

**МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МИОМАТОЗНОЙ ТКАНИ
У ПАЦИЕНТОК С ЛЕЙМИОМОЙ МАТКИ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ
УЛИПРИСТАЛА АЦЕТАТОМ**

Игизова Л.В., Литвак Е.О.

*Национальный медицинский университет им. А.А.Богомольца, Киев,
Украина ГНУ*

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

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

Резюме. Проведена морфологическая оценка состояния миоматозной ткани у пациенток с лейомиомой матки после лечения селективным модулятором прогестероновых рецепторов – улипристала ацетатом. Отмечалось достоверное снижение экспрессии рецепторов прогестерона, маркеров ингибитора апоптоза *bcl-2* и пролиферативной активности *Ki-67*.

Resume. It was study morphological evaluation of myoma tissue in patients with uterine leiomyoma after treatment with ulipristal acetate. There was a significant decrease of progesterone receptor expression, markers of apoptosis inhibitor *bcl-2* and proliferative activity *Ki-67*.

Актуальность. Миома матки - одна из наиболее распространенных доброкачественных опухолей женских половых органов, которая в 20–45 % случаев является причиной бесплодия, в 50–70 % – хирургических вмешательств, в том числе удаления органа, что приводит к ухудшению качества жизни женщины. 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].

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 [3].

УА 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 [4].

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 [7]. На клиническом материале морфологические изменения в ЛМ после воздействия УА описаны Тихомировым А.Л. и соавт. [2].

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

Материал и методы. Проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование ЛМ, удаленных путем миомэктомий 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).

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 НМ – 340E (Microm, Hamburg, Germany). Окрашивали гистологические препараты гематоксилином-эозином. Использовали микроскоп Axioskop 40 с фотокамерой AxioCam MRc5 (CarlZeiss).

В серийных парафиновых срезах толщиной 4-5 мкм проведено иммуногистохимическое исследование рецепторов эстрогена (DAKO, ER1), 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 докрашивали 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.

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 .

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 исследования и их обсуждение.

В группе ЛМ пациенток без предоперационного гормонального лечения рецепторы прогестерона экспрессировали $76,4 \pm 6,8\%$ ядер, КЭ составил $1,78 \pm 0,24$ (Рис. 1). Рецепторы эстрогена определялись в $32,8 \pm 2,6\%$ ядер, КЭ – $1,46 \pm 0,38$.

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 – $36,8 \pm 1,28\%$, КЭ – $1,32 \pm 0,2$ ($p < 0,05$) (Рис.2) и недостоверное снижение уровня экспрессии эстрогенов $30,7 \pm 3,4\%$, КЭ – $1,18 \pm 0,16$ ($p > 0,05$). Такая тенденция описана ранее в случаях применения препарата, обладающего антипрогестивным действием – мифепристона; в иммуногистохимических исследованиях выявлено значительное уменьшение количества рецепторов прогестерона, в то время как уровень рецепторов эстрогенов не изменялся, что позволило предположить возможность регрессии миоматозного узла в результате прямого антипрогестеронового действия [5]. В то же время Тихомирова и соавт., 2014 отмечают повышение экспрессии рецепторов прогестерона ядрами гладкомышечных клеток при сохранении уровня рецепторов эстрогенов в группе пациенток, принимавших УА [2]. 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, что приводит к увеличению жизненного цикла опухолевых клеток, а также повышает их пролиферативную активность [6].

Маркер ингибитора апоптоза bcl-2 в контрольной группе был обнаружен в $65,4 \pm 7,2\%$ клеток, КЭ составил $1,62 \pm 0,36$. У пациенток после приема УА отмечалось достоверное снижение ингибитора апоптоза bcl-2 – $42,6 \pm 3,2\%$, КЭ – $1,24 \pm 0,28$ ($p < 0,05$), что не совпадает с данными Тихомирова А.Л. и соавт. 2014, которые

отмечают лишь незначительное и статистически недостоверное снижение экспрессии ингибитора апоптоза bcl-2 в группе пациенток, принимавших УА [2].

Маркер пролиферации Ki-67 у пациенток без гормонального лечения определялся в 11,8% ядер гладкомышечных клеток (Рис. 3) , а у женщин, принимавших УА в 7,2 % клеток лейомиомы (Рис. 4), что совпадает с данными Тихомирова А.Л. и соавт., 2014 [2], которые выявили статистически значимое снижение пролиферативной активности гладкомышечных клеток в группе пациенток после приема УА.

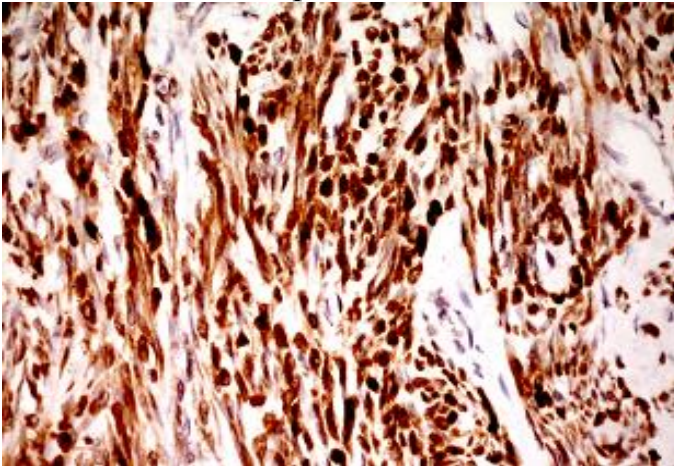


Рис. 1 – Гладкомышечных клеток лейомиомы прогестероновых рецепторов. Контрольная группа. Иммуногистохимическое исследование. x200

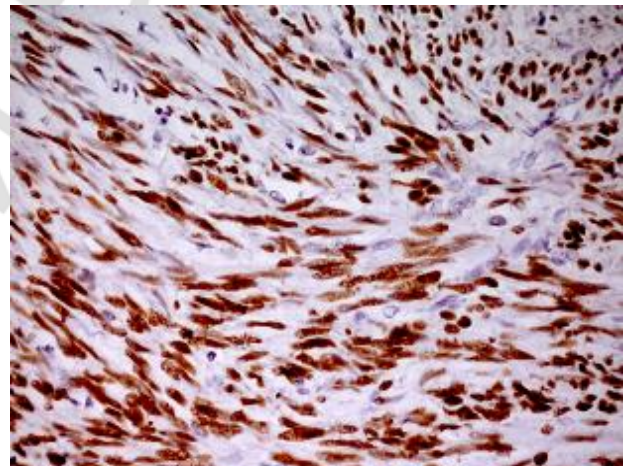


Рис. 2 – Экспрессия ядрами гладкомышечных клеток лейомиомы прогестероновых рецепторов. Группа пациенток, принимавших УА. Иммуногистохимическое исследование. x200.

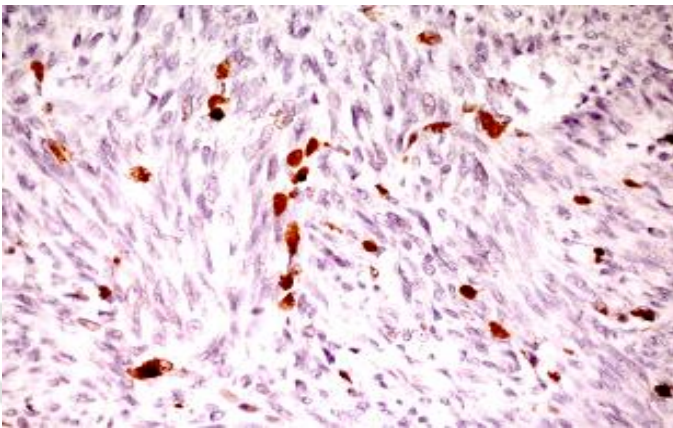


Рис. 3 – Экспрессия ядрами гладкомышечных клеток лейомиомы белка Ki-67. Контрольная группа. Иммуногистохимическое исследование. x400.

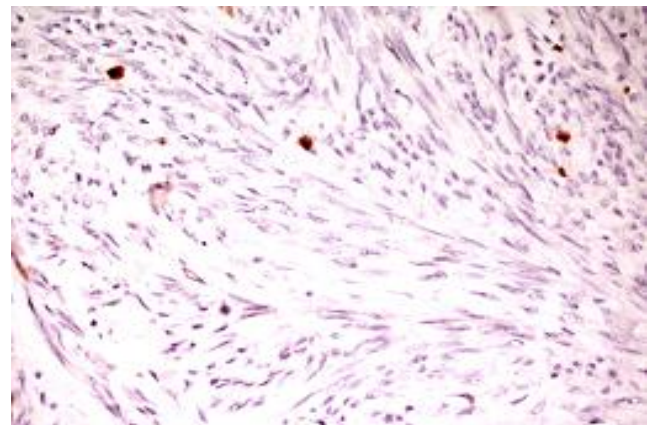


Рис. 4 – Экспрессия ядрами гладкомышечных клеток лейомиомы белка Ki-67. Группа пациенток, принимавших УА. Иммуногистохимическое исследование. x400.

Выводы.

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

Литература

1. Радзинский В.Е. Миома матки: курс на органосохранение. Информационный бюллетень / В.Е. Радзинский, Г.Ф.Топчиев // М.: Редакция журнала StatusPraesens, 2014. — 24 с.
2. Тихомиров А.Л. Клинико-морфологическая характеристика миомы матки после применения селективного модулятора рецепторов прогестерона улипристала / А.Л.Тихомиров, В.О. Зайратьянц // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. - 2014. – Т.13, № 1. – С. 67-72 .
3. Biglia N. Ulipristal acetate: a novel pharmacological approach for the treatment of uterine fibroids /N. Biglia, S. Carinelli, A. Maiorana [et al]// Drug Des. Devel. Ther. - 2014. - Vol. 20, N 8. - P. 285-92. doi: 10.2147/DDDT.S54565.
4. Donnez J. PEARL II and PEARL III Extension Study Group Long-term treatment of uterine fibroids with ulipristal acetate/J.Donnez, F. Vázquez, J. Tomaszewski [et al] // Fertil. Steril. - 2014. – Vol. 101, N 6. – P. 1565–1573. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.02.008.
5. Melis G. B. Pharmacokinetic evaluation of ulipristal acetate for uterine leiomyoma treatment / G.B. Melis, B. Piras, M.F. Marotto[et al] // Expert Opin. Drug Metab Toxicol. – 2012. – Vol. 8. – P. 901–8.
6. Murdoch M. Selective progesterone receptor modulators and their use within gynaecology / M. Murdoch, M. Roberts //Obstet.Gynaecol. - 2014.- Vol 16, N1. – P. 46-50. DOI: 10.1111/tog.12072
7. Yoshida S, Ohara N, Xu Q, Chen W, Wang J, Nakabayashi K, et al. Cell-type specific actions of progesterone receptor modulators in the regulation of uterine leiomyoma growth / S. Yoshida, N. Ohara, Q. Xu // Semin. Reprod. Med. – 2010/ - Vol. 28. – P. 260–273. DOI: 10.1055/s-0030-1251483.