

Е.Г.Курик
Е.О.Литвак
Б.В.Хабрат
Б.М.Лысенко

ГНУ «Научно-практический центр профилактической и клинической медицины» Государственного управления делами, Киев

Ключевые слова: лейомиома матки, рецепторы прогестерона, пролиферация, апоптоз, улипристала ацетат.

Надійшла: 10.08.2015
Прийнята: 02.09.2015

УДК: 618.14-006.36

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИОМАТОЗНОЙ ТКАНИ У ПАЦИЕНТОК С ЛЕЙОМИОМОЙ МАТКИ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ УЛИПРИСТАЛА АЦЕТАТОМ

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Совершенствование малоинвазивных методов хирургического лечения отдельных заболеваний сосудов, внутренних и репродуктивных органов, брюшной стенки, щитовидной и паращитовидных желез, суставов, в том числе с использованием имплантатов с индивидуально модифицированной поверхностью на основе нанобиосенсорных технологий» (номер государственной регистрации 0114U002120).

Реферат. В исследовании проведена иммуногистохимическая оценка состояния миоматозной ткани у пациенток с лейомиомой матки после лечения селективным модулятором прогестероновых рецепторов – улипристала ацетатом. У пациенток после трехмесячного курса лечения улипристала ацетатом отмечалось достоверное снижение экспрессии рецепторов прогестерона, маркеров ингибитора апоптоза bcl-2 и пролиферативной активности Ki-67, то есть, за счет уменьшения количества рецепторов прогестерона уменьшается его действие, вследствие чего происходит инициирование апоптоза и снижение процессов пролиферации, что способствует инволюции миомы.

Morphologia. – 2015. – Т. 9, № 3. – С. 42-47.

© Е.Г.Курик, Е.О.Литвак, Б.В.Хабрат, Б.М.Лысенко, 2015

✉ o.kuryk@oberig.ua

Kuryk E.G., Litvak E.O., Chabrat B.V., Lysenko B.M. Immunohistochemical characteristic of myoma tissue in patients with uterine leiomyoma after treatment with ulipristal acetate.

ABSTRACT. Background. Uterine leiomyoma is one of the most common benign tumors of the female genital organs. The main conservative treatment of leiomyoma is progesterone receptor blockers that suppress myoma growth and may lead to its regression. **Objective.** To study the immunohistochemical features of myoma tissue in patients with uterine leiomyoma after treatment with selective progesterone modulator - ulipristal acetate. **Methods.** Leiomyoma tissue obtained from 9 patients after ulipristal acetate treatment were investigated. Group for comparison - leiomyoma from patients without hormonal therapy. Immunohistochemical study of progesterone and estrogen receptors, proliferative activity marker Ki-67 and inhibitor of apoptosis Bcl-2 was performed. **Results.** In the group of patients without preoperative hormonal treatment progesterone receptors were expressed in 76,4±6,8% of the nuclei, estrogen receptors - in 32,8±2,6%. In the group of patients after treatment with ulipristal acetate there was a significant decrease of progesterone receptor expression – 36,8±1,28% (p <0,05) and a nonsignificant decrease of estrogen expression – 30,7±3,4% (p > 0,05). Bcl-2 in the control group was found in 65,4±7,2% cells, in leiomyoma after treatment there was a significant decrease of bcl-2 – 42,6±3,2% (p <0, 05). In leiomyomas without hormonal treatment Ki-67 was determined in 11,8% of the nuclei of smooth muscle cells, and in leiomyomas after ulipristal acetate – in 7,2% leiomyoma cells. **Conclusions.** In patients after three months of ulipristal acetate treatment there was a significant decrease of expression of progesterone receptor, bcl-2, and Ki-67. Taken together these data evidence reduced action of progesterone on leiomyoma cells, induction of apoptosis and decreased proliferation processes that may cause involution of fibroids.

Key words: leiomyomas of the uterus, progesterone receptors, proliferation, apoptosis, ulipristal acetate.

Citation:

Kuryk EG, Litvak EO, Chabrat BV, Lysenko BM. [Immunohistochemical characteristic of myoma tissue in patients with uterine leiomyoma after treatment with ulipristal acetate]. Morphologia. 2015;9(3):42-7. Russian.

Введение

Миома матки является одной из наиболее распространенных доброкачественных опухолей женских половых органов. В последние годы существует тенденция к увеличению количества

пациенток молодого возраста с лейомиомой матки (ЛМ), что делает особенно актуальным внедрение органосохраняющих операций с целью сохранения репродуктивной функции [1].

Миома матки – гормоно-зависимая опухоль

миометрия. Если раньше ключевую роль в патогенезе миомы отводили эстрогенам, то сегодня накоплена база данных о комплементарном действии эстрогена и прогестерона [2]. Оба гормона реализуют свое действие на ткани-мишени через специфические цитозольные рецепторы. События, инициируемые связыванием этих стероидов с рецептором, соответствуют общей модели механизма действия липофильных гормонов. Сначала происходит активация гормон-рецепторного комплекса, который затем перемещается в ядро, связывается с акцепторными областями хромосом и запускает транскрипцию генов. Образующая матричная РНК предназначена для синтеза специфических белков, определяющих биологический эффект стероида. Один из таких специфических белков – рецептор прогестерона. Для проявления биологического эффекта прогестерона необходимы эстрогены [3].

В консервативном лечении ЛМ используют различные блокаторы рецепторов прогестерона, которые подавляют рост миомы и могут приводить к ее регрессии. Одним из таких препаратов является улипристала ацетат (УА), который действует непосредственно на рецепторы прогестерона в ЛМ, эндометрии, гипофизе, подавляет овуляцию без значимого влияния на уровень продукции эстрогенов и глюкокортикоидов [4]. Угнетая процессы пролиферации и усиливая апоптоз клеток ЛМ, он не оказывает влияния на окружающий миометрий. Взаимодействуя с рецепторами прогестерона в аденогипофизе, он не влияет на продукцию пролактина и адренокортикотропного гормонов, вместе с тем подавляет продукцию фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов [5].

УА («Эсмия») относится к селективным модуляторам прогестероновых рецепторов II поколения. Клиническое исследование, проведенное в 18 исследовательских центрах в четырех странах Европы, включало женщин репродуктивного возраста как минимум с одной миомой матки от 3 до 10 см в диаметре, размером матки до 16 недель беременности, обильными менструальными кровотечениями, которые имели показания к операции по поводу миомы матки. Пациентки получили четыре интермиттирующих курса трехмесячного лечения УА в дозе 10 мг/сут. Период между каждым курсом включал одно менструальное кровотечение и начало второго. После четырех курсов частота аменореи составила 90%, объем миомы матки сократился на 72%. Значительный и стойкий регресс миоматозных узлов позволил отказаться от хирургического вмешательства у части пациенток [6].

Молекулярно-биологические механизмы влияния селективных модуляторов рецепторов прогестерона, к которым относится УА, изучены главным образом *in vitro* [7]. В культуре ткани ЛМ доказано подавление УА пролиферативной

активности и индукции апоптоза лейомиоцитов, снижение ими продукции факторов роста и коллагена в сочетании с повышением синтеза матриксных протеиназ. На клиническом материале морфологические изменения в ЛМ после воздействия УА описаны Тихомировым А.Л. и соавт. [8, 9].

Цель исследования – провести иммуногистохимическую оценку состояния миоматозной ткани у пациенток с ЛМ матки после лечения УА.

Материалы и методы

Проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование ЛМ, удаленных путем миомэктомии у 9 пациенток после трехмесячного курса лечения УА - 5 мг в сутки (основная группа). Возраст женщин был от 26 до 40 лет (средний возраст $35,8 \pm 4,2$ года) В группе сравнения исследовали 15 ЛМ у женщин без предоперационной гормональной терапии или контрацепции. Пациентки были в возрасте от 29 до 42 лет (средний возраст - $38,6 \pm 3,4$ лет). У пациенток основной группы размеры доминантного узла до лечения составляли $8,6 \pm 1,4$, после лечения – $4,8 \pm 1,2$; в группе сравнения размеры доминантного узла составляли $5,2 \pm 1,54$. В обеих группах узлы локализовались интрамурально и субмукозно. По гистологическому строению все узлы были простыми ЛМ.

Фрагменты ткани ЛМ фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине. Для проводки биопсийного материала после фиксации использовали гистопроцессор карусельного типа STP-120, для заливки парафиновых блоков станцию EC-350, для резки парафиновых блоков - ротационный микротом серии HM – 340E (Microm, Hamburg, Germany). Окрашивали гистологические препараты гематоксилином-эозином. Использовали микроскоп Axioskop 40 с фотокамерой AxioCam MRc5 (CarlZeiss).

На серийных парафиновых срезах толщиной 4-5 мкм проведено иммуногистохимическое исследование рецепторов эстрогена (DAKO, EP1), прогестерона (DAKO, PgR636), маркера пролиферативной активности Ki-67 (DAKO, SP6), ингибитора апоптоза Bcl-2 (BCL-2 alpha Ab-1 (100/D5), а также системы визуализации EnVision FLEX (DAKO) с диаминобензидином (ДАБ). Процесс окраски путем последовательных циклов инкубации реагентов и промывки на предметных стеклах производился в автостейнере производства Thermo Scientific. Препараты докрасивали гематоксилином Майера. Продуктом иммуногистохимических реакций являются мелкие коричневые гранулы в участках локализации антигена. Для рецепторов эстрогена и прогестерона, Ki-67 - это ядра клеток, для Bcl-2 – цитоплазма и ядра клеток.

Результаты иммуногистохимических реакций оценивали с помощью полуколичественного

морфометрического метода. Визуально оценивали интенсивность окраски клеток в баллах от 0 до 3 (отрицательная, слабая, умеренная и выраженная реакция) и подсчитывали процент позитивно окрашенных клеток при каждом значении интенсивности окраски, по 1000 клеток в 10 полях зрения с наиболее выраженной иммуногистохимической реакцией при увеличении микроскопа 400.

Также определяли среднюю площадь экспрессии, которая представляла собой отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками/ядрами к общей площади клеток/ядер в поле зрения, выражаемое в процентах. Указанные параметры отражают интенсивность синтеза и накопления исследуемых гомонов и сигнальных молекул в клетках и тканях.

Вычисляли коэффициенты экспрессии (КЭ) по формуле:

$$КЭ = \sum(i \times \Pi) / 100,$$

где i – интенсивность окраски в баллах (от 0 до 3), Π – % окрашенных ядер или клеток (от 0 до 100%) для каждого значения i [10].

Для оценки экспрессии Ki-67 оценивали количество окрашенных ядер гладкомышечных клеток от общего количества ядер клеток в препарате в%.

Статистическую обработку исходных данных, в том числе определение выборочных средних и выборочных стандартных отклонений, проводили с использованием статистического пакета Statistica 7.0. Для проверки гипотезы о равенстве средних значений рассматриваемых выборок использован t-критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В группе ЛМ пациенток без предоперационного гормонального лечения рецепторы прогестерона экспрессировали 76,4±6,8% ядер, КЭ составил 1,78±0,24 (рис. 1). Рецепторы эстрогена определялись в 32,8±2,6% ядер, КЭ – 1,46±0,38. Наши данные совпадают с данными Потапова В.А. и соавторов [11], которые отмечают, что образцы миомы характеризовались достоверно большей экспрессией прогестероновых рецепторов в сравнении с эстрогеновыми рецепторами.

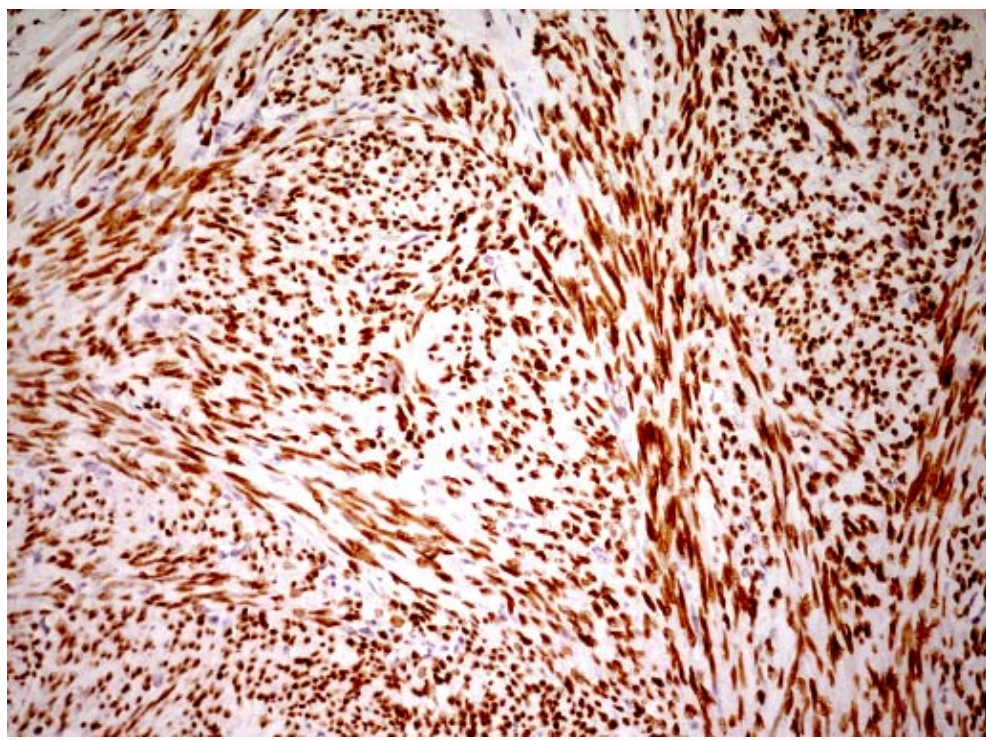


Рис. 1. Экспрессия ядрами гладкомышечных клеток лейомиомы прогестероновых рецепторов. Контрольная группа. Иммуногистохимическое исследование. $\times 200$.

В группе пациенток после лечения УА обращали на себя внимание меньшие размеры гладкомышечных клеток и их ядер в ЛМ; также отмечались очаговый склероз и гиалиноз стромы миоматозных узлов. Отмечалось достоверное снижение экспрессии рецепторов прогестерона – 36,8±1,28%, КЭ – 1,32±0,2 ($p < 0,05$) (рис.2) и не-

достоверное снижение уровня экспрессии эстрогенов 30,7±3,4%, КЭ – 1,18±0,16 ($p > 0,05$).

Такая тенденция описана ранее в случаях применения препарата, обладающего антипрогестивным действием – мифепристона; в иммуногистохимических исследованиях выявлено значительное уменьшение количества рецепто-

ров прогестерона, в то время как уровень рецепторов эстрогенов не изменялся, что позволило предположить возможность регрессии миоматозного узла в результате прямого антипрогестеронового действия [12].

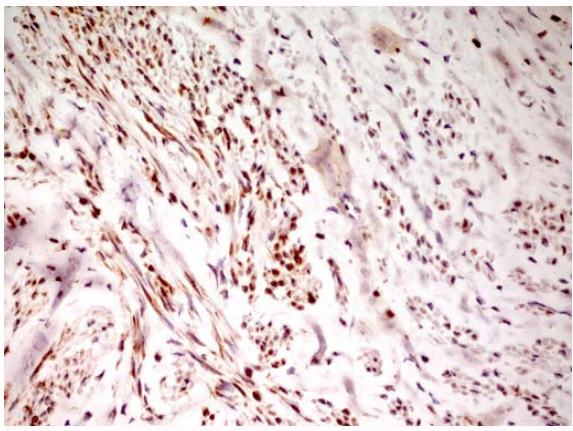


Рис. 2. Экспрессия ядрами гладкомышечных клеток лейомиомы прогестероновых рецепторов. Группа пациенток, принимавших УА. Иммуногистохимическое исследование. $\times 200$.

В то же время Тихомирова и соавторы [9] отмечают повышение экспрессии рецепторов прогестерона ядрами гладкомышечных клеток при сохранении уровня рецепторов эстрогенов в группе пациенток, принимавших УА. По мнению авторов, обнаруженная тенденция к повышению экспрессии рецепторов прогестерона клетками лейомиомы после терапии УА, возможно, представляет собой компенсаторный процесс. В то же время при таком подходе сложно объяснить механизм действия УА как селективного модулятора рецепторов прогестерона. Прогестерон стимулирует рост миомы через набор ключевых генов, регулирующих как апоптоз, так и пролиферацию. При связывании с этими рецепторами прогестерон стимулирует в клетках лейомиомы выработку факторов роста (EGF) и ингибитора апоптоза протоонкогена Bcl-2, в результате экспрессия маркеров пролиферации в клетках лейомиомы повышается, а активность апоптоза снижается. Таким образом, прогестерон способен влиять на рост миомы посредством блокирования апоптоза, часто приводит к увеличению жизненного цикла опухолевых клеток, а также повышает их пролиферативную активность [13].

Маркер ингибитора апоптоза bcl-2 в контрольной группе был обнаружен в $65,4 \pm 7,2\%$ клеток, КЭ составил $1,62 \pm 0,36$ (рис. 3). У пациенток после приема УА отмечалось достоверное снижение ингибитора апоптоза bcl-2 - $42,6 \pm 3,2\%$, КЭ - $1,24 \pm 0,28$ ($p < 0,05$) (рис. 4), что не совпадает с данными Тихомирова А.Л. и соавторов [9], которые отмечают лишь незначительное и статистически недостоверное снижение экспрессии

ингибитора апоптоза bcl-2 в группе пациенток, принимавших УА.

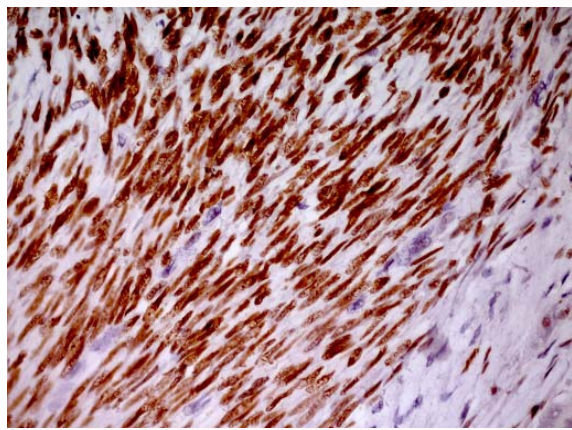


Рис. 3. Экспрессия ядрами гладкомышечных клеток лейомиомы ингибитора апоптоза bcl-2. Контрольная группа. Иммуногистохимическое исследование. $\times 400$.

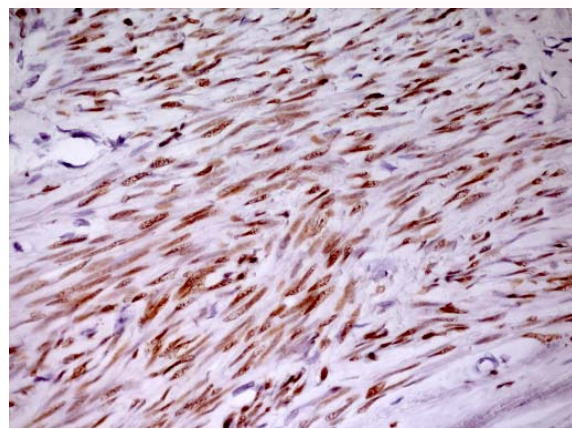


Рис. 4. Экспрессия ядрами гладкомышечных клеток лейомиомы ингибитора апоптоза bcl-2. Группа пациенток, принимавших УА. Иммуногистохимическое исследование. $\times 400$.

Маркер пролиферации Ki-67 у пациенток без гормонального лечения определялся в $11,8\%$ ядер гладкомышечных клеток (рис. 5), а у женщин, принимавших УА в $7,2\%$ клеток лейомиомы (рис. 6), что совпадает с данными Тихомирова А.Л. и соавторов [9], которые выявили статистически значимое снижение пролиферативной активности гладкомышечных клеток в группе пациенток после приема УА.

Заключение

У пациенток, принимавших УА, в гладкомышечных клетках лейомиомы отмечалось достоверное снижение экспрессии рецепторов прогестерона, маркеров ингибитора апоптоза bcl-2 и пролиферативной активности Ki-67. Таким образом, в гладкомышечных клетках миомы под воздействием УА происходит уменьшение количества рецепторов прогестерона, то есть уменьша-

ется его действие, вследствие чего происходит индуцирование апоптоза и снижение процессов пролиферации, за счет чего происходит инволюция миомы.

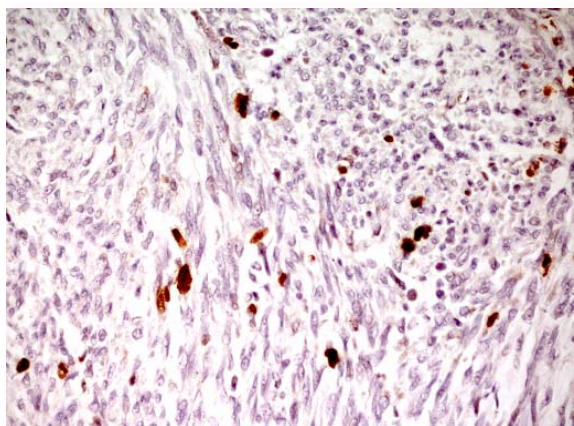


Рис. 5. Экспрессия ядрами гладкомышечных клеток лейомиомы белка Ki-67. Контрольная группа. Иммуногистохимическое исследование. $\times 400$.

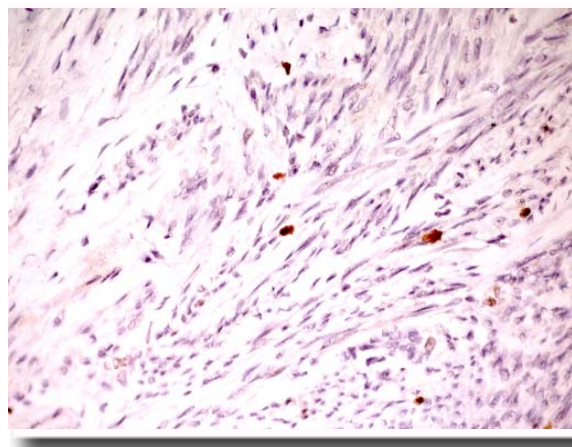


Рис. 6. Экспрессия ядрами гладкомышечных клеток лейомиомы белка Ki-67. Группа пациенток, принимавших УА. Иммуногистохимическое исследование. $\times 400$.

Перспектива дальнейших исследований

Необходимо продолжить иммуногистохимическую диагностику с определением маркеров эпидермального фактора роста, фактора роста эндотелия сосудов, фактора некроза опухоли, матриксных металлопротеиназ, коллагена для более полного изучения механизма воздействия УА на лейомиому матки.

Литературные источники

References

1. Radzinskiy VE, Totchiyev GF. [Uterine myoma: course for organ preservation. Newsletters]. M: Publishing office of StatusPraesens journal; 2014. P. 24. Russian.
2. Yoshida S, Ohara N, Xu Q, Chen W, Wang J, Nakabayashi K, Sasaki H, Morikawa A, Maruo T. Cell-type specific actions of progesterone receptor modulators in the regulation of uterine leiomyoma growth. *Semin Reprod Med.* 2010 May;28(3):260-73. doi: 10.1055/s-0030-1251483. PMID: 20414849
3. Talaulikar VS, Manyonda I. Progesterone and progesterone receptor modulators in the management of symptomatic uterine fibroids. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012 Dec;165(2):135-40. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.07.023. PMID: 22901974.
4. Talaulikar VS, Manyonda IT. Ulipristal acetate: a novel option for the medical management of symptomatic uterine fibroids. *Adv Ther* 2012;29(8):655-63. doi: 10.1007/s12325-012-0042-8. PMID:22903240
5. Biglia N, Carinelli S, Maiorana A, D'Alonzo M, Lo Monte G, Marci R. Ulipristal acetate: a novel pharmacological approach for the treatment of uterine fibroids. *Drug Des Devel Ther.* 2014 Feb 20;8:285-92. doi: 10.2147/DDDT.S54565. PMID: 24591818.
6. Donnez J, Vázquez F, Tomaszewski J, Nouri K, Bouchard P, Fauser BC, Barlow DH, Palacios S, Donnez O, Bestel E, Osterloh I, Loumaye E; PEARL III and PEARL III Extension Study Group. Long-term treatment of uterine fibroids with ulipristal acetate. *Fertil Steril.* 2014 Jun;101(6):1565-73.e1-18. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.02.008. PMID: 24630081.
7. Berger C, Boggavarapu NR, Menezes J, Lalitkumar PG, Gemzell-Danielsson K. Effects of ulipristal acetate on human embryo attachment and endometrial cell gene expression in an in vitro co-culture system. *Hum Reprod.* 2015 Apr;30(4):800-11. doi: 10.1093/humrep/dev030. PMID: 25740886.
8. Tikhomirov AL, Zayratyants OV. [A clinicomorphological characteristic of uterine myoma after using the selective progesterone receptor modulator ulipristal]. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii.* 2014, 13(1):67-72. Russian.
9. Tikhomirov AL, Kazenashev VV, Zayratyants OV, Manukhin IB. [First clinical-

morphological tendencies of the treatment of patients with myoma of womb with ulipristal acetate]. *Gynecology (Moscow)*. 2014;16(2):29-33. Russian.

10. Nisolle M, Gillerot S, Casanas-Roux F, Squifflet J, Berliere M, Donnez J. Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy. *Hum Reprod*. 1999 Nov;14(11):2844-50. PMID: 10548634.

11. Potapov VA, Donskaya YuV, Medvedev MV. [Histological and immunohistochemical evaluation of leiomyoma and endometrial tissue in pa-

tients with uterine leiomyoma and endometrial hyperplasia]. *Morphologia*. 2014;8(1):80-4. Ukrainian.

12. Engman M, Granberg S, Williams AR, Meng CX, Lalitkumar PG, Gemzell-Danielsson K. Mifepristone for treatment of uterine leiomyoma. A prospective randomized placebo controlled trial. *Hum Reprod*. 2009 Aug;24(8):1870-9. doi: 10.1093/humrep/dep100. PMID: 19389793.

13. Murdoch M, Roberts M. Selective progesterone receptor modulators and their use within gynaecology. *The Obstetrician & Gynaecologist*. 2014;16(1):46-50. DOI: 10.1111/tog.12072.

Курик О.Г., Литвак О.О., Хабрат Б.В., Лисенко Б.М. Імуногістохімічна характеристика міоматозної тканини у пацієнок з лейоміомою матки після лікування уліпрістала ацетатом.

Реферат. У дослідженні проведено імуногістохімічну оцінку стану міоматозної тканини у пацієнок з лейоміомою матки після лікування селективним модулятором прогестеронових рецепторів - уліпрістала ацетатом. У пацієнок після трьохмісячного курсу лікування уліпрістала ацетатом відзначалося достовірне зниження експресії рецепторів прогестерону, маркерів інгібітора апоптозу Bcl-2 і проліферативної активності Ki-67, тобто, за рахунок зменшення кількості рецепторів прогестерону зменшується його дія, внаслідок чого відбувається індукування апоптозу і зниження процесів проліферації, що спричиняє інволюцію міоми.

Ключові слова: лейоміома матки, рецептори прогестерону, проліферація, апоптоз, уліпрістала ацетат.