

РОЛЬ АПОПТОЗА И КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ МАТКИ

И.С.Сидорова, О.В.Рыжова, А.Б.Репин

Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова

Ведущее значение в патогенезе новообразований принадлежит программной клеточной гибели (апоптозу) и клеточной пролиферации. С помощью иммуногистохимических методов с использованием антител к Bax, Bcl-xL, Ki-67 в работе оценено проявление обоих процессов в гладкомышечных опухолях матки. Установлены различия в уровне апоптоза и пролиферации между доброкачественными и злокачественными опухолями.

Значительный прогресс в изучении патогенеза инициации и роста опухолей произошел благодаря открытию роли программной клеточной гибели (апоптоза) в динамике клеточной популяции. Многочисленными исследованиями было установлено, что рост новообразования может осуществляться двумя основными механизмами: снижением естественной убыли числа клеток в результате апоптоза, либо усилением клеточной пролиферации. Для полноценного функционирования клетки необходимо координированное действие двух противоположенных систем генов: запускающей синтез ферментов для деления клетки и запускающей синтез ферментов, препятствующих делению [2, 5]. В процессе жизненного пути клетки, равновесие систем постепенно нарушается, вследствие чего происходит генетически запрограммированная клеточная гибель - апоптоз [2, 5]. Остатки погибших клеток перерабатываются макрофагами, а часть материала используется другими клетками. Вокруг клеток, подвергшихся апоптозу, не возникает воспаления, а значит, жизнедеятельность ткани продолжается без нарушений [2, 5, 8, 17].

Регуляция апоптоза осуществляется при помощи конкурентного связывания между собой проапоптозных и антиапоптозных членов семейства Bcl с образованием гомо- и гетеродимеров за счет наличия гомологичных доменов в структурах вышеперечисленных протеинов [6, 9, 14]. Механизмы апоптоза преимущественно исследуются в культурах клеток [10-12, 15, 16], поэтому работы посвященные изучению гибели клеток *in vivo* немногочисленны, что явилось одной из причин проведения данного исследования.

Длительная, насчитывающая несколько десятилетий, история изучения гладкомышечных новообразований матки (к которым относятся различные гистотипы лейомиом и лейомиосаркомы), тем не менее, не разрешила кардинальных вопросов патогенеза заболевания, а, следовательно, и обоснованной патогенетической терапии.

Максимальная заболеваемость и большинство показаний к оперативному лечению данного типа новообразований (быстрый рост, большие размеры, саркоматозная трансформация узла) приходится на перименопаузальный возрастной период, являющийся кри-

тическим в жизни женщины [1, 4]. Угасание функции яичников, снижение гормонального фона, возникающие болезни адаптации и компенсации, эндокринные, метаболические и иммунологические нарушения predisполагают к манифестации опухолевых заболеваний [3].

Одним из главных критериев при оценке состояния миоматозных узлов является выявление злокачественного перерождения. Очаги некроза, высокая клеточность новообразования, клеточный полиморфизм не всегда специфичны и помимо лейомиосаркомы могут определяться и в доброкачественных миоматозных узлах (пролиферирующая лейомиома), обладающих исключительно доброкачественным течением и благоприятным прогнозом [3].

Целью работы явилось выявление особенностей клеточной пролиферации и апоптоза в патогенезе роста лейомиом и лейомиосарком матки.

Материалы и методы

В соответствии с целью исследования был проведен морфо-гистохимический анализ тканевых образцов миометрия, простой, пролиферирующей лейомиомы и лейомиосарком, полученных в результате оперативного лечения 30 пациенток. Основным показанием к операции у данного контингента больных явился быстрый рост миомы в перименопаузальном возрастном периоде. Диагноз "миома матки" был поставлен на основании жалоб больных, анамнестических данных, клинических симптомов и результатов физикального обследования. Быстрым ростом считали увеличение размеров миомы на 2 недели и более в течение 6 месяцев.

Для иммуногистохимического исследования комплекса «матка-миома» были использованы серийные срезы толщиной 4-5 микрон. После депара-

финирования серийных срезов, проводилась их предварительная обработка в микроволновом режиме с последующим инкубированием с первичными антителами. На следующих этапах применялся КИТ фирмы DAKO (StreptABComplex/HRP Duet, Mouse/Rabbit) или одноступенчатая система EnVision Mouse и Rabbit, фирмы DAKO. Проводили ИГХ исследование пероксидазно-антипероксидазным методом (ПАП) с применением панели моно- и поликлональных антител (АТ).

Для исследования применялись антитела к Bcl-xL, Bax и Ki-67. Bcl-xL - белок-индуктор клеточной пролиферации и ингибитор программированной клеточной гибели. Bax - белок-индуктор программированной клеточной гибели (апоптоза). Ki-67 представляет из себя антиген, который выявляется в пролиферирующих клетках в фазах G1, G2, S, M, но не в G0.

Пероксидазно-антипероксидазный метод (ПАП-метод) включал в себя проведение нескольких этапов. На первом этапе, после предварительного проведения блокировки реакций, тканевой субстрат обрабатывался первичным немеченным антителом. Вторым этапом применяли вторичное «мостовое» антитело, специфичное к видам животных, продуцирующих первичное антитело. Третьим этапом проводилась реакция вторичного антитела с пероксидазно-антипероксидазным комплексом (ПАК). ПАК содержит антитело против фермента пероксидазы хрена, полученного из того же вида животных, что и первичное антитело. При реакции этого антитела с пероксидазой хрена образуется пероксидазно-антипероксидазный комплекс.

В нашей работе использовалась DAKO envision system peroxidase, представляющая собой двухступенчатый ИГХ метод окрашивания, то есть вто-

рой и третий этапы исследования были объединены (меченный полимер - пероксидаза хрена - был конъюгирован со вторичными антителами). Последним главным этапом в иммуноокрашивании являлась визуализация желаемых антигенных сайтов. В нашем случае в качестве системы визуализации использовали диаминобензидин - ДАВ (ДАКО), дающий коричневый осадок, с последующим докрасиванием ядер клеток гематоксилином Майера.

Параллельно проводили контрольный эксперимент, чтобы убедиться в том, что отрицательный результат обусловлен именно отсутствием конкретного антигена, а не методическими ошибками. Аналогично, положительный результат должен быть обусловлен связыванием антигена, а не какими-то другими причинами. Проводился контроль на реагенты, ткани и все процедуры.

Результаты реакции оценивались полуколичественным методом по наличию светло-коричневых пятен в характерной для антигена локализации. Ин-

декс Ki-67 определялся как средний % меченных ядер клеток на 100 учтенных клеток (при расчете на 1000 клеток).

Результаты иммуногистохимического исследования тканей нормального миометрия, миом различных типов и лейомиосаркомы с поликлональными антителами к белкам - индукторам и ингибиторам апоптоза оценивались по следующим характеристикам: отсутствие реакции, слабая реакция (<20% клеток), умеренная реакция (20-50% клеток), выраженная реакция (>50% клеток).

Результаты и их обсуждение

Результаты иммуногистохимического исследования тканей нормального миометрия, миом различных типов и лейомиосаркомы с поликлональными антителами к белкам - индукторам и ингибиторам апоптоза позволили выявить некоторые закономерности в особенностях опухолевого роста данных новообразований.

В нормальном миометрии реакция с ингибитором апоптоза Bcl-xL была от-

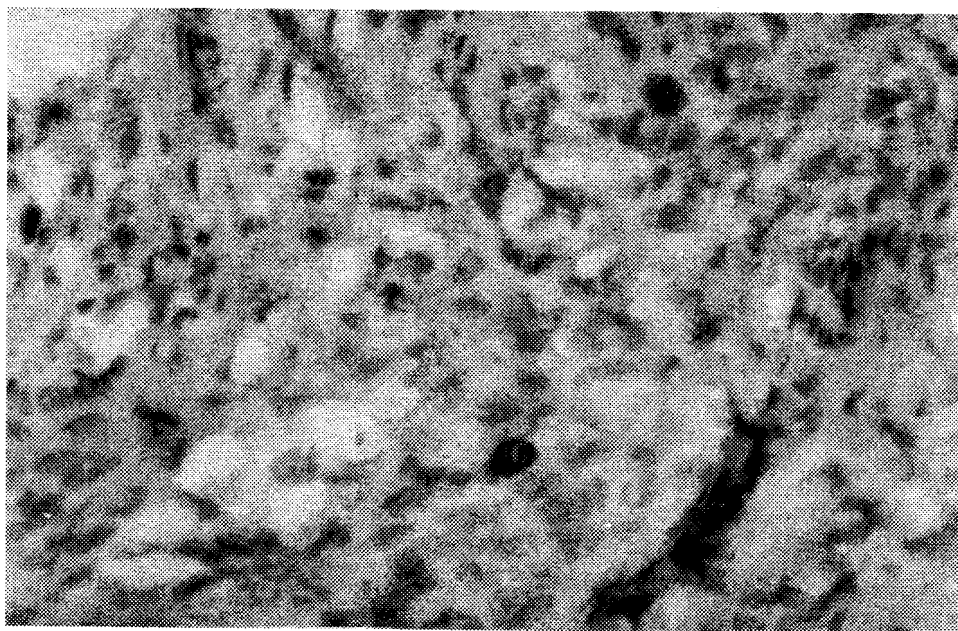


Фото №1 Интактный миометрий. ИГХ реакция с антителами к Ki-67. ПАП метод, докраска ядер гематоксилином Майера. Увеличение 250.

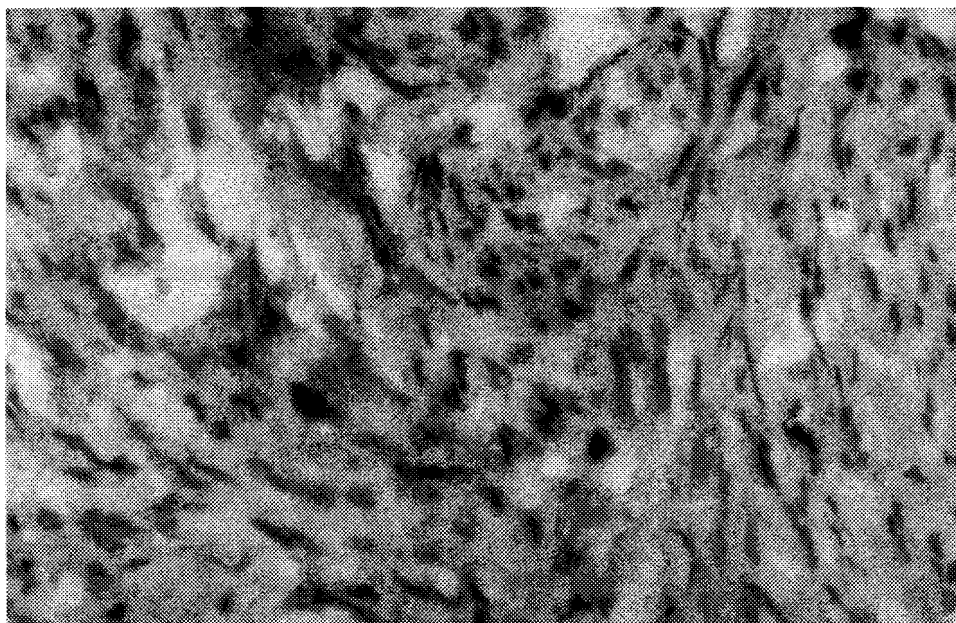


Фото №2 Простая лейомиома матки. ИГХ реакция с антителами к Ki-67. ПАП метод, докраска ядер гематоксилином Майера. Увеличение 250.

рицательной, реакция с индуктором апоптоза - Вах также либо отсутствовала, либо была слабо выраженной. Индекс клеточной пролиферации Ki-67 не превышал 2% (фото №1). В простых лей-

омиомах реакция с ингибитором апоптоза Bcl-xL была слабой, в то время как реакция с индуктором этого процесса варьировала от умеренной до выраженной. Индекс Ki-67 выявлен в 3% (фото №2).

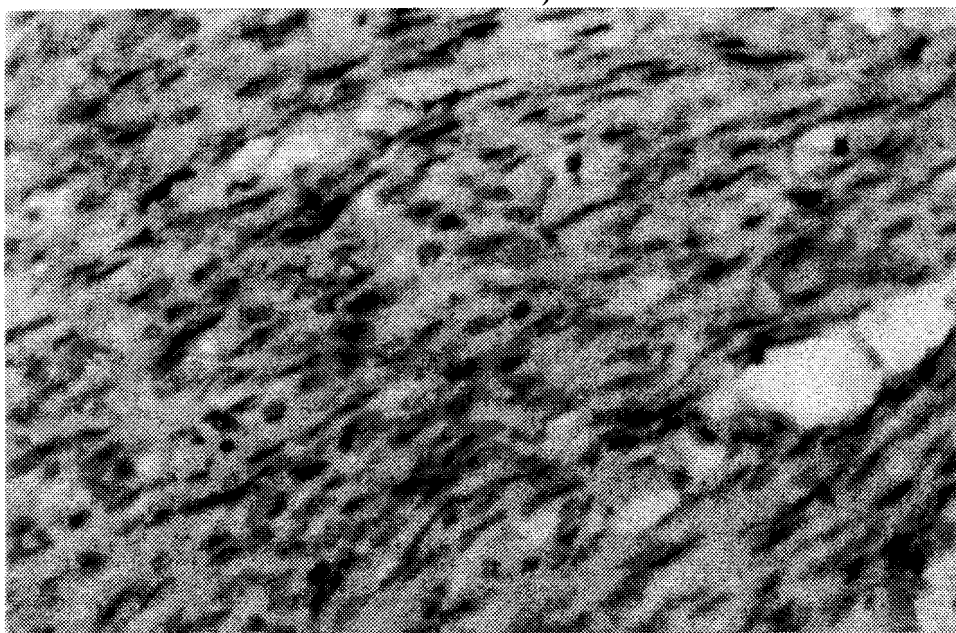


Фото №3 Пролиферирующая лейомиома матки. ИГХ реакция с антителами к Ki-67. ПАП метод, докраска ядер гематоксилином Майера. Увеличение 250.

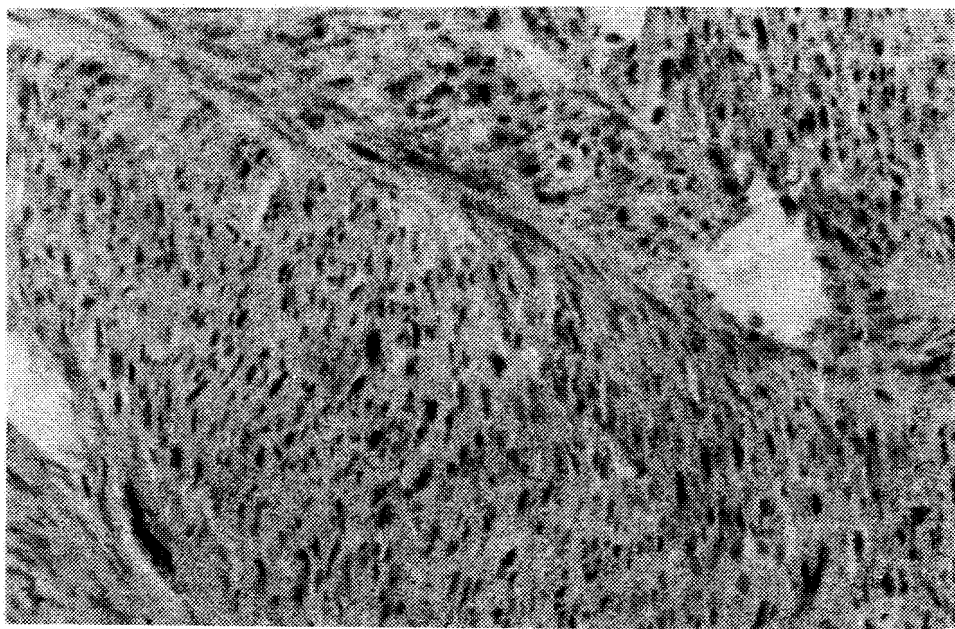


Фото №4 Лейомиосаркома. ИГХ реакция с антителами к Ki-67. ПАП метод, докраска ядер гематоксилином Майера. Увеличение 250.

Исследование образцов тканей пролиферирующей лейомиомы выявило умеренную экспрессию как индуктора (Bcl-xL), так и ингибитора апоптоза (Bax) и увеличение индекса ядер пролиферирующих клеток Ki-67 - до 8% (фото №3). В случае злокачественных опухолей – лейомиосарком - экспрессия протеинов-ингибиторов апоптоза была выраженной, в то время как индукторов апоптоза - слабой. Значение Ki-67 значительно превышало показатели доброкачественных опухолей, составляя 28-30% (фото №4).

Полученные результаты позволили сформулировать следующие положения в отношении гладкомышечных опухолей матки.

Bcl-xL - белок-индуктор клеточной пролиферации и ингибитор программированной клеточной гибели. Результаты ИГХ исследования выявили, что содержание этого протеина увеличивается в ряду «нормальный миометрий → простая миома → пролиферирующая миома → лейомиосаркома». В этом же

ряду увеличивается «клеточность» опухоли и снижается степень дифференцировки клеток. Это свидетельствует о ведущей роли клеточной пролиферации в патогенезе опухолей миометрия.

Это же положение подтверждается результатами исследования содержания ядерного белка Ki-67, являющегося маркером клеточной пролиферации. Высокая концентрация этого белка в тканях свидетельствует об увеличении числа клеток, готовых к митозу. Содержание этого белка в исследованных образцах также увеличивалось в ряду «нормальный миометрий → простая миома → пролиферирующая миома → лейомиосаркома», достигая в злокачественной опухоли уровня, во много раз превышающего уровень в нормальном миометрии.

Bax - белок-индуктор программированной клеточной гибели (апоптоза). Его накопление в клетках миомы можно рассматривать как компенсаторную реакцию внутренних регуляторных механизмов клетки на повышение экс-

прессии генов семейства Bcl, вызывающих увеличение клеточной пролиферации и ингибирование апоптоза.

Уменьшение экспрессии протеина Вах в ряду «простая миома → пролиферирующая лейомиома → лейомиосаркома» свидетельствует о прогрессирующем несовершенстве компенсаторной реакции в ответ на повышение экспрессии ингибиторов апоптоза и увеличение пролиферативной активности. В результате сочетанного действия вышеупомянутых процессов, ткани миомы теряют способность к контролируемому росту и правильной клеточной специализации.

Таким образом, в представленном исследовании были выявлены патогенетические механизмы нарушения соотношения процессов пролиферации и апоптоза, обуславливающих развитие различных типов миомы матки и лейомиосаркомы, а так же установлена степень значимости снижения естественной убыли числа клеток в результате апоптоза и усиления клеточной пролиферации для роста узлов и распространения опухолевого процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян А.Р. Некоторые патофизиологические основы миомы матки: Автореф. дис. канд. мед. наук. – Ереван, 1992.
2. Билич Г., Катинас Г.С., Назарова Л. В. Цитология. – СПб: Деан, 1999. – 112 с.
3. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии. – Л.: Медицина, 1989. – 464 с.
4. Вишневская Е.Е., Бохман Я.В. Ошибки в онкогинекологической практике. Минск.: Выш. шк, 1994. – 288 с.
5. Новиков В. С. Программированная клеточная гибель. – СПб.: Наука, 1996. – 276 с.

6. Пальцев М.А., Демура С.А., Коган Е.А. и др. Роль bcl-2, вах, вак в процессах спонтанного апоптоза и пролиферации в нейроэндокринных опухолях легких // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2000. – Т. 130, №7. – С. 98-101.

7. Banda N., Bernier J. // J. Exp. Med. – 1992. – Vol.38. – P. 252-256.

8. Cohen J. // Immunology Today. – 1993. – Vol.14. – P. 126-130.

9. Erola A.K., Rainio P. et al. // J. Pathol. – 1997. – Vol.181. – P.172-177.

10. Gavrieli Y., Sherman Y. // Cell. Biol. – 1992. – Vol.119. – P. 493-501.

11. Geng Y., Libby P. // Amer. J. Pathol. – 1995. – Vol.147. – P. 251-266.

12. Han D., Hong M. // Amer. J. Pathol. – 1995. – Vol.147. – P. 267-277.

13. James T. // Circulation. – 1994. – Vol.90. – P. 556-573.

14. Kumar S., Kinoshita M., Noda M. et al. Induction of apoptosis by the mouse Ned2 gene., which encodes a protein similar to the product of the C. Elegans cell death gene ced-3 and the mammalian IL-1b-converting enzyme // Genes Dev. – 1994. – Vol.8. – P. 1613-1626.

15. Schwarts S., Bennet M. // Amer. J. Pathol. – 1995. – Vol.147. – P. 229-234.

16. Vayssiere J., Petit P., Risler Y. // Prog. Nat. Acad. Sc. USA. – 1994. – Vol.91. – P. 11752-11756.

17. Wyllie A. // J. Pathol. – 1987. – Vol.153. – P. 313-316.

THE ROLE OF APOPTOSIS AND CELL PROLIFERATION IN THE PATHOGENESIS OF UTERUS SMOOTH MUSCLE TUMORS

I.S.Sidorova, O.V.Ruzhova, A.B.Repin

Programmed cell death (apoptosis) and cell proliferation is impotent factors in pathogenesis of tumors. Apoptosis and cell proliferation were studied in human leiomyomas, myometrium and leiomyosarcomas. Expression of Ki-67, Bax, Bcl-xL was analyzed by immunohistochemistry. Determine difference in apoptosis and proliferation in tissues.