

## ЕКСПРЕСІЯ BCL-2 ТА BAX У ГЛАДКОМ'ЯЗОВИХ ПУХЛИНАХ ТІЛА МАТКИ

Дніпропетровська державна медична академія  
кафедра патологічної анатомії та судової медицини  
(зав. – д. мед. н., проф. І.С. Шпонька)

**Ключові слова:** гладком'язові  
пухлини матки, маркери апоптозу,  
диференційна діагностика

**Key words:** smooth muscle uterine  
tumors, markers of apoptosis,  
differential diagnostics

**Резюме.** *Некоторые типы лейомиом тела матки сложно отличить от лейомиосарком, если использовать только рутинные морфологические методы диагностики. Мы исследовали операционный материал 10 пациенток с лейомиомами и 6 пациенток с лейомиосаркомами тела матки и определяли в нем уровень экспрессии bcl-2 и bax в дополнение к стандартной окраске гематоксилин-эозином микропрепаратов опухолевой ткани. Мы определили в большинстве, 8 из 10 лейомиом (80%), позитивную реакцию с bcl-2, в 2 из 10 (20%) была получена негативная реакция, причем в обоих новообразованиях были выражены явления миксоматоза. В 4 из 6 (67%) лейомиосарком мы обнаружили негативную экспрессию bcl-2, в 2 из 6 (33%) реакция была позитивной, последние имели строение высококодифференцированных образований. Также была выявлена позитивная экспрессия bax в 7 из 10 (70%) лейомиом и негативная в 3 из 10 (30%) доброкачественных гладкомышечных опухолей. Количество негативных в отношении экспрессии bax лейомиосарком равняется 5 из 6 (83%), в 1 из 6 (17%) случаев реакция была позитивной. Таким образом, определение экспрессии bax может быть полезным в алгоритме дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных гладкомышечных новообразований тела матки. Данное исследование не выявило статистически достоверной разницы уровней экспрессии bcl-2 в лейомиомах и лейомиосаркомах тела матки.*

**Summary.** *It is hard to distinguish some types of uterine leiomyomas from leiomyosarcomas using only routine morphological diagnostical methods. We investigated operating material from 10 patients with uterine leiomyomas and 6 patients with uterine leiomyosarcomas and determined the level of bcl-2 and bax expression, in addition to standard hematoxylin-eosin-stained sections. CONCLUSIONS: We defined in most, 8 from 10 (80%) leiomyoma cases, the positive reaction with bcl-2, in 2 of 10 (20%) cases we got negative reaction, with myxomatosis signs in both. In 4 of 6 (67%) leiomyosarcomas we saw negative expression of bcl-2, in 2 of 6 (33%) leiomyosarcoma cases reaction with bcl-2 was positive, the latter had highly differential neoplasms structure. Also we find bax positive expression in 7 of 10 (70%) leiomyomas and bax negative expression in 3 of 10 (30%) benign smooth muscle uterine tumors. The number of bax negative leiomyosarcomas was equal to 5 of 6 (83%), in 1 of 6 (17%) leiomyosarcoma cases reaction with bax was positive. Thus, determination of bax can profit in differential diagnostics algorithm for benign and malignant uterine smooth muscle tumors. The present study did not find statistically significant difference of bcl-2 levels in uterine leiomyomas and leiomyosarcomas.*

Порушення механізмів генетично запрограмованої загибелі клітин – апоптозу є однією з якостей, притаманних злоякісним пухлинам. Один із головних чинників генетичної стабільності, ген-онкосупресор p53, може з різних причин знаходитися в мутантному стані чи бути заблокованим деякими цитоплазматичними протеїнами. Серед блокувальних дії дикого типу (wt) p53 ведучу роль відіграє ендогенний білок bcl-2,

який стабілізує мембрану мітохондрій, запобігаючи виходу ряду активаторів апоптозу. У тих випадках, коли клітина отримує сигнал до генетичної програми клітинної загибелі, активується протеїн bax, який переходить з цитоплазми в мітохондрії та збільшує проникність їхньої мембрани, що призводить до виходу цитохрому та апоптозіндукуючого фактору (AIF), які, діючи через каскад каспаз чи безпосередньо прони-

каючи у ядро, запускають процеси апоптозу (Петров С.В., Райхлин Н.Т., 2004).

В алгоритмі з'ясування злоякісного потенціалу пухлини, прогнозу її перебігу та резистентності до терапії найбільш широко використовуються визначення експресії мутантного типу (mt) p53. Але відсутність експресії mt p53 не виключає порушення програми апоптозу через блокаду wt p53 ендogenous протейнами, зокрема bcl-2. Попередні дослідження різних типів злоякісних пухлин виявили залежність між гіперекспресією bcl-2 або зниженням експресії bax та зростанням пухлинної прогресії, прискоренням росту, посиленням метастазування та рецидивування. Дані літератури стосовно експресії bcl-2 та bax у гладком'язових пухлинах тіла матки дуже неоднозначні, деякі дослідники пишуть про підвищену експресію bax (Leiser AL, Anderson SE et al., 2006) та bcl-2 (Bodner K., Bodner-Adler B. Et al., 2004) у лейоміомах у порівнянні з лейоміосаркомами. З іншого боку, є інформація про більш високі показники експресії bcl-2 та bax у лейоміосаркомах. ( Hong T., Shimada Y. et al., 2001).

Метою нашого дослідження було визначення експресії внутрішньоклітинних регуляторних протейнів bcl-2 та bax у лейоміомах та лейоміосаркомах та з'ясування можливостей застосування цих маркерів у диференційно-діагностичному алгоритмі для доброякісних та злоякісних гладком'язових пухлин тіла матки.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Ретроспективно був досліджений операційний матеріал 10 пацієнток з лейоміомами та 6 пацієнток з лейоміосаркомами тіла матки, яким була проведена пангістеректомія.

Для проведення морфологічного дослідження операційний матеріал хворих фіксувався в 10% розчині формаліну. Після фіксації і проводки матеріал піддавався ретельному мікроскопічному рутинному дослідженню (забарвлення гематоксилином-еозином). Зрізи товщиною 4-5мкм наносилися на адгезивне предметне скло, слідом за чим депарафінізувалися відповідно до прийнятих стандартів. Для демаскування антигенів (НИАР) використовувалася обробка в автоклаві (8 хвилин при температурі 121°C) в цитратному буфері з рН=6,0.

Як первинні антитіла використовувалися моноклональні антитіла bcl-2 (клон 100/D5, LabVision), bax (клон 2D2, LabVision). Були виконані також контрольні дослідження з метою виключення помилково-позитивних чи помилково-негативних реакцій.

Подальшу обробку проводили з використанням універсальної системи візуалізації фірми LabVision ( UltraVision LP ) протягом 10 хвилин ( з біотинільованими антитілами і стрептавідинпероксидазним комплексом ). Після цього проводили реакцію з хромогеном DAB (LabVision), оцінюючи якість взаємодії під контролем мікроскопа (Leica DMLS) протягом від 20 секунд до 3 хвилин. Для адекватної диференціації структури тканини зрізи додатково забарвлювали гематоксилином Майєра.

З метою контролю специфічності імуногістохімічних реакцій було проведено серію досліджень з використанням гістологічних зрізів тканини матки із захворюваннями, не пов'язаними з гладком'язовими пухлинами. Диференційоване забарвлення тканини само по собі служило внутрішнім контролем (наприклад, негативна реакція стромы при позитивній реакції пухлинної тканини). Потім проводився ретельний порівняльний морфологічний аналіз зрізів, забарвлених рутинними барвниками і за допомогою імуногістохімічних методик.

Для максимального виключення суб'єктивного фактора дослідження проводили незалежно один від одного два досвідчених патологоанатоми, оцінюючи типи лейоміом, кількість мітозів та атипичних клітин у лейоміосаркомах, а також визначаючи наявність достатньої кількості матеріалу і його якість для проведення імуногістохімічного дослідження.

Клітини, позитивні у відношенні експресії bcl-2 та bax, підраховувалися у 4-6 полях зору. Ми оцінювали експресію регуляторних протейнів на високому збільшенні (  $\times 40$  об'єктив та  $\times 10$  окуляр). Як позитивну реакцію враховували цитоплазматичне та субмембранне коричневе забарвлення всіх клітин на підставі того, що антигенні детермінанти до вищевказаних маркерів розташовані у цитоплазмі та мітохондріях. Всі отримані реакції було розподілено на дві групи, в залежності від наявності імуногістохімічного забарвлення: «-» негативна, «+» позитивна.

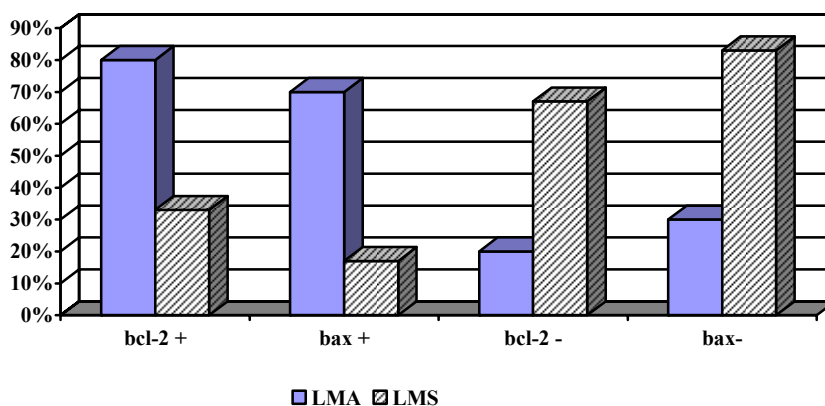
Статистичні методи: для оцінки різниці між підгрупами лейоміом та лейоміосарком був використаний непараметричний критерій  $\chi^2$  (хі-квадрат) Пірсона – тест на незалежність, що є опцією програми Exel. За нульову гіпотезу прийняли відсутність різниці в експресії маркеру в групах. Для оцінки достовірності результатів використали опцію Exel  $\chi^2$ -зворотній та оцінювали рівень значущості за таблицею « $\chi^2$  – розподіл» [Дюбина И.Н., 2006].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ми виявили наступні залежності між експресією регуляторних протеїнів bcl-2 та bax та статусом досліджуваних новоутворень: у більшості, 8 з 10 (80%) лейоміом, виявлено позитивну реакцію з bcl-2, у 2 з 10 (20%) лейоміом ми отримали негативну реакцію, причому в обох новоутвореннях були виражені явища міксоматозу. У 4 з 6 (67%) лейоміосарком спостерігалася негативна експресія bcl-2, у 2 з 6 (33%) лейоміосарком реакція з bcl-2 була позитивною,

останні мали будову високодиференційованих новоутворень ( $p > 0,05$ ). Експресія bax була позитивною у 7 з 10 (70%) лейоміом та негативною у 3 випадках з 10 (30%) доброякісних гладком'язових пухлин. Кількість негативних у відношенні до експресії bax лейоміосарком дорівнювала 5 з 6 (83%) в 1 з 6 (17%) випадків реакція була позитивною ( $p < 0,05$ ).

Розподіл позитивних та негативних реакцій з bcl-2 та bax серед лейоміом та лейоміосарком наданий на рисунку.



Експресія bcl-2 та bax у лейоміомах та лейоміосаркомах тіла матки

## ПІДСУМОК

Деякі типи лейоміом становлять труднощі для диференціального діагнозу з лейоміосаркомами при рутинному морфологічному дослідженні. Існує потреба у винаходженні нових діагностичних критеріїв, що дозволять точно верифікувати діагноз доброякісного чи злоякісного новоутворення тіла матки. Визначення експресії регуляторного протеїну bax може стати допоміжним у диференційному алгоритмі між вищевказаними гладком'язовими пухлинами. Відсутність імуногістохімічного забарвлення з bax у більшості лейоміосарком у порівнянні зі здебільшого позитивними реакціями у лейоміомах ( $p < 0,05$ ) може свідчити про інактивацію мітохондріального шляху апоптозу у злоякісних клітинах, як прояв однієї з головних якостей, притаманних малігнізуючим новоутворенням, –

автономного росту. Експресія bcl-2, за даними дослідження, не може використовуватися для диференційної діагностики між доброякісними та злоякісними гладком'язовими пухлинами тіла матки ( $p > 0,05$ ), але щоб зробити остаточні висновки щодо ролі цього протеїну, необхідним є проведення подальших досліджень.

## Перспективи

Отримані нами результати демонструють різницю фенотипів лейоміом та лейоміосарком тіла матки та є підставою для проведення повномасштабних клініко-морфологічних досліджень з метою використання рівня експресії регуляторних протеїнів, зокрема bax, як специфічного незалежного діагностичного маркера для гладком'язових пухлин тіла матки, гістологічні ознаки яких є сумнівними.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Запорожан В.М. Гінекологічна патологія: атлас / В.М. Запорожан, М.Р. Цегельський. – Одеса: Одес. мед. ун-т, 2002. – 307с.
2. Петров С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / С.В. Петров, Н.Т. Райхлин. – Казань: Титул, 2004. – 451с.
3. Cell proliferation, Estrogen Receptor, Progesteron Receptor and bcl-2 expression in GnRh Agonist Treated

Uterine Leiomyomas / Ken Vu, David L. Greenspan, T-C Wu. [et al.] // Human Pathology. – 1998. – Vol. 29, N 4. – P. 359-362.

4. Chuai S., Olshen A.B., Chi D.S., Soslow R.A. / Entrez PubMed – 2005 – Nov 9 – Режим доступу до журналу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

5. Estrogen and progesterone receptor expression in patients with uterine smooth muscle tumors / Bodner K.,

Bodner-Adler B., Kimberger O. [et al.] // Fertil Steril.- 2004.- Vol.81, N 4.- P. 1062-1066.

6. Hong T. Expression of angiogenic and apoptotic factors in leiomyosarcoma and leiomyoma. [ Електронний ресурс ] / T. Hong, Y. Shimada, S. Uchida, A. Itami [et al.] / Int. J. Mol. Med. – 2001 – Т. 8, N 2. – P. 141-8 - Режим доступу до журналу: [http:// www.ncbi. nlm. nih.gov/ pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

7. Leiser A.L. Apoptotic and cell cycle regulatory markers in uterine leiomyosarcoma [Електронний ресурс ] / A.L. Leiser, S.E. Anderson, P. Nonaka

8. Robert J. Kurman Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. Fifth Edition / J. Robert Kurman, M.D., W. Richard TeLinde // New York Inc.: Springer-Verlag. – 2002. – Vol. 1391. – P. 564-605; 1265-1267.

