

Ewelina Wawryk-Gawda,  
Barbara Jodłowska-Jędrzych

Katedra i Zakład Histologii  
i Embriologii z Pracownią Cytologii  
Doświadczalnej Uniwersytetu  
Medycznego w Lublinie  
Kierownik: dr hab. n. med.  
B. Jodłowska-Jędrzych  
profesor nadzwyczajny Uniwersytetu  
Medycznego w Lublinie

Address for correspondence/  
Adres do korespondencji:  
Ewelina Wawryk-Gawda  
Katedra i Zakład Histologii  
i Embriologii z Pracownią Cytologii  
Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin  
tel. 508191144  
e-mail: ewelina.wawryk@wp.pl

Received: 18.01.2011  
Accepted: 01.02.2011  
Published: 30.03.2011

## STATISTIC STATYSTYKA

Word count Liczba słów	0000/2353
Tables Tabele	0
Figures Ryciny	0
References Piśmiennictwo	27

## Role of the immunohistochemical exams in diagnosis of uterine leiomyosarcoma

### Rola badań immunohistochemicznych w diagnostyce mięsaka gładkokomórkowego macicy

Review article/Artykuł poglądowy

#### Summary

Uterine leiomyosarcoma is rare, representing 2-6% of all uterine neoplasms. Most occur in women over 40 years of age. The histopathologic diagnosis is based on the microscopic constellation of hypercellularity, severe nuclear atypia, coagulative necrosis and high mitotic rate.

Leiomyosarcoma is one of the mesenchymal tumors of the uterus. Into this group fall also endometrial stromal sarcoma, leiomyoma, smooth muscle tumour of uncertain malignant potential, malignant mixed Mullerian tumor and carcinosarcoma. The distinction between these tumors may at times be problematic cause of their similar microscopic building. It would be useful to have additional markers to distinguish among these neoplasms.

Immunohistochemical studies of oncoproteins will undoubtedly lead to an accurate and prognostically relevant classification of these tumors. A lot of studies were undertaken to evaluate the utility of selected immunohistochemical markers in differentiating mesenchymal tumors. Results demonstrate that the significantly elevated expression of certain antigens (p53, Ki-67, Mdm2, MPM), may be useful to distinguish between cases of malignant smooth muscle tumors and those of borderline histology.

Most types of uterine sarcomas have a poor prognosis. The conventional chemotherapy in leiomyosarcomas appears to be ineffective for some patients. In these women, new therapeutic strategies are warranted. Research demonstrate that uterine leiomyosarcomas express c-KIT, so the treatment with tyrosine kinase inhibitors in leiomyosarcoma patients might be hypothesized. Moreover leiomyosarcomas in occasional cases show positive staining for estrogen and progesterone receptors, hormonal manipulation in these cases may be helpful in controlling these tumors.

Scientists suggest that clinical trials with innovative therapeutic method are needed in these aggressive and chemoresistant tumors.

**Key words:** uterine sarcomas, leiomyosarcoma, immunohistochemistry

#### Streszczenie

Mięsak gładkokomórkowy (leiomyosarcoma) macicy jest rzadko występującym nowotworem. Stanowi on 2-6% wszystkich nowotworów macicy. Większość przypadków leiomyosarcoma występuje wśród kobiet powyżej 40 roku życia. Diagnoza histopatologiczna opiera się na stwierdzeniu bogato komórkowego utkania guza, z obecnością atypii jąder komórkowych, martwicy koagulacyjnej oraz wysokiego indeksu mitotycznego.

Leiomyosarcoma należy do nowotworów mezenchymalnych. Do tej grupy nowotworów zaliczamy również mięsaka podścieliskowego, mięśniaka gładkokomórkowego, nowotwory z mięśni gładkich o nieustalonym potencjale złośliwości oraz guzy mieszane mięśniowo-endometrialne i mięsakoraka. Ze względu na podobną budowę mikroskopową, rozróżnienie poszczególnych nowotworów tej grupy często sprawia trudności. Dlatego dla prawidłowej diagnozy, użyteczne byłoby wprowadzenie nowych metod diagnostycznych. Badania immunohistochemiczne nad biomarkerami nowotworowymi niosą nadzieje na właściwą i prognostycznie istotną klasyfikację tych nowotworów. Wiele badań zostało poświęconych ocenie przydatności wybranych markerów immunohistochemicznych w diagnostyce guzów mezenchymalnych. Wyniki badań wskazują, iż znaczący wzrost ekspresji niektórych markerów (p53, Ki-67, Mdm2, MPM) w nowotworach o wysokim stopniu złośliwości, może służyć ich odróżnieniu od nowotworów o granicznym stopniu zróżnicowania histologicznego.

Rokowanie w większości przypadków mięsaka jest niekorzystne. Konwencjonalne metody terapeutyczne u niektórych pacjentek wydają się być nieskuteczne. W tych przypadkach wskazane byłoby użycie nowych metod leczniczych. Badania wykazały obecność ekspresji białka c-KIT w utkaniu leiomyosarcoma, dlatego też autorzy uważają, iż leczenie za pomocą inhibitorów kinazy tyrozynowej mogłoby przynieść dobre efekty terapeutyczne. Ponadto w rzadkich przypadkach mięsaka wykazano obecność receptorów estrogenowych i progesteronowych, co pozwoliło na uzasadnienie stosowania hormonoterapii u tych chorych. Zebrane dane wskazują na konieczność przeprowadzenia badań klinicznych z użyciem nowatorskich metod diagnostycznych, szczególnie w przypadkach agresywnych, opornych na standardowo stosowane leczenie.

**Słowa kluczowe:** mięsaki macicy, mięsak gładkokomórkowy, immunohistochemia

Leiomyosarcoma of the uterus is a rare cancer of female reproductive organs. It represents only 2-6% of all cancers of the uterus, and 0.21 - 6% of all mesenchymal cancers of the uterus. Most cases of leiomyosarcoma of the uterus occur in women older than 40 years, often in the postmenopausal period, but it can occur in women of all ages. The most frequent symptoms include abnormal vaginal bleeding, vaginal discharge, pelvic pain and pelvic tumour found on examination [1].

Low incidence of leiomyosarcoma of the uterus is one of the reasons for still insufficient knowledge about it. Ongoing studies based on small numbers of cases, provide new, but ambiguous data [2]. Despite the rare incidence, this cancer is a serious problem of contemporary clinical gynaecologic oncology, since in most cases it is resistant to standard anticancer treatment. The 5-year survival ranges from 0 to 50%. Most data indicates that the average survival time in case of the diagnosis of uterine leiomyosarcoma is 10-18 months [1]. Breast cancer treatment relies primarily on surgical removal of the uterus with appendages and lymphadenectomy, supplemented in some cases by radiotherapy and chemotherapy. The patients who cannot be treated surgically undergo surgery with palliative radiotherapy, chemotherapy or hormonal therapy [3].

Therapeutic difficulties in the case of this cancer result mainly from insufficient knowledge of the biology of this tumour. There is still no data that could help improve treatment outcomes in patients with this diagnosis and justify the choice of appropriate therapy.

The diagnosis of leiomyosarcoma of the uterus is a precise histopathological examination. A characteristic feature of the microscopic structure of leiomyosarcoma is a very large number of cells in the tumour, morphologically, ultrastructurally and immunohistochemically resembling smooth muscle cells [1,4].

Histopathological criteria for the diagnosis of leiomyosarcoma are: the number of observed mitotic figures (5 or more mitoses in 10 microscopic fields of view under high magnification), the presence of cellular atypia and foci of coagulation necrosis. However, some tumours do not meet all these criteria. In the absence of necrosis, the diagnosis of uterine leiomyosarcoma is confirmed by a greater number of mitotic figures (the criterion is 10 or more mitoses in 10 fields of view under high magnification) and the presence of disseminated or moderate cellular atypia [2,4].

Mięśniakomięsak gładkokomórkowy (leiomyosarcoma) macicy należy do rzadkich nowotworów narządów rodnych kobiety. Stanowi on zaledwie 2-6% wszystkich nowotworów macicy oraz 0,21 – 6% wszystkich nowotworów mezenchymalnych macicy. Większość przypadków leiomyosarcoma macicy występuje wśród kobiet powyżej 40 roku życia, często w okresie pomenopauzalnym, jednak może on wystąpić u kobiety w każdym wieku. Do najczęściej obserwowanych objawów klinicznych należą m.in. nieprawidłowe krwawienie z dróg rodnych, upławy, ból w okolicy miednicy oraz badalny guz miednicy[1].

Niewielka częstość występowania leiomyosarcoma macicy jest jednym z powodów niedostatecznej wciąż wiedzy na jego temat. Stale prowadzone badania opierające się na niewielkiej grupie przypadków, dostarczają nowych lecz niejednoznacznych danych[2]. Mimo rzadkiego występowania, nowotwór ten stanowi poważny problemem kliniczny współczesnej onkologii ginekologicznej, gdyż w większości przypadków jest oporny na standardowo stosowane leczenie przeciwnowotworowe. Wskaźnik 5-letniego przeżycia waha się od 0 do 50%. Większość danych wskazuje, iż średni okres przeżycia w przypadku rozpoznania leiomyosarcoma macicy wynosi 10-18 m-cy[1]. Leczenie tego nowotworu polega przede wszystkim na chirurgicznym usunięciu macicy z przydatkami i limfadenektomii, uzupełnionym w niektórych przypadkach radioterapią i chemioterapią. Natomiast chore poza zasięgiem leczenia chirurgicznego poddawane są paliatywnej radioterapii, chemioterapii lub hormonaloterapii[3].

Trudności terapeutyczne w przypadku tego nowotworu wynikają głównie z niedostatecznego poznania biologii tego guza. Wciąż brak danych, które pomogłyby poprawić efekty terapii u pacjentek z tym rozpoznaniem i uzasadnić wybór właściwego postępowania terapeutycznego.

Podstawą rozpoznania mięsaka gładkokomórkowego macicy jest dokładne badanie histopatologiczne. Charakterystyczną cechą budowy mikroskopowej mięśniakomięsaka gładkokomórkowego jest bardzo duża liczba komórek w utkaniu guza, które morfologicznie, ultrastrukturalnie i immunohistochemicznie przypominają komórki mięśnia gładkiego[1,4].

Kryteria histopatologiczne służące do rozpoznania mięsaka gładkokomórkowego to: liczba obserwowanych figur mitotycznych (5 lub więcej mitoz w 10 mikroskopowych polach widzenia pod dużym powiększeniem DPW), obecność atypii komórkowej oraz ognisk martwicy koagulacyjnej. Jednak niektóre guzy nie spełniają wszystkich wymienionych kryteriów. W przypadku braku martwicy o rozpoznaniu leiomyosarcoma macicy decyduje większa liczba obserwowanych figur mitotycznych (za kryterium przyjmuje się wówczas 10 lub więcej mitoz w 10 DPW) oraz występowanie rozsianej lub umiarkowanej atypii komórkowej[2,4].

Guzy o nieco odmiennej budowie morfologicznej wymagają bardziej wnikliwej analizy, jednak w tych

Tumours with a slightly different morphology require more sophisticated analysis, but in these cases, a clear diagnosis can be difficult. The biggest diagnostic problems are observed in other mesenchymal tumours of morphological image similar to leiomyosarcoma, such as Smooth Muscle Tumour of Uncertain Malignant Potential, STUMP) and leiomyoma with significant features of cell atypia, or a great number of mitotic figures.

In such cases, it is necessary to use additional diagnostic methods. Hope for progress in this area is offered by studies based on immunohistochemical methods and genetic tests. As with other cancers, several cancer biomarkers were described and a part of them was examined in terms of usefulness in the diagnostics and determining the prognosis of leiomyosarcoma of the uterus.

Moreover, detailed scales and classifications, specifying the degree of histological malignancy and clinical leiomyosarcoma were developed [5,6]. According to the histological advancement (grading classification according to Coindre-Trojani) leiomyosarcoma is assessed in terms of degree of differentiation of cancer, mitotic index and the area occupied by tumour necrosis [5]. The clinical stage is determined using the FIGO 2009 classification, according to which in the first stage the diameter of the tumour is estimated, and in the next three steps the infiltration of adjacent organs and the presence of metastases in regional lymph nodes and distant metastases are taken into account [6].

These scales are based on morphological and macroscopic parameters of the tumour, while determining specific biomarkers in cancer cells allows the division of these cancers depending on molecular parameters. This in turn offers hope for the introduction of treatment methods whose activity will be selectively targeted at the detected particle.

Most studies are based on proteins associated with the course of the cell cycle, cell proliferation, apoptosis and the elements accompanying or cooperating with these proteins. The expression of p53 is the most frequently assessed and it is considered the main mechanism regulating cell life and a factor inhibiting the formation of cancers. In a healthy cell, p53 protein is active for a short period, its level is low and is not detected by immunohistochemical methods [7]. Mutations in the gene encoding the p53 protein result in the stabilization of this protein and its accumulation in the cell, then its presence can be detected using immunohistochemical methods [8].

The presence of p53 protein expression in cancers of the uterus is confirmed by many studies [7,8,10,11,12]. It has also been demonstrated that it is more intense in leiomyosarcoma in comparison with leiomyoma and STUMP. In his study, K. Mittal et al have demonstrated the expression of p53 protein in 75% of cases of leiomyosarcoma, including an intense expression (40% of tumour cells) in 33% of leiomyosarcoma cases, compared with very low expression of p53 protein in tumours of leiomyoma and STUMP type [9]. Similar results were

przypadkach jednoznaczne rozpoznanie może być trudne. Największe problemy diagnostyczne obserwuje się w przypadku innych nowotworów mezenchymalnych o podobnym obrazie morfologicznym do leiomyosarcoma, jak guz z mięśni gładkich o nieustalonym potencjale złośliwości (ang. smooth muscle tumour of uncertain malignant potential, STUMP) oraz mięśniak gładkokomórkowy (leiomyoma) z dużą cechą atypii komórek lub dużą liczbą obserwowanych figur mitotycznych.

W takich przypadkach konieczne jest użycie dodatkowych metod diagnostycznych. Nadzieje na postęp w tej dziedzinie niosą badania oparte na metodach immunohistochemicznych oraz badania genetyczne. Podobnie jak w przypadku innych nowotworów, opisano wiele biomarkerów nowotworowych i część z nich zbadano w aspekcie przydatności w diagnostyce i określeniu rokowania mięsaka gładkokomórkowego macicy.

Ponadto opracowano szczegółowe skale i klasyfikacje, określające stopień złośliwości histologicznej i klinicznej leiomyosarcoma [5,6]. Według zaawansowania histopatologicznego (Grading wg klasyfikacji Coindre-Trojaniego) mięsaka gładkokomórkowego ocenia się pod względem stopnia różnicowania nowotworu, indeksu mitotycznego oraz obszaru guza zajmowanego przez martwicę [5]. Natomiast stopień zaawansowania klinicznego określany jest przy pomocy klasyfikacji FIGO 2009, według której w pierwszym stopniu ocenia się średnicę guza, a w kolejnych trzech stopniach brane są pod uwagę naciekanie sąsiednich narządów i obecność przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych oraz przerzuty odległe [6].

Skale te oparte są na budowie morfologicznej oraz parametrach makroskopowych guza, natomiast poznanie specyficznych biomarkerów w komórkach nowotworowych pozwala na podział tych nowotworów w zależności od parametrów molekularnych. To z kolei niesie nadzieje na wprowadzanie metod leczniczych, których działanie będzie wybiórczo skierowane na wykrytą cząstkę.

Najwięcej badań dotyczy białek związanych z przebiegiem cyklu komórkowego, proliferacją komórek, apoptozą oraz elementów towarzyszących czy współpracujących w tymi białkami. Do najczęściej ocenianych należy ekspresja białka p53, które uważane jest za główny mechanizm regulujący życie komórki oraz czynnik hamujący powstawanie nowotworów. W zdrowej komórce białko p53 jest aktywne przez krótki okres, jego poziom jest niski i nie jest wykrywane metodami immunohistochemicznymi [7]. Mutacje w genie kodującym białko p53 powodują stabilizację tego białka i jego kumulację w komórce, wówczas jego obecność można wykryć przy użyciu metod immunohistochemicznych [8].

Obecność ekspresji białka p53 w nowotworach macicy potwierdza wiele badań [7,8,10,11,12]. Ponadto wykazano, iż jest ona intensywniejsza w leiomyosarcoma w porównaniu z leiomyoma i STUMP. W swoim badaniu K. Mittal i wsp. wykazali ekspresję białka p53 w 75% przypadków leiomyosarcoma, w tym intensywną

obtained by Zhai et al, who showed lack or low (<5% cells) expression of p53 protein in leiomyoma, but higher (> 5% of cells) in leiomyosarcoma [10]. In another study by K. Mittal et al, taking into account the histological criteria, divided leiomyosarcoma into malignant areas (> 10 mitoses/10 fields of view under high magnification, 2-3 + atypia, the presence of necrosis) and benign areas (0.1-2 0-4 mitoses/10 fields of view under high magnification + atypia, no necrosis) in order to evaluate the origin of leiomyosarcoma. The benign areas resembled leiomyoma and probably some of them underwent progression into leiomyosarcoma. Expression of p53 protein in these areas of the tumour occurred in 1% of cells, while malignant areas showed p53 protein expression in 70-100% of the cells [11].

The level and activity of p53 is regulated by a number of cellular proteins, such as WT-1 (Wilms' Tumour 1), MDM2 (murine double minute 2), MDM4 (murine double minute 4), JNKs (c-Jun N-terminal kinases). Proteins MDM2 and MDM4 seem to be particularly important and best-known. MDM2 protein binds p53 and inhibits its activity. The increased amount of MDM2 protein makes most of the p53 protein bound (inactive), which means lack of protection of cells by this protein, despite its high concentration in the cell [7]. In a study S. H. Kim et al showed the expression of p53 and MDM2 proteins in 63% and 60% of uterine sarcomas, respectively: leiomyosarcoma accounted for 34.9% of all sarcomas [8].

During many years of research on the importance of p53 as a prognostic factor in cancers of the uterus, divergent results were obtained. In the study by S. H. Kim et al it was noticed that there is a correlation between the p53 expression and the prognosis [8]. On the other hand, the time of patients' survival was not associated with p53 expression in a study by S.E. Akhan et al, as in the case of several other studies. However, a relation was observed between the p53 expression and recurrence of leiomyosarcoma, which confirmed other previous studies and allowed to regard the presence of the p53 expression in the tumour as a feature pointing to the malignancy of the cancer [12].

Moreover, many studies have shown that malignancy of the tumour can be demonstrated by specifying the intensity of proliferation of its cells [13]. For this purpose, a few studies have used determination of Ki-67 antigen expression by immunohistochemical methods. This antigen, due to its presence in all active phases of cell cycle (except for the G0 phase), according to some authors is considered a universal indicator of proliferation [12,13,14]. S. E. Akhan et al showed expression of this antigen in uterine leiomyosarcoma (the median was 30% stained cells) and confirmed that its presence means active growth of the tumour [12]. Moreover, increasing expression of Ki-67 antigen correlated with worse prognosis, which was confirmed in several previous studies [12]. In the study by Y. Kitaoka et al, positive reaction to the Ki-67 antigen was demonstrated in up to

ekspresję (obejmującą 40% komórek guza) w 33% przypadków mięsaka gładkokomórkowego, w porównaniu z bardzo niską ekspresją białka p53 w guzach typu leiomyoma i STUMP[9]. Podobne wyniki otrzymał Zhai i wsp., który wykazał brak lub niską (<5% komórek) ekspresję białka p53 w mięśniaku, natomiast wyższą (>5% komórek) w leiomyosarcoma[10]. W innym badaniu K. Mittal i wsp. kierując się kryteriami histopatologicznymi dokonali podziału leiomyosarcoma na rejony złośliwe (>10 mitoz/10 DPW, 2-3+ atypia, obecność martwicy) i rejony łagodne, (0-4mitozy/10DPW,1-2+atypia,brak martwicy) w celu próby oceny pochodzenia leiomyosarcoma. Łagodne rejony przypominały mięśniaka gładkokomórkowego i prawdopodobnie część z nich ulegała progresji do leiomyosarcoma. Ekspresja białka p53 w tych rejonach guza występowała w 1% komórek, natomiast złośliwe rejony wykazywały ekspresję białka p53 w 70-100% komórek[11].

Za regulację poziomu i aktywności białka p53 odpowiedzialnych jest szereg białek komórkowych, jak np. WT-1 (ang. Wilms' Tumour 1), MDM2 (ang. murine double minute 2), MDM4 (ang. murine double minute 4), JNKs (ang. c-Jun N-terminal kinases). Szczególnie istotne i najlepiej poznane wydają się być białka MDM2 i MDM4. Białko MDM2 wiąże białko p53 i hamuje jego aktywność. Zwiększona ilość białka MDM2 w komórce powoduje, że większość białka p53 jest związana (nieaktywna), co wiąże się z brakiem ochrony komórki przez to białko, mimo jego wysokiego stężenia w komórce[7]. W badaniu S.H.Kim i wsp. wykazali ekspresję białek p53 i MDM2 w odpowiednio 63% i 60% badanych mięsaków macicy, w tym leiomyosarcoma stanowił 34,9% wszystkich mięsaków[8].

Podczas wieloletnich badań nad znaczeniem białka p53 jako czynnika rokowniczego w nowotworach macicy, uzyskano rozbieżne wyniki. W badaniu S. H. Kim i wsp. dostrzeżono, iż istnieje zależność pomiędzy ekspresją białka p53, a rokowaniem[8]. Czas przeżycia pacjentek nie miał natomiast związku z ekspresją białka p53 w badaniu S.E. Akhana i wsp., podobnie jak w kilku innych badaniach. Dostrzeżono natomiast związek między ekspresją białka p53, a pojawianiem się wznovy leiomyosarcoma, co potwierdziło inne wcześniejsze badania i pozwoliło jednoznacznie uznać obecność ekspresji białka p53 w utkaniu guza za cechę świadczącą o złośliwości nowotworu[12].

Ponadto wiele badań wskazuje, iż złośliwy charakter guza można wykazać określając intensywność proliferacji jego komórek[13]. Do tego celu w kilku badaniach posłużono się określeniem ekspresji antygeny Ki-67 metodami immunohistochemicznymi. Antygen ten, ze względu na swoją obecność we wszystkich aktywnych fazach cyklu komórkowego (oprócz fazy G0), według niektórych autorów uznawany jest za uniwersalny wskaźnik proliferacji[12,13,14]. S.E. Akhan i wsp. wykazali ekspresję tego antygeny w mięsaku gładkokomórkowym macicy (mediana wynosiła 30% wybarwionych komórek) i potwierdzili, iż jego obecność oznacza aktywny wzrost

90% of uterine sarcomas. More intense expression occurred in the fast-growing, more advanced histological stages of sarcoma [15]. A study by K. Mayerhofer et al showed a positive reaction in 50% of leiomyosarcomas and 8% leiomyomas. However, none of the investigated STUMPs showed expression of Ki-67 antigen. This study confirmed previous reports and allowed to learn that the Ki-67 antigen may indicate malignancy of cancer and may serve as a criterion to distinguish STUMP from leiomyosarcoma [13]. A few years later K. Mittal et al made a similar comparison, obtaining an intense expression (? 30% of cells) in 10 of 12 examined cases of leiomyosarcoma, as compared with low or negative expression of this protein in cases of STUMP and leiomyoma [9].

Differential expression of Ki-67 antigen has been demonstrated in the previously described study by K. Mittal et al, in which „benign” areas of leiomyosarcoma showed low expression (5-15% of cells), while a stronger expression (40-100% of cells) was present in the „malignant” regions [11]. Similarly in a study by Sanci et al expression of Ki-67 antigen was much more intense in leiomyosarcoma, compared with leiomyoma [16].

Another factor demonstrating malignancy is the ability to spread in the form of metastasis to other organs. It depends, among others, on the ability to destroy cancer cells of intercellular matrix. Studies have shown that destruction of intercellular matrix occurs in the case of disorders of processes regulating the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) [17]. A study B. Bodner-Adler et al compared the intensity of expression of two MMPs (MMP-1 and MMP-2) responsible for the degradation of collagen fibres in the basal membranes and interstitial intercellular space. The study included cases of uterine leiomyoma (LM), STUMP and uterine leiomyosarcoma (LMS). In this study a correlation was observed between positive reaction of MMP-2, and involvement of vessels by cancer. A longer period of remission occurred in MMP-2 negative cancers. Index of MMP-1 expression was similar in all cancer types, while the positive reaction for MMP-2 was much more frequent in LMS (48% of cases) than in LM (12%) and STUMP (17%). This study suggests that the expression of MMP-1 does not have diagnostic or prognostic significance in uterine cancers, while MMP-2 is responsible for tumour invasiveness and ability to give distant metastases [18].

The factors responsible for tumour growth by providing it with adequate metabolic conditions are factors involved in angiogenesis, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor (EGF). Receptors of these factors in a study by Sanci et al showed a significantly stronger expression in leiomyosarcoma as compared with leiomyoma of the uterus.

guza[12]. Ponadto wzrastająca ekspresja antygenu Ki-67 korelowała z gorszym rokowaniem, co potwierdziło kilka wcześniejszych badań[12]. W badaniu Y. Kitaoka i wsp. dodatni odczyn antygenu Ki-67 wykazano aż w 90% mięsaków macicy. Intensywniejsza ekspresja występowała w szybko rosnących, bardziej zaawansowanych stadiach histologicznych mięsaków[15]. W badaniu K. Mayerhofer i wsp. wykazano dodatni odczyn w 50% leiomyosarcoma oraz w 8% leiomyoma. Natomiast w żadnym z badanych STUMP nie wykazano ekspresji antygenu Ki-67. Badanie to potwierdziło wcześniejsze doniesienia i pozwoliło stwierdzić, iż antygen Ki-67 może stanowić wykładnik złośliwości nowotworu, a ponadto może służyć jako kryterium odróżniające STUMP od leiomyosarcoma[13]. Kilka lat później K. Mittal i wsp. dokonali podobnego porównania uzyskując intensywną ekspresję (>30% komórek) w 10 z 12 badanych przypadków leiomyosarcoma, w porównaniu z niską lub ujemną ekspresją tego białka w przypadkach STUMP i leiomyoma[9].

Zróznicowaną ekspresję antygenu Ki-67 wykazano w opisywanym wcześniej badaniu K. Mittal i wsp., w którym „łagodne” rejony leiomyosarcoma wykazywały niską ekspresję (5-15% komórek), natomiast intensywniejszą ekspresję (40-100% komórek) wykazano w rejonach „złośliwych”[11]. Podobnie w badaniu Sanci i wsp. ekspresja antygenu Ki-67 była znacznie intensywniejsza w mięsaku gładkokomórkowym, w porównaniu z grupą mięśniaków gładkokomórkowych[16].

Innym czynnikiem świadczącym o złośliwości nowotworu jest zdolność do rozsiewu w postaci przerzutów do innych narządów. Zależy ona m.in. od zdolności niszczenia przez komórki nowotworowe macierzy międzykomórkowej. Badania wykazały, iż do niszczenia macierzy międzykomórkowej dochodzi w przypadku zaburzenia procesów regulujących aktywność metaloproteinaz (matrix metalloproteinases – MMPs)[17]. W badaniu B. Bodner-Adlera i wsp. porównano intensywność ekspresji dwóch metaloproteinaz (MMP-1 i MMP-2) odpowiedzialnych za degradację włókien kolagenowych w błonach podstawnych i śródmiąższowej przestrzeni międzykomórkowej. Badanie obejmowało przypadki mięśniaka gładkokomórkowego macicy (LM), STUMP i leiomyosarcoma macicy (LMS). W badaniu tym zaobserwowano występowanie korelacji pomiędzy dodatnim odczynem MMP-2, a zajęciem naczyń krwionośnych przez nowotwór. Dłuższy okres remisji występował w przypadkach nowotworów MMP-2 ujemnych. Indeks ekspresji MMP-1 był porównywalny we wszystkich typach nowotworów, natomiast dodatni odczyn dla MMP-2 znacznie częściej występował w LMS (48% przypadków), niż w LM (12%) i STUMP (17%). Jak wynika z tego badania ekspresja MMP-1 nie ma znaczenia diagnostycznego, ani prognostycznego w nowotworach macicy, natomiast MMP-2 odpowiada za inwazyjność nowotworu i zdolność do dawania odległych przerzutów[18].

Czynniki odpowiedzialnymi za wzrost nowotworu poprzez zapewnienie mu odpowiednich warunków metabolicznych uznane zostały czynniki biorące udział

This study showed association between angiogenesis and malignancy of cancer, and the presence of antibodies against growth factors as a possible therapeutic tool in the treatment of leiomyosarcoma of the uterus [16].

Determination of the presence of steroid receptors in tumour is a very valuable discovery for both the diagnostic determination of malignancy and the treatment of uterine sarcomas. Interesting results were obtained in the study by M. M. Leitao et al, which demonstrated an intense expression of the estrogenic receptor (ER) and progesterone receptor (PR) in leiomyoma (78% for ER and 88% for PR), whereas in cases of leiomyosarcoma the result was significantly lower (40% for ER and 38% for PR) [19]. The expression of androgen receptor remained at similar levels in both cancers (32% in LM and 40% in LMS). Interestingly, in 6 of the described patients hormone therapy was used without prior knowledge of receptor expression. Among these patients, immunohistochemical tests have shown a negative reaction of receptors in 3 patients, and in two cases all types of receptors showed a positive reaction [19]. The effects of treatment have not been described. This study confirmed several previous studies. In the light of present data it can be concluded that a positive reaction of steroid receptors confirmed by immunohistochemical tests of a tumour means a mild nature of cancer, a better prognosis, a longer survival and smaller cancer invasiveness. High activity of these receptors in a tumour also offers hope for treatment of a cancer by means of hormonal therapy with a good effect therapeutic effect. However, before such treatment is administered, the activity of steroid receptor should be first confirmed by immunohistochemical tests [11,9,12,15].

A similar diagnostics based on immunohistochemical tests of a tumour requires the use of new targeted therapies, including the tyrosine kinase inhibitor - STI571 (Gleevec). This product has become a breakthrough of modern therapy of gastrointestinal stromal cancers, similarly to the use of Herceptin (trastuzumab) in the treatment of advanced breast cancer or Iressy (gefitinib) in treating lung cancer. The effectiveness of these drugs depends on the presence of adequate receptors in tumour cells or abnormalities in the genome of the cell, such as the presence of the Her-2 gene and receptor, a mutation in the exon 11 of c-kit gene, the presence of C-kit protein, etc. [20].

Studies concerning the presence of Her-2 gene and protein showed their lack of uterine sarcomas [21].

w angiogenezie, takie jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyńowego (VEGF) oraz naskórkowy czynnik wzrostu (EGF). Receptory tych czynników w badaniu Sanci i wsp. wykazywały znacząco silniejszą ekspresję w mięsaku gładkokomórkowym w porównaniu z łagodnymi mięśniakami gładkokomórkowymi macicy. Badanie to wykazało powiązanie angiogenezy ze złośliwością nowotworu, a obecność przeciwciał przeciwko czynnikom wzrostu jako możliwe narzędzie terapeutyczne w leczeniu mięsaka gładkokomórkowego macicy[16].

Bardzo wartościowym odkryciem zarówno dla diagnostycznego określenia złośliwości jak i leczenia mięsaków macicy jest oznaczenie obecności receptorów steroidowych w utkaniu guza. Interesujące wyniki uzyskano w badaniu M.M.Leitao i wsp., w którym wykazano intensywną ekspresję receptora estrogenowego (ER) i progesteronowego (PR) w leiomyoma (78% dla ER i 88% dla PR), natomiast w przypadkach leiomyosarcoma wynik był znacznie niższy (40% dla ER i 38% dla PR)[19]. Ekspresja receptora androgenowego pozostawała na zbliżonym poziomie w obu nowotworach (32% w LM i 40% w LMS). Co ciekawe u 6 spośród opisywanych pacjentek stosowano hormonoterapię bez wcześniejszej znajomości ekspresji receptorów. Wśród tych pacjentek badania immunohistochemiczne wykazały ujemny odczyn receptorów u 3 pacjentek, a w dwóch przypadkach dodatni odczyn wykazywały wszystkie rodzaje receptorów[19]. Efekty leczenia nie zostały opisane. Badanie to potwierdziło kilka wcześniejszych badań. W świetle obecnych danych można stwierdzić, iż dodatni odczyn receptorów steroidowych potwierdzony badaniami immunohistochemicznymi guza, świadczy o łagodnym charakterze nowotworu, lepszym rokowaniu, dłuższym przeżyciu oraz mniejszej inwazyjności nowotworu. Wysoka aktywność tych receptorów w utkaniu guza daje również nadzieje na leczenie nowotworu za pomocą środków hormonalnych z dobrym efektem terapeutycznym. Jednak przed zastosowaniem takiego leczenia powinno się najpierw potwierdzić aktywność receptorów steroidowych badaniem immunohistochemicznym [11,9, 12,15].

Podobnej diagnostyki opartej na badaniach immunohistochemicznych guza wymaga zastosowanie nowoczesnych celowanych metod leczenia, do których należy inhibitor kinazy tyrozynowej – preparat STI571 (Gleevec). Preparat ten stał się przełomem współczesnej terapii nowotworów podścieliska przewodu pokarmowego, podobnie jak zastosowanie Herceptyny (trastuzumab) w leczeniu zaawansowanego raka piersi czy Iressy (gefitinib) w leczeniu raka płuc. Skuteczność działania tych leków zależy od obecności w komórkach nowotworu odpowiednich receptorów lub zaburzeń w genomie komórki, takich jak obecność genu i receptora Her-2, mutacja w exonie 11 genu c-kit, obecność białka C-kit, itp.[20].

Badnia obecności genu i białka Her-2 wykazały ich brak w mięsakach macicy[21]. Natomiast badania nad genem c-kit oraz jego produktem są niejednoznaczne.

However, studies of c-kit gene and its product are ambiguous. In the study by L. Wang et al, C-kit protein was detected in 75% of leiomyosarcomas and it was a very intense expression (estimated at 3+) [22]. In more benign tumours the expression was 28% (in a benign stromal sarcoma) or absent (in leiomyoma). The results did not confirm previous studies, but the study used material was derived from a Spanish female population, and according to the author the results may depend on the ethnic group of subjects. Furthermore, different technical procedures were adopted for the study and the presence of expression in 10% of tumour cells was considered as a positive result, while in the study by W. E. Winter et al a result was positive with 30% of stained cells. In this study the expression of C-kit protein was obtained in only 1 (6%) of 17 investigated LMS cases [22,23]. However, in a study by M. R. Raspollini et al positive expression (> 20% stained cells) was present in 53% of LMS. A longer period of remission in C-kit negative cases was also noticed in this study [24]. These studies require verification and harmonization of the procedure, because their effects can constitute a very important indicator, which is the presence of C-kit protein in a tumour, allowing a preliminary classification of patients for targeted therapy.

Studies of the family of p16 proteins are at a similar stage (including proteins p16, p15, p18 and p19), responsible for the inhibition of cell cycle progression, cell differentiation, apoptosis and DNA damage repair. High incidence was found in the case of genetic abnormalities of p16 protein, therefore studies on the clinical use of a p16 protein inducer are conducted [25]. In a study by B. Bodner-Adler et al the expression of p16 protein in uterine cancers was compared, which led to obtaining a comparable incidence of positive reaction in leiomyoma (LM) and STUMP (12% LM and 21% STUMP), whereas in the case leiomyosarcoma the index of p16 protein expression was 57% of LMS cases, which was a very intense expression. This result may be explained by the supposition that in the case of leiomyosarcoma, p16 protein is produced in large quantities, but its biological activity is low, which favours the development of cancer [25].

Undoubtedly genetic engineering methods belong to modern methods of anticancer treatment. Research on this method in cases of leiomyosarcoma led to the detection of calponin h1 using immunohistochemical methods and its significance in sarcomas. This protein is a part of a smooth muscle cell, and as demonstrated by studies, in leiomyosarcoma cells its amount is significantly reduced [26]. The change in the genome of human leiomyosarcoma cells involving the introduction of the gene encoding calponin h1, has increased the concentration of this protein in the cell, normal growth of smooth muscle cells and reduced the intensity of cancer cells proliferation. This data offers hope for the treatment of leiomyosarcoma cases diagnosed with immunohistochemical methods, using genetic engineering [26].

W badaniu L.Wang i wsp. białko C-kit wykryto w 75% badanych mięsaków gładkokomórkowych i była to bardzo intensywna ekspresja (oceniana na 3+)[22]. Natomiast w guzach o łagodniejszym charakterze ekspresja wynosiła 28% (w mięsaku podścieliskowym łagodnego stopnia) lub była nieobecna (w mięśniaku gładkokomórkowym). Wyniki nie potwierdziły poprzednich badań, jednak do badania użyto materiału pochodzącego od hiszpańskiej populacji kobiet, a według autora wyniki mogą być zależne od grupy etnicznej badanych. Ponadto zastosowano inne procedury techniczne badania oraz przyjęto za dodatni wynik obecność ekspresji w 10% komórek guza, podczas gdy w badaniu W.E. Winter i wsp. wynik dodatni stwierdzano przy 30% wybarwionych komórkach. W tym badaniu uzyskano ekspresję białka C-kit jedynie w 1 (6%) spośród 17 badanych LMS[22,23]. Natomiast w badaniu M.R. Raspollini i wsp. dodatnia ekspresja (>20% komórek wybarwionych) obecna była 53% LMS. W tym badaniu dostrzeżono również dłuższy okres remisji w przypadkach C-kit ujemnych[24]. Badania te wymagają weryfikacji i ujednoczenia procedury, ponieważ ich efekty mogą stanowić bardzo ważny wskaźnik, jakim jest obecność białka C-kit w utkaniu guza, pozwalający na wstępną kwalifikację chorych do celowanego leczenia.

Na podobnym etapie znajdują się badania nad rodziną białek p16 (obejmujące białka p16, p15, p18 i p19), odpowiedzialnych za hamowanie postępu cyklu komórkowego, za różnicowanie komórek, apoptozę i naprawę uszkodzeń DNA. Stwierdzono wysoką częstotliwość zachorowań w przypadku genetycznych nieprawidłowości białek p16, dlatego też, prowadzone są badania dotyczące zastosowania klinicznego induktora białka p16[25]. W badaniu B. Bodner-Adler i wsp. porównano ekspresję białka p16 w nowotworach macicy, uzyskując porównywalną częstość dodatniego odczynu w mięśniaku gładkokomórkowym (LM) i STUMP (12% LM i 21%STUMP), natomiast w przypadku leiomyosarcoma indeks ekspresji białka p16 wyniósł 57% przypadków LMS i była to bardzo intensywna ekspresja. Wynik ten może tłumaczyć przypuszczenie, iż w przypadku leiomyosarcoma białko p16 jest produkowane w dużej ilości, ale jego aktywność biologiczna jest niska, co sprzyja rozwojowi nowotworu[25].

Do nowoczesnych metod leczenia przeciwnowotworowego należą niewątpliwie metody inżynierii genetycznej. Badania nad tą metodą w przypadkach leiomyosarcoma doprowadziły do wykrycia przy użyciu metod immunohistochemicznych kalponiny h1 i jej znaczenia w mięsakach. Białko to wchodzi w skład komórki mięśnia gładkiego i jak wykazały badania w komórkach leiomyosarcoma jej ilość znacznie się zmniejsza [26]. Zmiana w genomie ludzkich komórek leiomyosarcoma polegająca na wprowadzeniu genu kodującego kalponinę h1, spowodowała wzrost stężenia tego białka w komórce, prawidłowy wzrost komórek mięśnia gładkiego oraz zmniejszenie intensywności proliferacji komórek nowotworowych. Dane te dają nadzieje na leczenie za

The described studies clearly indicate a need for improvement of the diagnostics of uterine cancers with immunohistochemical analysis and genetic testing. Most of the investigated markers allow to distinguish malignant cancers from benign ones. The presence or absence of a factor also allows to determine the prognosis and select an appropriate therapeutic method, including the classification of a patient for modern forms of anticancer therapy.

In some cases even a genetic test of known disorders of the genome does not give the expected results, e.g. the absence of mutations in exons 9,11,17 with positive expression of c-kit protein. However, in this case, the very detection of c-kit protein expression at the appropriate level enables classification of a patient for treatment with STI571.

Cases of inoperable cancers, producing multiple metastases, require immediate introduction of new therapies which already provide the desired effect in other types of cancers with similar biology.

The evaluation of immunohistochemical parameters with high predictive value is desirable in all cases of uterine leiomyosarcomas in order to create a system of classification of patients to appropriate therapeutic groups as early as during the initial diagnosis.

pomocą inżynierii genetycznej przypadków leiomyosarcoma diagnozowanych badaniami immunohistochemicznymi[26].

Opisane badania jednoznacznie wskazują na konieczność poszerzenia diagnostyki nowotworów macicy o badania immunohistochemiczne oraz badania genetyczne. Większość badanych markerów pozwala na odróżnienie nowotworów złośliwych od łagodnych. Obecność lub brak danego czynnika pozwala ponadto na ustalenie rokowania i wybranie odpowiedniej metody terapeutycznej, w tym również na kwalifikację chorego do nowoczesnych form leczenia przeciwnowotworowego.

W niektórych przypadkach nawet badanie genetyczne znanych zaburzeń genomu nie daje oczekiwanych efektów, np. brak mutacji w exonach 9,11,17 przy dodatniej ekspresji białka c-kit. Jednak w tym przypadku samo wykrycie ekspresji białka C-kit na odpowiednim poziomie pozwala na klasyfikację chorego do leczenia za pomocą STI571.

Przypadki nieoperacyjnych nowotworów, dających mnogie przerzuty wymagają natychmiastowego wprowadzenia nowych metod leczenia, które dają już oczekiwane efekty w innych typach nowotworów o podobnej biologii.

Natomiast poddanie ocenie parametrów immunohistochemicznych o dużej wartości prognostycznej wskazane jest we wszystkich przypadkach mięsaka gładkokomórkowego macicy, by stworzyć system klasyfikacji chorych do odpowiedniej grupy terapeutycznej już podczas pierwotnej diagnostyki.



## References/Piśmiennictwo:

1. **D'Angelo E., Prat J.**, Uterine sarcomas: A review, *Gynecol. Oncol.* 116 (2010), s. 131–139
2. **Gadducci A., Cosio S., Romanii A.**, The management of patients with uterine sarcoma: A debated clinical challenge, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 65 (2008), s. 129–142
3. **Zieliński J., Krzakowski M.**, Nowotwory złośliwe narządu płciowego kobiety. W: Krzakowski M. (red.): *Onkologia kliniczna*. Borgis-Wydawnictwo Medyczne, Warszawa, 2001 (tom II), s. 140–193.
4. **Larson B., Silfverswarbd C., Nilsson B.**, Prognostic factors in uterine leiomyosarcoma A clinical and histopathological study of 143 cases The Radiumhemmet series 1936–1981, *Acta Oncologica* 29 (1990) 2, s. 185–191
5. **Coindre J.M., Trojani M., Contesso G.**, Reproducibility of a Histopathologic Grading System for Adult Soft Tissue Sarcoma, *Cancer* 1986, 58, s. 306–309.
6. **Zalewski K., Doniec J., Baranowski W.**, Zmiany klasyfikacji zaawansowania nowotworów narządu płciowego u kobiet – stan na 2009 rok, *Ginekol Pol.* 2010, 81, s. 778–782,
7. **Sznarkowska A., Olszewski R., Zawacka-Pankau J.**, Farmakologiczna aktywacja supresora nowotworu, natywnego białka p53 jako obiecująca strategia zwalczania nowotworów, *Postępy Hig Med Dośw* (online), 2010; 64: s. 396–407
8. **Kim S.H., Kim J.W., Kim Y.T.**, Prognostic factors and expression of p53 and mdm-2 in uterine sarcomas, *Int. J of Gynecol. and Obst* (2006) 95, s. 272–277
9. **Mittal K., Demopoulos R.I.**, MIB-1 (Ki-67), p53, Estrogen Receptor, and Progesterone Receptor Expression in Uterine Smooth Muscle Tumors, *Human Path.* V. 32, No. 9 (Sept 2001), s. 984–987,
10. **Zhai YL, Kobayashi Y, Mori A.**, Expression of steroid receptors, Ki-67, and p53 in uterine leiomyosarcomas., *Int J Gynecol Pathol.* 1999 Jan;18(1),s.20-28.
11. **Mittal K., Joutovsky A.**, Areas with benign morphologic and immunohistochemical features are associated with some uterine leiomyosarcomas, *Gynecol Oncol* 104 (2007), s. 362–365,
12. **Akhan S.E., Yavuzb E., Tecer A.**, The expression of Ki-67, p53, estrogen and progesterone receptors affecting survival in uterine leiomyosarcomas: A clinicopathologic study, *Gynecol Oncol* 99 (2005), s. 36 – 42
13. **Mayerhofer K., Lozanov P., Bodner K.**, Ki-67 expression in patients with uterine leiomyomas, uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential (STUMP) and uterine leiomyosarcomas (LMS), *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83: s. 1085–1088
14. **Wlazlak E., Surkont G., Suzin J.**, Znaczenie ekspresji genów p53 i bcl-2 oraz antygenu proliferacji komórkowej Ki-67 w transformacji złośliwej w tkance gruczołowej błony śluzowej jamy macicy, *Prz Menopauz* 2003, 6, s. 24–30
15. **Kitaoka Y., Kitawaki J., Kosiba H.**, Aromatase cytochrome P450 and estrogen and progesterone receptors in uterine sarcomas: correlation with clinical parameters, *J of Steroid Bioch & Molec Biol* 88 (2004), s. 183–189
16. **Sanci M., Dikis C., Inan S.**, Immunolocalization of VEGF, VEGF receptors, EGF-R and Ki-67 in leiomyoma, cellular leiomyoma and leiomyosarcoma, *Acta Histochem.* 111(5) 2010 Jan 25, s.
17. **Wlazlak E., Surkont G., Kobos J.**, Ekspresja metaloproteinaz MMP-1, MMP-9 oraz tkankowego inhibitora metaloproteinazy TIMP-1 w przypadkach raka endometrium oraz rozrostów błony śluzowej jamy macicy, *Prz Menopauz* 2006; 6: s. 363–366,
18. **Bodner-Adler B., Bodner K., Kimberger O.**, Expression of Matrix Metalloproteinases in Patients With Uterine Smooth Muscle Tumors: An Immunohistochemical Analysis of MMP-1 and MMP-2 Protein Expression in Leiomyoma, Uterine Smooth Muscle Tumor of Uncertain Malignant Potential, and Leiomyosarcoma, *J Soc Gynecol Investig* Vol. 11, No. 3, April 2004, s.182-186
19. **Leitao M.M., Soslow R.A., Nonaka D.**, Tissue Microarray Immunohistochemical Expression of Estrogen, Progesterone, and Androgen Receptors In Uterine Leiomyomata and Leiomyosarcoma, *Cancer*, Sept 15, 2004 (101) 6, s. 1455-1462.
20. **Zografos G.C., Domeyer P.J.**, Inhibitory kinazy tyrozynowej i przekazywanie sygnału: mechanizmy molekularne w aspekcie najnowszych danych, *Współcz Onkol* (2005) vol. 9; 2, s.43–47
21. **Amant F., Vloeberghs V., Woestenborghs H.**, ERBB-2 gene overexpression and amplification in uterine sarcomas, *Gynecol Oncol* 95 (2004), s. 583–587
22. **Wang L., Felix J.C., Lee J.L.**, The proto-oncogene c-kit is expressed in leiomyosarcomas of the uterus, *Gynecol. Oncol.*, Vol. 90, Issue 2, 2003, s.402-406
23. **Winter W. E., Jeffrey D. Seidman J. D., Krivak T.C.**, Clinicopathological analysis of c-kit expression in carcinosarcomas and leiomyosarcomas of the uterine corpus, *Gynecol Oncol* 91 (2003), s. 3–8
24. **Raspolini M.R., Amunni G., Villanucci A.**, C-Kit Expression in Patients with Uterine Leiomyosarcomas: A Potential Alternative Therapeutic Treatment, *Clinical Cancer Research* Vol. 10, May 15, 2004, s. 3500–3503
25. **Bodner-Adler B., Bodner K., Czerwonka K.**, Expression of p16 protein in patients with uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical analysis, *Gynecol Oncol* 96 (2005), s. 62–66
26. **Horiuchi A., Nikaido T., Taniguchi S.**, Possible role of calponin h1 as a tumor suppressor in human uterine leiomyosarcoma, *J of the Nat Cancer Inst*; May 5, 1999; 91, 9, s. 790-796
27. **Murray S., Linardou H., Mountzios G.**, Low frequency of somatic mutations in uterine sarcomas: A molecular analysis and review of the literature, *Mutation Research* 686 (2010), s. 68–73