

М.М. Баударбекова

Особливості імуногістохімічного профілю інвазивних аденокарцином ендометрія

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: інвазивна аденокарцинома ендометрія, ангиогенез, p53, MMP-9, TIMP-1 та CD34.

За допомогою імуногістохімічних методів досліджено рівень експресії маркерів p53, MMP-9, TIMP-1 та CD34 в інвазивній аденокарциномі ендометрія у 20 жінок. Визначено лінійну кореляційну залежність між експресією CD34 та експресією матриксної металопротеїнази MMP-9.

Особенности иммуногистохимического профиля инвазивных аденокарцином эндометрия

М.М. Баударбекова

С помощью иммуногистохимических методов исследованы уровни экспрессии маркеров p53, MMP-9, TIMP-1 и CD34 в инвазивной аденокарциноме эндометрия у 20 женщин. Выявлена линейная корреляционная зависимость между экспрессией CD-34 и матриксной металлопротеиназы MMP-9.

Ключевые слова: инвазивная аденокарцинома эндометрия, ангиогенез, p53, MMP-9, TIMP-1 и CD34.**Патология.** – 2011. – Т.8, №3. – С. 62–64

Features of immunohistochemical profile of invasive endometrial adenocarcinomas

М.М. Baudarbekova

The levels of p53, MMP-9, TIMP-1 and CD34 receptors expression in invasive adenocarcinomas of endometrium in 20 women were investigated using immunohistochemical methods. Linear cross-correlation dependence between CD34 and MMP-9 markers was revealed.

Key words: invasive adenocarcinoma of endometrium, angiogenesis, p53, MMP-9, TIMP-1 and CD34.**Pathologia.** 2011; 8(3): 62–64

Аденокарцинома ендометрія є найбільш поширеною злоякісною пухлиною жіночих статевих органів у мешканок розвинутих країн [1,2]. У 60–90% жінок виникає гормонально залежний варіант пухлини, що розвивається на фоні гіперестрогенії та комплексу складних ендокринометаболических порушень, у тому числі, патології овуляторного процесу та порушень вуглеводного й ліпідного обміну [3].

Аденокарциному ендометрія вирізняє висока імовірність інвазії в міометрій, у якій ключову роль відіграє матриксна металопротеїназа MMP-9, що індукує протеоліз деяких компонентів екстрацелюлярного матриксу [4,5]. Активність MMP-9 пригнічує її тканинний інгібітор TIMP-1, що стимулює рост пухлини, антиапоптотичну активність, а також про- та антиангіогенний ефект. Рост і прогресія аденокарциноми ендометрія супроводжуються зміною експресії гену p53, вивченню якої присвячено поодинокі роботи [6,7], а також активацією неоангіогенезу [8]. Взаємозв'язок між експресією MMP-9 і TIMP-1 і кількістю мікросудин з експресією CD34 в ендотелії в інвазивних аденокарциномах ендометрія вивчено недостатньо.

Мета роботи

Виявити особливості експресії маркерів p53, MMP-9, TIMP-1 і CD34 у тканині інвазивного раку ендометрія в порівнянні з неінвазивною аденокарциномою та комплексною атипичною гіперплазією ендометрія.

Матеріали і методи дослідження

Досліджено операційний матеріал матки 20 жінок віком від 43 до 59 років з діагнозом «аденокарцинома з інвазією менше 1/2 міометрія, pT_{2a}N₀M_x» та «аденокарцинома з глибокою інвазією міометрія, pT_{2b}N₀M_x», а також біопсійний матеріал ендометрія 10 жінок з комплексною атипичною гіперплазією ендометрія та 10 жінок віком від 42 до 60 років з аденокарциномою ендометрія без інвазії в міометрій.

Імуногістохімічні дослідження виконували в парафінових зрізах тканини ендометрія і матки, отриманих на прецизійному ротаційному мікротомі HM 3600 («MICROM Laborgerate GmbH», Німеччина) та розміщених на адгезивних скельцях Super Frost Plus («Menzel Glaser», Німеччина). Після депарафінізації та регідратації зрізів проводили температурне демаскування антигенів (шляхом нагрівання на водяній бані в Трис-ЕДТА буфері з рН=9,0) та пригнічували активність ендогенної пероксидази 3% розчином перекису водню. Рівень експресії матриксної металопротеїнази MMP-9 клітинами визначали при застосуванні поліклональних антитіл *Rb a-Hu MMP-9 (92kDa Collagenase IV)*, рівень експресії її тканинного інгібітора TIMP-1 – за допомогою моноклональних антитіл *Mo a-Hu TIMP-1 Ab-2, Clone 102D1*, рівень експресії маркеру CD34 – моноклональними антитілами *Mo a-Hu CD34 (Endothelial Cell Marker), Ab-1, Clone QBEnd/10* (всі антитіла фірми «Thermo Fisher Scientific Inc.», США), рівень маркера p53 визначали

моноклональними антитілами *Mo a-Hu p53* (клон *DO7*) («ДАКО», Данія). Після нанесення блокуючої сироватки й інкубації з первинними антитілами проводили візуалізацію відповідних антигенів системою детекції DAKO EnVision+ System з діамінобензидином або LSAB2 System (фірми «ДАКО», Данія). Зрізи дофарбовували гематоксиліном Майєра.

Оцінку результатів експресії маркерів MMP-9, TIMP-1 та p53 проводили в мікроскопі Axioplan 2 («Carl Zeiss», Німеччина). У кожному випадку аналізували від 200 до 400 клітин у 5 полях зору при збільшенні $\times 200$. Результати імуногістохімічної реакції оцінювали напівкількісним підрахунком відсотка позитивно забарвлених клітин у стандартизованому полі зору мікроскопа. Отримані дані для p53 оцінювали за такими параметрами: IM (індекс мічених ядер) $< 10,0\%$ – низький рівень експресії, $10,0\% \leq IM < 30,0\%$ – високий рівень, $IM \geq 30,0\%$ – гіперекспресія. Рівень експресії маркерів MMP-9 і TIMP-1 розцінювали як слабкий при 0–33% позитивно забарвлених клітин, як помірний – при 34–66% позитивно забарвлених клітин і як виразний – при 67–100% позитивно забарвлених клітин. У тих же полях зору за допомогою пакету програм KS 200 («Kontron Elektronik», Німеччина) обчислювали площу судин (у квадратних мікрометрах), в ендотеліальних клітинах яких визначалась експресія CD34. Кореляційний зв'язок визначали вирахуванням коефіцієнту Спірмена, який обчислювали за допомогою програми «STATISTICA for Windows 6.0» (StatSoft Inc., ліцензія № AXXR712D833214FAN5).

Результати та їх обговорення

У жінок з інвазивною аденокарциномою ендометрія при імуногістохімічному дослідженні експресію p53 визначали в ядрах поодиноких клітин пухлинних залоз у вигляді коричневих гранул, що щільно заповнювали ядро. У 70% жінок з інвазивною аденокарциномою ендометрія рівень експресії гену p53 у клітинах пухлинних залоз був низький, у 20% пацієнток визначали високий рівень експресії p53, у 10% жінок спостерігали негативну реакцію. Основна функція гену p53 – регуляція мітотичного поділу клітин і контроль стабільності геному, цей ген постійно синтезується в клітинах як коротко існуючий білок. За необхідності репарації ДНК він гальмує мітоз клітини, а у випадках, коли пошкодження ДНК несумісне з продовженням життєдіяльності клітини, він активує її апоптоз [9–11]. Мутації гену p53, які часто виникають у клітинах злоякісних пухлин, призводять до синтезу функціонально неповноцінного білка, який має високу стабільність і накопичується в ядрі, що імуногістохімічно проявляється в чіткому ядерному забарвленні.

Виявлено певні відмінності експресії p53 у пухлинних клітинах інвазивної аденокарциноми ендометрія в порівнянні з його експресією в слизовій оболонці матки у жінок з комплексною атиповою гіперплазією ендометрія та у жінок з аденокарциномою ендометрія без інвазії в міометрій.

Серед жінок, хворих на комплексну атипову гіперпла-

зію ендометрія, у 90% пацієнток експресія p53 в епітелії залоз відсутня, у 10% жінок виявлявся низький рівень експресії p53 у клітинах залозистого епітелію. У групі жінок, хворих на неінвазивну аденокарциному ендометрія, у 30% пацієнток виявлено низький рівень експресії p53 у клітинах пухлинних залоз, у 70% пацієнток в епітелії залоз аденокарциноми експресія p53 відсутня.

При імуногістохімічному дослідженні інвазивної аденокарциноми ендометрія позитивну експресію матричної металопротеїнази MMP-9 спостерігали в цитоплазмі клітин у вигляді великої кількості дрібних гранул коричневого кольору. Серед жінок, хворих на інвазивну аденокарциному ендометрія, рівень експресії MMP-9 коливався від $11,4 \pm 1,68\%$ до $71,6 \pm 2,72\%$ позитивно забарвлених клітин (середнє значення – $38,40 \pm 11,85\%$). Експресію матричної металопротеїнази MMP-9 визначали переважно в пухлинних клітинах інвазивної аденокарциноми ендометрія, а також у клітинах строми аденокарциноми в локусах її глибокої інвазії в міометрій. Найвищий ступінь експресії MMP-9 спостерігали в пухлинних клітинах аденокарцином з низьким рівнем її гістологічного диференціювання, а також у зонах глибокої інвазії пухлин.

Експресія матричної металопротеїнази MMP-9 у групі жінок, хворих на комплексну атипову гіперплазію ендометрія, у всіх випадках була негативною. У жінок, хворих на неінвазивну аденокарциному, також спостерігали негативну експресію MMP-9 у 100% випадків.

Експресію тканинного інгібітора матричної металопротеїнази TIMP-1 спостерігали в цитоплазмі клітин у вигляді дрібних гранул світло-коричневого кольору. У жінок, хворих на інвазивну аденокарциному ендометрія, експресію TIMP-1 спостерігали в 1–3% пухлинних клітин і клітин строми. Оскільки відомо, що цей фермент блокує MMP-9, зрозуміло, що низький рівень TIMP-1 сприяє активації функцій MMP-9, наприклад, спрямованих на стимулювання неоангіогенезу та пухлинної інвазії.

У жінок, хворих на комплексну атипову гіперплазію ендометрія, експресію TIMP-1 в ендометрії не визначали. Серед жінок, хворих на неінвазивну аденокарциному ендометрія, у 20% пацієнток виявлено низький рівень експресії TIMP-1 у клітинах пухлинних залоз і строми, у 80% жінок цієї групи експресія TIMP-1 у клітинах пухлинних залоз і строми негативна.

До сьогодні механізми, за допомогою яких матричні металопротеїнази стимулюють пухлинну інвазію та ангіогенез, вивчено недостатньо. Численні дослідження довели, що для MMP-9 характерне стимулювання ангіогенезу в пухлинах [12] та активація прогресуючої генетичної нестабільності в пухлинних клітинах. Відомо, що пухлинні клітини секретують не тільки матричні металопротеїнази, але й ангіогенні фактори, такі як васкулоендотеліальний фактор росту (VEGF), фактор росту фібробластів b (bFGF), тромбоцитарний фактор росту (PDGF) та протизапальні молекули інтелейкіну-8 (IL-8), оксиду азоту (NO), що беруть участь у процесі

ангіогенезу [13,14]. Експресія пухлинними клітинами зазначених компонентів зумовлена конститутивною активацією проліферативних сигнальних каскадів, що призводять до активації неангіогенезу.

У жінок з комплексною атипичною гіперплазією ендометрія в ендотелії ендометріальних мікросудин визначали слабку експресію CD34. Серед жінок, хворих на неінвазивну аденокарциному ендометрія, слабку експресію CD34 визначали у 60% випадків, помірну – в 40% випадків.

У жінок, хворих на інвазивну аденокарциному ендометрія, привертала увагу виразна експресія CD34 у пухлинній тканині, який маркував ендотелій великої кількості судин, що розташовувались навколо злякисних залоз. Встановлено, що кількість судин максимально зростала в аденокарциномах ендометрія з глибокою інвазією в міометрій, у яких також спостерігали виразну експресію MMP-9. Обчислена за допомогою комп'ютерної морфометрії площа мікросудин з виразною експресією CD34 складала від $863,4 \pm 25,68$ мкм² до $4875 \pm 25,6$ мкм² у полі зору. Середній показник площі судин у випадках інвазивної аденокарциноми, обчислений за експресією CD34, склав $2712,11 \pm 831,12$ мкм². При статистичному аналізі встановлено сильний взаємозв'язок між рівнем експресії MMP-9 та площею судин за позитивною реакцією CD34 – позитивно спрямований коефіцієнт кореляції Спірмена ($r=+0,95$, $p<0,001$), що свідчить про наявність лінійної залежності між площею судин пухлинної тканини та активністю MMP-9 в інвазивній аденокарциномі ендометрія [15].

Висновки

У 70% жінок з інвазивною аденокарциномою ендометрія визначено низький рівень експресії гену p53 у ядрах клітин пухлинних залоз, у 20% пацієнток визначено високий рівень експресії p53, у 10% жінок відзначено негативну реакцію.

В інвазивній аденокарциномі ендометрія визначено слабку й помірну експресію MMP-9 у цитоплазмі клітин пухлинних залоз і строми, слабку цитоплазматичну експресію TIMP-1 у поодиноких клітинах строми і залоз пухлини, а також помірну й виразну експресію CD 34 в ендотелії судин пухлинної тканини.

Встановлено наявність лінійної залежності між площею судин пухлинної тканини та активністю матриксної металопротеїнази MMP-9 [позитивно спрямований коефіцієнт кореляції Спірмена ($r=+0,95$, $p<0,001$)].

Література

1. *Киселев В.И.* Молекулярные механизмы регуляции гиперпластических процессов / Киселев В.И., Лященко А.А. – М.: Димитрейд График Групп, 2005. – 348 с.
2. *Lukanova A.* Circulating levels of sex steroid hormones and risk of endometrial cancer in postmenopausal women/ Lukanova A., Lundin E., Micheli A. et al. // *Int. J. Cancer.* – 2004. – Vol. 108. – P. 425–432.
3. *Бочкарева Н.В.* Взаимосвязь апоптоза и неангиогенеза с активностью ферментов метаболизма эстрогенов в опухолях эндометрия / Бочкарева Н.В., Кондакова И.В., Коломиец Л.А. и др. // *Российский онкологический журнал.* – 2008. – №1. – С. 18–23.
4. *Пожариский К.М.* Иммуногистохимический профиль эндометриальной аденокарциномы тела матки: ER, PR, HER-2, Ki-67 и их прогностическое значение/ Пожариский К.М., Самсонова Е.А., Тен В.П. // *Архив патологии.* – 2005. – №2. – С. 13–17.
5. *Schrohl A.S.* Tumor tissue concentrations of the proteinase inhibitors tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) are complementary in determining prognosis in primary breast cancer / Schrohl A.S., Christensen I.J., Pedersen A.N. // *Molecular & Cellular Proteomics.* – 2003. – P. 164–172.
6. *Новикова Е.Г.* Лечение атипической гиперплазии эндометрия/ Новикова Е.Г., Чулкова О.В., Пронин С.М. // *Практ. онкология.* – 2004. – №5 (1). – С. 52–59.
7. *Stetler-Stevenson W.G.* Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis / Stetler-Stevenson W.G., Aznavoorian S., Liotta L.A. // *Annu Rev Cell Biol.* – 1993. – №9. – P. 541–573.
8. *Werb Z.* ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology / Werb Z. // *Cell.* – 1997. – №14; 91(4). – P. 439–442.
9. *Nakopoulou L.* Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis / Nakopoulou L., Giannopoulou I., Stefanaki K. // *Journal of Pathology.* – 2002. – №197. – P. 307–313.
10. *Carmeliet P.* Angiogenesis in cancer and other diseases / Carmeliet P., Jain R. // *Nature.* – 2000. – Vol. 407, №6801. – P. 249–257.
11. *Фільченков О.О.* Апоптоз і рак. Від теорії до практики / О.О. Фільченков, Р.С. Стойка – Тернопіль.: ТДМУ «Укрмедкнига», 2006. – 524 с.
12. *Vu et al.* Gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes / Vu et al. // *Cell.* – 1998. – №1;93 (3). – P. 411–422.
13. *Brem S.* Angiogenesis and cancer control: from concept to therapeutic trial / Brem S. // *Cancer Control.* – 1999. – №6 (5). – P. 436–458.
14. *Ferrara N.* VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors / Ferrara N. // *Nat Rev Cancer.* – 2002. – №2. – P. 795–803.
15. *Орлов А.И.* Прикладная статистика / Орлов А.И. – М.: Экзамен, 2006. – 672 с.

Відомості про автора:

Баударбекова М.М., асистент каф. патологічної анатомії та судової медицини з основами права ЗДМУ.

Адреса для листування:

Баударбекова Меруерт Монтаївна. 69035, м. Запоріжжя, пр-т Маяковського, 26, каф. патологічної анатомії та судової медицини з основами права ЗДМУ.

Тел.: (067) 613 88 29.

E-mail: baudarbekova@gmail.com