

ЛЕЙОМИОМЫ МАТКИ БОЛЬШИХ РАЗМЕРОВ: ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РОСТА

Коган Е.А.¹, Аскольская С.И.², Попов Ю.В.², Соломахина М.А.¹, Файзуллина Н.М.³

¹ГБОУ Первый медицинский университет им. И.М. Сеченова

²ФНКЦ специализированной медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России

³ФГБУ НЦ АГиП им. В.И. Кулакова МЗ РФ

Патогенез миомы матки остается спорным и вызывает много вопросов, а причины и механизм развития лейомиом матки (ЛММ) больших размеров неизвестны. В работе оценены патогенетические механизмы роста лейомиом больших размеров в различных возрастных группах на основании изучения экспрессии TGF- β , CD117, PD-ECGF, Ki67, *connexin* и *nestin* в послеоперационном материале путем сопоставления клинических и морфологических данных. Наиболее выраженная активность зон роста по молекулярным маркерам обнаруживается у женщин с лейомиомой матки больших размеров (ЛММБ), старше 45 лет, что требует онкологической настороженности.

Ключевые слова: миома матки больших размеров, PD-ECGF, TGF- β , Ki67, CD117.

LARGE UTERINE LEIOMYOMAS: PATHOGENETIC MECHANISMS OF GROWTH

Kogan E.A., Askolskaya S.I., Popov Yu.V., Solomakhina M.A., Fayzullina N.M.

The pathogenesis of uterine fibroids remains controversial and raises many questions. The causes and mechanism of development of large leiomyoma are unknown. In the work the pathogenic mechanisms of large leiomyomas growth were estimated for different age groups. The research was based on studying of the expression of TGF- β , CD117, PD-ECGF, Ki67, *connexin* and *nestin* in postoperative material by comparing the clinical and morphological data. The most pronounced activity of growth areas, identified by molecular markers, was found in women over 45 years with LMMB-size, which requires the vigilance of cancer.

Key words: large uterine fibroids, PD-ECGF, TGF- β , Ki67, CD117.

Особенности клинического течения миомы матки больших размеров определяются многими факторами: размерами и локализацией опухоли (субсерозные, интрамуральные, субмукозные и их сочетания), особенностями гемодинамических нарушений в малом тазу, вариантом ее гистологического строения (простая, клеточная, пролиферирующая, липолейомиома и т.д.), состоянием рецепторного аппарата миометрия и эндометрия, а также наличием сопутствующей гинекологической патологии [1-6]. В генезе миомы матки играют роль изменения иммунологической реактивности,

а также состояние гипоталамо-гипофизарной системы, функции яичников, надпочечников, щитовидной железы.

До настоящего времени существует традиционное мнение о ведущей роли эстрогенов в патогенезе миом. Уменьшение объемов миоматозных узлов и значительное снижение содержания рецепторов эстрогенов в миометрии и тканях миомы после длительного лечения агонистами гонадолиберина подтверждают это мнение [2, 4]. В последнее время появилось сообщение о влиянии прогестероновых рецепторов на рост и развитие миомы матки. Ryzard et al (2001

г.) в своих исследованиях показали, что экспрессия прогестероновых рецепторов в клетках лейомиомы значительно выше, чем в обычном миометрии и ниже, чем в эндометрии, а экспрессия прогестероновых рецепторов в клетках лейомиомы матки значительно превышает экспрессию эстрогеновых рецепторов [7]. Прогестероновые рецепторы на высоком уровне экспрессируются в небольших лейомиомах матки, в то время как уровень экспрессии прогестероновых рецепторов снижается в лейомиоме матки больших размеров до уровней наблюдаемых в группах без лейомиомы матки. Экспрессия эстрогеновых рецепторов не зависит от возраста женщины и размера лейомиомы матки [8].

Рост миомы матки происходит с накоплением коллагена [9-12], фибронектина [13] и гликозаминогликанов [14], которые служат резервуаром для биологически активных факторов роста и цитокинов [15].

Исходя из результатов иммуногистохимического исследования, в ряде работ сделано предположение, что факторы роста, продуцируемые миомой матки, через пара- и аутокринные механизмы могут способствовать росту миомы за счет гипертрофии и пролиферации миометрия, усилению неангиогенеза и неправильному формированию сосудов с низкорезистентным кровотоком, более выраженным в пролиферирующих миомах [16-18].

В настоящее время в развитии лейомиомы матки большое внимание уделяется факторам апоптоза, пролиферации и неангиогенеза, которые наиболее интенсивно происходят в так называемых зонах роста опухолей [16, 17]. Зонами роста ЛММ обозначаются скопления клеток гладкомышечного и перичитарного происхождения вокруг сосудов, формирующих муфтообразные структуры и располагающиеся на территории опухоли [16-18]. ЛММ является истинной опухолью, что подтверждено моноклональностью ее клеток. Рост ЛММ зависит от продукции местных факторов, таких как: TGF-beta 1 antibody — белка, являющегося одним из многочисленных факторов роста и играющего важную роль в ангиогенезе (содержится в α -гранулах в тромбоцитах и синтезируется в мегакариоцитах). В литературе обсуждается также вопрос о возможных источниках роста ЛММ и из взаимосвязи с прогениторными клетками и опухолевыми стволовыми клетками, экспрессирующими определенные маркеры и факторы роста, среди которых важное место зани-

мают АСА протеин, Connexin 43, CD117, Nestin, Ki-67, PD-ECGF [17].

Цель исследования

Целью исследования явилась оценка клинико-морфологических особенностей и патогенетических механизмов роста ЛММ больших размеров различных возрастных группах на основании изучения экспрессии TGFb, CD117, PD-ECGF, Ki67, connexin и nestin в зонах роста опухолей.

Материал и методы исследования

В исследование включены 54 пациентки, которым проводилось операционное лечение в отделении общей хирургии ФГБУ «Научный центр акушерства и гинекологии, перинатологии им. В.И. Кулакова» г. Москвы за период с 2012 по 2014 год. Всем пациентам проводили ультразвуковое исследование органов малого таза с определением размеров и расположения узлов миомы. Проведено оперативное лечение в зависимости от возраста и тяжести заболевания (экстирпация матки с и без придатков, миомэктомия, выполненные различными доступами) с последующей морфологической верификацией диагноза. Средний возраст больных при исследовании колебался от 15 до 57 лет и составил $41,86 \pm 8,1$ г.

Все пациентки были разделены на две группы; основная – с ЛММБ (лейомиома матки больших размеров), больше 6 см в диаметре и группа сравнения с ЛМММ (лейомиома матки малых размеров), менее 4 см в диаметре. Каждая группа была разделена на две подгруппы по возрасту: женщины моложе 45 лет и женщины старше 45 лет (I а,б, II а,б).

Морфологическое исследование включало изучение макропрепарата, а также гистологическое и иммуногистохимическое исследования по общепринятым методикам. Материал фиксировался в 10% забуференном формалине, заливался в парафин. Серийные парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивались гематоксилином и эозином, а также использовались для иммуногистохимических реакций.

Имуногистохимически определяли экспрессию Ki67 (MIB-1 моноклональные мышинные антитела RTU, в разведении 1:100 Dako), PD-ECGF (мышинные моноклональные антитела, клон P-GF.44C Termo Fisher Scientific Inc. в разведении 1:100, Abcam), TGFb (мышинные моноклональные антитела, клон TB21 в разведении 1:100, Abcam), Connexin 43 (кроличьи поликлональные антитела, Abcam), Nestin (мышинные моноклональные антитела,

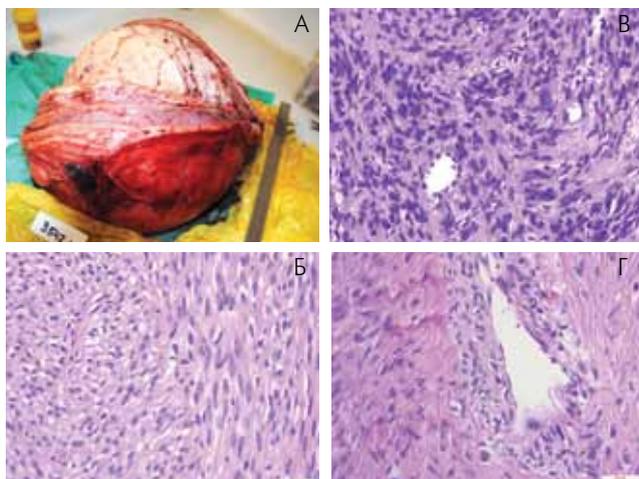


Рис. 1. Макропрепарат гигантской лейомиомы (а), варианты: простая (б), клеточная (в) с зонами роста (г). Окраска гематоксилином и эозином. X400.

clone Rat-401, Abcam), CD117 (кроличьи моноклональные, клон YR145, Cell Marque). Демаскировка антигенов проводилась в ретривере с цитратным буфером pH=6,0 при температуре – 120С° в течение 20 минут. Результаты реакций были оценены полуколичественным методом в баллах по общепринятой методике для всех антител [17] за исключением Ki-67. Оценка экспрессии Ki-67 проводилась с подсчетом индекса пролиферации (ИП) процента позитивных клеток на 3000 клеток одного типа. Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью электронных таблиц Microsoft Excel и прикладных программ «Статистика» для Windows v.7.0. Для сравнения числовых данных использовали метод t-критерий Стьюдента. Попарное сравнение осуществляли с помощью критерия Манна-Уитни.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Клинические особенности ЛММ больших размеров проявлялись в жалобах пациенток. Наиболее частой жалобой пациенток являлась жалоба на нарушение менструальной функции – маточные кровотечения в виде мено- и метроррагий, которые составляли 89% (48 случаев), приведшие к анемизации у 12% женщин (7 случаев) и нарушению трудоспособности – у 8% (5 случаев). Заболевание сопровождалось болевым синдромом у 57% пациенток (30 случаев). Как правило, боли локализовались в нижних отделах живота, пояснице. Нарушения функции смежных органов (мочевого пузыря,

прямой кишки) имелось у 6% больных и чаще наблюдались при межсвязочном, подбрюшинном, шеечном расположении узлов.

Морфологическое исследование. В исследуемом материале ЛММ локализовалась следующим образом: субсерозные – 67% (36 случаев); интрамуральные – 20% (11 случаев); субмукозные – 11% (6 случаев) и их различное сочетание в 2% (1 случай).

В нашем материале преобладали пациентки с гистологическим вариантом простой ЛММ, что составило 81% (44 случая) от общего числа исследованных пациенток, из них в основной группе – 49% (26 случаев), в группе сравнения – 51% (28 случаев) (рис. 1, 2).

Простая ЛММ макроскопически имела вид узла с четкими контурами, плотной консистенции, серого цвета, волокнистого строения. Нередко (в 40% случаев) отмечалось мелкодольчатое строение внутри крупных ЛММ. При микроскопическом исследовании простая ЛММ больших размеров построена из переплетающихся пучков крупных гладкомышечных клеток, фигуры митозов не определялись. В периферических отделах опухолевых узлов отмечались единичные «зоны роста» ЛММ (рис.1б) вокруг сосудов в виде муфт из лейомиоцитов (рис.1г). Строма представлена соединительнотканью прослойками и сосудами капиллярного и синусоидного типа. На границе с сохранной тканью располагалась псевдокапсула из лейомиоцитов и фибробластических элементов. В некоторых ЛММ отмечались очаги некрозов и кровоизлияний. Достоверных различий в размере очагов некрозов и кровоизлияний по группам не выявлено. Фигуры митозов отсутствовали, а ИП по Ki67 составлял 0,1%. Однако, отмечалась тенденция к увеличению объема некроза и кровоизлияния у женщин молодого возраста, как с малыми, так и с большими ЛММ, по сравнению с женщинами старшего возраста.

Клеточная ЛММ встретилась у 13,5% женщин (7 случаев) из общего числа пациенток, из них в основной группе – в 8,1% (5 случаев), группе сравнения – в 5,4% (3 случая). Макроскопически клеточная ЛММ больших размеров имела вид узла с четкими контурами, плотноэластической и иногда мягковатой консистенции, серого цвета, и была окружена слабовыраженной псевдокапсулой. При микроскопии, в отличие от простой ЛММ больших размеров, клеточная ЛММ имела более выраженный

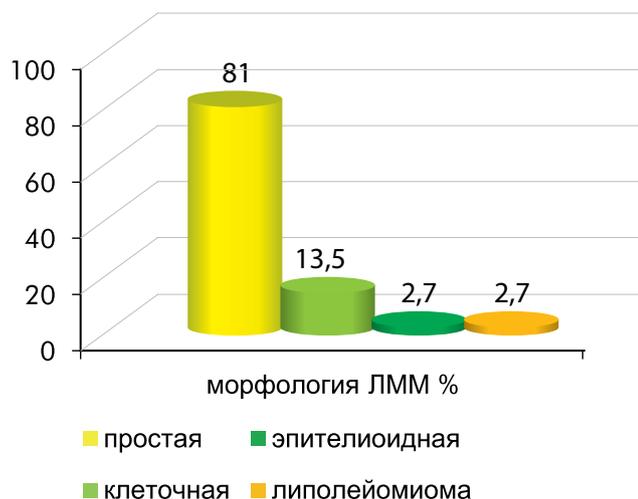


Рис. 2. Гистологические типы ЛММ больших размеров.

паренхиматозный компонент, в то время как стромальный был выражен значительно меньше (рис.1в). Пучки опухолевых гладкомышечных клеток имели нечеткие контуры, однако ядра их были одинакового размера, митозы отсутствовали, а ИП по Ki67 составлял 4 %. Визуализировались многочисленные «зоны роста» вокруг сосудов, где в основном и были сосредоточены пролиферирующие Ki67 позитивные клетки. В клеточной ЛММ больших размеров намного чаще (82% наблюдений) отмечались очаги некрозов и кровоизлияний, по сравнению с ЛММ группы сравнения, а также с простой ЛММ.

Эпителиоидная ЛММ больших размеров, в нашем материале была у 1 женщины основной группы, подгруппы б. Гистологическое строение опухоли отличается от других типов ЛММ: большое количество сосудов, вокруг которых происходит формирование опухоли из гладкомышечных клеток или, возможно, из перицитов. Митозы единичные, ИП по Ki67 составил 6%.

Липолейомиома – опухоль достаточно редкая, в нашем материале встретилась у 1 женщины основной группы, подгруппы а. Макроскопически липолейомиома представлена узлом с четкими контурами, от окружающих тканей отделена псевдокапсулой. На разрезе узел серого цвета с желтоватым оттенком. Консистенция мягко-эластическая, ткань не имела волокнистого строения, а была более однородного вида.

Резюмируя данные морфологического исследования, следует подчеркнуть, что среди ЛММ больших размеров преобладают простые ЛММ, также, как и в группе сравнения, однако относи-

тельная частота клеточных лейомиом была относительно выше в группе ЛММ больших размеров, где чаще встречались очаги некроза и кровоизлияний. В ЛММ больших размеров отмечается повышенная васкуляризация и гипертрофия мышечных волокон вокруг сосудов, а также большое количество зон роста по сравнению с ЛММ малых размеров из группы сравнения.

Иммуногистохимическое исследование

ИГХ исследование позволило установить молекулярно биологические особенности ЛММ больших размеров, связанные с характеристиками их зон роста.

1. Иммуногистохимическое исследование Ki67.

При ИГХ исследовании экспрессия Ki67, ЛММ с разными гистологическими типами, выявлялась ядерная окраска преимущественно вокруг сосудов (Табл.1).

Таблица 1

Экспрессия Ki67 (ИП)
в исследованных группах

Группа	ЛММ		Прилежащий миометрий
	Зона роста	лейомиоциты	
ЛММ (1а)	1,75%	1,38%	0,38%
ЛММ (1б)	2,22%	0,00%	0,00%
ЛММ (2а)	1,63%	0,63%	0,25%
ЛММ (2б)	1,50%	0,13%	0,00%

ИП у женщин с большими ЛММ старше 45 лет, составил в среднем 2,22 балла. У женщин с большими ЛММ, но моложе 45 лет ИП был немного ниже, и в среднем составил 1,75 баллов. При сравнении пациенток с малыми ЛММ старше 45 лет с основной группой, пациенток старше 45 лет, ИП вокруг сосудов и зон роста был достоверно выше в основной группе по сравнению с ЛММ группы сравнения.

2. Иммуногистохимическое исследование TGFβ.

При ИГХ исследовании экспрессия белка TGFβ преобладала в зонах роста у женщин старше 45 лет. Отмечалась тенденция к увеличению экспрессии данного белка в зонах роста ЛММ больших размеров, особенно с клеточным типом строения. Различия экспрессии TGFβ в зонах роста между группами были статистически не достоверны. (Табл. 2, 3, рис. 3, 4).

3. Иммуногистохимическое исследование CD 117.

При ИГХ исследовании экспрессия CD 117 (цитоплазматическое окрашивание) обнаруживалась, как правило, в зонах роста, и реже в самой ткани опухоли, особенно у женщин моложе 45 лет. В лейомиоцитах экспрессия белка была примерно равной во всех исследованных группах. (см. Табл. 2, 3, рис. 3, 4). Поскольку в ЛММ больших размеров зон роста было достоверно больше, чем в группе сравнения, то и в целом CD 117 позитивных клеток в них было больше.

4. Иммуногистохимическое исследование PD-ECGF.

При ИГХ исследовании экспрессия PD-ECGF выявлялась в цитоплазме опухолевых клеток. Экспрессия маркера была выше при ЛММ больших размеров по сравнению с группой сравнения ($p < 0,05$). (см. Табл. 2, 3, рис. 3, 4).

5. Иммуногистохимическое исследование Nestin и Connexin.

В основной группе у женщин с ЛММ больших размеров старше 45 лет экспрессия этих белков была максимальная, составила в среднем 6 баллов. В лейомиоцитах – 2 и 4 балла соответственно, а в прилежащем миометрии была практически нулевая. В целом обнаружено достоверно более высокое содержание *Nestin* и *Connexin* в клетках ЛММ больших размеров по сравнению с ЛММ малых размеров ($p < 0,05$).

Нестин и коннексин показывают высокую экспрессию в зонах роста у женщин основной группы старше 45 лет, в опухолях, происходит повышение экспрессии и накопления белка нестина ($p < 0,05$).

Таблица 2

Экспрессия биомаркеров
в лейомиоцитах лейомиом матки

Маркер/группа	ЛММ больших размеров		ЛММ малых размеров	
	1а	1б	2а	2б
TGFβ	0,90	0,78	0,9	0,78
CD117	0,15	0,17	0,11	0,33
PD-ECGF	1,33	2,75	0,25	1,33
Nestin	0,67	2	0,67	0
Connexin	0,67	2	0,67	0

Таблица 3

Экспрессия биомаркеров
в зонах роста лейомиом матки

Маркер/группа	зоны роста		ЛММ малых размеров	
	1а	1б	2а	2б
TGFβ	1,16	1,44	0,9	0,78
CD117	0,33	0,31	0,11	0,33
PD-ECGF	2	4,33	0,25	1,33
Nestin	2	6	0,67	0
Connexin	2	6	0,67	0

Обсуждение

ЛММ матки больших размеров имеют клинические, морфологические и иммуногистохимические особенности, связанные с повышением пролиферативной активности клеток в зоне роста. Резюмируя данные морфологического исследования следует подчеркнуть, что частота клеточных лейомиом была относительно выше в группе ЛММ больших размеров, где чаще встречались очаги некроза и кровоизлияний. В ЛММ больших размеров отмечается повышенная васкуляризация и гипертрофия мышечных волокон вокруг сосудов, а также большое количество зон роста по сравнению с ЛММ малых размеров из группы сравнения.

Патогенетические механизмы роста ЛММ больших размеров связанные с активацией и увеличением количества зон роста. В зонах роста сосредоточены пролиферирующие клетки, имеющие признаки стволовости и способные продуцировать разнообразные ростовые факторы.

При ИГХ исследовании в нашей работе было установлено повышение экспрессии Ki-67, PD-ECGF, TGFβ, CD117, Nestin и Connexin. В зонах роста у женщин с ЛММ больших размеров по сравнению с ЛММ малых размеров, особенно у женщин старше 45 лет, данные факторы были выше. Данные маркеры демонстрируют влияние на рост ЛММБ и участвуют в патогенезе их развития. Рост ЛММБ у женщин старшего возраста происходит за счет усиления пролиферации клеток в зоне роста, которая осуществляется за счет влияния факторов роста.

В зонах роста ЛММБ у женщин старшего возраста отмечается одновременное повышение экспрессии нестина и коннексина, связанное, по-видимому, с усилением клеточного взаимодействия и изменением цитоскелета гладкомы-

печных клеток, что, возможно, характерно для нарушения стромально-мезенхимального взаимодействия. Повреждение зон роста и нарушение стромально-мезенхимального взаимодействия приводит к усилению экспрессии белков межклеточной адгезии (коннексин) и повреждению цитоскелета гладкомышечных клеток, что проявляется в усилении экспрессии нестина. Рост ЛММ больших размеров зависит от активации пролиферативной активности и приобретения признаков частичной стволовости клеток в зонах роста. Можно предположить, что длительное повреждающее действие факторов агрессии в зонах роста, которые фактиче-

ски являются нишами стволовых клеток и описаны не только в ЛММ, но и в ткани миометрия, может приводить к развитию опухоли и ее прогрессирующему росту.

Заключение

Патогенетические механизмы роста ЛММ больших размеров связаны с активацией гладкомышечных и перичитарных клеток зон роста и увеличением их количества в опухоли. В зонах роста сосредотачиваются пролиферирующие клетки, имеющие признаки стволовости и способные продуцировать разнообразные ростовые факторы.

Литература:

1. Sozen I., Arici A. Cellular Biology of Myomas: Interaction of Sex Steroids with Cytokines and Growth Factors. In: Myomas. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America 2006 ; 33 (1): 41-58.

2. Wilsin E.A., Yang F., Rees E.D. Estradiol and progesterone binding in uterine leiomyomata and in normal uterine tissues. *Obstet Gynecol.* 1980, Vol. 55, P 347–53.

3. В.Е. Радзинский, Г.Ф. Тотчиев. Миома матки: курс на органосохранение. Информационный бюллетень / М.: Редакция журнала StatusPraesens, 2014. 24 с.

4. Сидорова И. С., Шешукова Н. А., Закаблуква С. В. Патология эндометрия при наличии миомы матки. *Гинекология.* 2000; 8(4): 6 - 10.

5. Шиляев А.Ю. Лейомиома матки (в помощь начинающему врачу). *Гинекология,* 2005, т.7. N 1. С. 65-70.

6. Леваков С.А. Варианты развития миомы матки (простая и пролиферирующая). Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 2001.

7. Zaslowski R1, Surowiak P, Dziegiel P, Pretnik L, Zabel M. Analysis of the expression of estrogen and progesterone receptors, and of PCNA and Ki67 proliferation antigens, in uterine myomata cells in relation to the phase of the menstrual cycle. *Med Sci Monit,* 2001; 7(5): p 908-13.

8. Danuta Plewka, Jacek Marczyński, Michał Morek, Edyta Bogunia, Andrzej Plewka: Receptors of Hypothalamic-Pituitary-Ovarian-Axis Hormone in Uterine Myomas. *BioMed Research International Volume 2014 (2014), Article ID 521313, 13 p.*

9. Пальцев М.А., Иванов А.А. Межклеточные взаимодействия. М., 1995.

10. Биохимические основы патологических процессов. Под ред. Е.С. Северина. М., 2000.

11. Kawaguchi K., Fujii J., Konishi I., Okamura H., Mori T. Ultrastructural study of cultured smooth muscle cells from uterine leiomyoma and myometrium under the influence of sex steroids. *Gynecol Oncol.* 1985; 21: 32–41.

12. Stewart E.A., Friedman A.J., Peck K., Nowak R.A. Relative overexpression of collagen type 1 and collagen type 3 messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79: 900–906.

13. Arici A., Sozen I. Transforming growth factor- β 3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertil Steril.* 2000; 73: 1006–11.

14. Wolanska M., Sobolewski K., Drozdewicz M., Bankowski E. Extracellular matrix components in uterine leiomyoma and their alteration during the tumour growth. *Mol Cell Endocrinol.* 1998; 189: 145–52.

15. Hulboy D.L., Rudolph L.A., Matrisian L.M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod.* 1997; 3: 27–45

16. Коган Е.А., Игнатова В.Е., Унанян А.Л., Сидорова И.С. Соотношение процессов пролиферации и апоптоза в различных гистологических типах лейомиомы матки. *Арх патол* 2005; 67:4: 32-36.

17. Сидорова И.С., Унанян А.Л., Коган Е.А., Гуриев Т.Д., Миома матки у больных молодого возраста: клинико-патогенетические особенности. *Аку-*

- шерство, гинекология и репродукция. 2010; №1: с.16-20.
18. Сидорова И.С., Коган Е.А., Унанян А.Л. Клинико-морфологические параллели и молекулярные механизмы стромально-паренхиматозных взаимоотношений при миоме матки. Мол Мед. 2009;1:9-15.

Информация об авторах:

Коган Евгения Александровна – д.м.н., профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии ГБОУ Первый медицинский университет им. И.М.Сеченова.
Тел.: 8-926-533-12-71. E-mail: koganevg@gmail.com

Аскольская Светлана Ивановна – д.м.н., руководитель центра акушерства и гинекологии
ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.
Тел.: 8-925-006-06-11. E-mail: askolskayas@mail.ru

Попов Юрий Вячеславович – врач отделения гинекологии ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.
Тел.: 8-910-441-64-00. E-mail: yury.popoff@gmail.com

Соломахина Марина Александровна – к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии
им А.И. Струкова Первого МГМУ им И.М. Сеченова.
Тел.: 8-926-492-70-66. E-mail: masolomahina@yandex.ru

Файзулина Нафиса Мануваровна – к.х.м., ст.н.с. ФГБУ Научный центр акушерства,
гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова Минздрав России.