

УДК 616.14-006.363.04:577.217.348-03-07-091

**ЛЕЙОМИОСАРКОМА ТЕЛА МАТКИ С БОЛЬШИМ
КОЛИЧЕСТВОМ МНОГОЯДЕРНЫХ КЛЕТОК:
КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ, ПРОГНОЗ И ПРОБЛЕМЫ КЛАССИФИКАЦИИ**

Авдалян А.М., Бобров И.П., Климачев В.В., Круглова Н.М., Лазарев А.Ф.

Алтайский филиал РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул,

e-mail: ashot_avdalyan@mail.ru;

Алтайский медицинский университет, Барнаул, e-mail: patholo-gy_agmu@mail.ru

Авторами на материале 198 случаев злокачественных гладкомышечных опухолей тела матки были проанализированы различные гистологические типы лейомиосаркомы (ЛМС). Было выявлено, что в 19,7% случаев ЛМС отмечены структуры, содержащие большое количество многоядерных клеток. Авторы выявили, что такие ЛМС обладали значимо отличными от других типов ЛМС молекулярно-биологическими характеристиками со своими особенностями ангиогенеза и архитектоники сосудов, высокой экспрессией Ki-67, BrdU-метки, p53, амплификацией аргирофильных белков области ядрышковых организаторов, высокими морфоденситометрическими параметрами, метаболической активностью с инверсией «дыхательного ансамбля», высокой активностью фермента – гиразы TopoIIa, чаще негативным рецепторным статусом и частой ядерной транслокацией молекулярного шаперона HSP70, а также вызывали крайне неблагоприятный исход заболевания.

Ключевые слова: лейомиосаркома матки, многоядерные клетки, молекулярно-биологические характеристики

**UTERINE LEIOMYOSARCOMA WITH A LARGE NUMBER OF MULTINUCLEATED
CELLS: CLINICOPATHOLOGIC AND BIOMOLECULAR CHARACTERISTICS,
PROGNOSIS AND CLASSIFICATION PROBLEMS**

Avdalyan A.M., Bobrov I.P., Klimatchev V.V., Kruglova N.M., Lazarev A.F.

Altai branch of ROSC N.N. Blochin, RAMS, Barnaul, e-mail: ashot_avdalyan@mail.ru;

Altai medical university, Barnaul, e-mail: pathology_agmu@mail.ru

The authors have analyzed various histological types of the leiomyosarcoma (LMS) on the basis of 198 cases of plain-muscle malignant tumors of the body of uterus. The studies have shown that in 19,7% of LMS cases there were detected structures containing large numbers of multinucleated cells. The authors have discovered that the molecular and biological characteristics of such LMS considerably differed from other LMS types, having their own particularities in angiogenesis and vessels architectonics, high expression of Ki-67, BrdU-marker, p53, amplification of argyrophilous proteins in the areas of nucleolar organizers, high morphodensitometric indices, metabolic activity with inversion of «breathing ensemble», high activity of ferment, gyrase TopoIIa, and predominantly negative receptor status and frequent nuclear translocation of molecular chaperone HSP70 and extremely negative disease outcome.

Keywords: Uterine leiomyosarcoma, multinucleated cells, molecular and biological characteristics

Злокачественные новообразования мягких тканей остаются одним из самых сложных разделов онкологии, как в диагностике, так и прогнозировании течения заболевания [1]. Одной из редких локализаций злокачественных неоплазий этой группы является лейомиосаркома (ЛМС) тела матки, хотя из всех неэпителиальных опухолей она встречается значительно чаще – в 25–60% [2; 3]. В целом, ЛМС составляет 1–1,3% злокачественных новообразований матки [4] и 25–60% сарком матки [5]. При этом ряд авторов считает, что данная опухоль практически нечувствительна к химио- и лучевой терапии [6; 7] и причины остаются неизвестными. Следует отметить, что, с точки зрения гистологических вариантов, опухоли ЛМС – достаточно гетерогенная группа, включающая в себя наиболее часто встречающиеся формы – веретенноклеточный и эпителиоидноклеточный вариан-

ты [8]. В редких случаях выделяют и еще один вариант опухоли – миксоидную [9]. Вместе с тем достаточно часто патолог стелкивается с ЛМС тела матки, одним из компонентов которой являются многоядерные клетки, причем иногда охватывающие значительный объем опухоли. Безусловно, многоядерные клетки в мезенхимальных злокачественных опухолях – явление достаточно частое и может входить в понятие опухолевого полиморфизма, но регулярность встречаемости таких типов опухоли позволяет рассмотреть их отдельно. Однако отсутствие соответствующей рубрики в классификации ВОЗ не позволяло до настоящего времени оценить клинико-морфологические характеристики и особенности экспрессии биомолекулярных маркеров в опухолях такого типа.

Цель исследования, исходя из вышеизложенного, – определить клинико-морфо-

логические и молекулярно-биологические характеристики ЛМС тела матки с большим количеством многоядерных клеток в своем составе и прогноз больных с таким типом неоплазии.

Материалы и методы исследования

В исследование включили 198 лейомиосарком, удаленных по поводу быстрорастущей опухоли тела за период 1996–2008 годов в Алтайском крае. Изучению подвергали образцы опухоли (центр и периферия), исследовали неизмененный миометрий перитуморозной зоны (не более 0,5–1 см от опухоли). С точки зрения клинико-морфологических данных, оценивали состояние репродуктивной функции, возраст больных лейомиосаркомой, размер и локализацию образования, количество неоплазий в теле матки. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, железным гематоксилином по Гейнденгайну, пикрофуксином по Ван-Гизону. Параллельно гистологические срезы окрашивали нитратом серебра по методу Howell W.M. и Black D.A., 1980 в модификации Боброва И.П. и соавт., 2002 для определения активности аргирофильных белков области ядрышкового организатора (AgNOR). Для исследования НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ на замораживающем микротоме готовили срезы толщиной 10–15 мкм, наклеивали на стекло и инкубировали в субстрате соответствующего фермента: НАДН2-диафараза (IUBMB 1.6.99.1), сукцинатдегидрогеназа СДГ (IUBMB 1.3.99.1) и лактатдегидрогеназа ЛДГ (IUBMB 1.1.1.27). Ядра докрашивали 0,1%-м водным раствором нильского голубого. Активность ферментов в гладкомышечных клетках оценивали количественным методом Нарциссова Р.П., основанным на подсчете образованных в клетке видимых гранул формазана, при использовании п-нитротетразолия фиолетового. Микроциркуляторное русло с целью исследования особенностей архитектоники изучали на свежемороженых нефиксированных срезах опухоли толщиной 30–40 мкм, окрашенных на щелочную фосфатазу по Гомори ЩФ (IUBMB 3.1.3.1). Морфоденситометрические особенности клеток опухоли (плоидность и площадь ядер) выявляли на срезах, окрашенных по Фельгену. При определении гистограмм плоидности за эталон 2с принимали малый тканевой лимфоцит. Использовали иммуногистохимический способ с полимерной системой визуализации BioGenex Super Sensitive Polymer-HRP Detection System/DAB. Для дифференциальной диагностики использовали панель, состоящую из виментина, десмина, гладкомышечного актина и CD68, а опухоль считали гладкомышечного гистогенеза при умеренной либо выраженной цитоплазматической позитивной реакции к SMA α . Плотность сосудов микроциркуляторного русла (ПМЦР) оценивали на позитивно окрашенном эндотелии CD31 на 2 мм². Пролиферативную активность оценивали по уровню экспрессии Ki-67 (клон MIB-1), количество клеток в S-фазе оценивали по BrdU-метке: для предобработки использовали раствор BrdU (Sigma B 5002,7 mg/ml saline; Sigma), который вводили в маточную артерию и инкубировали при температуре 37 °C 24 часа. Далее, вместо предобработки 2M HCL и последующим использованием протеазы по Harms G. et al., 1986 мы использовали обработку в цитратном буфере с pH 6.0 в модификации Tang X. et al., 2007 [10]. Оценивали

экспрессию белков-регуляторов апоптоза Bcl-2 (клон МКА 124) и p53 (клон DO-7). Определяли активность фермента-гиразы Topoisomerase II α (клон Ki-S). Оценивали локализацию молекулярного шаперона HSP70 (клон W27) в клетке и оценивали рецепторный статус неоплазии по экспрессии рецепторов прогестерона (клон PgR636) и эстрогена α (1D5) по методике согласно ER/PR pharmDx. Оценивали экспрессию коллагена общего типа. Для оценки полученных результатов использовали компьютерный анализатор с программой Image Tool 3.0 и Image J в автоматическом и ручном режимах просчета – количество коллагена в процентном соотношении, площадь и плоидность и количество аргирофильных гранул в ядре клетки (кариоплазматический и нуклеолярные кластеры). Прогноз оценивали, исследуя 10-летнюю выживаемость по Каплан-Мейеру, проводили многофакторный регрессионный анализ по Коксу. Статистическую обработку проводили при помощи программы Statistica 6.0, корреляцию определяли по Пирсону.

Результаты исследования и их обсуждение

Лейомиосаркома с большим количеством многоядерных клеток (ЛМСБКМ) наиболее часто выглядела как веретенклеточная гладкомышечная опухоль со всеми светооптическими признаками злокачественности и с широкими полями многоядерных клеток, занимающих не менее 10% от общих структур (рис. 1). В случаях с высокой степенью опухолевой анаплазии на светооптическом уровне такие компоненты опухоли было невозможно отличить от фиброзной гистиоцитомы либо гигантоклеточной опухоли, что требовало ИГХ диагностики с, как правило, отрицательной реакцией к CD68 и позитивной к SMA (рис. 2, 3). Реже такие структуры встретились нам в эпителиоидных ЛМС тела матки. Поскольку неоплазия с такого типа структурами в большей степени регистрировалась в веретенклеточных саркомах, то в последующем сравнение параметров проводили именно с ней. Веретенклеточная лейомиосаркома (ЛМСВ) встретилась нам в 57,6% случаев, а ЛМСБКМ – в 19,7% случаев, что было относительно частым показателем. Средний возраст больных ЛМСВ составил $52,3 \pm 0,9$, а ЛМСБКМ – $54,2 \pm 1,6$, различия статистически незначимы. В 52,7% случаев больные с ЛМСВ были менопаузального возраста, а ЛМСБКМ в период менопаузы была отмечена в 46,1%, что также было сопоставимо. Не было выявлено отличий и в размере неоплазии. Локализация также не имела особенностей при опухолях обоого типа.

Наибольшие различия были выявлены при исследовании биомолекулярных характеристик неоплазии. Избыточная продукция внеклеточного матрикса в виде коллагена общего типа при ЛМСВ была характерна для $5,3\% \pm 2,5$ случаев, а для ЛМСБКМ – в $23,2\% \pm 6,7$ случаев, $p \leq 0,05$.

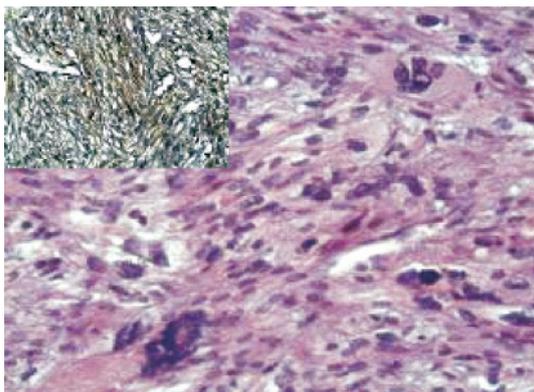


Рис. 1. Лейомиосаркома с большим количеством многоядерных клеток, степень злокачественности G1. Окраска гематоксилин и эозин; ув. x200; в левом верхнем углу позитивная иммуногистохимическая реакция к SMA

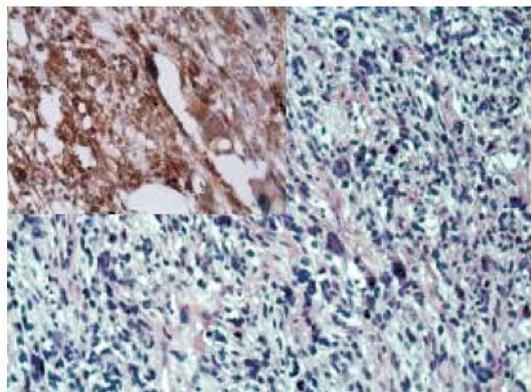


Рис. 2. Лейомиосаркома с большим количеством многоядерных клеток, степень злокачественности G2. Окраска гематоксилин и эозин; ув. x100; в левом верхнем углу позитивная иммуногистохимическая реакция к SMA

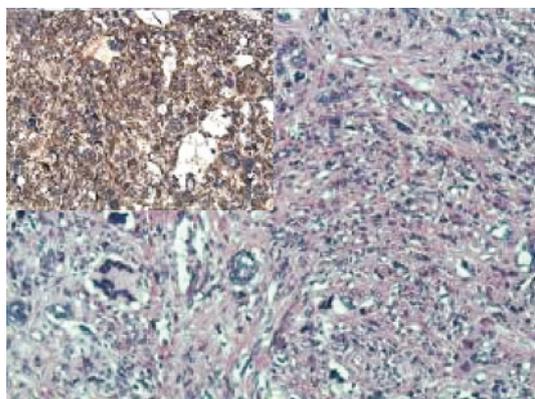


Рис. 3. Лейомиосаркома с большим количеством многоядерных клеток, степень злокачественности G3. Сложно дифференцировать с фиброзной гистиоцитомой. Окраска гематоксилин и эозин; ув. x200; в левом верхнем углу позитивная иммуногистохимическая реакция к SMA

Практически в 69,2%±9 случаев ЛМСБКМ характеризовалась небольшим содержанием коллагена. Метаболическая активность ЛМСБКМ по уровню общего метаболизма была значимо выше, чем в саркомах другого типа, и составила 173,3 ± 5,6 гранулы НАДН2-диафоразы, причем за счет усиления обоих типов метаболизма с усилением ЛДГ и СДГ (инверсия метаболического профиля). При исследовании микроциркуляторного русла, по данным контрастного компьютерного анализа, ЛМСБКМ характеризовались интенсивным окрашиванием эндотелия сосудов на щелочную фосфатазу и наличием множества истинных капиллярных – сосудисто петель вне зон некроза. Кроме того, в большинстве случаев отме-

чали незавершенность строения некоторых петель и большое количество растущих новообразованных капилляров в зоне свободной от некротических изменений. Простая веретенчатая ЛМС была с более завершенным ангиогенезом с преобладанием сосудов модульного типа и небольшим количеством петель и анастомозов. ПМЦР ЛМСБКМ составила 71,4 ± 2,1 на 2 мм², а при ЛМСВ ПМЦР была значимо меньше – 60,4 ± 1,9. При анализе морфоденситометрических характеристик образований обоих типов были получены данные, показывающие значимые различия: при веретенчатой ЛМС площадь ядер была 82,2 ± 1,9 мкм², а плоидность – 8,6с ± 0,2. В то же время параметры ЛМСБКМ были значимо выше – площадь ядер была 108,7 ± 6,5 мкм², а плоидность – 12,4с ± 0,7. Количество AgNOR также было значимо выше в ЛМСБКМ, чем в ЛМСВ (30,5 ± 4,1 и 19,8 ± 0,7 соответственно) за счет обоих типов кластеров гранул. Пролиферативная активность имела отличия с большим индексом Ki-67 в ЛМСВ (24,6% ± 2,5 и 16,5% ± 2,1 соответственно). Вместе с тем количество клеток с гиперэкспрессией белка было выше в ЛМСБКМ (60,2% ± 3,2 и 45,7% ± 2,2 соотв.). Количество клеток в S-фазе цикла по данным BrdU-метки, было выше в ЛМСБКМ (6,8% ± 0,1 и 4,9% ± 0,07 соответственно). Активность Vcl-2 была практически одинаковой при всех гистологических типах ЛМС и варьировала от 78 до 81%. Вместе с тем степень экспрессии значимо варьировала и при ЛМСВ низкую степень отмечали в 21,4% ± 4,4, а при ЛМСБКМ всего в 9,1% ± 5 (p ≤ 0,05). Активность белка-активатора апоптоза p53 так же, как и Vcl-2, значимо не различа-

Сравнительные молекулярно-биологические характеристики лейомиосаркомы тела матки и 10-летняя выживаемость при гистологической форме веретенчатой лейомиосаркомы и с большим количеством многоядерных клеток

Исследуемый маркер		Тип опухоли		Различия (p)
		ЛМСВ	ЛМСБКМ	
ВКМ (+++)		5,3% ± 2,5*	23,2% ± 6,7	p = 0,0002
Метаболизм	НАДН2	140,5 ± 3,1*	173,3 ± 5,6	p = 0,02
	СДГ	57,9 ± 1,9*	69,6 ± 2,5	
	ЛДГ	29,5 ± 1,1*	34,8 ± 2,7	
ПМЦР (CD31)		60,4 ± 1,9*	71,4 ± 2,1	p = 0,003
Морфо денситометрия	Площадь (мкм ²)	82,2 ± 1,9*	108,7 ± 6,5	p = 0,004
	Плоидность (с)	8,6с ± 0,2*	12,4 ± 0,7	
AgNOR (нуклеоларный кластер)		19,8 ± 0,7*	30,5 ± 4,1	p = 0,0006
Ki-67		16,5% ± 2,1*	24,6% ± 2,5	p = 0,01
BrdU-метка		4,9% ± 0,07*	6,8% ± 0,1	p = 0,04
Bcl-2		21,4% ± 4,4*	9,1% ± 5	p = 0,00002
p53		20% ± 3,4	28,5% ± 5,2	p = 0,05
Топоизомеразы IIα		13,1% ± 2,6*	23,1% ± 2,9	p = 0,0008
Транслокация HSP70		50% ± 10,2	42,4% ± 7,4	p = 0,2
Рецепторный статус		52,6% ± 4,6*	38,4% ± 8,1	p = 0,01
10-летняя выживаемость		66,7% ± 6,4*	9,1% ± 5	p = 0,0000001

Примечание: знаком * отмечены значимые различия при $p \leq 0,05$.

лась между гистологическими вариантами ЛМС, но степень экспрессии также была сопоставима при различных типах ЛМС. Активность и степень экспрессии фермента-гиразы ТопоIIα была значимо выше при ЛМСБКМ, чем при ЛМСВ – 23,1% ± 2,9 и 13,1% ± 2,6 соответственно по уровню активности. Клеток с выраженной степенью экспрессии фермента было также больше при ЛМСБКМ – 61,5% ± 8,9 и 37,2% ± 4,9 соотв. Активность и ядерная транслокация

HSP70 не были связаны с гистологическим типом саркомы. Веретенчатая ЛМС была чаще позитивнее по отношению к рецепторам прогестерона и эстрогена, чем ЛМСБКМ – 52,6% ± 4,6 и 38,4% ± 8,1. Анализ выживаемости показал, что в группах ЛМС всех типов стадии I–II прогноз был наиболее неблагоприятен при ЛМСБКМ – до 10 лет дожили 9,1% ± 5 больных, а при ЛМСВ – 66,7% ± 6,4, что было значимо лучшим показателем (таблица, рис. 4).

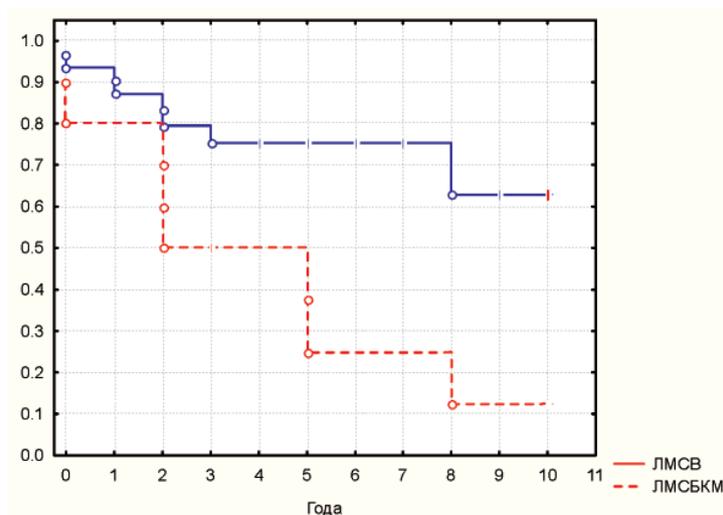


Рис. 4. Зависимость кумулятивной выживаемости от гистологического типа по Каплан-Мейеру

Заключение. Таким образом, полученные результаты в виде значимых отличий в патоморфологических и молекулярно-биологических параметрах лейомиосаркомы с большим количеством многоядерных клеток и значимо неблагоприятным прогнозом по отношению к другим типам гладкомышечных злокачественных неоплазий этой локализации требуют отдельной констатации в патологанатомическом заключении и в целом могут позволить выделить этот тип лейомиосаркомы в отдельную классификационную рубрику.

Список литературы

1. Франк Г.А. Проблемы морфологической классификации и диагностики опухолей мягких тканей // Практическая онкология. – 2004. – Т. 5, №4. – С. 231–236.
2. Norris H.J., Zaloudek C.J. Mesenchymal tumors of the uterus. In: Blaustein A. editor. Pathology of the female genital tract. 2nd ed. New York. Springer – Verlag Books; 1982. – P. 352–392.
3. Harry V.N., Narayansingh G.V., Parkin D.E. Uterine leiomyosarcomas: a review of the diagnostic and therapeutic pitfalls // Obstet. and Gynecol. – 2007. – №9. – P. 88–94.
4. Giuntoli R.L., Metzinger D.S., DiMarco C.S., Cha S.S., Sloan J.A., Keeney G.L., Goustaut B.S. Retrospective review of 208 patients with leiomyosarcoma of the uterus: prognostic indicators, surgical management, and adjuvant therapy // Gynecol. oncol. – 2003. – Vol. 89, №3. – P. 460 – 469.
5. Robboy J., Bentley C., Butnor K, Anderson C. Pathology and Pathophysiology of Uterine Smooth-Muscle Tumors // *En. Health Perspectives Suppl.* – 2000. – Vol. 108, №S5. – P. 779–784.
6. Dinh T.A., Oliva E.A., Fuller A.F., Lee H., Goodman A. The treatment of uterine leiomyosarcoma. Result from a 10-year experience (1990 – 1999) at the Massachusetts General Hospital // *Gynecol. Oncol.* – 2004. – Vol. 92, №2. – P. 648–652.
7. Ghaemmaghami F., Zarchi M.K., Gilani M.M., Mousavi A., Behtash N., Chasemi M. Uterine sarcoma: clinicopathological characteristics, treatment and outcome in Iran // *Asian pacific J. cancer prev.* – 2008. – №9. – P. 421–426.
8. Silva E.C., Bodurka D.C., Scouros M.A., Ayala A.A. uterine leiomyosarcoma that became positive for HMB45 in the metastasis // *Ann. Diagn. Pathol.* – 2005. – №1. –P. 43–45.
9. Vigone A., Giana M., Surico D., Leutner M., Surico N. Massive myxoid leiomyosarcoma of the uterus // *Int. Gynecol. Cancer.* – 2005. – Vol. 15, № 3. – P. 564–567.
10. Tang X., Douglas L. Fal., Li X., Lane T., Luskin M.B. Antigen-Retrieval Procedure for Bromodeoxyuridine Immunolabeling with Concurrent Labeling of Nuclear DNA and Antigens Damaged by HCl Pretreatment // *J. of Neuroscience.* – 2007. – Vol. 27(22). – P. 5837–5844.

Рецензенты:

Лепилов А.В., д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии с секционным курсом ГОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул;

Талалаев С.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой гистологии ГОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул.