

І.С. Шпонька, Г.С. Гончарова

Значення експресії p53 та p21 у лейоміомах і лейоміосаркомах тіла матки

Дніпропетровська державна медична академія

Ключові слова: лейоміома, лейоміосаркома, маркери апоптозу.

Окремі типи лейоміом складно відрізнити від лейоміосарком, якщо використовувати тільки рутинні морфологічні методи діагностики. Досліджено операційний матеріал 10 пацієнток з лейоміомами та 6 пацієнток з лейоміосаркомами тіла матки, визначено рівень експресії p53 і p21 у доповнення до стандартного гематоксилін-еозинового забарвлення препаратів. Визначено відсутність імуногістохімічного забарвлення з p53 у всіх (100%) лейоміом і позитивну (83%) або слабо позитивну (17%) реакцію з p53 у лейоміосаркомах. Виявлено також позитивну (80%) або слабо позитивну (20%) експресію p21 в лейоміомах, у порівнянні з переважно негативною (83%) або слабо позитивною (17%) реакцією з p21 у лейоміосаркомах. Отже, зазначені маркери можуть бути корисними у диференційно-діагностичному алгоритмі для доброякісних і злоякісних гладком'язових пухлин тіла матки.

Значение экспрессии p53 и p21 в лейомиомах и лейомиосаркомах тела матки

И.С. Шпонька, А.С. Гончарова

Некоторые типы лейомиом сложно отличить от лейомиосарком, если использовать только рутинные морфологические методы диагностики. Исследован операционный материал 10 пациенток с лейомиомами и 6 пациенток с лейомиосаркомами, определен уровень экспрессии p53 и p21 в дополнение к стандартному гематоксилин-эозинному окрашиванию микропрепаратов опухолевой ткани. Выявлено отсутствие иммуногистохимического окрашивания с p53 во всех (100% случаев) лейомиомах и позитивную (83%) или слабо позитивную (17%) реакцию с p53 в лейомиосаркомах. Также выявлена позитивная (80%) или слабо позитивная (20%) экспрессия p21 у лейомиомах, по сравнению с преимущественно негативной (83%) или слабо позитивной (17%) реакцией с p21 в лейомиосаркомах. Таким образом, указанные маркеры могут быть полезными в алгоритме дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных гладкомышечных новообразований тела матки.

Ключевые слова: лейомиома, лейомиосаркома, маркеры апоптоза.**Патология.** – 2011. – Т.8., №1. – С. 49–51**Significance of p53 and p21 expression in leiomyoma and leiomyosarcoma of uterine body**

I.S. Shponka, A.S. Honcharova

Some types of uterine leiomyomas are hardly distinguished 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 p53 and p21 expression, in addition to standard hematoxylin-eosin-stained sections. We revealed the absence of immunohistochemical staining with p53 in all (100%) leiomyomas and positive (83%) or weakly positive (17%) reaction with p53 in leiomyosarcomas. We also found positive (80%) or weakly positive (20%) p21 expression in leiomyomas compared to mainly negative (83%) or weakly positive (17%) p21 reaction in leiomyosarcomas. Thus, previously mentioned markers can be useful in differential diagnostics algorithm for benign and malignant uterine smooth muscle tumors.

Key words: leiomyoma, leiomyosarcoma, markers of apoptosis.**Pathologia.** 2011; 8(1): 49–51

Адекватна регуляція проліферативних змін у нормальних тканинах є запорукою збереження кількісного гомеостазу популяції клітин. Значну роль відіграє елімінація мутантних клітин шляхом апоптозу. Центральна роль у розвитку генетичної програми клітинної смерті належить «дикому» типу гена-онкосупресора p53 і кодованому ним протеїну p53. Втрата контролю за клітинним циклом, що пов'язана з мутацією та інактивацією онкосупресорних властивостей «дикого» типу гену p53 є універсальним процесом, що виявляється у широкому діапазоні злоякісних новоутворень і є несприятливою прогностичною ознакою. Гіперекспресія протеїну p21, що належить до групи інгібіторів циклінзалежної кінази та пригнічує прогресію клітинного циклу, свідчить про високий онкосупресивний потенціал тканини.

Лейоміоми тіла матки є дуже розповсюдженими пухлинами жіночої репродуктивної системи. Завдяки застосуванню терапевтичних схем із застосуванням гонадотропін-рилізінг гормонів та емболізації артерій

матки, стала можливою консервативна тактика ведення хворих, які в попередньому потребували винятково хірургічного втручання. У цій ситуації надзвичайно потрібним є проведення диференційної діагностики між деякими типами лейоміом, зокрема мітотично активними, епітеліоїдними, атипівими та лейоміосаркомами.

Мета роботи

Визначення експресії регуляторних протеїнів p53 і p21 у лейоміомах і лейоміосаркомах тіла матки, а також з'ясування цінності цих маркерів для диференційної діагностики зазначених злоякісних і доброякісних пухлин.

Матеріали і методи дослідження

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

Для морфологічного дослідження операційний матеріал хворих фіксували в 10% розчині формаліну. Після фіксації і проводки матеріал піддавали ретельному мікроскопічному рутинному дослідженню (фарбування

гематоксиліном-еозином). Зрізи товщиною 4–5 мкм наносили на адгезивне предметне скло, потім депарафінізували згідно прийнятих стандартів. Для демаскування антигенів (H1AR) використовували обробку в автоклаві (8 хвилин за температури 121°C) в цитратному буфері з рН=6,0.

Як первинні антитіла використовували моноклональні антитіла р53 (клон SP5) та р21 (клон CP74) фірми LabVision. Виконано також контрольні дослідження для виключення помилково позитивних чи помилково негативних реакцій.

Подальшу обробку проводили з використанням універсальної системи візуалізації фірми LabVision (Ultra Vision LP) протягом 10 хвилин (з біотинільованими антитілами і стрептавідин-пероксидазним комплексом). Після цього проводили реакцію з хромогеном DAB (LabVision), оцінюючи якість взаємодії під контролем мікроскопу (Leica DMLS) протягом від 20 секунд до 3 хвилин.

Для адекватної диференціації структури тканини зрізи додатково фарбували гематоксиліном Майєра.

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

Для максимального виключення суб'єктивного фактора незалежно один від одного дослідження проводили 2 досвідчені патологоанатома, оцінюючи типи лейоміом, кількість мітозів та атипівих клітин у лейоміосаркомах, а також визначаючи наявність достатньої кількості матеріалу і його якість для проведення імуногістохімічного дослідження.

Клітини, позитивні у відношенні експресії р53 та р21, підраховували у 4–6 полях зору. Оцінювали експресію регуляторних протеїнів при великому збільшенні ($\times 40$ – об'єктив, $\times 10$ – окуляр). Як позитивну реакцію враховували інтрануклеарне коричневе забарвлення всіх клітин на підставі того, що антигенні детермінанти до зазначених маркерів розташовані у ядрах. Усі отримані реакції розподілено на 3 групи, залежно від ступеня інтенсивності імуногістохімічного забарвлення: «-» – негативна, «+» – слабо позитивна, «++» – позитивна.

Результати та їх обговорення

Отримали наступні закономірності між статусом досліджуваних пухлин і рівнем експресії регуляторних протеїнів: у всіх 10 (100%) лейоміомах експресія р53 була негативною («-»). У 8 з 10 (80%) лейоміом спостерігали позитивну («++») експресію р21 (рис. 1, кольор. вкладка 2), у 2 з 10 (20%) реакції з р21 слабо позитивні («+») (рис. 2, кольор. вкладка 2).

У 5 з 6 (83%) досліджуваних лейоміосарком визначено позитивну («++») експресію р53 (рис. 3, кольор. вкладка

2), в 1 з 6 (17%) рівень імуногістохімічного забарвлення з р53 був слабо позитивним (рис. 4, кольор. вкладка 2). Експресія р21 у 5 з 6 (83%) досліджуваних лейоміосарком була негативною («-») (рис. 5, кольор. вкладка 2), у 1 з 6 (17%) спостерігали слабо позитивну («+») реакцію з р21 (рис. 7, кольор. вкладка 2).

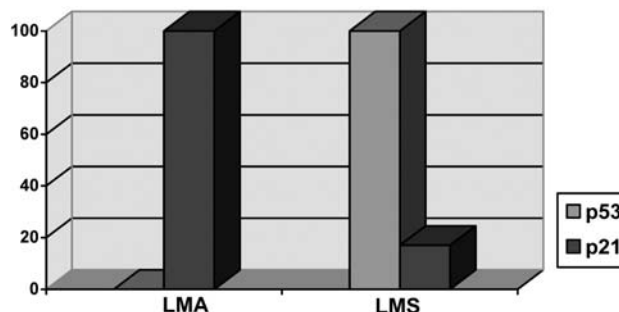


Рис. 7. Експресія р53 та р21 у лейоміомах та лейоміосаркомах тіла матки.

На рис. 7 представлено значення експресії регуляторних протеїнів р53 і р21 у доброякісних і злоякісних гладком'язових пухлинах матки. Кількісні значення представлено у процентному співвідношенні.

Висновки

Відсутність імуногістохімічного забарвлення з р53 в лейоміомах і позитивна або слабо позитивна реакція у лейоміосаркомах свідчить про порушення механізмів, що контролюють ріст і розмноження клітин у злоякісних гладком'язових пухлинах, а також про можливу резистентність до лікарських препаратів.

Позитивна або, рідше, слабо позитивна експресія р21 у лейоміомах, у порівнянні зі здебільшого негативною або слабо позитивною реакцією в лейоміосаркомах є відображенням інактивзації онкосупресивної функції інгібіторів циклінзалежних кіназ.

Використання специфічних і вірогідних діагностичних критеріїв для гладком'язових пухлин тіла матки відкриває можливість використання в деяких суперечливих випадках органозберігаючих методів лікування жінок.

Визначення експресії протеїнів-регуляторів клітинного циклу р53 і р21 у лейоміомах і лейоміосаркомах тіла матки може бути використано у диференційно-діагностичному алгоритмі зазначених новоутворень.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати демонструють різницю фенотипів лейоміом і лейоміосарком тіла матки та є підставою для проведення подальших клініко-морфологічних досліджень, з метою використання рівня експресії регуляторних протеїнів р53 і р21 як специфічного незалежного діагностичного маркера для гладком'язових пухлин тіла матки, гістологічні ознаки яких є сумнівними.

Література

- Петров С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / С.В. Петров, Н.Т. Райхлин – Казань: «Титул», 2004. – 451 с.

2. *Запорожан В.М.* Гінекологічна патологія: Атлас. / В.М. Запорожан, М.Р. Цегельський. – Одеса, 2002. – 307 с.
3. Кондрик Н.И. Патология матки: Иллюстрированное руководство / Кондрик Н.И. – М.: Практическая медицина, 2008. – 334 с.
4. *Leiser A.L.* Apoptotic and cell cycle regulatory markers in uterine leiomyosarcoma [Електронний ресурс] / Leiser A.L., Anderson S.E., Nonaka P., Chuai S., Olshen A.B., Chi D.S., Soslow R.A. // Entrez PubMed. – 2005. – Nov. 9. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
5. *Hong T.* Expression of angiogenic and apoptotic factors in leiomyosarcoma and leiomyoma [Електронний ресурс] / Hong T., Shimada Y., Uchida S., Itami A., Li Z., Ding Y. // Int J Mol Med. – 2001. – №8 (2). – P. 141–148. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
6. *Giordano G.* Value of immunohistochemistry in uterine pathology: common and rare diagnostic dilemmas / Giovanna Giordano // Pathology – Research and Practice. – 2009. – №205. – P. 663–676.
7. *D'Angelo E.* Uterine sarcomas: A review / Emanuela D'Angelo, Jaime Prat // Gynecologic Oncology. – 2010. – №116. – P. 131–139.

Відомості про авторів:

Шпонька І.С., д. мед. н., професор, зав. каф. патологічної анатомії і судової медицини ДДМА.

Гончарова Г.С., аспірант каф. патологічної анатомії і судової медицини ДДМА.

Адреса для листування:

Шпонька Ігор Станіславович. 49044, р. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 9.

Тел.: (056) 735 05 20.

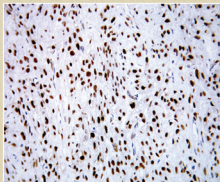


Рис. 1. Позитивна (++) експресія з p21 в лейоміомі тіла матки. х 400.

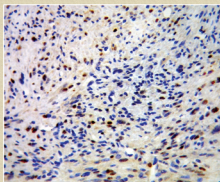


Рис. 2. Помірно позитивна (+) експресія з p21 в лейоміомі тіла матки. х 400.

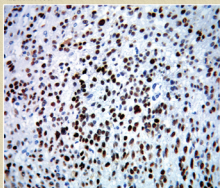


Рис. 3. Позитивна (++) експресія з p53 в лейоміосаркомі тіла матки. х 400.

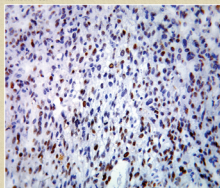


Рис. 4. Помірно позитивна (+) експресія з p53 в лейоміосаркомі тіла матки. х 400.

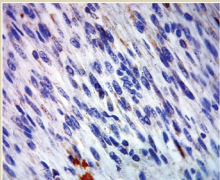


Рис. 5. Негативна експресія з p21 в лейоміосаркомі тіла матки. х 400.

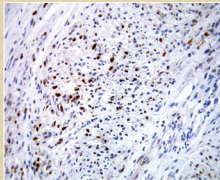


Рис. 6. Помірно позитивна (+) експресія з p21 в лейоміосаркомі тіла матки. х 400.

(Рис. 1–6 до статті І.С. Шпоньки, Г.С. Гончарової «Значення експресії p53 та p21 у лейоміомах і лейоміосаркомах тіла матки», с. 49–51)