

А.М. Авдалян¹, И.П. Бобров¹, В.В. Климачев² и А.Ф. Лазарев¹

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ И АКТИВНОСТЬ АРГИРОФИЛЬНЫХ БЕЛКОВ ОБЛАСТИ ЯДРЫШКОВЫХ ОРГАНИЗАТОРОВ В КЛЕТКАХ НЕИЗМЕНЕННОГО МИОМЕТРИЯ И ЛЕЙОМИОМЕ ТЕЛА МАТКИ

¹ Лаборатория молекулярной диагностики (зав. — канд. мед. наук А.М. Авдалян) Алтайского филиала Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН; ² кафедра патологической анатомии (зав. — проф. В.В. Климачев) Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул, e-mail: ashot_avdalyan@mail.ru

На материале 106 образцов неизмененного миометрия и 106 опухолевых узлов простой лейомиомы проведен анализ экспрессии рецепторов прогестерона и эстрогена α (РП и РЭ) в сопоставлении с количеством аргирофильных белков области ядрышковых организаторов (Ag-ОЯОР). Показано, что в неизмененном миометрии и простой лейомиоме РП экспрессировались в 100% случаев, а РЭ значительно реже (37 ± 4 и $24 \pm 4\%$ соответственно). Ag-ОЯОР-белков в неизмененном миометрии было значимо меньше, чем в лейомиоме ($3,1 \pm 0,5$ и $5,6 \pm 0,4$ соответственно). Кроме того, выявлено, что количество Ag-ОЯОР-белков зависело от наличия РЭ. При наличии РЭ как в неизмененном миометрии, так и в лейомиоме, количество аргирофильных гранул было меньше, чем при отсутствии РЭ.

Ключевые слова: миометрий, лейомиома, рецепторы прогестерона, рецепторы эстрогена, аргирофильные белки.

По данным ряда авторов, гормонемия и экспрессия рецепторов прогестерона и эстрогена (РП, РЭ) сопряженно способствуют инактивации и/или запуску процессов программируемой гибели или пролиферативной активности гладких мышечных клеток (ГМК). По общему мнению, прогестерон усиливает пролиферацию, вызывает экспрессию Bcl-2, подавляет амплификацию p53; эстроген же снижает пролиферативную активность, увеличивает экспрессию p53 [1, 12, 14, 17, 20–23]. Кроме того, показано, что результатом взаимодействия половых гормонов с РП и РЭ является вовлечение в модуляцию транскрипционной активности рибосомальных генов клеток лейомиомы (ЛМ) [16]. Тем не менее, ряд авторов отметили неоднозначность роли гормонов и их рецепторов в ГМК в патогенезе роста ЛМ [5, 11]. Было показано, что локальная гормонемия и количество рецепторов гормонов могут стать из главными факторами, регулирующими интенсивность течения процессов гиперплазии ГМК, что в конечном итоге, вероятно, может влиять на развитие ЛМ [4]. Вместе с тем, частота развития лейомиосаркомы из ЛМ, по данным литературы, колеблется в пределах от 0,13 до 0,29%, а механизмы, лежащие в основе канцерогенеза, изучены недостаточно [15]. В настоящее время роль половых гормонов считается ведущей в развитии, росте и малигнизации ЛМ тела матки, что согласуется с гормонально-метаболической теорией канцерогенеза как одной из наиболее доказанных [2].

В последнее время обнаружено участие аргирофильных белков областей ядрышковых орга-

низаторов (Ag-ОЯОР-белков) в регуляции митотического цикла. Установлено, что уровень их экспрессии коррелирует с транскрипционной активностью рибосомальных генов, а также с показателями пролиферативной активности клеток [3, 8].

Таким образом, сопоставление наличия РП и РЭ α неизмененного миометрия и ЛМ матки и выявление степени корреляции с количеством Ag-ОЯОР-белков позволит более четко определить динамику изменения экспрессии рецепторов и активности рибосомальных белков в цепочке изменений от нормы до ЛМ, что будет способствовать более глубокому пониманию морфогенеза развития и дальнейшей малигнизации ЛМ.

Исходя из изложенного, целью данного исследования стало определение содержания РП и РЭ α в ГМК неизмененного миометрия и простой формы ЛМ в сопоставлении с активностью Ag-ОЯОР-белков.

Материал и методы. Исследовали миометрий удаленной матки пациенток ($n=35$) с клинической картиной быстрорастущей ЛМ (боли, кровотечения, двукратное и более увеличение, по данным УЗИ, в течение 1 года). Во всех случаях обнаруживали множественные узлы диаметром от 1 до 10 см. Материал брали из наименьшего и наибольшего узлов, всего изучены 106 простых ЛМ. Во всех случаях исследовали неизмененный миометрий на расстоянии не менее 1 см от изучаемого миоматозного узла. Практически 70% больных были пре- и менопаузального возраста (от 45 лет и более) с нарушением менструальной функции. Средний возраст пациенток — 47 ± 7 лет (мин. — 27; макс. — 66; мода — 46). Треть больных были репродуктивного возраста,

прооперированы во вторую половину менструального цикла. Уровень экспрессии РП и РЭ α определяли при помощи иммуногистохимического метода с применением системы визуализации EnVision+Dual Link и первичных антител к половым рецепторам (клон PgR 636 и 1D5, DAKO, Дания). Для оценки результатов реакции применяли балльную шкалу оценки, разработанную производителем [10]. Шкала учитывает как число положительно окрашенных ядер опухолевых клеток (до 5 баллов в зависимости от доли окрашенных ядер), так и интенсивность окраски (до 3 баллов). Итоговый балл, означающий гормонозависимость ткани, получают путем сложения обоих показателей. Новообразования, имеющие от 0 до 2 баллов, считаются гормонально-негативными, 3 и более баллов — гормонально-позитивными. Для исследования активности Ag-ОЯОР-белков парафиновые срезы толщиной 3 мкм помещали на стекла, покрытые поли-L-лизинном. После стандартного депарафинирования срезы автоклавируют при 120 °C в течение 20 мин, в 0,01 М цитратном буфере (рН 6,0), как предложено «Международным комитетом по количественной оценке Ag-ОЯОР-белков» с целью стандартизации исследования [6, 19]. После охлаждения срезы помещали в 2 н. муравьиную кислоту на 12 мин при комнатной температуре [3]. Далее срезы обрабатывали по одностадийной методике [18] при помощи AgNO₃ (Bio-Optica, Италия). Докрашивание ядер не проводили, срезы заключали в канадский бальзам. В каждом случае изучали 10 цифровых изображений, полученных с соответствующих полей зрения микроскопа при увеличении 1000 (об. 100, масляная иммерсия). Использовали микроскоп Zeiss AxioStar plus (Германия) с цифровой камерой 2.1 Мп. Получали цифровое изображение с разрешением 1024x768 в формате tiff. Среднее количество клеток, подвергнутых анализу, в каждом случае составило 199 (от 112 до 327 клеток в автоматическом режиме подсчета при помощи прикладной программы Image Tool 3.0). Статистическую обработку проводили при помощи компьютерной программы STATISTICA 6.0. При проверке статистических гипотез применяли непараметрические методы: однофакторный тест Краскела–Уоллиса, U-тест Манна–Уитни, коэффициент корреляции рангов Спирмена (r). Значимость полученных критериев оценивали при P<0,05.

Результаты исследования. Полученные данные показали, что ГМК неизмененного смежного с ЛМ миометрия содержали РП в 100% случаев с высокой степенью экспрессии и числом клеток, имевших рецепторы — от 6 до 8 баллов (рис. 1, а). Содержание РП в ГМК простой ЛМ статистически не отличалось от такового в смежном миометрии (см. рис. 1, б). Тем не менее, степень выраженности и число клеток с позитивной реакцией в ЛМ были стабильно выше, чем в прилежащем миометрии.

РЭ в ГМК неизмененного миометрия выявлялись в 37±4% случаев и, как правило, со слабой степенью экспрессии и низким числом окрашенных клеток — от 3 до 5 баллов по шкале. В ЛМ позитивная реакция встречалась значимо реже — в 24±4% случаев, но с более высокой интенсивностью позитивной реакции в ГМК (см. рис. 1, в; P=0,05). Таким образом, практически в трети случаев ГМК ЛМ и неизмененного миометрия

не экспрессировали РЭ α и не выявлялись при помощи иммуногистохимического метода. Распределение как РП, так и РЭ в смежном с ЛМ миометрии было равномерным с несколько большей интенсивностью окраски в подслизистом и меньшей — в субсерозном слое. В ЛМ в центре и по периферии опухоли выявлены также равномерные интенсивность реакции и число ГМК, содержащих рецепторы.

Количество аргирофильных гранул в прилежащем к ЛМ миометрии было значимо ниже, чем в ЛМ (рис. 2, а, б), и составило 3,1±0,5 и 5,6±0,4 соответственно (P=0,04). Вместе с количественными изменениями в виде увеличения содержания аргирофильных белков происходили и качественные реаранжировки внутриядрышкового кластера гранул: увеличивалось число нуклеолонемных ядрышек, которые в неизмененном миометрии мы не находили.

Определяли также количество Ag-ОЯОР-белков в зависимости от наличия РП и РЭ в ГМК миометрия и ЛМ. Поскольку РП были обнаружены в 100% ЛМ и неизмененном миометрии со степенью позитивной реакции по шкале от 5 до 8 баллов, то была определена зависимость количества белков от наличия РЭ α .

Зависимость содержания аргирофильных белков областей ядрышковых организаторов (Ag-ОЯОР-белков) от наличия рецепторов эстрогена α в гладких мышечных клетках неизмененного миометрия и лейомиомы

Наличие рецептора	Ag-ОЯОР-белки		Коэффициент корреляции
	Миометрий	Лейомиома	
Наличие	1,6±0,3	4,2±0,5	r=0,56
Отсутствие	3,4±0,10*	6,3±0,6*	

* Различия статистически значимые при P<0,05.

Полученные данные показали, что при наличии РЭ в неизмененном миометрии количество аргирофильных гранул было значимо ниже, чем при отсутствии РЭ (см. рис. 2, в). Данная закономерность прослеживалась и в ЛМ (таблица; см. рис. 2, г).

Обсуждение полученных данных. Таким образом, результаты исследования показали, что наличие РП характерно для клеток миометрия и простой ЛМ и является конституциональным, генетически закрепленным свойством ГМК. Экспрессия РЭ была выявлена лишь в 37,1% случаев в неизмененном миометрии, а в клетках ЛМ наличие рецепторов было отмечено реже — в 23,5% случаев, но окраска была более интенсивной, что, возможно, является косвенным показателем большего количества РЭ α . Результаты, полученные нами, несколько противоречат дан-

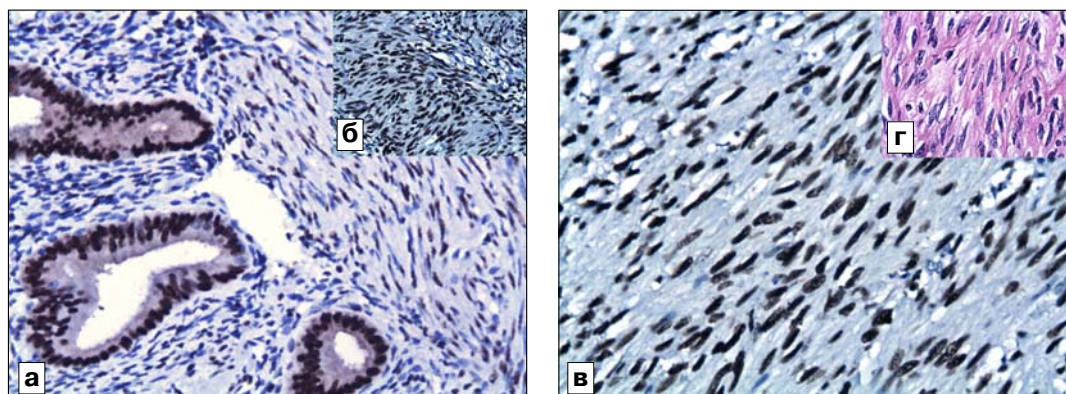


Рис. 1. Экспрессия рецепторов прогестерона и эстрогена α (РП и РЭ) в гладких мышечных клетках (ГМК) неизмененного миометрия и лейомиомы (ЛМ).

а, б — экспрессия РП в ГМК подслизистого (а) и среднего (б) слоев неизмененного миометрия, смежного с ЛМ; в, г — экспрессия РП в ГМК простой ЛМ; д — экспрессия РЭ в ГМК простой ЛМ. а–в, д — иммуногистохимическая реакция, хромоген–диаминобензидин; г — гематоксилин–эозин. Ув.: а, б — 200; в–д — 400.

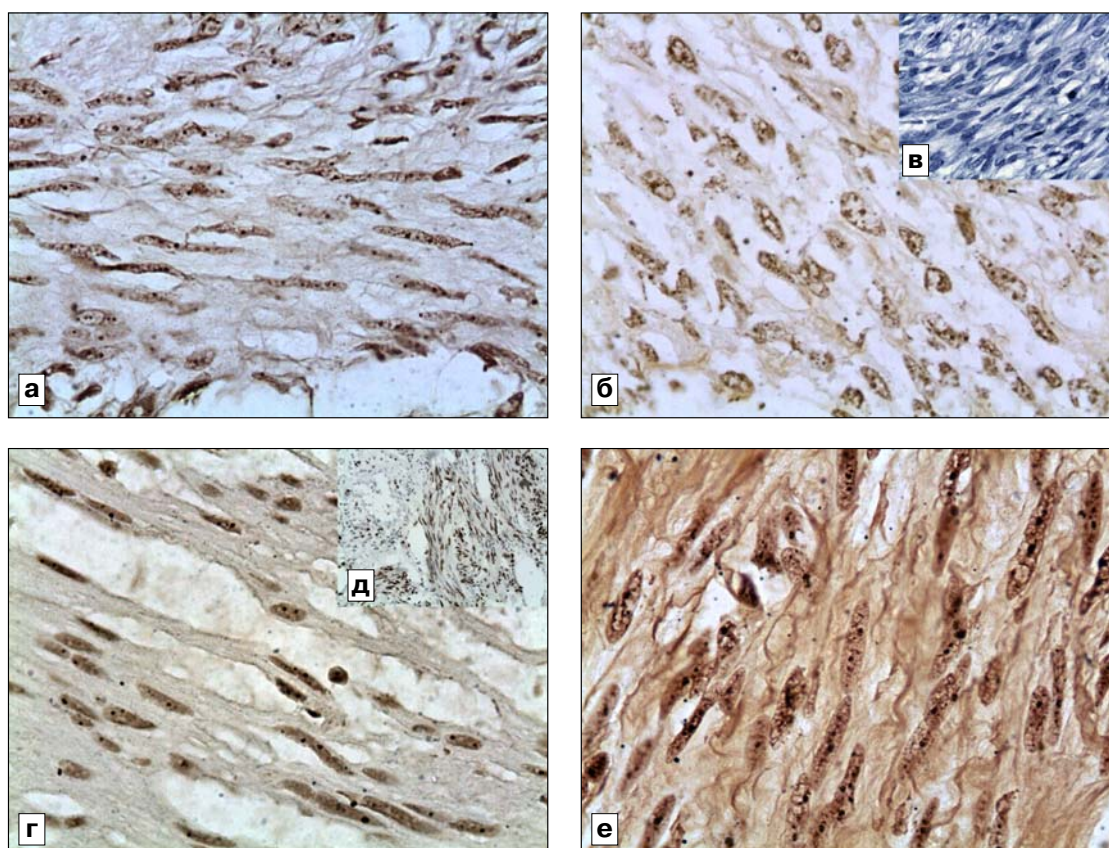


Рис. 2. Аргирофильные гранулы в неизмененном миометрии и лейомиоме (ЛМ) при наличии или отсутствии рецепторов эстрогена α (РЭ) в гладких мышечных клетках (ГМК).

а — неизмененный миометрий, смежный с ЛМ; б, в — ГМК простой ЛМ; г, д — смежный с ЛМ неизмененный миометрий при наличии РЭ в ГМК; е — простая ЛМ при отсутствии РЭ в ГМК. а, б, г, е — импрегнация нитратом серебра; в — окраска гематоксилином по Гейденгайну; д — иммуногистохимическая реакция на РЭ. Ув.: а, б, г, е — 1000; в — 400; д — 200.

ным других исследователей, которые в неизменном миометрии находили меньшее количество РЭ, нежели в ЛМ [8]. Это противоречие можно объяснить тем, что в нашем исследовании основная часть материала была получена у больных в предменопаузальный период с нарушением гормонального гомеостаза и в фазу секреции менструального цикла, что согласуется с мнением других авторов о большем количестве РЭ в ЛМ, чем в неизменном миометрии, но при этом в секреторную фазу количество РЭ значительно уменьшается [9, 21]. Кроме того, существует мнение, что у женщин в предменопаузе и при нарушении менструальной функции различий в экспрессии РЭ в миометрии и ЛМ нет [1, 13]. Следует отметить, что основная часть исследователей при анализе количества рецепторов половых гормонов использовали методики их определения в сыворотке, что, являясь чувствительным количественным методом, не всегда коррелирует с иммуногистохимическим качественным методом.

Исследованию активности ядрышкообразующих зон в гладкомышечных опухолях тела матки посвящены небольшое число работ [20]. В эксперименте отмечено, что амплификация рибосомальных генов в ГМК в значительной степени зависит от гормонального гомеостаза. Так, при введении эстрадиола была выявлена гипертрофия матки, а в клетках резко возросло число Ag-ОЯОР-белков. После воздействия прогестин развивались прегестационные изменения в матке и было отмечено еще большее увеличение количества Ag-ОЯОР-белков в ядрышках. Обобщая несколько противоречивые данные литературы, можно говорить о том, что наиболее низкая пролиферативная активность ГМК в неизменном миометрии и ЛМ характерна для женщин в постменопаузе, однако она возрастает в фазу пролиферации и при гиперэстрогемии, а пик пролиферации с гиперэкспрессией Ag-ОЯОР-белков и Ki-67 выявляется в секреторную фазу с гиперпрогестинемией [21].

Активность рибосомальных генов, оцененная количеством Ag-ОЯОР-белков, была значимо выше в ЛМ по сравнению с неизменным миометрием. Увеличение количества аргирофильных белков было взаимосвязано с рецепторным статусом ГМК как в неизменном миометрии, так и в ЛМ: их содержание увеличено в ГМК миометрия и опухоли с отсутствием РЭ с высоким коэффициентом корреляции ($r=0,56$). Представляется возможным, что количество и активность рибосомальных аргирофильных белков находятся в прямой зависимости не только от локальной гипергормонемии, но и от наличия рецепторов в

самых ГМК неизменного миометрия и опухоли, что, в конечном итоге, в сочетании с изменением ряда других клинко-морфологических параметров приводит к опухолевому каскаду и развитию и росту доброкачественных и злокачественных гладкомышечных опухолей тела матки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вихляева Е.М. Руководство по диагностике и лечению лейомиомы матки. М., МЕД пресс-информ, 2004.
2. Имянитов Е.Н. и Хансон К.П. Молекулярная онкология: клинические аспекты. СПб., Изд. дом СПбМАПО, 2007.
3. Мамаев Н.Н., Мамаева С.Е., Либушкина И.Л. и др. Активность ядрышковых организаторов нормальных и лейкозных клеток костного мозга человека. Цитология, 1984, т. 26, № 1, с. 46–51.
4. Савицкий Г.А. и Савицкий А.Г. Миома матки (проблемы патогенеза и патогенетической терапии). СПб., ЭЛБИ, 2000.
5. Сидорова И.С., Леваков С.А., Зайратьянц О.В. и др. Миома матки (современные проблемы этиологии, патогенеза, диагностики и лечения). М., изд. МИА, 2002.
6. Aubele M., Bieterferd S., Derenzini M. et al. Guidelines of AgNOR quantitation. Zbl. Pathol., 1994, v. 140, № 1, p. 107–108.
7. Bakas P., Liapis A., Vlahopoulos S. et al. Estrogen receptor alpha and beta in uterine fibroids: a basis for altered estrogen responsiveness. Fertil. Steril., 2008, v. 90, № 5, p. 1878–1885.
8. Derenzini M. The AgNORs. Micron, 2000, v. 31, p. 117–120.
9. Englund K., Blanck A., Gustavsson I. et al. Sex steroid receptors in human myometrium and fibroids: changes during the menstrual cycle and gonadotropin-releasing hormone treatment. J. Clin. Endocrinol. Metabol., 1998, v. 83, № 11, p. 4092–4096.
10. ER/PR pharmDx. Targeted therapies require targeted diagnostics. DAKO, Denmark, 2004.
11. Esposito N.N., Hunt J.L., Bakker A. and Jones M.W. Analysis of allelic loss as an adjuvant tool in evaluation of malignancy in uterine smooth muscle tumors. Am. J. Surg. Pathol., 2006, v. 30, № 1, p. 97–103.
12. Gao Z., Matsuo H., Nakago S. et al. p53 Tumor suppressor protein content in human uterine leiomyomas and its down-regulation by 17 β -estradiol. J. Clin. Endocrinol. Metabol., 2002, v. 87, № 8, p. 3915–3920.
13. Jakimiuk A.J., Bogusiewicz M., Tarkowski R. et al. Estrogen receptor alpha and beta expression in uterine leiomyomas from premenopausal women. Fertil. Steril., 2004, v. 82, № 3, p. 1244–1249.
14. Kelley T.W., Borden E.C. and Goldblum J.R. Estrogen and progesterone receptor expression in uterine and extrauterine leiomyosarcomas: an immunohistochemical study. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol., 2004, v. 12, № 4, p. 338–341.
15. Leibsohn S., Ablain G., Michell D.R. and Schaerth J.B. Leiomyosarcoma in a series of hysterectomies performed for presumed uterine leiomyomas. Am. J. Obstet. Gynecol., 1990, v. 162, № 4, p. 968–974.
16. Maruo T., Ohara N., Wang J. and Matsuo H. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. Hum. Reprod. Update, 2004, v. 10, № 3, p. 207–220.

17. Molinari A.M., Bontempo P., Schiavone E.M. et al. Estradiol induces functional inactivation of p53 by intracellular redistribution. *Cancer Res.*, 2000, v. 60, p. 2594–2597.
18. Ofner D. and Schmid K. W. Standardized AgNOR analysis: its usefulness in surgical oncology. *Histochem. Cell Biol.*, 1996, v. 106, № 2, p. 193–196.
19. Ploton D., Ménager M., Jeannesson P. et al. Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.*, 1986, v. 18, № 1, p. 5–14.
20. Shimomura Y., Matsuo H., Samoto T. and Maruo T. Up-regulation by progesterone of proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor expression in human uterine leiomyoma. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 1998, v. 83, № 6, p. 2192–2198.
21. Viville B., Charnock-Jones D.S., Sharkey A.M. et al. Distribution of the A and B forms of the progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium. *Hum. Reprod.*, 1997, v. 12, № 4, p. 815–822.
22. Wu X., Blanck A., Olovsson M. et al. Apoptosis, cellular proliferation and expression of p53 in human uterine leiomyomas and myometrium during the menstrual cycle and after menopause. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 2000, v. 79, № 5, p. 397–404.
23. Xu Q., Takekida S., Ohara N. et al. Progesterone receptor modulator CDB-2914 down-regulates proliferative cell nuclear antigen and Bcl-2 protein expression and up-regulates caspase-3 and poly(ADP-ribose) polymerase expression in cultured human uterine leiomyoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 2004, v. 82, № 5, p. 1936–1940.

Поступила в редакцию 06.07.09
Получена после доработки 15.11.09

SEX HORMONES RECEPTOR EXPRESSION AND THE ACTIVITY OF THE ARGYROPHILIC PROTEINS OF THE NUCLEOLAR ORGANIZER REGION IN THE CELLS OF INTACT MYOMETRIUM AND IN LEIOMYOMATA OF THE UTERINE CORPUS

A.M. Avdalyan, I.P. Bobrov, V.V. Klimachyov and A.F. Lazarev

The authors have analyzed the expression of progesterone receptor (PR) and estrogen receptor α (ER) in comparison with the argyrophil proteins content in the nucleolar organizer region (NOR) in 106 samples of the intact myometrium and in 106 tumorous nodes of the simple leiomyoma. PR expression was shown in 100% cases of the intact myometrium and simple leiomyoma, while ER expression was far less common, 37.4±4.2 and 23.5±4.1%, respectively. There were much fewer AgNOR proteins in the intact myometrium than in the leiomyoma (3.1±0.5 and 5.6±0.4, respectively). Moreover, the number of AgNOR proteins was shown to depend on the presence of ER: when smooth muscle cells were ER-positive, there were fewer argyrophilic granules than when they were absent in both intact myometrium and simple leiomyoma.

Key words: *myometrium, leiomyoma, progesterone receptors, estrogen receptors, argyrophilic proteins.*

Laboratory of Molecular Diagnostics, Altai Branch of RAMS N.N. Blokhin Russian Oncology Center, Department of Pathological Anatomy, Altai State Medical University, Barnaul