

©М. В. Медведєв

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

## НОВІ ПОГЛЯДИ НА МЕХАНІЗМИ ПАТОГЕНЕЗУ ЛЕЙОМІОМИ МАТКИ

НОВІ ПОГЛЯДИ НА МЕХАНІЗМИ ПАТОГЕНЕЗУ ЛЕЙОМІОМИ МАТКИ. Етіологія та патогенез лейоміоми матки - вельми поширеної доброякісної пухлини жіночої репродуктивної системи залишаються не до кінця зрозумілими. Беручи до уваги велику роль місцевої ендокринної регуляції росту лейоміоми, було запропоновано можливу участь морфологічно нормального міометрія в її патогенезі. Спираючись на доведений факт несприятливого впливу множинної лейоміоми на частоту рецидивів, було проведено порівняльний аналіз експресії імуногістохімічних маркерів у незміненому міометрії жінок з лейоміомою матки. За отриманими даними виділено два імуноморфотипи нормального міометрія у жінок з лейоміомою матки. Жінки з множинною лейоміомою мали статистично значуще збільшення експресії ароматази, TSP-1 VEGF і підвищену судинну щільність (CD34) у незміненому міометрії.

НОВЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМАХ ПАТОГЕНЕЗА ЛЕЙОМИОМЫ МАТКИ. Этиология и патогенез лейомиомы матки - распространенной доброкачественной опухоли женской репродуктивной системы остаются не до конца понятными. Принимая во внимание большую роль местной эндокринной регуляции роста лейомиомы, было предложено возможное участие морфологически нормального миометрия в ее патогенезе. Основываясь на доказанном факте неблагоприятного воздействия множественной лейомиомы на частоту рецидивов, был проведен сравнительный анализ экспрессии иммуногистохимических маркеров в неизмененном миометрии женщин с лейомиомой матки. По полученным данным выделено два иммуноморфотипа нормального миометрия у женщин с лейомиомой матки. Женщины с множественной лейомиомой имели статистически значимое увеличение экспрессии ароматазы, TSP-1, VEGF и повышенную васкулярную плотность (CD34) в неизмененном миометрии.

NEW PERSPECTIVES ON MECHANISMS OF PATHOGENESIS OF UTERINE LEIOMYOMA. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyoma - very common female benign tumor are still not very clear. Taking into account the great role of local endocrine regulation of leiomyoma growth, we proposed possible involvement of morphologically normal myometrium in leiomyoma pathogenesis. Based on the proven fact of unfavorable influence of multiple myoma on recurrence rate we conducted a comparative analysis of the expression of immunohistochemical markers in unchanged myometrium of women with uterine leiomyomas. According to data obtained it was possible to distinguish two different types of normal myometrium in women with uterine fibroids. Women with multiple myoma had statistically significant increase of expression of aromatase, TSP-1, VEGF and increased vascular density (CD34).

**Ключові слова:** лейоміома матки, імуногістохімічне дослідження, патогенез.

**Ключевые слова:** лейомиома матки, иммуногистохимическое исследование, патогенез.

**Key words:** uterine leiomyoma, immunohistochemical study, pathogenesis.

**ВСТУП.** Лейоміома матки (ЛМ) є найбільш поширеною доброякісною пухлиною жіночих статевих органів, моноклональним проліфератом. Незважаючи на доброякісний характер, захворювання завдає великої шкоди жіночому репродуктивному здоров'ю та веде до серйозних соціальних та економічних наслідків, знижуючи репродуктивний потенціал, працездатність та якість життя жінок [1].

Добре відомо, що яєчникові стероїди відіграють важливу роль у прогресуванні ЛМ. На сьогодні накопичено достатньо даних про роль не тільки стероїдних гормонів у сироватці крові, але й місцевих стероїдів у патогенезі ЛМ. Ці процеси регулюються ферментом ароматазою, який бере участь у перетворенні андрогенів в естрогени [2].

Ріст і руйнування екстрацелюлярного матриксу також є важливими патогенетичними факторами в прогресуванні ЛМ. Існують дані як про знижену активність матриксних металопротеїназ у тканині лейоміоми, що перешкоджає руйнуванню ЕЦМ, так і про підвищену активність тканинних інгібіторів матриксних металопротеїназ [3].

Баланс процесів проліферації та апоптозу також є важливим фактором прогресування ЛМ. Встанов-

лено, що в ряді випадків ЛМ характеризується підвищеною проліферацією [4]. Дані про роль апоптозу є суперечливими - частина дослідників вважає, що знижений апоптоз є однією із ланок патогенезу лейоміоми матки [5]; інші не знайшли такої закономірності [6].

Сьогодні є переконливі докази, що генетичні та епігенетичні фактори також відіграють важливу роль у патогенезі лейоміоми матки. Тим не менше, патогенез лейоміоми матки - дуже поширеної доброякісної пухлини все ще залишається недостатньо зрозумілим.

Враховуючи доведену велику роль паракринної регуляції росту пухлини, а також не зовсім зрозумілий потенціал до утворення нових лейоміоматозних вузлів у різних жінок, автором запропонована гіпотеза про можливу участь морфологічно нормального міометрія, що оточує міоматозний вузол, у патогенезі лейоміоми матки. Метою роботи стало вивчення ролі незміненого міометрія у патогенезі лейоміоми матки.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** Дослідження проводилися на базі КЗ «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. 1.1. Мечникова» протягом 2010-2014 років.

На підставі доведеного факту несприятливого впливу множинної лейоміоми, міоми на частоту ре-

цидивів після консервативної міомектомії [7] було проведено порівняльний аналіз експресії імуногістохімічних маркерів у центрі та периферії домінантно-лейоміоматозного вузла, а також у незміненому міометрії жінок з множинними лейоміоми матки (5 вузлів та більше) з несприятливим прогнозом розвитку рецидиву (група 1 - 10 жінок) і жінок з одиничним лейоміоматозним вузлом, який мав відносно сприятливий прогноз у відношенні виникнення рецидиву (група II - 10 жінок).

Всім жінкам була виконана абдомінальна (лапаротомна або міні-лапаротомна) міомектомія у фолікулярну фазу менструального циклу, в результаті чого отримані біоптати як лейоміоматозних вузлів, так і незміненого міометрія, що їх оточує. Всі пацієнтки не отримували гормонального лікування протягом принаймні 6 місяців до операції. Жінки з такою гінекологічною патологією, як гіперплазія ендометрія, синдром полікістозних яєчників та ендометріоз, були виключені з дослідження через можливий вплив на фізіологію міометрія.

Після проведеного гістологічного дослідження всі зразки були діагностовані як доброякісні прості лейоміоми матки. Для імуногістохімічного дослідження (ІГХ) було обрано маркери, які охоплюють основні перелічені у вступі ланки прогресування пухлини: рецептори до естрогену (ER) та до прогестерону (PR), ароматаза, Ki-67, bcl-2, VEGF, CD34, TSP-1 (тромбоспондин-1), MMP-9 (матриксна металопротеїназа), eNOS (ендотеліальна NO-синтетаза) [8].

Зрізи завтовшки 4-5 мкм наносили на предметні стекла, фіксували в нейтральному забуференому формаліні з наступним проведенням теплової індукції епітопного звороту (HIER). Використовували моноклональні антитіла до Ki-67, bcl-2, MMP 9 (DakoCytomation), ER, PR (Novocastra), VEGF, eNOS, TSP-1, CD34 (LabVision), ароматази (AbD Serotec). Подальшу обробку проводили з використанням системи візуалізації LSAB2 та EnVision (DakoCytomation). Після цього проводили реакцію з хромогеном DAB (DakoCytomation), оцінюючи якість взаємодії. Для диференціювання структур тканин зрізи додатково фарбувались гематоксиліном 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 x100, x200, x400, та x1000 (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 відсотка клітин з позитивним забарвленням Ki-67 (індекс проліферації). При вивченні експресії ER, PR та ароматази підраховували QH-score. Експресію інших маркерів підраховували як кількість позитивно забарвлених клітин на 1000 [8].

Отримані дані піддавали статистичній обробці. Визначення вірогідності розходжень між вибірками проводили з урахуванням нормальності розподілу із залученням як параметричних, так і непараметрич-

них критеріїв. У дослідженні було прийнято рівень статистичної значущості  $p < 0,05$ . При проведенні статистичної обробки усі необхідні розрахунки виконували за допомогою програми Statistica (версія 6.1; серійний номер AGAR 909 E415822FA).

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.** Обидві групи були подібні за середнім віком, індексом маси тіла, наявністю супутніх захворювань, оперативних втручань ( $p > 0,05$ ). Середній вік досліджуваних жінок склав  $33,3 \pm 2,2$  року. Середній індекс маси тіла -  $23,3 \pm 2,2$  кг/м<sup>2</sup>. Досліджені групи, крім того, не відрізнялися статистично значимо за кількістю пологів, самовільних абортів та кесаревого розтину в анамнезі ( $p > 0,05$ ).

Проведені ІГХ дослідження показали досить не виражену проліферативну активність у тканині міометрія та ЛМ жінок обох груп (Ki-67). В цілому для зразків тканини ЛМ була характерна статистично значимо більша проліферативна активність у досліджуваних групах ( $p < 0,05$ ). Навпаки, експресія одного з відомих маркерів апоптозу - Bcl-2 була вірогідно більшою у тканині ЛМ у порівнянні із зразками міометрія ( $p < 0,05$ ).

У дослідженні зразки лейоміоми характеризувались вірогідно більшою експресією як естрогенових (ER), так і прогестинових рецепторів (PR), причому найбільш виразною була експресія PR ( $p < 0,05$ ). На сьогодні накопичено достатньо даних про важливу роль у прогресуванні ЛМ не тільки концентрацій стероїдних гормонів у сироватці крові, але і локального стероїдогенезу [2]. За результатами проведених досліджень видно, що для зразків тканин була характерна незначна експресія ароматази, але вірогідно більша в тканині міоми в порівнянні з міометрієм ( $p < 0,05$ ).

Процеси синтезу і деградації екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ) відіграють не менш важливу роль у прогресуванні ЛМ, ніж проліферація та апоптоз. Враховуючи значно більшу кількість елементів ЕЦМ в ЛМ, цілком очікуваною була підвищена експресія матриксних металопротеїназ (MMP-9) у зразках лейоміоми в порівнянні з нормальним міометрієм ( $p < 0,05$ ).

Безсумнівним є факт необхідності забезпечення адекватного кровопостачання для прогресування будь-якої пухлини. Експресія проангіогенних факторів eNOS та VEGF була також статистично значимо більшою в зразках лейоміоми в порівнянні з міометрієм ( $p < 0,05$ ). Навпаки, зміни експресії TSP-1 у зразках, отриманих у жінок досліджуваних груп, були протилежними змінам експресії VEGF: найбільша частота експресії TSP-1 була у міометрії, що було вірогідно більшим, ніж в ЛМ ( $p < 0,05$ ). Більш розгорнуто перелічені результати описані в попередніх публікаціях [9].

Цікавою є інформація про експресію ІГХ маркерів у різних частинах міоматозних вузлів - в центрі та на периферії. Виявилось, що периферійні ділянки володіють значно більшою проліферативною активністю, ніж центральна ділянка одного і того ж міоматозного вузла (рис. 1). Крім того, на периферії вузла була виявлена підвищена експресія факторів

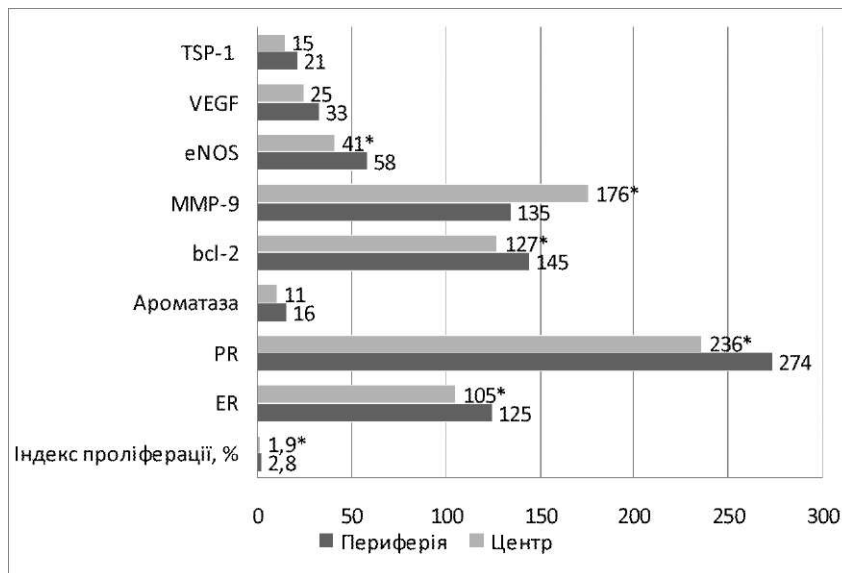


Рис. 1. Експресія імуногістохімічних маркерів у центрі та периферії міоматозних вузлів, кількість поз. на 1000 клітин.

Примітка. \* - різниця вірогідна при  $p < 0,05$  у порівнянні із зразками з периферії.

ангіогенезу, рецепторів стероїдних гормонів, факторів, що гальмують процеси апоптозу, ароматази, тромбоспондину-1 та, навпаки, знижена експресія MMP. Все перелічене свідчить про значно більший потенціал до росту саме периферичних ділянок міоматозних вузлів.

Отже, регрес та слідом загибель міоматозного вузла виникає з центральної частини. Прогресування лейоміоми до дуже великих розмірів можливе лише при появі адекватного кровопостачання з формуванням зони активного росту. Це дозволяє робити припущення про важливу роль міометрія, що оточує вузол, у подальшому прогресуванні ЛМ через

його паракринний вплив та активне кровопостачання ЛМ.

При дослідженні незміненого міометрія було виявлене підвищення експресії ароматази у жінок групи I ( $p < 0,05$ ). Так, тільки в двох із 10 зразків міометрія маток з одним міоматозним вузлом була виявлена експресія ароматази (20 %). Навпаки, у міометрії маток з множинними міоматозними вузлами експресія ароматази була виявлена в 8 випадках із 10 (80 %). Отже, міометрій жінок з великою кількістю міоматозних вузлів здатен підвищувати локальний синтез естрогенів, який не залежить від сироваткової концентрації останніх та функції гіпофіза (рис. 2).

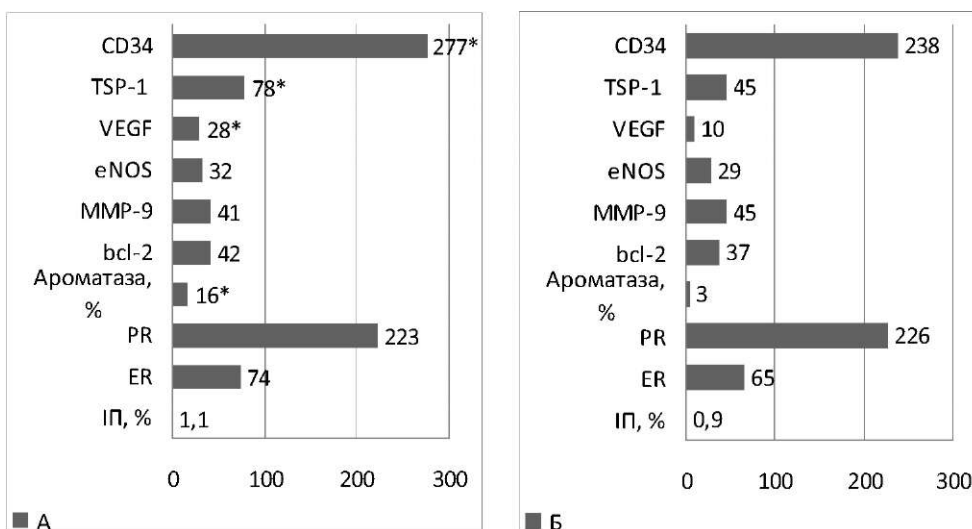


Рис. 2. Два варіанти експресії імуногістохімічних маркерів у зразках міометрія з множинною лейоміомою матки (А) та одиничним вузлом (Б).

Примітка. \* - різниця вірогідна при  $p < 0,05$  у порівнянні із Б.

Як представлено на рисунку 2, окрім ароматази, в незміненому міометрії жінок групи I відмічалася підвищена експресія маркерів ангиогенезу (TSP-1, VEGF та CD34), що дозволило виділити два різних імуноморфотипи міометрія. Це може надати можливість більш точного розуміння механізмів виникнення ЛМ та покращити прогнозування рецидивів ЛМ.

**ВИСНОВКИ.** Ці спостереження та розрахунки дали підстави розглядати лейоміому матки не як окрему доброякісну пухлину, а говорити про «лейоміоматозну хворобу матки», коли сам міометрій під впливом не з'ясованих до кінця причин сприяє появі нових міоматозних вузлів та підтримує їх прогресуван-

ня. В генезі та прогресуванні невеликих міоматозних вузлів, які є практично аваскулярними, велику роль відіграє здатність міометрія, що оточує, забезпечити адекватне кровопостачання для подальшого росту. Вочевидь це і відбувається, що підтверджено ІГХ дослідженнями міометрія у жінок з множинною ЛМ, які виявили підвищення факторів ангиогенезу та ароматазної активності (перший варіант імуноморфотипу).

**ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО ДОСЛІДЖЕННЯ.** Отримані дані є дуже важливим підґрунтям для вивчення терапевтичного впливу безпосередньо на «гіперактивний» міометрій, як причину виникнення або рецидиву лейоміоми матки.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Долецкая Д. В. Оценка качества жизни у больных миомой матки после различных видов хирургического лечения / Д. В. Долецкая, М. А. Ботвин, Н. М. Побединский // Акушерство и гинекология. - 2006. - № 1. - С. 10-13.
2. Shozu M. Aromatase and leiomyoma of the uterus / M. Shozu, K. Murakami, M. Inoue // Semin Reprod. Med. - 2004. - Vol. 22, № 1. - P. 51-60.
3. Hulboy D. L. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function / D. L. Hulboy, L. A. Rudolph, L. M. Matrisian // Mol. Hum. Reprod. -1997. - Vol. 3, № 1. - P. 27-45.
4. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis / T. Maruo, N. Ohara, J. Wang, H. Matsuo // Hum. Reprod. Update. - 2004. - Vol. 10, № 3. - P. 207-220.
5. Altered hormonal responsiveness of proliferation and apoptosis during myometrial maturation and the development of uterine leiomyomas in the rat / K. D. Burroughs, R. Fuchs-Young, B. Davis, C. L. Walker // Biol. Reprod. - 2000. - Vol. 63, № 5. - P. 1322-1330.
6. Cell proliferation and apoptosis in human uterine leiomyomas and myometria / D. Dixon, G. P. Flake, A.B.Moore [etal.]//VirchowsArch. - 2002.-Vol.441, № 1. - P. 53-62.
7. Медведев М. В. Лейоміома матки: нові підходи до застосування органозберігаючих технологій в лікуванні / М. В. Медведев // Медичні перспективи. - 2012. - Т. 17, № 3. - С. 83-87.
8. Місце імуногістохімічних методів у диференційній діагностиці гладком'язових пухлин матки / І. С. Шпонька, В. О. Потапов, М. В. Медведев, Г. С. Гончарова // Медичні перспективи. - 2009. - Т.14, № 2. - С. 39-46.
9. Медведев М. В. Імуногістохімічна оцінка стану міоматозної тканини та міометрія у хворих на лейоміому матки при гіпо- та гіперестрогенних станах, обумовлених різними схемами використання аналогів гонадотропін-релізінг гормону / М. В. Медведев // Морфологія. - 2012. - Т.6, № 1. - С. 43-49.

Отримано 13.02.15