© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 618.14-006.36-091.8;577.21

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИОМЫ ТЕЛА МАТКИ ПО ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СТЕРОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, STS, SULT И PTEN

С.В. Шрамко[1], кандидат медицинских наук, **А.С. Лещенко**[2],
Е.П. Хвостова[3], кандидат биологических наук, **М.А. Сабанцев**[1],
Л.Г. Баженова[4], доктор медицинских наук, доцент,
Л.Ф. Гуляева[2, 3], доктор биологических наук, профессор

[1]Городская клиническая больница №1, Кемеровская область, Новокузнецк,
[2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск,
[3]Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск,
[4]Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей МЗ РФ, Новокузнецк
E-mail: ivanovakatysha@mail.ru

Миома тела матки является одной из наиболее распространенных доброкачественных опухолей женской репродуктивной системы. Так как эта патология в большинстве случаев является гормональнозависимой, нами был определен уровень экспрессии генов стероидных рецепторов ERs, PR, эстрогеновой сульфотрансферазы (SULT1E1), стероидной сульфатазы (STS) и тирозиновой фосфатазы (PTEN) в миоматозных узлах 33 женщин с помощью обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Выявлено достоверное увеличение уровня мРНК генов ERα, ERβ, PgR и гена PTEN в образцах пролиферирующей и непролиферирующей миомы матки, а также снижение экспрессии генов STS, PTEN и PgR в образцах миомы матки с сопутствующей гиперплазией и малигнизированной миомой.

Ключевые слова: *миома матки, эстрогеновые рецепторы, прогестероновый рецептор, стероидная сульфатаза, стероидная сульфотрансфераза, PTEN*

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF UTERINE LEIOMYOMA ACCORDING TO EXPRESSION OF GENES OF STEROID RECEPTORS, STS, SULT AND PTEN

S.V. Shramko[1], A.S. Leshchenko[2], E.P. Khvostova[3], M.A. Sabantsev[1], L.G. Bazhenova[4], L.F. Gulyaeva[2, 3]
[1]City Clinical Hospital № 1, Novokuznetsk
[2]Novosibirsk State University
[3]Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk
[4]Novokuznetsk Postgraduate Physician Institute

Leiomyoma is one of the most common benign tumors of the female reproductive system. As this pathology in most cases is hormone dependent, we determined the level of gene expression of steroid receptors ERs, PR, estrogen sulfotransferase SULT1E1, STS steroid sulphatase and tyrosine phosphatase PTEN in myoma nodes in 33 women using Real-time RT-PCR. A significant increase in the level of mRNA of the ERα, ERβ, PgR, and the PTEN gene in samples from proliferative and non-proliferative uterine leiomyoma, as well as the decrease in the expression of genes STS, PTEN and PgR in samples of myoma associated with hyperplasia and malignant uterine have been identified.

Key words: *uterine cancer, estrogen receptor, progesterone receptor, steroid sulfatase, steroid sulfotransferase, PTEN*

Миома матки – одна из наиболее распространенных доброкачественных опухолей репродуктивной системы. Средний возраст выявления миомы матки составляет 32,8 года. Данное заболевание относительно редко встречается у женщин до 30 лет (0,9–1,5%), а в возрасте старше 30 лет выявляется в 15–17% наблюдений [2]. Истинная распространенность лейомиомы матки, выявляемая по материалам аутопсий, составляет 50–62% [1]. Отметим, что происходит увеличение числа молодых женщин с патологией матки в возрасте до 35 лет, а возраст рождения первого ребенка смещается с 25 к 30 годам. Интерес к исследованию данной патологии у женщин репродуктивного возраста обусловлен сохранением не только детородной функции, но и высокого качества жизни.

Из данных литературы известно, что около 20% женщин в возрасте старше 18 лет, в том числе около 70% – в период от 30 до 40 лет, лишаются матки в результате хирургического лечения [3]. Более половины хирургических вмешательств в гинекологических отделениях выполняют по поводу миомы матки. Поскольку эта патология в большинстве случаев является гормональнозависимой, одной из важных

характеристик становится определение рецепторного статуса по экспрессии стероидных рецепторов ERα, ERβ, PR. Другой возможной причиной может быть нарушение баланса сульфонирования и десульфатирования эстрогенов [14]. Этот процесс играет немаловажную роль в регуляции активности и транспорта стероидных гормонов. Сульфаты эстрогенов могут служить резервуаром для образования биологически активных эстрогенов под действием стероидной сульфатазы (STS) [16]. Любое нарушение в одной из этих систем вызывает изменение в содержании эстрогенов, что может стать причиной возникновения опухоли. В последнее время широко обсуждается роль фермента PTEN в развитии различных опухолевых процессов. Уникальная фосфатидид-3-фосфатазная активность PTEN делает его одним из ключевых супрессоров опухолей в организме [6].

Таким образом, молекулярная характеристика миомы матки может быть использована для персонализированного подхода к лечению и прогнозу данных заболеваний.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для определения уровня экспрессии генов стероидных рецепторов, эстрогеновой сульфотрансферазы, стероидной сульфатазы и PTEN использовали образцы ткани миомы матки, удаленные в ходе хирургического вмешательства: у 10 пациенток с диагнозом миомы тела матки, 10 – с пролиферирующей миомой тела матки, 8 – с миомой тела матки и гиперплазией эндометрия, 5 – с лейомиосаркомой. В качестве контрольных использованы образцы неизмененной ткани миометрия из удаленных участков матки одной и той же пациентки. Операционный материал получали из ГКБ №1 г. Новокузнецка. Взятие образцов миометрия проводил врач гинекологического отделения С.В. Шрамко (табл. 1) с согласия больных по стандартному протоколу этического комитета РФ. Сразу после хирургического вмешательства свежий образец ткани помещали в емкость с жидким азотом до процедуры выделения РНК.

Выделение суммарной РНК из образцов и ДНКазную обработку проводили с использованием наборов Qiagen (Rneasy Lipid Tissue® Mini Kit и RNase-Free DNase Set соответственно, США) согласно рекомендациям производителя. Количество РНК в пробе определяли спектрофотометрическим методом. Качественный анализ выделенной РНК осуществляли путем электрофоретического разделения в 1,5% агарозном геле.

Уровень экспрессии исследуемых генов определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) с использованием Maxima SYBR Green qPCR Master Mix («Fermentas») на амплификаторе IQ5 («Bio-Rad Laboratories», США). В качестве гена сравнения использовали «ген домашнего хозяйства» *GAPDH*.

В ПЦР использовали специфические праймеры к последовательностям генов *ERα, ERβ, PGR, SULT1E1, hSTS, PTEN* (табл. 2).

Каждую ПЦР, содержащую 1 мкл кДНК, проводили в объеме 25 мкл при следующих условиях:

Таблица 1

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ МИОМОЙ ТЕЛА МАТКИ

Показатель	Пролиферирующая миома	Непролиферирующая миома	Миома матки с гиперплазией эндометрия	Лейомиосаркома
Возраст, годы	39,4±11,4	39,3±6,3	52,1±11,9	53,2±13,8
Длительность заболевания, годы	7,2±7,8	7,7±9,3	4,8±6,2	9,2±9,8
Нарушения менструального цикла*	7/3; 1/2; 0/1; 2/0	5/3; 0/2; 0/1; 5/0	5/3; 1/2; 2/1; 1/0	3/3; 0/2; 1/1; 1/0
Учащенное мочеиспускание	2	3	2	1
Возраст менархе, годы	13,3±1,7	13,3±2,7	12,2±1,8	13,4±2,6
Продолжительность менструации, дни	5,3±2,3	5,6±3,4	4,8±2,2	4,8±2,2
Продолжительность менструального цикла, дни	34,7±61,3	24,7±3,7	24,7±3,7	27,2±4,2
Роды	1,0±3,0	1,4±1,4	1,2±1,2	1,8±0,8
Аборты	2,7±7,3	2,1±3,9	4,0±11,0	6,0±10,0
Выкидыши	0,1±0,1	0,1±0,1	0,22±1,78	0,4±0,6
Объем операции**	3/2; 3/1; 4/0	0/2; 7/1; 3/0	5/2; 4/1; 0/0	4/2; 1/1; 0/0

* В числителе – число больных, в знаменателе – вид патологии: 3 – гиперполименорея; 2 – менорргия; 1 – менопауза; 0 – нет нарушений; ** в числителе – число больных, в знаменателе – объем вмешательства: 0 – консервативная тактика; 1 – гистерэктомия без придатков; 2 – гистерэктомия с придатками.

95°С – 3 мин, 95°С – 15 с (40 циклов), 58°С – 20 с, 72°С – 20 с. Для контроля специфичности ПЦР использовали кривые плавления и гель-электрофорез. В каждом эксперименте на 1 планшет помещали образцы исследуемых кДНК с праймерами на целевые гены и ген сравнения (по 3 повтора). Параметры ПЦР рассчитывали по дозо-зависимым кривым: эффективность реакции – не менее 90%, коэффициент корреляции – не менее 0,98, наклон кривой (slope) – 3,4±0,4.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы MedCalc; статистически значимыми считали $p<0,05$. Среднее, ошибку среднего и достоверность различий между 2 параметрами рассчитывали по критерию Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологический эффект эстрогенов реализуется через их взаимодействие с рецепторами эстрогенов, которые, в свою очередь, активируют гены-мишени во многих тканях. В настоящее время известны 2 изоформы ER – ERα и ERβ. Активация ERβ приводит к изменению регуляции клеточного цикла через взаимодействие с циклинами и их киназами и, как следствие, – к усилению пролиферации [7, 10]. Гиперэкспрессия *ERα* в нормальной ткани увеличивает риск возникновения гормональнозависимой опухоли. Важное различие между ERα и ERβ состоит в регуляции клеточной пролиферации: ERα наиболее часто проявляет пролиферативное действие, ERβ – антипролиферативное [11]. Отношение степени распределения экспрессии ERα и ERβ может играть ключевую роль в нормальном функционировании эндометрия и миометрия, что имеет существенное клиническое значение [18]. Наряду с эстрогенами важную роль в организме женщины играет прогестерон – стероидный гормон, который вырабатывается во время эмбриогенеза, менструального цикла и беременности. Одна из физиологических ролей прогестерона в регуляции железистого эпителия эндометрия заключается в индукции клеточной дифференцировки и ингибировании эстроген-опосредованной клеточной пролиферации [12].

При исследовании рецепторного статуса миомы тела матки нами выявлено достоверное увеличение экспрессии генов *ERα* и PR у больных с простой ($p=0,03$) и пролиферирующей миомами матки ($p=0,01$), а также у больных с миомой тела матки и гиперплазией эндометрия ($p=0,03$). Снижение экспрессии данных генов отмечено у пациентов с диагнозом лейомиосаркомы ($p=0,06$; см. рисунок).

Из данных научной литературы известно, что в матке, как и в молочной железе, эстрогены увеличивают пролиферацию клеток. Кроме того, в гиперплазированных тканях отмечено увеличение экспрессии гена *ERα* [19]. Отсутствие или снижение экспрессии *ERα* является показателем плохого прогноза (развивается гормональнонезависимая опухоль, плохо поддающаяся терапии) [17]. Содержание прогестероновых и эстрогеновых рецепторов зависит от степени васкуляризации миоматозных узлов. В гиперваскулярных узлах отмечается значительное преобладание рецепторов к прогестерону по сравнению с таковым в гиповаскулярных узлах [15]. Таким образом, миома с повышенной васкуляризацией находится под преимущественным влиянием прогестерона. Это позволяет сделать вывод, что опухолевый рост лейомиомы обусловлен повышенной прогестероновой стимуляцией, поскольку прогестерон, являясь половым гормоном, модулирует митотическую активность в миометрии и миоматозных узлах.

Кроме того, нами отмечено достоверное увеличение уровня мРНК *ERβ* у больных с диагнозом пролиферирующей миомы ($p=0,01$) и миомы с гиперплазией эндометрия ($p=0,01$). Выявлено также недостоверное увеличение содержания данного рецептора у больных с простой миомой ($p=0,07$) и лейомиосаркомой ($p=0,07$; см. рисунок).

Из полученных в ряде исследований данных следует, что соотношение мРНК ERβ/ERα находится в прямой зависимости от стадии рака эндометрия [20]. В исследовании F. Takama и соавт. показано [18], что

Таблица 2

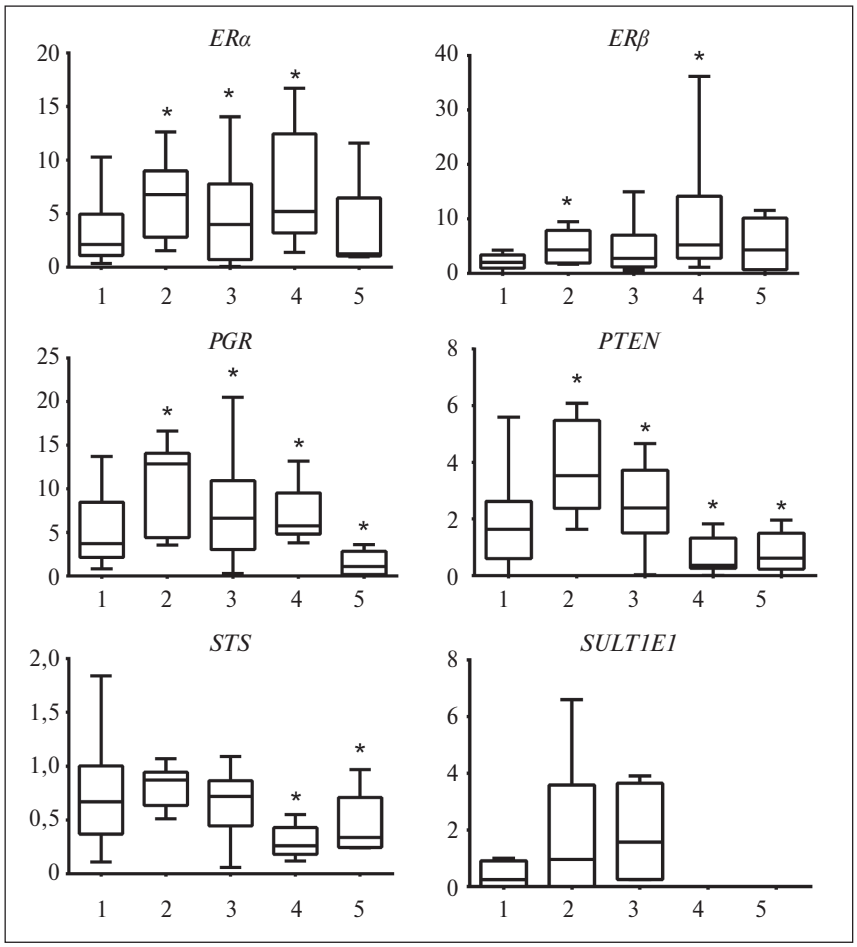
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПЦР

Ген	Последовательность праймера (прямой и обратный)	
PTEN	Прямой	5'- CGAACTGGTGTAATGATATGT- 3'
	Обратный	5'- CATGAACTTGTCTTCCCGT- 3'
STS	Прямой	5'- CCTCCTACTGTTCTTTCTGTGGG-3'
	Обратный	5'- GGTCGATATTGGGAGTCCTGATA-3'
SULT1E1	Прямой	5'- AGAGGAGCTTGTGGACAGGA – 3'
	Обратный	5'- GGCGACAATTTCTGGTTCAT – 3'
PGR	Прямой	5'- TCATTCTATTCATTATGCCTTACCA – 3'
	Обратный	5'- GACTTCGTAGCCCTTCCAAAG – 3'
ERβ	Прямой	5'- GTCACAGCGACCCAGGAT – 3'
	Обратный	5'- CAAAAGAGTCTCCATCTTCATTC – 3'
ERa	Прямой	5'- ATGATGAAAGGTGGGATACGA-3`
	Обратный	5'- CTGTTCTTCTTAGAGCGTTTGATC-3'

экспрессия ERβ, выше чем ERα, при раке эндометрия с тяжелыми поражением миометрия, на основании чего сделан вывод, что ERβ играет важную роль в прогрессировании поражения миометрия [18]. Таким образом, дисбаланс между экспрессией ERα и ERβ считается важным шагом в развитии эстрогензависимых опухолей [13].

Для исследования роли сульфонирования эстрогенов в патогенезе миомы нами определено относительное содержание мРНК гена *SULT1E1*. Полученные результаты показали, что уровень экспрессии гена *SULT1E1* достоверно не изменялся, кроме того, у больных с диагнозом миомы с гиперплазией эндометрия и лейомиосаркомы экспрессия данного гена отсутствовала. Из данных литературы известно, что в ткани с уменьшенной экспрессией гена понижена и активность соответствующего фермента. Это может приводить к повышению концентрации эстрогенов и катехолэстрогенов и, следовательно, увеличивать риск новообразований, что показано для рака молочной железы [8]. Предполагается, что баланс между сульфонированием и десульфонированием в тканях может играть важную роль в регуляции уровней эстрогенов *in situ*. Сульфаты эстрогенов могут служить резервуаром для образования биологически активных эстрогенов посредством действия STS [16]. Следовательно, определение уровня экспрессии гена *STS* является важным шагом в изучении механизма развития миомы матки. Достоверных различий в экспрессии данного гена у больных миомой и пролиферирующей миомой не выявлено (p=0,2). Показано достоверное снижение уровня мРНК гена *STS* у больных с диагнозом миомы с гиперплазией эндометрия (p=0,01) и лейомиосаркомы (p=0,03; см рисунок).

Анализируя полученные данные, можно заключить, что в опухолевых тканях эндометрия регистрируется повышение экспрессии гена *STS*, тогда как экспрессия гена *SULT1E1* имеет тенденцию к снижению. Интересен тот факт, что в тканях, где экспрессия гена *STS* снижается, экспрессии эстрогеновой сульфатазы вообще не определяется. Это свидетельствует о вовлечении ферментов сульфонирования/десульфонирования эстрогенов в механизм возникновения и поддержания гормональнозависимых опухолей эндометрия человека. STS осуществляет реакцию гидролиза сульфатов эстрона, из которого могут быть синтезированы стероиды с эстрогенными свойствами (например, эстрадиол), стимулирующие рост опухоли. В этом случае индукция *SULT1E1* и/или ингибирование *STS* могут иметь потенциальный лечебный эффект в терапии миомы матки.



*Уровень экспрессии генов ERα, ERβ, PGR, STS, SULT1E1, PTEN в образцах тканей: 1 – нормальный миометрий; 2 – пролиферирующая миома матки; 3 – непролиферирующая миома матки; 4 – миома матки с гиперплазией эндометрия; 5 – лейомиосаркома; по оси ординат – относительная экспрессия гена, рассчитанная с использованием $2^{-2\Delta Ct}$-метода; горизонтальные линии – медиана; *p<0,05*

При исследовании экспрессии гена *PTEN* нами показаны достоверное увеличение экспрессии данного гена у пациенток с непролиферирующей (p=0,03) и пролиферирующей миомой (p=0,001) и, наоборот, достоверное снижение уровня мРНК гена *PTEN* у больных с диагнозом миомы с гиперплазией эндометрия (p=0,02) и лейомиосаркомы (p=0,1; см. рисунок). Известно, что PTEN является опухолевым супрессором за счет ингибирования PI3K-Akt-пути. PTEN дефосфорилирует PIP3 до PIP2,

являясь, таким образом, частью сигнального пути, который останавливает клеточное деление и индуцирует апоптоз. Это предотвращает бесконтрольный рост клеток и развитие онкологического процесса [21]. Тогда нарушение его функционирования приводит к развитию широкого спектра опухолей человека (рака предстательной железы, эндометрия, яичников, молочной железы) [4]. В настоящее время экспрессия и регуляция PTEN в миометрии и лейомиомах до конца не изучены. Известно, что уровень белка PTEN в железистом эпителии эндометрия при атипичной и простой гиперплазиях ниже, чем в неизмененном эндометрии [9]. D. Takiko и соавт. [5] показали, что делеции в гене *PTEN* приводят к трансформации миоцитов в адипоциты и формированию липолейомиомы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проблема опухолей женской репродуктивной системы остается одной из актуальных в клинической онкологии. Это связано не только с неуклонным ростом заболеваемости в группе зрелого женского населения, но и увеличением числа пациенток репродуктивного возраста. Кроме того, отмеченный в популяции рост эндокринно-обменных нарушений, относительной гиперэстрогении, позволяет прогнозировать дальнейший рост числа гормонально-зависимых заболеваний женской репродуктивной системы. Анализ полученных результатов показывает, что, характеристика опухолей по экспрессии генов *ERα, ERβ, PGR, SULT1E1, hSTS, PTEN* может быть стратегией и одним из этапов разработки дифференциального лечения опухолей матки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулаков В.И., Прилепская В.Н., Радзинский В.Е. Руководство по амбулаторно-поликлинической помощи в акушерстве и гинекологии // М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2007; 200 с.
2. Сидорова И.С. Миома матки (современные аспекты этиологии, патогенеза, классификации и профилактики) // М.: Изд-во МИА. – 2003; 66 с.
3. Савицкий Г.А., Савицкий А.Г. Миома матки: проблемы патогенеза и патогенетической терапии // ЭЛБИ-СПб, 3-е изд. – 2003; 235 с.
4. Cubery J., Steelman L., Chappell W. et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascade inhibitors: how mutations can result in therapy resistance and how to overcome resistance // Oncotarget. – 2012; 3 (10): 1068–111.
5. Takiko D., Lindsey J., Besnard V. et al. Cell-specific conditional deletion of Pten in the uterus results in differential phenotypes // Gynecol. Oncol. – 2011; 122 (2): 424–29.
6. Ghita C., Vilcea I., Dumitrescu M. et al. The prognostic value of the immunohistochemical aspects of tumor suppressor genes p53, bcl-2, PTEN and nuclear proliferative antigen Ki-67 in resected colorectal carcinoma // Rom. J. Morphol. Embryol. – 2012; 53 (3): 549–56.
7. Foxa E., Andradeb J., Shupnik M. Novel actions of estrogen to promote proliferation: Integration of cytoplasmic and nuclear pathways // Steroids. – 2009; 74: 622–7.
8. Kulendran M., Salhab M., Mokbel K. Oestrogen-synthesising enzymes and breast cancer // Anticancer Res. – 2009; 29 (4): 1095–109.
9. Kimura F., Watanabe J., Hata H. et al. PTEN immunohistochemical expression is suppressed in G1 endometroid adenocarcinoma of the uterine corpus // J. Cancer Res. Clin. Oncol. – 2004; 130: 161–68.
10. La Rosa P., Acconcia F. Signaling functions of ubiquitin in the 17β-estradiol (E2): estrogen receptor (ERα) network // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2011; 127 (3–5): 223–30.
11. Matthews G. Estrogen signaling: Subtle balance between ERα and ERβ // Molecular Interventions. – 2003; 3: 281–92.
12. Mani S. Progestin receptor subtypes in the brain: the known and the unknown // Endocrinology. – 2008; 149 (6): 2750–56.
13. Mylonas I., Jeschke U., Shabani N. et al. Normal and malignant human endometrium express immunohistochemically estrogen receptor alpha (ERα), estrogen receptor Beta (ERβ) and progesterone receptor (PR) // Anticancer Res. – 2005; 25: 1679–86.
14. Purohit A., Foster P. Steroid sulfatase inhibitors for estrogen- and androgen-dependent cancers // Endocrinol. – 2012; 212 (2): 99–110.
15. Kim J., Sefton E. The role of progesterone signaling in the pathogenesis of uterine leiomyoma // Mol. Cell. Endocrinol. – 2012; 358 (2): 223–31.
16. Sugawara T., Fujimoto S. The potential function of steroid sulphatase activity in steroid production and steroidogenic acute regulatory protein expression // Biochemistry. – 2004; 380: 153–60.
17. Sahab Z., Man Y., Byers S., Sang Q. Putative biomarkers and targets of estrogen receptor negative human breast cancer // Int. J. Mol. Sci. – 2011; 12 (7): 4504–21.
18. Takama F., Kanuma T., Wang D. et al. Oestrogen receptor beta expression and depth of myometrial invasion in human endometrial cancer // Br. J. Cancer. – 2001; 84: 545–9.
19. Thomas C., Gustafsson J. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy // Nat. Rev. Cancer. – 2011; 11 (8): 597–608.
20. Zhou X., Tengy X., Song W., Wu Y. Expression of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells and estrogen receptor subtypes in the normal, hyperplastic, and carcinomatous endometrium // Int. J. Gynecol. Cancer. – 2008; 18: 152–8.
21. Zhang P., Chen J., Guo X. New insights into PTEN regulation mechanisms and its potential function in targeted therapies // Biomed. Pharmacother. – 2012; 66 (7): 485–90.