

<https://doi.org/10.29296/25877305-2021-09-16>

Экспрессия сигнальных молекул (p53, коллаген II типа, VEGF и VEGFR) в биоптатах интактного миометрия у женщин разного возраста

А.И. Шаповалова¹,В.О. Полякова^{2,3}, доктор биологических наук, профессор, профессор РАН,Т.С. Клейменова², кандидат биологических наук¹Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России³Белгородский государственный национальный исследовательский университет

E-mail: vopol@yandex.ru

Цель исследования. Изучить корреляцию экспрессии маркеров p53, коллагена II типа, VEGF и VEGFR в биоптатах интактного миометрия у женщин разных возрастных групп.

Материал и методы. В исследование включены 90 пациенток в возрасте от 23 до 47 лет, которые были рандомизированы на 6 групп. В первые 3 группы вошли 45 практически здоровых женщин, в 4-ю, 5-ю и 6-ю группы – женщины с диагностированной миомой матки. У пациенток подтверждено наличие двух диаметрально противоположных вариантов развития миоматозных узлов в репродуктивном возрасте – простая миома и пролиферирующая миома, с преобладанием последнего варианта. Материал проанализирован иммунофлуоресцентным и морфометрическим анализом на экспрессию белка p53, коллагена II типа, VEGF и VEGFR.

Результаты. Средняя относительная площадь уровня экспрессии p53 была ниже во всех трех возрастных группах по сравнению с группой контроля. Уровень VEGF оказался достоверно выше у женщин с пролиферирующими миомами, что свидетельствует об усилении процесса неоангиогенеза в активных миомах матки у женщин более молодого возраста. Уровень коллагена II типа был выше во всех возрастных группах у пациенток с миомой матки.

Заключение. Выявленные особенности пролиферации, апоптоза и неоангиогенеза позволяют считать изученные сигнальные молекулы потенциальными мишенями и открывают новые перспективы патогенетически обоснованной терапии миомы матки, заключающейся в разработке препаратов, способствующих ингибированию процессов пролиферации, неоангиогенеза и стимулированию апоптоза. Можно предположить, что группа препаратов, способная регулировать метаболизм изученных сигнальных молекул, займет важное место в консервативном лечении на начальном этапе развития миоматозных узлов у женщин молодого возраста.

Ключевые слова: онкология, гинекология, миома матки, апоптоз, пролиферация, ангиогенез, факторы роста.

Для цитирования: Шаповалова А.И., Полякова В.О., Клейменова Т.С. Экспрессия сигнальных молекул – p53, коллагена II типа, VEGF и VEGFR в биоптатах интактного миометрия у женщин разного возраста. Врач. 2021; 32 (9): 76–79. <https://doi.org/10.29296/25877305-2021-09-16>

Миомы (лейомиомы) – наиболее часто встречающиеся доброкачественные опухоли женских половых органов; они диагностируются приблизительно у 70% всех женщин старше 30 лет [1]. Данный диагноз может быть установлен в 5–77% случаев в зависимости от методов диагностики [2]. По данным литературы известно, что миомы матки распространены у афроамериканских женщин, нерожавших женщин, среди пациенток, страдающих ожирением, а также с миомой матки в семейном анамнезе [3–5]. Кроме того, предполагается, что приблизительно у 40–60% женщин гистерэктомия выполняется из-за развития миом матки [6]. Фактическую распространенность данной нозологии определить достаточно трудно, так как часто наличие лейомиомы матки не сопровождается клиническими проявлениями [7]. В большинстве случаев (80%) лейомиомы матки протекают бессимптомно, если же они проявляются, то это отрицательно влияет на качество жизни женщин [8].

В настоящее время в качестве прогностических факторов для оценки формирования несостоятельного рубца рассматривается экспрессия маркеров апоптоза и пролиферации (p53, PCNA), коллагена II типа, маркеров ангиогенеза (фактор роста эндотелия сосудов – VEGF, рецептор VEGF – VEGFR) в тканях интактного миометрия, полученных при миомэктомии.

Известно, что p53 – белок клеточного цикла, функционирующий как супрессор роста клеток. Результаты исследований экспрессии p53 в гладкомышечных опухолях матки противоречивы. В одних исследованиях [9] описывается высокая экспрессия p53 в атипичных лейомиомах. Однако в других публикациях [10] в образцах лейомиом (типичных и атипичных) верифицирована слабая экспрессия p53.

Рубцы являются результатом синтеза и деградации внеклеточного матрикса. В этом процессе участвуют факторы роста, а также протеолитические ферменты, такие как эластаза и коллагеназа [11].

Во многих исследованиях говорится об изменении количества коллагена в лейомиомах [12–14], также сообщается о снижении размера клеток, увеличении плотности клеток и коллагеновых фибрилл в лейомиомах [15].

VEGF является важным маркером для определения степени васкуляризации как конкретного участка ткани, так и оценки степени васкуляризации рубцов. В исследовании D. Plewka и соавт. (2016) показана повышенная экспрессия VEGF-A как в малых, так и в крупных миомах, что может быть признаком усиленного ангиогенеза и интенсивного роста опухоли. Возможно, высокая экспрессия VEGF-A и VEGF-R1 в больших миомах может провоцировать злокачественную трансформацию [16].

Несмотря на приведенные данные, роль апоптоза и факторов роста в патогенезе миомы матки у женщин

разного репродуктивного возраста изучена недостаточно.

Цель исследования – изучить корреляцию экспрессии маркеров p53, коллагена II типа, VEGF и VEGFR в биоптатах интактного миометрия у женщин разных возрастных групп.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось в отделении оперативной гинекологии с операционным блоком ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» («НИИ АГиР им. Д.О. Отта») (Санкт-Петербург). Всем пациенткам проведен комплекс диагностических мероприятий: сбор анамнестических данных, клинико-гинекологическое обследование, эхография (УЗИ с трансабдоминальным, трансвагинальным датчиком с цветным доплеровским картированием – ЦДК), эндоскопия (гистероскопия, лапароскопия), гистологическое исследование соскобов и макропрепаратов, удаленных во время операций.

Материал для иммунофлуоресцентного исследования получен методом трепан-биопсии интактного миометрия в зоне, прилежащей к миоматозному узлу, во время лапароскопической миомэктомии у женщин в возрасте от 23 до 47 лет. В контрольной группе при диагностической лапароскопии брали биоптаты миометрия. Операция проводилась в 1-ю фазу менструального цикла. Весь материал разделен на 6 групп (см. таблицу). Изучались 3 возрастных группы: ранний (20–29 лет), средний (30–39 лет) и поздний (40–49 лет) репродуктивный возраст. Работа одобрена этическим комитетом (ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», Протокол от 19.10.2017 №33/4); все пациентки подписали информированного согласия на участие в исследовании.

Для иммунофлуоресцентного исследования использовали первичные моноклональные антитела к p53 (1:50, Dako), коллагену II типа (1:400, Abcam), VEGF (1:50, Dako) и VEGFR (1:100, Abcam). В качестве вторичных антител использовали AlexaFlour 647 (1:1000, Abcam), ядра докрасивали DAPI (1:100, Applichem). Иммунофлуоресцентное исследование и морфометрический анализ проводили с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FV1000. В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении $\times 200$ и $\times 400$. Площадь экспрессии, выраженную в процентах, и оптическую плотность оценивали на системе компьютерного анализа микроскопических изображений «Видеотест-Морфология 5.0».

Статистическая обработка проводилась в программе Excel 2010, Microsoft Office и в аналитической программе Statistica 10.0. Описательная статистика включала в себя расчет медиан и квартилей (так как распределение не является нормальным). В связи с небольшой выбор-

кой и отсутствием нормального распределения использован U-критерий Манна–Уитни, с помощью которого попарно сравнены выборки показателей относительной площади экспрессии и оптической плотностью для всех подгрупп. Значение $p < 0,017$ принято как статистически значимое (с учетом поправки Бонферрони).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании выявлено, что средняя относительная площадь уровня экспрессии p53 была ниже во всех трех группах пациенток с миомой матки по сравнению с группами контроля того же возраста: 20–29 лет – соответственно $4,2 \pm 0,3$ и $4,7 \pm 0,2\%$; 30–39 лет – соответственно $3,8 \pm 0,2$ и $5,2 \pm 0,5\%$; 40–49 лет – соответственно $3,1 \pm 0,2$ и $6,2 \pm 0,4\%$. Тем не менее, коэффициент Спирмана между возрастом женщин и относительной площадью экспрессии p53 составил 0,8 ($r=0,8$), что указывает на наличие высокой корреляции. Увеличение экспрессии маркера p53 в биоптатах интактного миометрия с возрастом подтверждается данными корреляционного анализа и может отражать увеличение риска несостоятельности рубца на матке после консервативной миомэктомии.

В узлах миомы матки VEGF обнаружен не только в эндотелии микрососудов, но и в отдельных клетках сосудистой стенки и периваскулярной ткани. Кроме того, экспрессию VEGF выявляли в эндотелии сосудов миометрия.

Уровень VEGF оказался статистически достоверно ($p < 0,017$) выше в пролиферирующих миомах у женщин 4-й, 5-й и 6-й групп:

- ранний репродуктивный возраст (20–29 лет) – в 1-й группе (контроль) – $12,3 \pm 1,4\%$, в 4-й – $17,5 \pm 1,2\%$;
- средний репродуктивный возраст (30–39 лет) – во 2-й группе (контроль) – $14,3 \pm 1,7\%$, в 5-й – $18,4 \pm 2,1\%$;
- поздний репродуктивный возраст (40–49 лет) – в 3-й группе (контроль) – $16,2 \pm 0,7\%$, в 6-й – $19,2 \pm 1,8\%$.

Это свидетельствует об усилении процесса неоангиогенеза в активных миомах матки у женщин более молодого возраста.

Группы исследования Study groups		
Группа исследования	Выборка	Возраст, лет
1-я (контрольная)	n=20	20–29
2-я (контрольная)	n=15	30–39
3-я (контрольная)	n=10	40–49
4-я (пациентки с миомой матки)	n=20	20–29
5-я (пациентки с миомой матки)	n=15	30–39
6-я (пациентки с миомой матки)	n=10	40–49

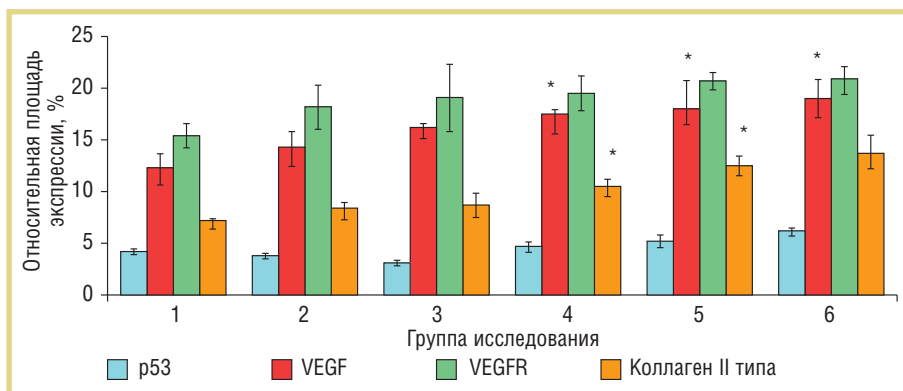


Диаграмма относительной площади экспрессии маркеров p53, коллаген II типа, VEGF и VEGFR в исследуемых группах.

Примечание. * – $p < 0,017$.

Diagram of the relative expression area of the markers p53, collagen type II, VEGF, and VEGFR in the examined groups.

Note. * $p < 0.017$.

этапе развития миоматозных узлов у женщин молодого возраста. Данное исследование поможет повысить уровень здоровья женщин разного репродуктивного возраста, так как миома матки оказывает значительное влияние на качество жизни.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование не имело финансовой поддержки.

Литература/Reference

1. Reis F.M., Bloise E., Ortiga-Carvalho T.M. Hormones and pathogenesis of uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2016; 34: 13–24. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2015.11.015
2. Sparic R., Mirkovic L., Malvasi A. et al. Epidemiology of Uterine Myomas: A Review. *Int J Fertil Steril.* 2016; 9 (4): 424–35. DOI: 10.22074/ijfs.2015.4599
3. Wise L.A., Palmer J.R., Stewart E.A. et al. Age-specific incidence rates for self-reported uterine leiomyomata in the Black Women’s Health Study. *Obstet Gynecol.* 2005; 105 (3): 563–8. DOI: 10.1097/01.AOG.0000154161.03418.e3
4. Taran F.A., Wallwiener M., Kabashi D. et al. Clinical characteristics indicating adenomyosis at the time of hysterectomy: a retrospective study in 291 patients. *Arch Gynecol Obstet.* 2012; 285 (6): 1571–6. DOI: 10.1007/s00404-011-2180-7
5. Fernandez H., Capmas P., Lucot J.P. et al.; GROG. Fertility after ectopic pregnancy: the DEMETER randomized trial. *Hum Reprod.* 2013; 28 (5): 1247–53. DOI: 10.1093/humrep/det037
6. Fleischer R., Weston G.C., Vollenhoven B.J. et al. Pathophysiology of fibroid disease: angiogenesis and regulation of smooth muscle proliferation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008; 22 (4): 603–14. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2008.01.005
7. Стрижакова М.А., Панов В.О., Уварова Е.В. и др. Магнитно-резонансная томография: возможности исследования органов мочеполовой системы у девочек с пороками развития и объемными образованиями внутренних гениталий. *Репродуктивное здоровье детей и подростков.* 2005; 1: 44–52 [Strizhakova M.A., Panov V.O., Uvarova E.V. et al. Magnetic resonance imaging: the possibilities of studying the organs of the genitourinary system in girls with malformations and volumetric formations of the internal genitals. *Reproductive health of children and adolescents.* 2005; 1: 44–52 (in Russ.)].
8. Downes E., Sikirica V., Gilabert-Estelles J. et al. The burden of uterine fibroids in five European countries. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010; 152 (1): 96–102. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2010.05.012
9. Stănescu A.D., Nistor E., Sajin M. et al. Immunohistochemical analysis in the diagnosis of uterine myometrial smooth muscle tumors. *Rom J Morphol Embryol.* 2014; 55 (3 Suppl): 1129–36.
10. Hewedi I.H., Radwan N.A., Shash L.S. Diagnostic value of progesterone receptor and p53 expression in uterine smooth muscle tumors. *Diagn Pathol.* 2012; 7: 1. DOI: 10.1186/1746-1596-7-1
11. Czarkowska-Paczek B., Przybylski J. Mechanizmy gojenia uszkodzonych tkanek [Mechanisms of tissue repair]. *Przegl Lek.* 2004; 61 (1): 39–42.
12. Iwahashi M., Muragaki Y. Increased type I and V collagen expression in uterine leiomyomas during the menstrual cycle. *Fertil Steril.* 2011; 95 (6): 2137–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.12.028
13. Zbucka M., Miłtyk W., Bielawski T. et al. Mechanism of collagen biosynthesis up-regulation in cultured leiomyoma cells. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007; 45 (Suppl 1): S181–5.
14. Berto A.G., Sampaio L.O., Franco C.R. et al. A comparative analysis of structure and spatial distribution of decorin in human leiomyoma and normal myometrium. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1619 (1): 98–112. DOI: 10.1016/s0304-4165(02)00446-4

Схожие данные получены при изучении уровня VEGFR, однако они не являются статистически достоверными:

- ранний репродуктивный возраст (20–29 лет) – в 1-й группе (контроль) – $15,4 \pm 1,1\%$, в 4-й – $19,5 \pm 1,7\%$
- средний репродуктивный возраст (30–39 лет) – во 2-й группе (контроль) – $18,2 \pm 2,1\%$, в 5-й – $20,7 \pm 0,8\%$;
- поздний репродуктивный возраст (40–49 лет) – в 3-й группе (контроль) – $19,1 \pm 3,2\%$, в 6-й – $20,9 \pm 1,4\%$.

При исследовании коллагена II типа площадь экспрессии статистически достоверно различалась в группах среднего и позднего репродуктивного возраста (1-я группа – $7,2 \pm 0,4\%$, 4-я – $10,3 \pm 0,8\%$; 2-я – $8,4 \pm 0,7\%$, 5-я – $12,5 \pm 0,9\%$). В группе раннего репродуктивного возраста повышение экспрессии коллагена II было недостоверным: 3-я группа – $8,7 \pm 1,1\%$, 6-я – $13,7 \pm 1,6\%$. Снижение экспрессии маркера коллагена II типа у женщин с возрастом также свидетельствует о более высоком риске несостоятельности рубца на матке после миомэктомии. Полученные результаты продемонстрированы на рисунке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные особенности пролиферации, апоптоза и неоангиогенеза позволяют считать изученные сигнальные молекулы потенциальными мишенями и открывают новые перспективы патогенетически обоснованной терапии миомы матки, заключающейся в разработке препаратов, способствующих ингибированию процессов пролиферации, неоангиогенеза и стимулированию апоптоза. Можно предположить, что группа препаратов, способная регулировать метаболизм изученных сигнальных молекул, займет важное место в консервативном лечении на начальном

15. Chung Y.J., Chae B., Kwak S.H. et al. Comparison of the inhibitory effect of gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist, selective estrogen receptor modulator (SERM), antiprogestone on myoma cell proliferation *in vitro*. *Int J Med Sci.* 2014; 11 (3): 276–81. DOI: 10.7150/ijms.7627

16. Plewka D., Morek M., Bogunia E. et al. Expression of VEGF isoforms and their receptors in uterine myomas. *Ginekol Pol.* 2016; 87 (3): 166–77. DOI: 10.17772/gp/60979

EXPRESSION OF SIGNALING MOLECULES (P53, COLLAGEN TYPE II, VEGF AND VEGFR) IN BIOPTS OF INTACT MYOMETRY IN WOMEN OF DIFFERENT AGES

A. Shapovalova¹; Professor V. Polyakova^{2,3}, Doctor of Biological Sciences, Professor of the Russian Academy of Sciences; T. Kleimenova², Candidate of Biological Sciences

¹Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology

²Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Health of Russia

³Belgorod National Research University

The aim of the study. To study the correlation of expression of p53, type II collagen, VEGF and VEGFR in biopsy specimens of intact myometrium in women of different age groups.

Materials and methods. The study included 90 patients aged 23 to 47 years, who were randomized into 6 groups. The first three groups included 45 practically healthy patients, the fourth, fifth and sixth groups – women with diagnosed uterine myoma, as a result of which the presence of two diametrically opposite variants of the development of myoma nodes in reproductive age was confirmed – simple myoma and proliferating myoma, with the latter variant predominating. Immunofluorescence and morphometric analysis of p53 proteins, type II collagen, VEGF and VEGFR using Olympus FV1000.

Results. The average relative area of the p53 expression level was lower in all three age groups compared to the control group. The VEGF level turned out to be statistically significantly higher in proliferating fibroids in women, which indicated an intensification of the neoangiogenesis process in active uterine fibroids in younger women. The level of type II collagen was higher in all age groups in patients with uterine fibroids.

Conclusion. The revealed features of proliferation, apoptosis and neoangiogenesis indicate new aspects of pathogenetically substantiated therapy for uterine fibroids. It becomes possible to develop drugs that contribute to the inhibition of the processes of proliferation, neoangiogenesis and stimulation of apoptosis. Apparently, this group of drugs will occupy an important place in therapeutic agents for conservative treatment at the initial stage of the development of myomatous nodes in young women.

Key words: oncology, gynecology, leiomyomas, apoptosis, proliferation, angiogenesis, growth factors.

For citation: Shapovalova A., Polyakova V., Kleimenova T. Expression of signaling molecules (p53, collagen type II, VEGF and VEGFR) in biopts of intact myometry in women of different ages. *Vrach.* 2021; 32 (9): 76–79. <https://doi.org/10.29296/25877305-2021-09-16>

Региональная
онкологическая
информационная
система

ОНКОР

Полный контроль над онкологической ситуацией в регионе

- Единый цифровой контур в здравоохранении.
- Подсистема «Онкология» ГИС СЗ субъекта РФ.
- Полноценная и контролируемая интеграция с ВИМИС по профилю «Онкология».

✉ oncor.pro ✉ kov@oncor.pro ☎ +7 (902) 873 96 83, (343) 302 50 01