



ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В МИОМЕТРИИ И ЭНДОМЕТРИИ БОЛЬНЫХ С СОЧЕТАННЫМИ ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ МАТКИ

М.Ю. Смирнова¹

Л.Х. Джемлиханова¹

М.А. Клецёв²

И.Н. Костючек²

Д.А. Ниаури¹

И.М. Квотной²

¹Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

²НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург

e-mail: makleshchov@mail.ru

На основании морфологического и иммуногистохимического исследования показано, что обследование женщин с гормонально зависимыми гиперпластическими процессами на уровне тканевой экспрессии сигнальных молекул позволяет выявить важные особенности взаимного влияния этих заболеваний.

Ключевые слова: миома матки, аденомиоз, простая гиперплазия эндометрия, рецепторы эстрогенов, рецепторы прогестерона, факторы роста, апоптоз.

Интерес исследователей к проблемам сочетания между собой гиперпластических процессов органов репродуктивной системы женщин связан с большой распространенностью гиперпластических процессов в структуре гинекологической патологии и с высокой частотой сочетаний этих заболеваний. Так, у больных миомой матки аденомиоз встречается в 23-55 % случаев [3, 5] гиперплазия эндометрия – более чем в 70 % случаев [13]; у больных аденомиозом миома матки выявляется в 35-85 % [1, 9, 15], гиперплазия эндометрия – от 7 до 35% случаев [1, 3]. Поэтому актуальными являются вопросы патогенеза этих заболеваний, выбора оптимальной лечебной тактики и прогноза рецидивов.

Несмотря на различный гистогенез миомы матки, аденомиоза и гиперплазии эндометрия известна зависимость развития этих заболеваний от действия половых стероидных гормонов. Активно изучается также роль факторов, регулирующих пролиферацию и апоптоз.

В последние годы появляются работы, посвящённые молекулярно-биологическим характеристикам миомы матки, аденомиоза – как изолированных, так и при их сочетании [4, 6, 7, 11, 12]. Изучаются клинические и патоморфологические аспекты сочетания миомы матки с онкологической патологией (рак эндометрия, злокачественная трансформация аденомиоза) [8, 9]. Однако имеющиеся в литературе данные с трудом поддаются сопоставлению, поскольку получены на разном клиническом материале, с применением различных методик. В то же время, характеристики интактного миометрия с точки зрения экспрессии факторов пролиферации и апоптоза у больных с миомой матки, аденомиозом и их сочетанием практически не изучены, хотя представляют интерес с фундаментальных (уточнение патогенеза заболеваний) и прикладных позиций (прогнозирование рецидивов заболеваний после органосохраняющего лечения).

Целью работы явилось сравнительное изучение экспрессии рецепторов половых стероидных гормонов, факторов пролиферации и апоптоза в тканях матки у больных с солитарной миомой матки (ММ) и при её сочетании с аденомиозом (АМ) и гиперплазией эндометрия (ГЭ).

Проведено пилотное исследование, в которое вошли 13 больных миомой матки: в солитарной форме (n=6) и в сочетании с АМ (n=4) или с ГЭ (n=3). Во всех случаях критерием включения была гистологическая верификация диагноза. Проводилось клиническое обследование больных, оперативное лечение, гистологическое и иммуно-



гистохимическое (ИГХ) исследование операционного материала: эндометрия, узлов миомы матки и интактного миометрия.

Клиническая характеристика обследованных больных. В исследование были включены пациентки репродуктивного и перименопаузального возраста (средний возраст $43,7 \pm 6,0$ лет). Давность заболевания ММ к моменту оперативного лечения составила от нескольких месяцев до 20 лет, при этом у одной больной ММ была зарегистрирована после проведенной ранее консервативной миомэктомии. У всех больных с сочетанием ММ и АМ миома матки являлась первым выявленным заболеванием, а АМ у всех больных был выявлен впервые при настоящей госпитализации. Во всех случаях сочетания ММ и простой ГЭ миома матки была первым выявленным заболеванием.

Средний возраст менархе у обследованных женщин составил $12,9 \pm 1,2$ лет. Длительность менструального цикла у больных с регулярным циклом составила $28,0 \pm 1,3$ дня, длительность менструального кровотечения $5,2 \pm 1,5$ дней. Нарушения менструального цикла отмечены у 4 больных и проявлялись гиперменореей (1), опсоменореей (1), менометроррагией (1), метроррагией (1). Беременности в анамнезе были у 12 женщин, роды – у 10 женщин, искусственные аборты у 9 женщин, самопроизвольные выкидыши у 2 больных. Бесплодием страдали 2 больные (1 – первичным, 1 – вторичным). Больные предъявляли жалобы на боли в нижних отделах живота (5 больных), нарушения менструального цикла (4), бесплодие (1); у 3 больных жалоб не было. Основными показаниями к оперативному лечению явились большие размеры миомы матки (4 больных), быстрый рост миомы матки (5), метроррагии (1), болевой синдром (2), множественность миомы матки (2), планирование беременности (1), сочетание гиперпластических процессов матки (1); сочетанные показания отмечены в 5 случаях. В 11 случаях произведены радикальные операции (надвлагалищная ампутация или экстирпация матки), в 2 случаях – органосохраняющие операции (консервативная миомэктомия).

При обследовании сопутствующий наружный генитальный эндометриоз выявлен у 3 больных, опухолевидные заболевания яичников – у 8 больных (представлены фолликулярными кистами в 5 случаях, стромальной гиперплазией – в 2 случаях, кистой желтого тела – в 1 случае); хронические воспалительные заболевания органов малого таза выявлены у 5 больных; заболевания шейки матки выявлены у 9 больных. Из сопутствующей экстрагенитальной патологии заболеваниями сердечно-сосудистой системы страдали 6 больных, анемия выявлена у 4 больных, заболеваниями пищеварительной системы страдали 6 больных, заболеваниями дыхательной системы страдали 3 больных, заболеваниями почек также 3 больных. Патология щитовидной железы выявлена у 3 больных, нарушения углеводного обмена – 1 больной.

Группы больных с солитарной ММ, с ММ в сочетании с АМ и с ММ в сочетании с ГЭ по клиническим характеристикам были сопоставимы между собой.

Морфологические методы исследования. Проводилось стандартное патоморфологическое исследование операционного материала и отбор образцов ткани для ИГХ исследования.

ИГХ методом в ткани лейомиомы (для всех больных) и интактного миометрия и эндометрия (в случае радикальных операций) выявляли экспрессию рецепторов эстрогенов (ER) и прогестерона (PR), маркера пролиферации Ki-67, сосудистого эндотелиального фактора роста (СЭФР) и трансформирующего фактора роста- β (ТФР- β), факторов системы апоптоза Fas (CD95) и FasL. Все маркеры исследовали на парафиновых срезах (толщина 5 мкм) авидин-биотиновым иммунопероксидазным методом. Предварительно образцы тканей фиксировали в нейтральном формалине (рН=7,2).

Постановку ИГХ реакции осуществляли по стандартному протоколу [10] с использованием моноклональных мышинных антител к ER, PR, Ki-67 («Dako», Дания), СЭФР, ТФР- β , Fas и FasL («Novocastra», Великобритания) и системы визуализации Dako Cytomation LSAB2 System-HRP («Dako», Дания), состоящей из биотинилированных козьих антикроличьих и антимышиных антител, стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена и 3,3'-диаминобензида. Исследование проводилось с использованием соответствующего позитивного и негативного контроля. На заключительном этапе препараты докрашивали гематоксилином для выявления ядер.



Для количественной оценки результатов ИГХ реакции получали по 5 микрофотографий соответственно 5 случайно выбранным полям зрения на увеличении $\times 200$ для каждого образца. В дальнейшем с помощью программы компьютерного анализа изображений «Морфология 5.0» (ВидеоТест, Россия) оценивали площадь, занятую иммунопозитивными структурами, относили её к общей площади кадра и рассчитывали показатель относительной площади (%), в котором и выражалась экспрессия исследуемых маркеров. Ранее нами было показано, что этот показатель возможно использовать для сравнения распространённости экспрессии как ядерных, так и цитоплазматических маркеров в серии однотипных образцов ткани [14].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов описательной статистики и непараметрических критериев: U критерий Манна-Уитни, ранговый дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса, медианный тест. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

Результаты. Экспрессия изучаемых маркеров в эндометрии. Из 7 больных с ММ, у которых было выполнено ИГХ исследование эндометрия, 5 были прооперированы в период с 17 по 25 день менструального цикла, 2 больные – с 8 по 16 день цикла. При гистологическом исследовании у 3-х больных, прооперированных с 17 по 25 день цикла, выявлена гиперплазия эндометрия (в 2 случаях выявлена простая гиперплазия эндометрия без атипии и в 1 случае – базальная), а у 2-х – эндометрий соответствовал секреторной фазе. Из больных, прооперированных с 8 по 16 день цикла, у одной ММ была солитарным заболеванием, а у второй – сочеталась с АМ; эндометрий соответствовал пролиферативной фазе менструального цикла у обеих больных.

Достоверных различий в экспрессии исследуемых маркеров в эпителии желёз эндометрия у больных с солитарной ММ (в эндометрии, соответствующем секреторной фазе) и у больных с ММ в сочетании с ГЭ не было выявлено (табл. 1). Однако имеется тенденция к большей экспрессии рецепторов прогестерона у больных с сочетанием ММ и ГЭ. Закономерной представляется большая экспрессия маркера клеточной пролиферации Ki67 у больных с сочетанием ММ и ГЭ по сравнению с изолированной ММ – это отвечает патофизиологической сути ГЭ.

Таблица 1

Экспрессия исследуемых маркеров в эпителии желёз эндометрия при ГЭ и в секреторную фазу менструального цикла

| Клиническая группа | Сопоставляемая величина | Значения относительной площади (%) исследуемых маркеров в эпителии желёз эндометрия | | | | | | |
|--------------------|-------------------------|---|------|------|-------|------|------|------|
| | | ER | PR | Ki67 | ТФР-β | СЭФР | Fas | FasL |
| солитарная ММ | Наблюдение 1 | 20,7 | 14,3 | 0,3 | 41,1 | 17,9 | 33,1 | 6,4 |
| | Наблюдение 2 | 22,9 | 0,3 | 0 | 40,4 | 1,4 | 40 | 7,6 |
| сочетание ММ и ГЭ | Наблюдение 1 | 26 | 27,4 | 15 | 30,5 | 30,5 | 28,4 | 23,3 |
| | Наблюдение 2 | 23,3 | 26,9 | 14,9 | 32,3 | 32,7 | 19,4 | 23,1 |
| | Наблюдение 3 | 39,2 | 24,6 | 10,7 | 19,7 | 0 | 17,8 | 6,3 |

Имеется тенденция к более низкой экспрессии ТФР-β в железах эндометрия при наличии ГЭ. Учитывая, что этот ростовой фактор способствует дифференцировке клеток, выступает потенциальным ингибитором пролиферации эпителиальных клеток [2], снижение его экспрессии при ГЭ представляется объяснимым.

Имеется тенденция к более низкой экспрессии Fas при сочетании ММ и ГЭ и к более высокой экспрессии его лиганда у этих больных. При этом характерное для опухолевой трансформации соотношение Fas/FasL в пользу FasL [2] наблюдается только при ММ и ГЭ.

Экспрессия изучаемых маркеров в строме эндометрия секреторной фазы цикла также достоверно не различалась (табл. 2).



Таблица 2

**Экспрессия исследуемых маркеров в строме эндометрия при ГЭ
и в секреторную фазу менструального цикла**

| Клиническая группа | Сопоставляемая величина | Значения относительной площади (%) исследуемых маркеров в строме эндометрия | | | | | | |
|--------------------|-------------------------|---|------|------|-------|------|------|------|
| | | ER | PR | Ki67 | ТФР-β | СЭФР | Fas | FasL |
| солитарная ММ | Наблюдение 1 | 13,8 | 24,1 | 2,9 | 28,3 | 12,1 | 18,8 | 2 |
| | Наблюдение 2 | 14,9 | 19,8 | 0 | 49,9 | 8,3 | 46,7 | 9 |
| сочетание ММ и ГЭ | Наблюдение 1 | 13,7 | 12,9 | 7,5 | 25,5 | 27,9 | 34,2 | 5,4 |
| | Наблюдение 2 | 7,9 | 12 | 2,6 | 7,9 | 13,7 | 13 | 9,6 |
| | Наблюдение 3 | 12,9 | 12,4 | 2 | 7,2 | 0 | 0 | 0 |

В строме эндометрия секреторной фазы менструального цикла отмечается тенденция к меньшему уровню экспрессии PR у больных с ММ и ГЭ, а также к большей экспрессии Ki67 у этих больных.

В пролиферативную фазу менструального цикла у 2 обследованных пациенток наблюдалась меньшая экспрессия ER в железах эндометрия в случае сочетания ММ и АМ по сравнению с солитарной ММ (12,9 и 35,3%, соответственно). Та же закономерность выявлена и для экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста – экспрессия в железах эндометрия пролиферативной фазы менструального цикла ниже при наличии АМ (8,6%, чем при солитарной ММ (13,7%). Напротив, экспрессия ТФР-β оказалась выше при наличии АМ по сравнению с больными с солитарной ММ (22,6 и 4,6%, соответственно). Выявленные закономерности нуждаются в уточнении на большем клиническом материале.

Экспрессия изучаемых маркеров в узлах лейомиомы достоверно не различалась в сравниваемых группах. Отмечается лишь тенденция к большей экспрессии ТФР-β, Fas и FasL в узлах лейомиомы при солитарной ММ по сравнению со случаями ММ в сочетании с АМ или ГЭ (табл. 3).

Стоит отметить также, что при солитарной миоме матки особенно высокие значения экспрессии PR (13,2%), ТФР-β (23,3%) и СЭФР (14,2%) отмечены в узле лейомиомы, гистологически характеризующейся как растущая.

В целом среди изученных образцов лейомиомы самый высокий уровень экспрессии PR отмечен при ММ в сочетании с АМ (относительная площадь экспрессии 22,1%) и при ММ в сочетании с ГЭ (относительная площадь экспрессии 11,2%), что говорит об особенностях рецепторного профиля миом при присоединении второго заболвания.

Таблица 3

Экспрессия исследуемых маркеров в узлах лейомиомы матки

| Клиническая группа | Значения относительной площади (%) исследуемых маркеров в строме эндометрия, среднее арифметическое±среднее квадратическое отклонение | | | | | | |
|-------------------------|---|------------|---------------|------------|---------------|-----------------|-----------------|
| | ER | PR | Ki67 | ТФР-β | СЭФР | Fas | FasL |
| солитарная ММ (n=5) | 3,48±3,5 9 | 6,76±5,45 | 0,04±0, 05 | 13,27±7,12 | 3,00±6,2 7 | 10,49±12,1 9 | 16,66±10,1 3 |
| сочетание ММ и АМ (n=4) | 1,98±2,7 8 | 10,85±9,15 | 0,03±0, 05 | 4,40±2,26 | 0,70±1,2 7 | 3,93±3,27 | 2,85±3,38 |
| сочетание ММ и ГЭ (n=3) | 3,60±2,1 5 | 8,63±2,95 | 0,00±0, 00 | 6,83±6,48 | 1,40±2,3 4 | 8,47±4,37 | 6,80±2,09 |

По экспрессии изучаемых маркеров в интактном миометрии не было выявлено достоверных различий между сопоставляемыми группами (табл. 4). Отмечается особенность миометрия больных с сочетанием ММ и АМ в виде полного отсутствия экспрессии маркера пролиферации Ki67.



Таблица 4

Экспрессия исследуемых маркеров в интактном миометрии

| Клиническая группа | Значения относительной площади (%) исследуемых маркеров в строме эндометрия, среднее арифметическое±среднее квадратическое отклонение | | | | | | |
|-------------------------|---|----------------|---------------|-----------------|-----------|-------------|------------|
| | ER | PR | Ki67 | ТФР-β | СЭФР | Fas | FasL |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| солитарная ММ (n=4) | 1,38±2,23 | 6,15±3,17 | 0,04±0,0 4 | 18,45±13,8 1 | 3,23±1,25 | 14,18±11,07 | 9,88±4,45 |
| сочетание ММ и АМ (n=3) | 0,57±0,72 | 7,30±5,98 | 0,0±0,0 | 5,00±5,63 | 0,33±0,58 | 1,63±1,60 | 2,83±2,63 |
| сочетание ММ и ГЭ (n=2) | 6,15±1,34 | 13,85±0,3 5 | 0,10±0,1 4 | 19,30±3,54 | 1,70±2,26 | 0,0±0,0 | 9,55±12,94 |

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что обследование женщин с гормонально зависимыми гиперпластическими процессами на уровне тканевой экспрессии сигнальных молекул позволяет выявить важные особенности взаимного влияния этих заболеваний.

Литература

1. Гуриев, Т.Д. Сочетание миомы матки и аденомиоза: новые аспекты патогенеза, диагностики и лечения: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. / Т.Д. Гуриев. – М. – 2005. – 47 с.
2. Дамиров, М.М. Аденомиоз. / М.М. Дамиров. – М.: БИНОМ, 2004. – 320 с.
3. Мунтян, А.Б. Рак эндометрия и миома матки: клинические, гормональные и биохимические аспекты / А.Б. Мунтян, Л.А. Коломиец, Н.В. Бочкарёва // Сибирский онкологический журнал. – 2007. – Приложение. – С. 55-59.
4. Печеникова, В.А. Клиника, морфофункциональная характеристика аденомиоза и его опухолевой трансформации: Автореф. дисс.... канд. мед. наук. / В.А. Печеникова. – СПб, 2005. – 21 с.
5. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Ред. С.В. Петров и Н.Т. Райхлин // – 3-е изд., дополненное и переработанное. – Казань: Титул. – 2004. – 456 с.
6. Сидорова, И.С. Дооперационное прогнозирование пролиферативной активности доброкачественных гладкомышечных опухолей матки / И.С. Сидорова, Н.Н. Капустина, О.В. Рыжова // Акуш. и гинек. – 2004. – № 5. – С. 25-29.
7. Сидорова, И.С. Комплексная консервативная терапия миомы матки в сочетании с аденомиозом: применение препарата «Курантил» / И.С. Сидорова, С.А. Леваков, А.Л. Унанян // Consilium medicum. – 2007. – Т.9. – № 6. – С. 21-24.
8. Сидорова, И.С. Патология эндометрия при наличии миомы матки / И.С. Сидорова, Н.А. Шешукова, С.В. Закаблукова // Гинекология. – 2006. – Т. 8. – № 4. – Режим доступа: <http://old.consilium-medicum.com/media/gynecology/>. – Дата обращения: 23.09.2009.
9. Смирнова, М.Ю. Количественная иммуногистохимия: оптимизация анализа экспрессии сигнальных молекул в миометрии. / М.Ю. Смирнова (м др.) // Архив патологии. – 2010. – Т. 72. – № 1. – С. 51-55.
10. Унанян, А.Л. Эндометриоз тела матки и яичников: новые аспекты патогенеза, клиники и лечения: Автореферат дисс. ... доктора медицинских наук / А.Л. Унанян. – Москва, 2007. – 45 с.
11. Bergeron, C. Pathology and physiopathology of adenomyosis / C. Bergeron, F. Amant, A. Ferenczy // Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. – 2006. – Vol. 20, Issue 4 (August 2006). – P. 511-521.
12. Kim, R. The role of Fas ligand and transforming growth factor beta in tumor progression: molecular mechanisms of immune privilege via Fas-mediated apoptosis and potential targets for cancer therapy. / R. Kim (and oth.) // Cancer. – 2004. – Vol. 100. – N 11. – P. 2281-91.
13. Kitawaki, J. Adenomyosis: the pathophysiology of an oestrogen-dependent disease / J. Kitawaki // Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. – 2006. – Vol. 20, Issue 4 (August 2006). – P. 493-502.
14. Maruo, T. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. / T. Maruo (and oth.) // Hum. Reprod. Update. – 2004. – Vol. 10. – N. 3. – P. 207-20.



15. Vercellini, P. Adenomyosis: epidemiological factors / P. Vercellini(and oth.) // Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. – 2006. – Vol., Issue 4 (August 2006). – P. 465-477.

IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES OF SIGNALING MOLECULE EXPRESSION IN THE MYOMETRIUM AND ENDOMETRIUM OF PATIENTS WITH CONCOMITANT HYPERPLASTIC PROCESSES IN UTERUS

M.Yu.Smirnova¹, L.H. Dzhemlikhanova¹

M.A.Kleshchov², I.N.Kostioutchek²

D.A.Niauri¹, I.M.Kvetnoy²

*¹St.Petersburg Institute
of Bioregulation and Gerontology,
NMB of RAMS*

*²D.O Ott Research Institute
Of Obstetrics and Gynecology RAMS,
St.Petersburg*

e-mail: makleshchov@mail.ru

Based on morphological and immunohistochemical studies showed that screening women with hormone-dependent hyperplasia at the level of tissue expression of signaling molecules can the interference of these diseases.

Keywords: uterine fibroids, adenomyosis, simple endometrial hyperplasia without atypia, estrogen receptors, progesterone receptors, growth factors, apoptosis.