

**І.С.Шпонька
Г.С.Гончарова**

Дніпропетровська державна
медична академія

Ключові слова: мезенхімальні пухлини тіла матки, імуногістохімічні маркери, диференційна діагностика.

Надійшла: 14.05.2011
Прийнята: 12.06.2011

УДК 618.14-006.36-076

ДИФЕРЕНЦІЙНА ДІАГНОСТИКА МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ ПУХЛИН ТІЛА МАТКИ НА ОСНОВІ ВИВЧЕННЯ ІМУНОФЕНОТИПІВ НОВОУТВОРЕНЬ

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи „Індивідуалізація лікування злоякісних пухлин з урахуванням біологічних показників активності пухлинного процесу та маркерів хіміогормонорезистентності” (Номер державної реєстрації 0101U001002).

Резюме. Морфологічна діагностика мезенхімальних новоутворень тіла матки є складною у зв'язку з поліморфізмом добро- та злоякісних процесів. Метою дослідження було розроблення комплексних диференційно-діагностичних критеріїв для вищевказаних пухлин на підставі вивчення показників експресії маркерів біологічних властивостей тканин. Ми встановили, що для діагностики гладком'язових пухлин з сумнівним злоякісним потенціалом доцільним буде використання в якості основних p53, Ki-67, ER, PGR та допоміжних p21, bax, VEGF, TSP-1, CD34. Для диференційного діагнозу лейоміом та ендометріальних стромальних пухлин необхідним є спектр маркерів, що складається з CD10, desmin, α -SMA, h-caldesmon, Ki-67. Для визначення ступеня атипії у пухлинах ендометріальної строми найбільш інформативною буде діагностична панель з Ki-67, p53, ER, PGR, а також cyclin D1. Питання гістогенеза високозлоякісних сарком краще за все допоможе вирішити комплекс з CD10, α -SMA, desmin, та h-caldesmon.

Морфологія. – 2011. – Т. V, № 2. – С. 19-23.

© І.С.Шпонька, Г.С.Гончарова, 2011

Shponka I.S., Goncharova A.S. Differential diagnostics of mesenchymal tumors of uterine corpus founded on immunophenotypes of neoplasms.

Summary. Morphological diagnostics of mesenchymal uterine neoplasms is complex due to polymorphism of benign and malignant processes. The purpose of our research was to devise the complex differential diagnostics criteria for foregoing tumors founded on expression's indexes of biological tissue's properties markers studying. We determined, that for smooth muscle tumors with unknown malignant potential diagnostics, it will be an expedient to use as main markers p53, Ki-67, ER, PGR and as auxiliary p21, bax, VEGF, TSP-1, CD34. For differential diagnosis of leiomyomas and endometrial stromal tumors it is necessary to use CD10, desmin, α -SMA, h-caldesmon, Ki-67. For definition of atypia's level in the tumors of endometrial stroma, the most informative will be diagnostic panel from Ki-67, p53, ER, PGR, and cyclin D1. To solve the issue of histogenesis will help the complex consists of CD10, α -SMA, desmin, та h-caldesmon.

Key words: mesenchymal tumors of uterine corpus, immunohistochemical markers, differential diagnostics.

Вступ

Мезенхімальні пухлини тіла матки представлені новоутвореннями з різноманітними клініко-морфологічними властивостями та потенціалом злоякісності, що розвиваються з тканин, які мають мезодермальне походження. Диференціювання звичайно здійснюється в бік гладком'язових клітин міометрія та ендометріальних стромальних клітин (Blaustein A. et al., 2002).

Проблема пухлинних захворювань тіла матки (ТМ) посідає значне місце серед онкологічної патології у жінок не тільки у зв'язку з поширеністю патології в структурі пухлинних процесів, але й внаслідок поступового зростання захворю-

ваності та вираженої тенденції до омолодження. Найбільш частою доброякісною пухлиною жіночої статеві системи є лейоміома матки, яка виявляється у 20-40% жінок репродуктивного віку (Oliva E. et al., 2002). Захворювання призводить до суттєвого погіршення якості життя жінок, через його зв'язок з рядом репродуктивних та гінекологічних проблем, зокрема безплідністю, невиношуванням вагітності, тазовим болем та меноррагіями, а також має велику соціально-економічну значимість, тому що пов'язане зі зниженням загальної народжуваності.

Саркоми ТМ є рідкісними формами злоякісних пухлин ТМ (4-9%) та виявляються з часто-

тою 1-2 випадки на 100 000 (Leiser A.L. et al., 2006, D'Angelo E. et al., 2009). Клінічна їх поведінка характеризується агресивністю, медіана розвитку рецидивів, за виключенням ендометріальних стромальних сарком низького ступеня злоякісності складає менш ніж 2 роки в зворотній залежності від стадії, в той час як ендометріальні стромальні саркоми низького ступеня злоякісності здатні до рецидиву через великі часові інтервали, більш ніж через 20 років (Baker P. et al., 2007). Найбільш часто після лейоміом у ТМ зустрічаються лейоміосаркоми та саркоми ендометріальної строми, а також їх доброякісні аналоги – ендометріальні стромальні вузли. Встановлення біологічних особливостей пухлин з різним рівнем атипії представляє собою важливий етап у виборі терапевтичної тактики для пацієнок з неепітеліальними новоутвореннями тіла матки.

В наших дослідженнях найчастіше виникала потреба у диференційному діагнозі (ДД) лейоміом та лейоміосарком, ендометріальних стромальних пухлин з різним потенціалом злоякісності та лейоміом, стромальних вузлів та сарком ендометріальної строми різного ступеня диференціювання, а також лейоміосарком, які слід диференціювати від ендометріальних сарком високого ступеня злоякісності. Можливості сучасних малоінвазивних терапевтичних підходів обмежені внаслідок поліморфізму доброякісних пухлин, тому особливої уваги потребує диференціювання лейоміом та ендометріальних стромальних вузлів від їх злоякісних аналогів.

Метою дослідження було розроблення комплексних диференційно-діагностичних критеріїв для вищевказаних пухлин на підставі вивчення показників експресії маркерів біологічних властивостей тканин.

Матеріал та методи

Для вирішення поставлених задач у нашому дослідженні використано клініко-анатомічний матеріал 72 випадків діагностованих доброякісних та злоякісних мезенхімальних пухлин тіла матки у жінок різних вікових груп, який було отримано під час органозберігаючих або радикальних оперативних втручань в лікувально-профілактичних закладах м.Дніпропетровська в період з 2004 по 2011 рік. Серед них більшу частину, 41 випадок склали лейоміоми, 11 лейоміосарком, 5 ендометріальних стромальних вузлів, 7 високодиференційованих сарком ендометріальної строми та 8 низькодиференційованих ендометріальних сарком.

Для проведення морфологічного дослідження використовували парафінові блоки операційного та біопсійного матеріалу. Після проведення ретельного рутинного патогістологічного дослідження зрізи товщиною 4-6 мкм наносили на спеціальні адгезивні предметні стекла SuperFrost Plus, потім депарафінізували відпо-

відно до прийнятих стандартів. Після депарафінізації для епітопного звороту виконувалось нагрівання в цитратному буфері з рН=6,0 в автоклаві (8 хвилин при температурі +1210 С) із симетричним розташуванням стекел у кюветі. З метою ІГХ верифікації діагнозу ми використовували спектр антитіл, який включав маркери проліферації та регуляції клітинного циклу: Ki-67 (клон SP6, LabVision), p53 (клон SP5, LabVision), p21(клон CP74, LabVision), bcl-2 (клон 100/D5, LabVision), бах (клон 2D2, LabVision); рецептори до стероїдних гормонів: ER (клон SP1, LabVision) та PgR (клон SP2, LabVision), маркери васкулогенезу CD34, VEGF – фактор росту ендотелію судин (клон VG1, LabVision), тромбоспондин (клон A6.1, LabVision), а також маркери гістогенезу десмін (клон D33, LabVision), α -SMA (поліклон.), h-кальдесмон, (клон h-cald, LabVision), CD 10 (клон 56C6, LabVision).

Важливими умовами специфічних та якісних імуногістохімічних реакцій є правильно підібраний титр антитіл, а також час і температура інкубації. Ми використовували інкубацію зрізів з первинними антитілами у вологих камерах при температурі 23-25°C на протязі 30 хвилин. Титр антитіл підбирався індивідуально для кожного маркера.

Наступний етап імуногістохімічного дослідження проводили з використанням системи візуалізації останнього покоління UltraVision QUANTO (LabVision), ідентифікація реакцій проводилась за допомогою хромогену DAB та додаткового забарвлення гематоксиліном Майєра для відтворення структурної організації тканини.

Результати та їх обговорення

При проведенні диференційної діагностики між доброякісними та злоякісними пухлинами гладком'язового походження середня кількість клітин з Ki-67-позитивною міткою в гладком'язових саркомах складала 37%, в той час як у лейоміомах дорівнювала всього 9%, що узгоджується з сучасними поглядами на порушення механізмів чутливості до зовнішньої регуляції клітинного поділу в злоякісних пухлинах, більшу їх автономність та незалежність, що супроводжується безконтрольним розмноженням. Індекс експресії p53 у лейоміосаркомах ТМ складав в середньому 15%, що в 4 рази перевищувало значення цього показника у лейоміомах. Протилежну тенденцію ми визначили для інгібітора прогресії клітинного циклу p21; виявилось, що його рівень його експресії у лейоміомах в середньому складає 24%, тоді як у їх злоякісних аналогах дорівнює 9%. Це може свідчити про суттєве порушення онкосупресивних механізмів у клітинах злоякісних пухлин, у той час, як в доброякісних новоутвореннях підтримується їх відносно адекватне функціонування.

При вивченні маркерів контрольно здійснення мітохондріального шляху апоптозу, bcl-2 та бах,

ми з'ясували, що частота позитивних реакцій з ними вища у доброякісних гладком'язових пухлинах у порівнянні зі злоякісними, майже в 3 рази та в 4,5 рази відповідно, але дані, отримані для bcl-2 не були статистично достовірними ($p > 0,05$). Аналіз рівня експресії ER та PGR при лейоміомах та лейоміосаркомах ТМ дозволив нам визначити загальні закономірності експресії цих маркерів при гладком'язових новоутвореннях ТМ, що проявлялось у суттєвому зменшенні кількості забарвлених клітин, інтенсивності імуногістохімічної реакції, поряд зі зростанням ступеня атипії та злоякісного потенціалу пухлини.

Маркери ангиогенезу, VEGF, CD34 та TSP-1 не є прямими показниками порушень геному клітин, які безпосередньо вказують на злоякісний потенціал пухлини, але виявлення різниці у процесах неоваскулогенезу між доброякісними та злоякісними процесами ТМ є непрямим доказом діагнозу захворювання. Так, в лейоміомах ми спостерігали більш інтенсивну реакцію з VEGF, як у паренхімі, так і у стромі новоутворень (помірна та виражена відповідно) порівняно з лейоміосаркомами (слабка та помірна). За допомогою визначення CD34 ми мали можливість оцінити середню кількість судин у полі зору, для доброякісних гладком'язових пухлин цей показник дорівнював $30 \pm 2,24$ для злоякісних — $21 \pm 1,56$, причому тип розподілу судин в лейоміомах був дифузним, в той час як у лейоміосаркомах ми виявляли неоднорідне розташування судин у різних зонах новоутворень, що є ознакою незрілого, малоефективного ангиогенезу у злоякісних неопластичних процесах, що в подальшому призводить до формування в паренхімі значних дистрофічно-некротичних осередків під впливом гіпоксії та метаболічної недостатності.

Для маркера TSP-1 ми встановили наступні закономірності: збільшення рівнів експресії ознаки в доброякісних пухлинах, а саме фокальної слабко позитивної реакції в паренхімі та помірно інтенсивного забарвлення в стромі лейоміом при відповідно негативній паренхиматозній та позитивній стромальній експресії різного ступеня інтенсивності у лейоміосаркомах ТМ. Оцінка реакцій з VEGF, TSP-1, CD34 має вторинний характер та використовується для підтвердження отриманих результатів.

Диференційний діагноз, направлений на з'ясування гістогенезу та водночас вирішення питання злоякісного потенціалу новоутворення, як у випадку з деякими типами лейоміом та високодиференційованими ендометріальними стромальними саркомами, є однією з найважливіших проблем, що виникають при діагностиці пухлин мезенхімального походження ТМ. Ми визначили в матеріалі переважної більшості (92,7%) лейоміом негативний тип реакції з CD10, тоді як у всіх випадках вузлів та високодиференційованих сарком ендометріальної стромі, чітко виявляли дифузну позитивну мембранну реакцію у парен-

химі новоутворень та негативну — у стромі. При вивченні показників експресії desmin було встановлено стабільно позитивну реакцію у лейоміомах ТМ на відміну від ендометріальних стромальних пухлин (ЕСП). Особливо суттєвою була різниця між лейоміомами та високодиференційованими стромальними саркомами, 71,4% яких прореагували з desmin негативно.

Результати, отримані нами при визначенні у лейоміомах та ЕСП експресії гладком'язового актину - α -SMA, свідчать про те, що різниця забарвлення з ним у цих новоутвореннях є досить суттєвою: 100% лейоміом виявилися позитивно забарвленими, 100% вузлів ендометріальної стромі та 85,7% сарком ендометріальної стромі низького рівня злоякісності продемонстрували негативну експресію ознаки. У всіх випадках лейоміом ми виявили позитивну реакцію з h-caldesmon, в той час як серед ЕСП у 100% вузлів та 71,4% високодиференційованих сарком ендометріальної стромі експресія його була негативною.

За нашими результатами, середні значення індексу експресії Ki-67 лейоміом та вузлів ендометріальної стромі не мали суттєвих відмінностей та склали 9 та 8% відповідно. Інша проліферативна активність характеризувала високодиференційовані та низькодиференційовані саркоми ендометріальної стромі, в якій цей показник дорівнював 24% та 43% відповідно. При визначенні показників p53 статусу у нашому дослідженні виявлено значні відмінності рівнів його експресії у доброякісних та злоякісних новоутвореннях ендометріального стромального походження. Середні показники індексу експресії маркера порушення ядерного шляху контролю апоптозу у високодиференційованих саркомах ендометріальної стромі були в 2,6 разів вищі за показник у вузлах ендометріальної стромі та майже в 2 рази нижчі за його значення у низькодиференційованих стромальних саркомах. Експресія ER при злоякісних ендометріальних стромальних неопластичних процесах ТМ виявляється значно рідше ніж в доброякісних пухлинах стромі, сягаючи мінімальних значень при високозлоякісних новоутвореннях ТМ. Встановлено, що значення напівкількісного коефіцієнту в групі вузлів ендометріальної стромі статистично достовірно перевищували цей показник для високо- та низькодиференційованих сарком ендометріальної стромі у 3,2 та 11 разів відповідно. Ці тенденції залишаються актуальними і для експресії у зазначених новоутвореннях PGR.

В нашому дослідженні при вивченні показників порушень регуляції клітинного циклу за рівнем експресії протеїну cyclin D1 у ЕСП з різним потенціалом малігнізації, було встановлено існування значних відмінностей цього показника між високозлоякісними саркомами та вузлами і низькозлоякісними саркомами ендометріальної стромі, в той час як між останніми двома патологічними процесами ми не виявили значної різниці за ним. При

ендометріальних саркомах високого ступеня злоякісності індекс *cyclinD1*-експресії статистично вагомо перевищував аналогічний показник у групі низькозлоякісних сарком у 2 рази, а у групі вузлів ендометріальної строми - у 3 рази ($p < 0,05$). Між рівнями експресії показника у саркомах низького ступеня злоякісності та ендометріальними вузлами різниця дорівнювала всього 2%.

З'ясування генезу злоякісних пухлинних клітин проводилося з допомогою панелі антитіл, що включала CD 10, α -SMA, desmin, h-caldesmon. В більшості досліджуваних нами лейоміосарком (90%) ми винайшли негативну реакцію з CD10, в той час як серед низькодиференційованих сарком ендометріальної строми таких виявилось тільки 12,5%. Аналіз рівня експресії α -SMA у низькодиференційованих саркомах гладком'язового та стромального походження також продемонстрував суттєві відмінності даної ознаки: у 92,5% лейоміосарком ми спостерігали позитивну реакцію, тоді як всі 100% сарком ендометріальної строми були забарвлені з α -SMA негативно. При дослідженні забарвлення з desmin, ми виявили позитивну експресію маркера різного ступеня інтенсивності у всіх лейоміосаркомах та негативну реакцію у 100% низькодиференційованих сарком ендометріальної строми. Позитивна експресія h-caldesmon спостерігалася у 87,8% лейоміосарком та лише у 12,5% низькодиференційованих стромальних сарком.

Висновки

1. Експресія білка Ki-67 збільшується з мірою наростання злоякісного потенціалу мезенхімальних пухлин ТМ і досягає максимуму при низькодиференційованих саркомах ендометріальної строми та лейоміосаркомах. Позитивна реакція з ER та PGR є свідченням більш доброякісного характеру неопластичного процесу, ніж негативне забарвлення з ними.

2. Експресія білка p53 збільшується з наростанням ступеня атипії мезенхімальних новоутворень ТМ і досягає максимуму при високозлоякісних саркомах. Зниження індексу експресії p21 асоціюється зі збільшенням ступеня атипії та злоякісного потенціалу гладком'язових пухлин ТМ.

3. Позитивна імуногістохімічна реакція з *bax* характерна для більшості лейоміом та частини лейоміосарком, у той час як негативний *bax*-статус спостерігається переважно в лейоміосаркомах та рідше в лейоміомах. Позитивна експресія *bcl-2* в лейоміомах, визначається частіше ніж у лейоміосаркомах, але ця різниця не підтверджена статистично ($p > 0,05$). Для поліпшення гістологічної діагностики гладком'язових пухлин ТМ як уточнюючі маркери рекомендуються використовувати з'ясування активності васкулогенезу (лейоміоми демонструють більш інтенсивне забарвлення з VEGF, TSP-1 та вищу кількість судин в полі зору за даними визначен-

ня CD34, ніж їх злоякісні аналоги).

4. Показники експресії *cyclin D1* у високозлоякісних саркомах ендометріальної строми, вищі ніж у низькозлоякісних саркомах та доброякісних ендометріальних стромальних пухлинах. У високодиференційованих саркомах та вузлах ендометріальної строми спостерігається негативна *cyclin D1*-експресія, в той час як у низькодиференційованих — слабопозитивна та виражена. Позитивний CD10 та негативний α -SMA, h-caldesmon та desmin-статус асоціюється з походженням з ендометріальної строми, тоді як негативна експресія CD10 одночасно з позитивним α -SMA, h-caldesmon та desmin-забарвленням пов'язані з гладком'язовим гістогенезом новоутворень.

5. Основними маркерами у ДД лейоміом та лейоміосарком ТМ є p53, Ki-67, ER, PGR, допоміжними p21, *bax*, VEGF, TSP-1, CD34. Експресія *bcl-2*, за даними дослідження не може використовуватися для диференційної діагностики між доброякісними та злоякісними гладком'язовими пухлинами тіла матки ($p > 0,05$). Імунофенотип лейоміоми: p53 -, Ki-67 -, ER++, PGR+++, p21+, *bax*+++, VEGF++, CD34+++, TSP-1+. Для лейоміосарком був характерним наступний імунопрофіль: p53 ++, Ki-67 ++, ER -, PGR -, p21 -, *bax* +/-, VEGF+, CD34 +, TSP-1-. Для ДД клітинних лейоміом та ЕСП (вузлів або низькозлоякісних сарком) ТМ ключову роль відіграє визначення гістогенезу та проліферативна активність, тому маркерами першої лінії були CD10, desmin, α -SMA, h-caldesmon, Ki-67. ІГХ характеристика клітинної лейоміоми: CD10 -, desmin ++, α -SMA ++, h-caldesmon ++, Ki-67 -. Фенотип ЕСП (високозлоякісної саркоми або вузла) має такі риси: CD10 ++, desmin -, α -SMA -, h-caldesmon -, Ki-67 +/- (саркома/ вузол).

6. Доброякісні та малігнізуючі ЕСП, що потребують ДД, насамперед підлягають визначенню експресії Ki-67, p53, ER, PGR, а також *cyclin D1*. Імунопрофіль вузла ендометріальної строми: Ki-67 -, p53 -, ER ++, PGR ++, *cyclin D1* -; саркоми ендометріальної строми низького ступеня злоякісності: Ki-67 +, p53+, ER +, PGR ++, *cyclin D1* -; саркоми ендометріальної строми високого ступеня злоякісності: Ki-67 ++, p53 ++, ER -, PGR +, *cyclin D1*+. Для з'ясування гістогенезу низькодиференційованих мезенхімальних пухлин ТМ першочерговим є застосування маркерів CD10, α -SMA та desmin, додатково можна використовувати визначення реакції з h-caldesmon. Імунофенотип лейоміосаркоми: CD10 -, α -SMA ++, desmin ++, h-caldesmon +; низькодиференційованої саркоми ендометріальної строми: CD10 ++, α -SMA -, desmin -, h-caldesmon -.

Перспективи подальших досліджень

Подальшою роботою в цьому напрямку буде встановлення чітких та розширених діагностичних алгоритмів з врахуванням особливостей різновидів мезенхімальних захворювань тіла матки.

Літературні джерела

An immunohistochemical analysis of endometrial stromal and smooth muscle tumors of the uterus: a study of 54 cases emphasizing the importance of using a panel because of overlap in immunoreactivity for individual antibodies / E. Oliva, R. H. Young, M. B. Amin, P. B. Clement // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2002. – Vol. 26, № 4. – P. 403-412.

Leiser A. L. Apoptotic and cell cycle regulatory markers in uterine leiomyosarcoma / A. L. Leiser, S. E. Anderson, D. Nonaka // *Gynecol. Oncol.* – 2006. – Vol. 101, № 1. – P. 86-91.

Baker P. Endometrial stromal tumours of the

uterus: a practical approach using conventional morphology and ancillary techniques / P. Baker, E. Oliva // *J. Clin. Pathol.* – 2007. – Vol. 60. – P. 235–243.

Blaustein A. Blaustein's pathology of the female genital tract / A. Blaustein, R.J. Kurman. – 5th ed. – New York: Springer, 2002. – 1391 p.

D'Angelo E. Comparative clinicopathologic and immunohistochemical analysis of uterine sarcomas diagnosed using the World Health Organization classification system / E. D'Angelo, L. G. Spagnoli, J. Prat // *Hum. Pathol.* – 2009. – Vol. 40, № 11. – P. 1571-1585.

Шпонька И.С., Гончарова А.С. Дифференциальная диагностика мезенхимальных опухолей тела матки на основе изучения иммунофенотипов новообразований.

Резюме: Морфологическая диагностика мезенхимальных новообразований тела матки сложна в связи с полиморфизмом добро- и злокачественных процессов. Целью нашего исследования была разработка комплексных дифференциально-диагностических критериев для вышеуказанных опухолей на основании изучения показателей экспрессии маркеров биологических свойств тканей. Мы установили, что для диагностики гладкомышечных опухолей с сомнительным злокачественным потенциалом целесообразно использовать в качестве основных маркеров p53, Ki-67, ER, PGR и дополнительных p21, bax, VEGF, TSP-1, CD34. Для дифференциального диагноза лейомиом и эндометриальных стромальных опухолей необходим спектр маркеров, состоящий из CD10, desmin, α -SMA, h-caldesmon, Ki-67. Для определения степени атипичности при опухолях эндометриальной стромы наиболее информативной будет диагностическая панель из Ki-67, p53, ER, PGR, а также cyclin D1. Вопросы гистогенеза высокозлокачественных сарком лучше всего поможет разрешить комплекс из CD10, α -SMA и desmin, а также h-caldesmon.

Ключевые слова: мезенхимальные опухоли тела матки, иммуногистохимические маркеры, дифференциальная диагностика.