса Ki-67 в ткани опухоли у больных раком яичников I и II стадии // Российский онкологический журнал. 2014. Т. 19, №5. С. 36–41. DOI: 10.17816/onco40112
5. Степанова Е.В., Барышников А.Ю., Никогосян С.О., Кузнецов В.В., Карапетян В.Л. Молекулярно-биологические факторы прогноза рака яичников начальных стадий // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2011. № 22(1). Р. 37–41.
6. Сулайманова Р.Т., Хайруллин Р.М., Имаева А.К. Способ моделирования проканцерогенного действия синестрола на яичники потомства женского пола у лабораторных мышей. Патент на изобретение № RU 2676437 от 09.01.2018.
7. Сулайманова Р.Т., Хайруллин Р.М., Лебедева А.И., Сулайманова Л.И., Асхабова Э.Д. Морфологические особенности яичников потомства лабораторных мышей, которым вводили эстрогены во время беременности // Педиатр. 2021. Т. 12, № 6. С. 55–62.
8. Сулайманова Р.Т. Эффекты пренатального воздействия субтоксической дозы синестрола на яичники потомства лабораторных мышей // Морфологические ведомости. 2020. Т. 28, № 1. С. 37–42. DOI: 10.20340/mv-mn.2020.28(1):37-42.

9. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. С. 49–51.
10. Чибисова Г.М., Хабаров С.В. Комплексное определение онкомаркеров СА125, HE4 и индекса ROMA как фактор прогноза развития рака яичников // Вестник новых медицинских технологий. 2018. Т. 25, №3. С. 15–20. DOI: 10.24411/1609-2163-2018-16158.
11. Шарафутдинова Л.А. Морфофункциональные изменения нервной, иммунной и репродуктивной систем при воздействии наноразмерного диоксида титана в форме рутила: дис. ... д.б.н. Казань, 2019. 258 с.
12. Cora M.C., Kooistra L., Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears // Toxicologic Pathology. 2015. № 43(6). С. 776–793.

References

1. Gus'kova TA. Doklinicheskoye toksikologicheskoye izucheniye lekarstvennykh sredstv kak garantiya bezopasnosti provedeniya ikh klinicheskikh issledovaniy [Preclinical toxicological examination of medicines as a guarantee of the safety of their clinical trials]. Toksikologicheskij vestnik, 2010;5(104):2-6. Russian.
2. Grigoryan AN. Fizicheskoye i polovoye razvitiye detej, rozhdennykh zhenshchinami, primivavshimi vo vremya beremennosti gormonal'nyuyu terapiyu [Physical and sexual development of children born to women who took hormone therapy during pregnancy] [dissertation]. Moscow; 2017. Russian.
3. Korsak VS. Registr VRT Rossijskoj associacii reprodukcii cheloveka. Otchet za 2017 god [Register of the Russian Association of Human Reproduction. Report for 2017]. Problemy reprodukcii. 2019;25(6):9-21. Russian.
4. Nikogosyan SO, Baryshnikov AYU, Stepanova EV, Kuznecov VV, Karapetyan VL. Klinicheskoye znachenie indeksa Ki-67 v tkani opuholi u bol'nykh rakom yaichnikov I i II stadii [Clinical value of the Ki-67 index in tumor tissue in patients with stage I and II ovarian cancer]. Rossijskij onkologicheskij zhurnal. 2014;19(5):36-41. DOI: 10.17816/onco40112. Russian.
5. Sulaimanova RT, Khairullin RM, Lebedeva AI, Sulaimanova LI, Askhabova ED. Morfologicheskie osobennosti yaichnikov potomstva laboratornykh myshej, kotorym vvodili estrogeny vo vremya beremennosti [Morphological features of ovaries of offspring of laboratory mice injected with estrogens during pregnancy]. Pediatr. 2021;12(6):55-62. Russian.
6. Sulaimanova RT. Effekty prenatal'nogo vozdejstviya subtoksicheskoj dozy sinestrola na yaichniki potomstva laboratornykh myshej [Effects of prenatal exposure to a subtoxic dose of synestrol on the ovaries of offspring of laboratory mice]. Morfologicheskie vedomosti. 2020;28(1):37-42. DOI: 10.20340/mv-mn.2020.28(1):37-42. Russian.
7. Sulaymanova RT, Khayrullin RM, Imaeva AK. Sposob modelirovaniya prokancerogenogo dejstviya sinestrola na yaichniki potomstva zhenskogo pola u laboratornykh myshej. Patent na izobretenie. [A method for modeling the procarcinogenic effect of synestrol on the ovaries of female offspring in laboratory mice]. № RU 2676437 data 09.01.2018. Russian.
8. Stepanova EV, Baryshnikov AYU, Nikogosyan SO, Kuznecov VV, Karapetyan VL. Molekulyarno-biologicheskie faktory prognoza raka yaichnikov nachal'nykh stadij. [Molecular biological factors of the prognosis of ovarian cancer of the initial stages] Vestnik RONC im. NN. Blohina RAMN. 2011; 22(1): 37-41. Russian.
9. Khabriyev RU. Rukovodstvo po eksperimental'nomu izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv [Guidelines for the experimental study of new pharmacological substances]. Moscow; 2005. Russian.
10. Chibisova GM, Khabarov SV. Kompleksnoye opredeleniye onkomarkerov SA125, HE4 i indeksa ROMA kak faktor prognoza razvitiya raka yaichnikov [Complex definition of oncoprotein CA125, HE4 and ROMA index as a factor in the prognosis of ovarian cancer]. Journal of New Medical Technologies. 2018;25(3):15-20. DOI: 10.24411/1609-2163-2018-16158. Russian
11. Sharafutdinova LA. Morfofunkcional'nye izmeneniya nervnoj, immunnoj i reproduktivnoj sistem pri vozdejstvii nanorazmernogo dioksida titana v forme rutile. [Morphofunctional changes of the nervous, immune and reproductive systems under the influence of nanoscale titanium dioxide in the form of rutile] [dissertation]. Kazan'; 2019. Russian.
12. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. Toxicologic Pathology. 2015;43(6):776-93.

Библиографическая ссылка:

Сулайманова Р.Т. Экспрессия маркера *ki-67* при пренатальном введении эстрогенов на яичники потомства // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2022. №3. Публикация 3-2. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-3/3-2.pdf> (дата обращения: 20.05.2022). DOI: 10.24412/2075-4094-2022-3-3-2. EDN YRQBHH *

Bibliographic reference:

Sulaymanova RT. Jekspressija markera *ki-67* pri prenatal'nom vvedenii jestrogenov na jaichniki potomstva [Expression of the *ki-67* marker during prenatal administration of estrogens to the ovaries of offspring]. Journal of New Medical Technologies, e-edition. 2022 [cited 2022 May 20];3 [about 5 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-3/3-2.pdf>. DOI: 10.24412/2075-4094-2022-3-3-2. EDN YRQBHH

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-3/e2022-3.pdf>

**идентификатор для научных публикаций EDN (eLIBRARY Document Number) будет активен после загрузки полной версии журнала в eLIBRARY