

**В.О.Потапов
Ю.В.Донська
М.В.Медведєв**

ДЗ «Дніпропетровська
медична академія МОЗ
України»

Ключові слова: лейоміо-
ма матки, гіперплазія ен-
дометрія, імуногістохіміч-
ний аналіз.

Надійшла: 20.02.2014

Прийнята: 14.03.2014

УДК 618.14:616-006.36-089:612.6

ГІСТОЛОГІЧНА ТА ІМУНОГІСТОХІМІ- ЧНА ОЦІНКА СТАНУ МІОМАТОЗНОЇ ТКАНИНИ ТА ЕНДОМЕТРІЯ У ХВОРИХ НА ЛЕЙОМІОМУ МАТКИ ТА ГІПЕРПЛА- ЗІЮ ЕНДОМЕТРІЯ

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи "Розробка нових підходів до прогнозування, профілактики і лікування гормонозалежних захворювань жіночої репродуктивної системи" (номер державної реєстрації 0107U011888).

Реферат. У дослідженні проведено імуногістохімічний аналіз маркерів проліферації, апоптозу, ангиогенезу та рецепторів стероїдних гормонів міоматозної тканини і ендометрія у 30 хворих з лейоміомою матки та гіперплазією ендометрія. Дослідження показали, що у випадках високого ризику рецидиву лейоміоми матки та гіперплазії ендометрія виявлено: підвищену проліферативну активність, ангиогенез та пригнічений апоптоз. З метою оптимізації результатів лікування у жінок з імуноморфотипом «високої активності» слід уникати застосування терапії гестагенами. Лікуванням вибору в таких випадках повинні бути препарати з вираженим потужним впливом на всі перелічені ланки.

Morphologia. – 2014. – Т. 8, № 1. – С. 80-84.

© В.О.Потапов, Ю.В.Донська, М.В.Медведєв, 2014

✉ medvedev.mv@gmail.com

Potapov V.A., Donskaya Yu.V., Medvedev M.V. Histological and immunohistochemical evaluation of leiomyoma and endometrial tissue in patients with uterine leiomyoma and endometrial hyperplasia.

ABSTRACT. Background. Uterine leiomyoma and endometrial hyperplasia are commonly found disorders because of quite similar pathogenic pathways associated with action of sex steroids such as estradiol and progesterone. The gold standard of treatment of combination of uterine leiomyoma and endometrial hyperplasia is myomectomy with further prescription of gestagens. **Objective.** Histological and immunohistochemical evaluation of leiomyoma and endometrial tissue in patients with uterine leiomyoma and endometrial hyperplasia. **Methods.** In this study histological and immunohistochemical analysis of leiomyoma and endometrium samples were conducted in 30 patients with uterine leiomyoma and endometrial hyperplasia. Further evaluation with transvaginal ultrasound endometrial biopsy was conducted in 6 and 12 months after surgery. **Results.** In women with combined endometrial hyperplasia and uterine leiomyoma there is an increased risk of myoma relapse (23.3%) and treatment failure of endometrial hyperplasia (36.7%) after traditional treatment with gestagens. Among 7 patients with leiomyoma recurrence there was persistence of endometrial hyperplasia what was associated with increased proliferation, angiogenesis and decreased apoptosis. **Conclusion.** During a comprehensive immunohistochemical study of endometrial biopsies and uterine leiomyoma in women with histologically verified uterine leiomyoma and endometrial hyperplasia common immunohistochemical features had been identified such as increased expression of ki-67 and VEGF and bcl-2. It was proposed that traditional scheme using derivatives of progesterone should be avoided in such patients. In order to optimize treatment outcomes in women with such findings proposed treatment of choice should be drugs with severe suppressive action on proliferation, angiogenesis with simultaneous stimulating action on apoptosis. Drug of choice in such case should be GnRH agonist what should be assessed in future research.

Key words: leiomyoma, endometrial hyperplasia, immunohistochemical analysis.

Citation:

Potapov VA, Donskaya YuV, Medvedev MV. [Histological and immunohistochemical evaluation of leiomyoma and endometrial tissue in patients with uterine leiomyoma and endometrial hyperplasia]. *Morphologia*. 2014;8(1):80-4. Ukrainian.

Вступ

В останні роки існує тенденція до зростання числа хворих молодого віку з лейоміомою матки (ЛМ) – одним з найбільш розповсюджених захворювань жіночої репродуктивної системи, що

вимагає широкого впровадження органозберігаючих методів лікування [1].

Стандартомінвазивного органозберігаючого лікування ЛМ залишається консервативна міомектомія. Нажаль, міомектомія не завжди дає

задовільні результати. За даними літератури, приблизно 25-50% жінок мають рецидив після міомектомії і 10% потребують повторного оперативного втручання у періоді від 1 до 10 років після першої операції [1; 2].

Золотим стандартом терапії гіперпластичних процесів ендометрія(ГЕ) вважаються препарати групи гестагенів. Однак застосування гестагенів, необхідне для досягнення та підтримки лікувального ефекту гіперплазії ендометрія, часто обмежене, з урахуванням сучасної концепції патогенезу лейоміоми матки, яка розглядає вплив прогестерону як негативний у відношенні прогресування ЛМ, у тому числі рецидиви після органозберігаючого хірургічного лікування лейоміоми [1; 2].

В останні роки разом із розвитком молекулярно-біологічних та імуногістохімічних методів дослідження було з'ясовано, що існує декілька різних імуноморфотипів лейоміоматозних вузлів та ендометрія із різним ступенем проліферації, апоптозу та експресії рецепторів стероїдних гормонів, що обумовлює різну чутливість до різних видів медикаментозної терапії. Разом з цим, в літературі немає єдиної думки щодо впливу того чи іншого морфотипу на частоту рецидивів гіперпроліферативних процесів матки при використанні різних схем лікування [3].

У зв'язку з цим постає необхідність поновому переглянути питання етіології та патогенезу даних захворювань, а також закономірність їх розвитку з метою розробки диференційованого алгоритму ведення пацієнток, спрямованого на лікування гіперпластичних процесів ендометрія та одночасну профілактику рецидивів лейоміоми матки.

Мета даного дослідження полягала у гістологічній та імуногістохімічній оцінці стану міоматозної тканини і ендометрія у хворих з лейоміомою матки та гіперплазією ендометрія.

Матеріали та методи

Усі оперативні втручання були проведені з 2010 по 2013 рік у КЗ «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова».

У дослідженні прийняло участь 30 жінок з ЛМ та ГЕ, яким була виконана консервативна міомектомія лапаротомним або лапароскопічним шляхом у фолікулярну фазу циклу. Жінки отримували традиційне лікування у післяопераційному періоді згідно клінічному протоколу «Гіперплазія ендометрія»: дідрогестерон 10 мг перорально двічі на добу з 5 по 25 день менструального циклу на протязі 6 місяців.

Усі вузли, видалені під час оперативних втручань, а також біоптати ендометрія, отримані під час передопераційного діагностичного вишкрябання, гістероскопії або пайпель-біопсії, були піддані стандартному гістологічному дослідженню з верифікацією діагноза. Повторне обстеження, яке включало УЗД та пайпель-біопсію ендометрія, проводилось через 6 та 12 місяців після міомектомії. Під рецидивом лейоміоми матки розуміли наявність вузла діаметром 2 см та більше.

Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження проводили у зразках біоптатів лейоміоми матки, отриманих під час органозберігаючих оперативних втручань та біопсій ендометрія у всіх пацієнток, що досліджувались. Дослідження проводилось у лабораторії патоморфології і імуногістохімії ДЗ «ДМА МОЗ України» (д.мед.н., проф. І.С. Шпонька) за стандартними методиками.

В основі прогресування ЛМ, ГЕ як і будь якої неоплазії лежить співвідношення процесів проліферації, апоптозу та ангиогенезу. Крім того, необхідною умовою прогресування є сприятливий гормональний фон (рецептори гормонів репродуктивної системи). В зв'язку з цим було обрано імуногістохімічні маркери, які охоплюють основні перелічені ланки прогресування пухлини: рецептори до естрогену (ER, клон 1D5, DAKO; клон SP1, LabVision) та до прогестерону (PR, клон PgR 636, DAKO; клон SP2, LabVision), індекс проліферації (Ki-67, клон MIB-1, DAKO; клон SP6, LabVision), регулятор апоптозу (bcl-2, клон 124, DAKO), васкулярний ендотеліальний фактор росту(VEGF, клон VG1, DAKO).

Зрізи товщиною 4-5 мкм наносили на предметні стекла, фіксували в нейтральному забуференому формаліні з наступним проведенням теплової індукції епітопного звороту (HIER). Подальшу обробку проводили з використанням системи візуалізації LSAB2 та EnVision (DakoCytomation) протягом 10 хвилин з кожним реагентом з проміжним промиванням у TPIC-буферному розчині. Після цього проводили реакцію з хромогеном DAB (DakoCytomation), оцінюючи якість взаємодії. Для диференціювання структур тканин зрізи додатково фарбувались гематоксилином Майєра протягом 3 хвилин. Результат оцінювали як позитивний при випаданні солей хромогену у вигляді специфічної реакції.

Кількісні та якісні показники експресії маркерів вивчали як мінімум на 8-10 випадково обраних полях зору мікроскопа гістологічних зрізів при збільшенні $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, та $\times 1000$ (коли це було необхідно). Для максимально точної кількісної оцінки ІГХ маркерів, що вивчалися, підраховували щонайменше 1000 клітин та рівень експресії у них. Ступінь виразності проліферативних процесів оцінювали підрахуванням відсотку клітин, з позитивним забарвленням Ki-67(індекс проліферації). При вивченні експресії ER та PR підраховували QN-score. Експресію інших маркерів підраховували як кількість позитивно забарвлених клітин на 1000 [3].

Отримані дані піддавали статистичній обробці (описова статистика). При проведенні статистичної обробки отриманих квантифікованих результатів усі необхідні розрахунки виконували за

допомогою ліцензійної програми Statistica (версія 6.1; серійний номер AGAR 909 E415822FA).

Результати та їх обговорення

Середній вік досліджуваних жінок склав $33,8 \pm 1,2$ року. Середній індекс маси тіла – $23,2 \pm 2,6$ кг/м². У 13 жінок був одиничний вузол, у 8 – два вузла, у 9 – три та більше міоматозних вузлів. Середня вага видалених міоматозних вузлів склала $144 \pm 11,9$ г (діапазон 10-525 г). Середній діаметр доміантного вузла був $4,2 \pm 0,76$ см (діапазон 1-15,0 см). Під час хірургічного втручання середній розмір матки у досліджуваних жінок відповідав $9,1 \pm 1,2$ тижням вагітності.

Після проведеного гістологічного дослідження всі зразки були діагностовані як доброякісні лейоміоми матки. Причому у 6 випадках (20%) діагноз був «клітинна лейоміома матки», решта – 24 випадки (80%) – «проста лейоміома матки». Переважною формою ГЕ серед усіх досліджуваних жінок була проста неатипова ГЕ (26 випадків – 86,7%), яка має найменший потенціал малігнізації. Для даного типу ГЕ були характерні зростання кількості залоз, їх збільшення, іноді кістозне розширення. Клітини залозистого епітелію були витягнуті, ядра розміщені перпендикулярно до базальної мембрани, інколи траплялись фігури мітозу. Строма була компактною, представлена веретеноподібними клітинами із співвідношенням залози/stroma більше 1:1. Проста ГЕ характеризувалися збільшеним проліферативним потенціалом залозистого та стромального компонентів ендометрія, але без значних структурних трансформацій тканини, а також відсутністю атипово сформованих клітин. Іншими словами – при збільшенні кількості епітеліальних клітин та клітин сполучної тканини не відбувалося зміни кількісних характеристик слизової матки, що відбивалося у збереженні співвідношення епітелій/stroma, порівняно із нормою. Частота комплексної неатипової ГЕ склала 13,3% (4 випадки). Для комплексної гіперплазії було характерне збільшення кількості залоз, склад-

ність і різноманітність їх будови, нерівність контурів, архітектурна атипія, але без нуклеарної атипії, поліморфізму ядер, патологічно підвищеної кількості фігур мітозу. Клітини залоз були витягнутими, або круглими із стратифікацією.

Слід відмітити, що у більшості жінок, що досліджувались, за даними УЗД не було ознак гіперплазії ендометрія, що говорить про низьку інформативність УЗД з метою діагностики ГЕ у жінок репродуктивного віку. Це цілком зрозуміло, оскільки діагностичним критерієм у цих жінок згідно наказу МОЗ України №676 є товщина М-ехо більше 16 мм, що буває дуже рідко при ізольованих гіперпластичних процесах ендометрія без наявності поліпів.

Враховуючи низьку інформативність отриманих даних про експресію маркерів, що вивчались в даному дослідженні у стромі ендометрія, надалі буде приведена лише інформація, яка стосується ІГХ-забарвлення залоз ендометрія в отриманих зразках.

Як описано у підрозділі «матеріали та методи», жінки отримували лікування дідрогестероном 20 мг на добу протягом 6 місяців після міомектомії, після чого виконувалась біопсія ендометрія. У разі наявності гістологічно підтвердженого гіперпластичного процесу ендометрія лікування дідрогестероном продовжувалося ще на 6 місяців з повторним виконанням пайпель-біопсії. Паралельно двічі виконувалося ультразвукове дослідження з оцінкою наявності даних за рецидивом ЛМ (вузол 2 см та більше). Як представлено на рисунку 1, частота рецидивів ЛМ через рік спостереження склала 23,3% (у 7 жінок), що перевищує загальноприйняті показники – у середньому 10% на рік [4]. Крім того, у 11 жінок (36,7%) навіть через 12 місяців лікування дідрогестероном зберігалася гіперплазія ендометрія, що є незадовільним результатом. Цікавим був факт того, що усі 7 жінок з рецидивом ЛМ потрапили до групи з неефективністю лікування ГЕ.

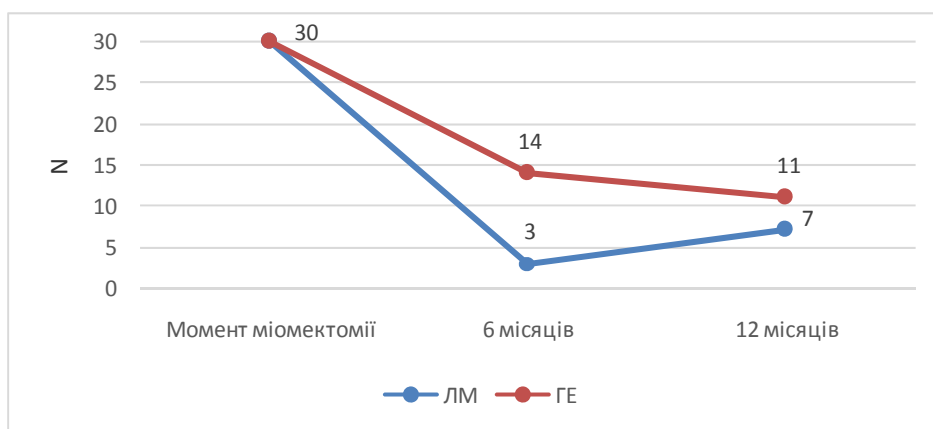


Рис. 1. Наявність лейоміоми матки та гіперплазії ендометрія на протязі 12 місяців спостереження.

При всебічному аналізі результатів ІГХ досліджень зразків різних тканин було виявлено спільні риси у функціонуванні лейоміоми матки та гіперплазованого ендометрія. Аналіз отриманих у ході ІГХ дослідження даних продемонстрував певні відмінності у жінок з рецидивом лейоміоми матки та персистенцією гіперпластичних змін ендометрія від решти випадків з більш сприятливими результатами лікування, що вилилося у виділення двох морфотипів, характерних для високої і помірної активності гіперпроліферативних процесів матки (табл. 1).

Антитіло Ki-67 дозволяє ідентифікувати ядерний антиген, що експресується у всіх клітинах, які вийшли з G₀ фази мітозу, тобто дає можливість оцінити проліферативний потенціал зразка тканини. Проведені імуногістохімічні дослідження показали досить невиражену проліферативну активність як у тканині ЛМ так і ендометрії у жінок з ефективним лікуванням. Між тим, у всіх жінок з рецидивом ЛМ та персистенцією ГЕ індекс проліферації був більше 3 у обох зразках.

Таблиця 1
Імуноморфотипи у жінок з високою та помірною активністю гіперпроліферативних процесів

Показник	Імуноморфотип	Імуноморфотип
	1 «помірна активність»	2 «висока активність»
Індекс проліферації в лейоміомі та ендометрії	<3 в обох зразках	>3 в обох зразках
Експресія Bcl-2 (H-score)	<2	>2
VEGF в лейоміомі	<20	>20

Що стосується рецепторів статевих стероїдних гормонів (ЕР та ПР), то в нашому дослідженні зразки міоми характеризувались вірогідно більшою експресією ПР у порівнянні з естрогеновими рецепторами. Це є підтвердженням високої чутливості лейоміоматозної тканини до прогестерону (та, можливо, його синтетичних похідних). Однак дані отримані в гіперплазованому ендометрії були досить суперечливими. У зв'язку з тим, що експресія ЕР та ПР, особливо в ендометрії, дуже залежить від фази менструального циклу, наявності запальних змін та багатьох інших факторів, ці маркери було виключено з опису запропонованих морфотипів.

Лейоміома матки та гіперплазія ендометрія відомі як гормонозалежні процеси, що, незважаючи на відносно низьку мітотичну активність, здатні до значного росту, іноді протягом малого проміжку часу. Експресія одного з відомих маркерів апоптозу – bcl-2, який є інтрацелюлярним

мембрано-асоційованим протеїном, експресія якого у клітині свідчить про пролонгацію її життя шляхом пригнічення процесів клітинної смерті через обмеження активації каспаз, була вірогідно більшою, як у міоматозній тканині, так і в ендометрії жінок з рецидивом ЛМ та неефективністю терапії ГЕ. Цікаво, що інші дослідники також розглядають гіперекспресію bcl-2 як маркер неефективності терапії гіперпластичних процесів ендометрія гестагенами [3; 5].

VEGF – один із потужніших індукторів неопластичного статистично значимо частіше виявлявся у зразках ЛМ та ГЕ у жінок з незадовільними результатами лікування. Отже, підсилення ангиогенезу також можна розглядати у якості фактора ризику рецидиву лейоміоми матки та неефективності лікування гіперплазії ендометрія гестагенами.

Отже, у ході комплексного імуногістохімічного дослідження біоптатів ендометрія та лейоміоми матки у жінок з гістологічно верифікованою ЛМ та ГЕ вдалося виявити спільні ІГХ риси у випадках високого ризику рецидиву ЛМ та неефективності лікування ГЕ традиційною схемою із застосуванням похідних прогестерону. До таких несприятливих показників можна віднести: підвищену проліферативну активність, ангиогенез та пригнічений апоптоз. З метою оптимізації результатів лікування у жінок з імуноморфотипом «високої активності» слід уникати застосування терапії гестагенами. Лікуванням вибору в таких випадках повинні бути препарати з вираженим потужним впливом на всі перелічені ланки: антипроліферативний, проапоптотичний та направлений на пригнічення ангиогенезу.

Висновки

1. Тривала терапія гіперпластичних процесів ендометрія препаратами прогестерону (в даному випадку – дідрогестерон) після міомектомії може сприяти підвищенню частоти рецидивів лейоміоми матки у деяких випадках.

2. Імуногістохімічне дослідження відіграє важливу роль у розумінні процесів прогресування ЛМ та неефективності терапії ГЕ на рівні інтракринної та паракринної регуляції. Вивчення маркерів проліферації, апоптозу, ангиогенезу та рецепторів стероїдних гормонів дає можливість отримати молекулярні докази ефективності різних методів гормональної корекції.

3. Існує два імуноморфотипи гіперпроліферативних процесів матки – морфотип низького ризику рецидиву ЛМ та неефективності терапії ГЕ гестагенами, та морфотип високого ризику, який характеризується підвищеною проліферацією, ангиогенезом та гальмуванням апоптозу.

4. Імуноморфотип високого ризику потребує більш адекватної медикаментозної корекції з метою лікування ГЕ та профілактики рецидивів ЛМ.

Перспективи подальших досліджень з ви-

вченням імуногістохімічних маркерів з метою прогнозування рецидивів міоми матки та гіперплазії ендометрія, а також підбору оптимальної

гормональної терапії у жінок з поєднаними гормонозалежними процесами матки.

Літературні джерела References

1. De Leo V, Morgante G, La Marca A, Musacchio MC, Sorace M, Cavicchioli C, Petraglia F. A benefit-risk assessment of medical treatment for uterine leiomyomas. *Drug Saf.* 2002;25(11):759-79. Cited in: PubMed; PMID: 1222988.

2. Lethaby A, Vollenhoven B, Sowter M. Efficacy of pre-operative gonadotrophin hormone releasing analogues for women with uterine fibroids undergoing hysterectomy or myomectomy: a systematic review. *BJOG.* 2002 Oct;109(10):1097-108. Cited in: PubMed; PMID: 12387461.

3. Vu K1, Greenspan DL, Wu TC, Zacur HA, Kurman RJ. Cellular proliferation, estrogen receptor, progesterone receptor, and bcl-2 expression in GnRH agonist-treated uterine leiomyomas. *Hum*

Pathol. 1998 Apr;29(4):359-63. Cited in: PubMed; PMID: 9563785.

4. Bozzini N, Rodrigues CJ, Petti DA, Bevilacqua RG, Gonçalves SP, Pinotti JA. Effects of treatment with gonadotropin releasing hormone agonist on the uterine leiomyomata structure. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003 Apr;82(4):330-4. Cited in: PubMed; PMID: 12716317.

5. Regidor PA, Schmidt M, Callies R, Kato K, Schindler AE. Estrogen and progesterone receptor content of GnRH analogue pretreated and untreated uterine leiomyomata. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1995 Nov;63(1):69-73. PMID: Cited in: PubMed; 8674569.

Потапов В.А., Донская Ю.В., Медведев М.В. Гистологическая и иммуногистохимическая оценка состояния миоматозной ткани и эндометрия у больных лейомиомой матки и гиперплазией эндометрия.

Реферат. В исследовании проведен иммуногистохимический анализ маркеров пролиферации, апоптоза, ангиогенеза и рецепторов стероидных гормонов в миоматозной ткани и эндометрии у 30 больных с лейомиомой матки и гиперплазией эндометрия. Исследования показали, что в случаях высокого риска рецидива миомы матки и гиперплазии эндометрия выявлено: повышенную пролиферативную активность, ангиогенез и подавление апоптоза. С целью оптимизации результатов лечения у женщин с иммунорфотипом «высокой активности» следует избегать применения терапии гестагенами. Лечение выбора в таких случаях должны быть препараты с выраженным мощным воздействием на все перечисленные звенья.

Ключевые слова: лейомиома матки, гиперплазия эндометрия, иммуногистохимический анализ.