

Czy poziom ekspresji COX-2 oraz iNOS może być czynnikiem prognostycznym w diagnozie mięśniaków macicy?

Can the level of expression of COX be a prognostic factor in the diagnosis uterine leiomyomatosis?

Michał Morek, Edyta Bogunia, Andrzej Plewka, Adam Miśkiewicz,
Beata Jakubiec-Bartnik

STRESZCZENIE

WSTĘP

Mięśniaki macicy są najczęstszymi łagodnymi nowotworami żeńskiego narządu rodneho. Przed 40 rokiem życia problem ten dotyczy blisko 30% kobiet populacji kaukaskiej. Diagnostyka mięśniaków opiera się na badaniach ginekologicznym oraz ultrasonograficznym. Pomocniczo stosuje się również histerosonografię, tomografię komputerową oraz rezonans magnetyczny. Cyklooksigenaza 2 (COX-2) jest izoformą indukowalną, syntetyzowaną w odpowiedzi na stymulację fizyczną, chemiczną lub biologiczną. Ulega ekspresji m.in. w tkankach nowotworowych. Stymulacja indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS) oraz wydzielanie NO zachodzące w zmianach patologicznych, odgrywają istotną rolę w rozwoju nowotworu.

CEL PRACY

Uzasadnione zatem wydaje się określenie ekspresji COX-2 i iNOS w niezłośliwych komórkach nowotworowych mięśniaków macicy. W celu dokładnej analizy ekspresji tych czynników zdecydowano się także na pobranie fragmentów obrzeża mięśniaków i porównanie zaobserwowanej ekspresji z wynikami otrzymanymi z mięśniaków.

MATERIAŁ I METODY

Kontrolę czystą stanowiło 20 pacjentek, u których nie stwierdzono zmian mięśniakowatych, zarówno w wieku reprodukcyjnym, jak i okołomenopauzalnym (po 10 pacjentek). Do badań zakwalifikowano po 20 kobiet w wieku rozrodczym ze zmianami mięśniakowymi w macicy oraz z mięśniakami w wieku okołomenopauzalnym. W badanych wycinkach tkankowych dokonano oceny gęstości optycznej komórek z ekspresją wybranych enzymów, tj. COX-2 oraz iNOS.

Zakład Proteomiki
Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem
Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

ADRES

DO KORESPONDENCJI:
Dr hab. n. med. Andrzej Plewka
Zakład Proteomiki
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
w Sosnowcu
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
ul. Ostrogórska 30
41-200 Sosnowiec
tel. 32 364 14 30
fax. 32 364 14 40
e-mail: proteomika@sum.edu.pl
Ann. Acad. Med. Siles. 2012, 66, 1, 28–34
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ISSN 0208-5607

WYNIKI I WNIOSKI

Ekspresja COX-2 oraz iNOS była wyższa zarówno w mięśniaku, jak i w myometrium otaczającym mięśniak w porównaniu z ekspresją tych białek w myometrium macicy kobiet zdrowych. Zwiększona ekspresja COX-2 i iNOS na obrzeżu mięśniaków macicy może decydować o pojawieniu się nowych guzów. Dlatego też należy rozważyć wykorzystanie poziomu ekspresji COX-2 i iNOS jako czynników prognostycznych.

SŁOWA KLUCZOWE

COX-2, iNOS, macica, mięśniak macicy, wiek reprodukcyjny, wiek okołomenopauzalny

ABSTRACT**INTRODUCTION**

Fibroids are the most common tumors of benign nature of the female reproductive organ. Before the age of 40 this problem affects nearly 30% of female Caucasian population. Diagnosis of fibroids is based on a gynecological examination and ultrasound. Additionally the diagnosis also applies histerosonography, CT scan and MRI scan. COX-2 is induced isoform synthesized in response to the physical, chemical or biological stimulation. Is expressed, inter alia, in tumor tissues. Stimulation of iNOS and NO separation occurring in the pathological changes play an important role in the development of cancer.

AIM OF STUDY

Therefore it seems to be justified to determine the expression of COX-2 and iNOS in the benign tumor cells of uterine fibroids. For exact analysis of the expression of these factors also decided to get outskirts fragments of fibroids and shows a comparison of observed expressions with the results obtained with fibroids.

MATERIAL AND METHODS

Pure control comprised 20 patients in whom there were no fibroidal changes, both in the reproductive age and perimenopausal (10 patients each). To the research qualified 20 women in childbearing age and 20 women in perimenopausal age all with fibroidal changes in uterus. In the studied biopsied tissue evaluated the optical density of cells with the expression of selected proteins like cyclooxygenase-2 (COX-2) and induced nitric oxide synthase (iNOS).

RESULTS AND CONCLUSIONS

Expression of COX-2 and iNOS was higher in the myoma and in the surrounding myometrium fibroids compared with the expression of these proteins in healthy women uterus myometrium. Increased expression of COX-2 and iNOS at the periphery of uterine fibroids can decide the appearance of new tumors. Therefore, you should consider the use of the expression levels of COX-2 and iNOS as a prognostic factor.

KEY WORDS

COX-2, iNOS, uterus, uterine myomas, reproductive age, perimenopausal age

WSTĘP

Mięśniaki macicy (*uterine leiomyoma*, *fibroadenoma*) są najczęstszymi łagodnymi nowo-

tworami żeńskiego narządu rodneego. Charakteryzują się wolnym tempem wzrostu. Częstość ich występowania według różnych źródeł wynosi od 20 do 60%. Są to dane szacunkowe, gdyż duża część kobiet w związku

z brakiem jakichkolwiek objawów nie podlega diagnostyce [1]. Przed 40 rokiem życia problem ten dotyczy blisko 30% kobiet populacji kaukaskiej i około 50% kobiet populacji negroidalnej. Do podstawowych objawów możemy zaliczyć: ostre lub przewlekłe dolegliwości bólowe w dole brzucha, z nasileniem podczas miesiączek, obfite krwawienia miesiączkowe, krwawienia międzymiesiączkowe, zaburzenia płodności, objawy uciskowe na narządy miednicy mniejszej, objawy zakażenia w przypadku zmian martwiczych w obrębie mięśniaka, patologiczny przebieg ciąży oraz porodu [2]. Czynniki ryzyka wystąpienia mięśniaków macicy są: wczesna miesiączka, późne lata reprodukcyjne, otyłość, nierództwo, przyjmowanie niektórych leków oraz dieta bogata w czerwone mięso [1].

Diagnostyka mięśniaków opiera się na badaniach ginekologicznym oraz ultrasonograficznym, obejmując rozpoznanie patologiczne w obrębie narządu rodnej kobiety oraz rozpoznanie struktury morfologicznej zmian i ocenę energii przepływów naczyniowych. Pomocniczo w diagnostyce stosuje się również histerosonografię, tomografię komputerową oraz rezonans magnetyczny.

Mięśniaki są leczone zachowawczo lub operacyjnie. Protokół postępowania zależy od natężenia objawów i skutków, wywoływanych przez mięśniaki. Istotny jest wiek pacjentki, liczba, wielkość, lokalizacja mięśniaków, chęć posiadania potomstwa czy współistnienie innych chorób [1].

Cyklooksygenaza (COX) jest kluczowym enzymem biorącym udział w syntezie prostanooidów [3]. COX-2 jest izoformą indukowalną, syntetyzowaną krótkotrwale w określonych tkankach w odpowiedzi na stymulację fizyczną, chemiczną lub biologiczną. Ulega ekspresji głównie w komórkach układu immunologicznego i tkankach nowotworowych pod wpływem cytokin i mitogenów [4,5,6].

Syntaza tlenu azotu 2 (NOS-2, iNOS) jest również enzymem indukowalnym. Do jej stymulacji dochodzi najczęściej pod wpływem cytokin, hipoksji, stanu zapalnego, martwicy, infekcji, lipopolisacharydów, cukrzycy, miażdżycy czy promieniowania UV [7]. Dane literaturowe podają, iż aktywność iNOS może odgrywać znaczącą rolę jako nowy biologiczny marker progresji guzów. Wzrost ekspresji tej formy syntazy zaobserwowano w wielu typach nowotworów [8]. Stymulacja iNOS oraz wydzielanie NO, zachodzące w zmianach

patologicznych, odgrywają istotną rolę w rozwoju nowotworu [9,10]. Indukowalna syntaza tlenu azotu – iNOS – uczestniczy w procesach zapalnych poprzez stymulację cytokin, endotoksyn czy reaktywnych form tlenu. Wytwarza duże ilości tlenu azotu, z jednej strony niekorzystnego dla ludzi, z drugiej zaś zabójczego dla samych komórek guzowatych [11].

Uzasadnione zatem wydaje się określenie ekspresji COX-2 oraz iNOS w niezłośliwych komórkach nowotworowych mięśniaków macicy. W celu dokładnej analizy ekspresji tych czynników zdecydowano się także na pobranie fragmentów obrzeża mięśniaków i porównanie zaobserwowanej ekspresji z wynikami otrzymanymi z mięśniaków.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach uczestniczyło 60 kobiet. Kontrolę czystą stanowiło 20 pacjentek, u których nie stwierdzono zmian mięśniakowatych, zarówno w wieku reprodukcyjnym (10 pacjentek), jak i okołomenopauzalnym (10 pacjentek). Do badań zakwalifikowano 20 kobiet w wieku rozrodczym ze zmianami mięśniakowymi w macicy (poniżej 45 roku życia, FSH < 30 mIU/ml) oraz 20 kobiet z mięśniakami w wieku okołomenopauzalnym (45–55 rok życia, FSH > 30 mIU/ml). Materiał badany został pozyskany śródoperacyjnie. Tkanekę z mięśniaka o wymiarach 1 × 0,5 cm i takiej samej wielkości fragment tkanki pobrano z marginesem około 4 cm od granicy mięśniaka. Uzyskane wycinki natychmiast umieszczano w zbuforowanej formalinie. Kontrolę stanowił materiał pobrany z macic kobiet operowanych z innych powodów. Niniejsze badania zostały przeprowadzone po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach nr 6501-93/06.

Przed oznaczeniami immunohistochemicznymi skrawki zostały odparafinowane w cieplarni (15 min, 56° C), a następnie w ksylenie i uwodnione w szeregu alkoholowym o malejącym stężeniu: od alkoholu absolutnego do 50%, i płukane w wodzie destylowanej, a następnie w 10-milimolowym buforze PBS o pH 7,5.

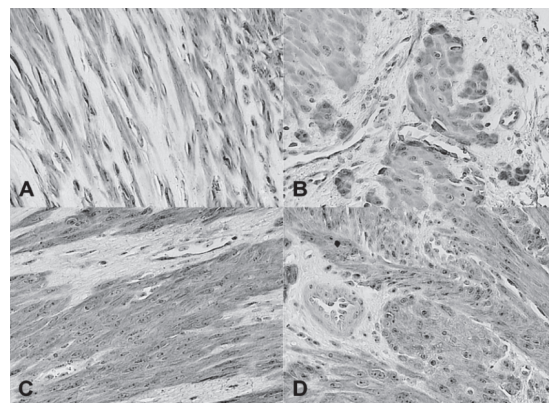
W celu zwiększenia dostępności antygenów COX-2 oraz iNOS dla stosowanych przeciwciał (mysie monoklonalne przeciwciała firmy Santa Cruz Biotechnology skierowane prze-

ciwko COX-2 oraz królicze poliklonalne przeciwiało firmy Abcam skierowane przeciwko iNOS) preparaty były inkubowane w łaźni wodnej o temperaturze 95° C w roztworze Tris-EDTA o pH 9,0 przez 30 min. Miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciała zostały zablokowane poprzez inkubację z nieimmunizowaną surowicą kozią (przy oznaczaniu iNOS) lub końską (przy oznaczaniu COX-2) przez 20 min w temperaturze pokojowej. Po usunięciu surowicy, naniesieniu odpowiednich przeciwciał pierwotnych, skrawki inkubowano przez całą noc w temperaturze 4°C. Zablokowanie aktywności endogennej peroksydazy osiągnięto przez inkubację skrawków w 1,5% (v/v) roztworze H₂O₂ w PBS przez 10 min. W celu uwidocznienia związanego przeciwciała pierwotnego zastosowano metodę ABC (*Avidin-biotin-enzyme complex*) z wykorzystaniem zestawu reagentów Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories). Na skrawki zostały nałożone odpowiednie biotynylowane przeciwciała wtórne, a następnie kompleks awidyn-biotynylowana peroksydaza chrzanowa. W celu wizualizacji utworzonego kompleksu zastosowano substrat peroksydazy, zawierający 3,3-diaminobenzydynę (DAB) i nadtlenek wodoru, zgodnie z protokołem firmowym (Vector Laboratories). Preparaty podbarwiono hematoksyliną Gilla, odwodniono w odwrotnym szeregu ksilenowo-alkoholowym (etanol 70%, 80%, 90%, 2 razy alkohol absolutny; roztwór etanol:ksylen (1:1); 2 razy ksylen – w każdym z rozpuszczalników po 2 min) i zamknięto szkiełkiem nakrywkowym. Negatywną kontrolę stanowiły skrawki, w których przeciwciało pierwotne zastąpiono nieimmunizowaną surowicą, odpowiednio: królika (przy oznaczaniu iNOS) lub myszy (przy oznaczaniu COX-2). Kontrolę wykonywano równolegle na każdym szkiełku, w celu wyeliminowania reakcji niespecyficzych. Dokumentację fotograficzną sporządzono za pomocą mikroskopu świetlnego wyposażonego w przystawkę fotografującą (Nikon). W celu oceny nasilenia reakcji immunologicznej z każdego wykonanego odczynu zrobiono zdjęcia pod powiększeniem x 200 (obiektyw x 20 i okular x 10) mikroskopem Nikon, wyposażonym w kamerę cyfrową. Pomiary densytometryczne powstałego barwnego produktu reakcji immunohistochemicznej wykonano przy zastosowaniu programu Image Pro Plus dla wszystkich odczynów. Wyniki poddano analizie statystycznej.

Uzyskane wyniki wprowadzono do bazy danych, następnie rozkład zmiennych ciągłych w badanych grupach oceniano pod względem normalności rozkładu testem Kołmogorowa-Smirnowa. Znamienność statystyczną różnic między średnimi zmiennych o rozkładzie normalnym oceniano za pomocą testu t-Studenta, a między średnimi zmiennych o rozkładzie różnym od normalnego testem U Manna-Whitneya. Wartości zostały przedstawione jako średnie arytmetyczne ± odchylenie standardowe. Różnice uznawano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności p < 0,05. W analizie statystycznej oparto się na programie Statistica firmy Stat Soft, USA.

WYNIKI

W badanych wycinkach tkankowych dokonano oceny gęstości optycznej komórek z ekspresją omawianych wcześniej enzymów (COX-2 i NOS-2), która stanowi odzwierciedlenie stężenia produktu reakcji immunocytochemicznej. Reprezentatywne obrazy mikroskopowe preparatów, w których oznaczano immunohistochemicznie powyższe białka, przedstawiają ryciny 1 i 2.

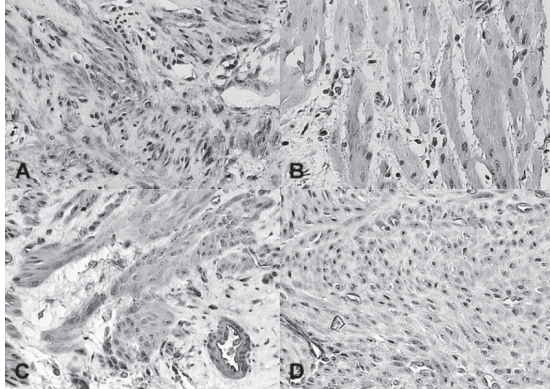


Ryc. 1. Immunohistochemicznie wyrażona ekspresja COX-2 w macicy kobiet w wieku reprodukcyjnym. A – mięśniaki małe; B – kontrola autologiczna mięśniaków małych; C – mięśniaki duże; D – kontrola autologiczna mięśniaków dużych.

Fig. 1. Immunohistochemical staining with rabbit anti-COX-2 of uterine samples from reproductive age women. A – small myomas; B – periphery of small myomas; C – large myomas; D – periphery of large myomas.

Otrzymane wyniki zestawiono w postaci wykresów. Dane dotyczące ekspresji COX-2 przedstawiono na rycinie 3, natomiast wyniki dotyczące ekspresji iNOS na rycinie 4.

Wśród kobiet w wieku reprodukcyjnym średnia wartość gęstości optycznej COX-2 była znamienne statystycznie wyższa zarówno w myometrium macicy otaczającym mięśniak, jak i samym mięśniaku u kobiet, u których stwierdzono obecność guza, w porównaniu z myometrium macicy kobiet zdrowych. Wartość ta stanowiła odpowiednio: 231% (otoczenie mięśniaka) i 260% (mięśniak) średniej wartości uzyskanej w grupie kontrolnej.

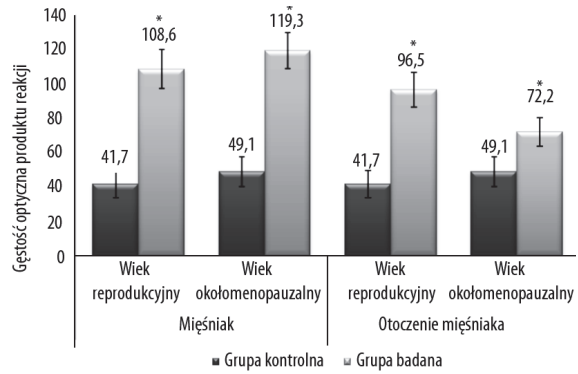


Ryc. 2. Immunohistochemicznie wyrażona ekspresja iNOS w macicy kobiet w wieku reprodukcyjnym. A – mięśniaki małe; B – kontrola autologiczna mięśniaków małych; C – mięśniaki duże; D – kontrola autologiczna mięśniaków dużych.

Fig. 2. Immunohistochemical staining with rabbit anti-iNOS of uterine samples from reproductive age women. A – small myomas; B – periphery of small myomas; C – large myomas; D – periphery of large myomas.

Podobną sytuację zaobserwowano w grupie kobiet w wieku okołomenopauzalnym. Średnia wartość gęstości COX-2, zarówno w myometrium macicy otaczającym mięśniak, jak i w samym mięśniaku, również w sposób znamienne statystycznie przewyższała średnią gęstość optyczną w myometrium kobiet zdrowych i stanowiła odpowiednio: 147% (otoczenie mięśniaka) i 243% (mięśniak) jej wartości. Zarówno w grupie kontrolnej, jak i badanej różnice wartości średniej gęstości optycznej COX-2 między kobietami w wieku reprodukcyjnym a kobietami w wieku okołomenopauzalnym nie osiągnęły znamienności statystycznej dla $p < 0,05$.

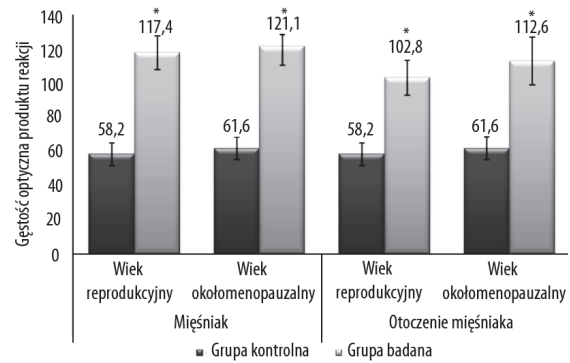
Wśród kobiet w wieku reprodukcyjnym średnia wartość gęstości optycznej NOS-2 była znamienne statystycznie wyższa zarówno w myometrium macicy otaczającym mięśniak, jak i samym mięśniaku u kobiet, u których stwierdzono obecność guza w porównaniu z myometrium macicy kobiet zdrowych. Wartość ta stanowiła odpowiednio: 177% (oto-



Ryc. 3. Średnia gęstość optyczna (OD) cyklooksygenazy-2 w myometrium macicy kobiet zdrowych, myometrium otaczającym mięśniak i w samym mięśniaku.

Fig. 3. Average optical density (OD) of COX-2 in myometrium, the myoma and the myometrium of uterus with the myoma.

czenie mięśniaka) i 202% (mięśniak) średniej wartości uzyskanej w grupie kontrolnej.



Ryc. 4. Średnia gęstość optyczna (OD) indukwalnej syntazy tlenku azotu w myometrium macicy kobiet zdrowych, myometrium otaczającym mięśniak i w samym mięśniaku.

Fig. 4. Average optical density (OD) of iNOS in myometrium, the myoma and the myometrium of uterus with the myoma.

Podobną sytuację zaobserwowano w grupie kobiet w wieku okołomenopauzalnym, gdzie średnia wartość gęstości iNOS, zarówno w myometrium macicy otaczającym mięśniaka, jak i w samym mięśniaku, również w sposób znamienne statystycznie przewyższała średnią gęstość optyczną w myometrium kobiet zdrowych i stanowiła odpowiednio: 183% (otoczenie mięśniaka) i 195% (mięśniak) jej wartości.

Zarówno w grupie kontrolnej, jak i badanej różnice wartości średniej gęstości optycznej iNOS między kobietami w wieku reprodukcyjnym a kobietami w wieku okołomenopauzalnym nie osiągnęły znamienności statystycznej dla $p < 0,05$.

DYSKUSJA

Mięśniaki należą do łagodnych, nienabłonkowych nowotworów, wywodzących się z mięśni gładkich mioblastu lub ściany naczyń krwionośnych błony mięśniowej macicy [12].

Można przypuszczać, iż wśród wielu czynników podejrzewanych o udział w powstawaniu mięśniaków ważne miejsce może zajmować stan zapalny, który prawdopodobnie rozwija się nie tylko w samym guzie, ale i w jego okolicy. Dlatego podjęliśmy decyzję, aby ocenić ekspresję dwóch indukowalnych enzymów, kluczowych dla procesu zapalnego – iNOS-2 oraz COX-2, zarówno w myometrium otaczającym mięśniaki macicy, jak i w samym mięśniaku. Zważywszy, że wiek kobiety jest ważnym czynnikiem ryzyka występowania mięśniaków, dla właściwej oceny zjawisk biologicznych zachodzących w mięśniówce sąsiadującej z guzem oraz w samym mięśniaku, ekspresję badanych białek odnieśliśmy do wieku kobiet [12,13]. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami Madeja [14], który wykazał zwiększoną ekspresję obydwu enzymów w guzach *uterine leiomyoma* i ich sąsiedztwie.

Zarówno ekspresja COX-2, jak i NOS-2 pozostaje pod wpływem jądrowego czynnika κ B (NF κ B), który stanowi kluczowy element kontroli rozwoju stanu zapalnego [14,15]. Zwiększona ekspresja COX-2 i NOS-2 odzwierciedla więc zwiększoną ekspresję lub aktywność NF κ B. Pozwala to domyślać się innych konsekwencji działania tego białka w mięśniaku macicy i jego otoczeniu.

NF κ B fizjologicznie występuje w formie związanej z białkiem inhibitorowym I κ B, które zatrzymuje nieaktywny NF κ B na obszarze cytoplazmy. Interleukina 1 β , TNF- α , chemokiny czy wewnątrzkomórkowy stres prowadzą do fosforylacji I κ B przez kinazę I κ B (IKK), co powoduje uwolnienie czynnika i jego translokację do jądra, gdzie reguluje szeroką gamę genów. Ich produkty są związane m.in. z rozwojem stanu zapalnego. I tak, wśród cytokin są to np. IL-1 β i TNF- α , wśród chemokin: IL-8 i MCP-1. Z angiogenezą wiążą się: VEGF, TNF- α czy IL-8, natomiast z proliferacją: TNF- α , IL-1 czy IL-6. COX-2 i NOS-2, oprócz związku z rozwojem stanu zapalnego, są także łączone z promocją guza [16,17]. Należy tutaj bardzo wyraźnie podkreślić, iż cytokiny aktywujące NF κ B, takie jak IL-1 β czy TNF- α , są wydzielane nie tylko przez zaktywowane makrofagi

i monocyty, ale także przez same komórki mięśniaka, skąd prawdopodobnie dyfundują do myometrium otaczającego guza.

Dowodem mogą być wyniki pracy Madeja [14] oraz nasze badania (dane nieopublikowane), w których wykazano zwiększoną ekspresję IL-1 β oraz TNF- α w mięśniaku. Podobną sytuację zaobserwowano w otoczeniu mięśniaka, a zatem obszar ten sam w sobie może stanowić źródło tych cytokin. Dodatkowo wykazano w nim zwiększoną infiltrację makrofagów [18]. Warto wspomnieć, iż poziom omawianych cytokin, szczególnie IL-1 β , jest podwyższony w surowicy kobiet z mięśniakami macicy. Możliwe, iż pasaż tych czynników z łożyska naczyniowego przyczynia się do uruchomienia kinaz fosforylujących I κ B. IL-1 β i TNF- α pobudzając NF κ B wpływają pośrednio na poziom COX-2 i NOS-2 [14].

Podobne wyniki podają Comunoglu i wsp. [19], którzy w badaniach ekspresji kilku czynników, a wśród nich COX-2 w różnych zmianach guzowych w macicy, dokonali analizy tkanek macicy (przypadki mięśniaków, nietypowych zmian mięśniakowatych i mięsaków macicy), przeprowadzając oznaczenie immunohistochemiczne, z użyciem przeciwciał adekwatnych do oznaczanego czynnika. We wszystkich preparatach, w których oznaczano COX-2, w mięśniakach macicy stwierdzono ekspresję tego czynnika, a w kilku przypadkach nadekspresję. Nadekspresję stwierdzono także w kilku atypowych zmianach podobnych do mięśniaków, lecz w żadnym preparacie wykonanym z tkanki mięsaka [19].

Warto zastanowić się, czy stwierdzenie u kobiet z mięśniakami macicy zwiększonej ekspresji COX-2 i iNOS w myometrium otaczającym guz nie jest negatywnym czynnikiem prognostycznym, wskazującym na ryzyko ponownego rozwoju mięśniaka. Możliwe, iż obecność badanych enzymów świadczy także o możliwości zezłośliwienia danej zmiany, gdyż w innych publikacjach dotyczących udziału COX-2 i NOS-2 w onkogenezie aktywność obu białek stwierdzano w przypadkach nowotworów złośliwych narządów rodnych. Co więcej, Thomsen i wsp. [20] zaobserwowali korelację między wzrostem aktywności NOS-2 a wzrostem stopnia złośliwości tych nowotworów. Natomiast Li i wsp. [21] wykryli znacząco wyższą ekspresję COX-2 w ogniskach przerzutowych raka jajnika i przypuszczają, iż może to mieć wpływ na progresję nowotworu w jajniku.

Charakterystyka COX-2 i iNOS skłania do tezy, iż enzymy te mogą stać się interesującymi czynnikami prognostycznymi. Tym bardziej ciekawa staje się korelacja między indukowanymi formami tych enzymów, z uwzględnieniem faktu, że aktywność iNOS w dużym stopniu pokrywa się z danymi dotyczącymi aktywności COX-2. Dlatego też należy rozważyć wykorzystanie poziomu ekspresji COX-2 i iNOS jako czynnika prognostycznego.

WNIOSKI

1. Ekspresja COX-2 oraz iNOS jest wyższa zarówno w mięśniaku, jak i w myometrium otaczającym mięśniak w porównaniu
2. Ekspresja COX-2 i iNOS zarówno w guzach, jak i w ich okolicy pozostaje w pozytywnej korelacji między sobą, co wskazuje na wspólną aktywację i regulację obydwu białek, ich współdziałanie oraz wzajemne interakcje w tych obszarach.
3. Myometrium macicy otaczające mięśniak nie jest wolne od zmian patologicznych charakterystycznych dla stosunkowo dobrze odgraniczonych guzów. Zwiększona ekspresja COX-2 i iNOS na obrzeżu *uterine leiomyoma* wskazuje, iż w obszarze tym toczy się proces zapalny.
4. Zwiększona ekspresja COX-2 i iNOS na obrzeżu mięśniaków macicy może decydować o pojawieniu się nowych guzów.

PIŚMIENNICTWO

1. Robak-Chołubek D, Jakiel G. Mięśniaki macicy. *Prz. Menopauz.* 2006; 6: 406–412.
2. Reroń A., Huras H. Leczenie mięśniaków macicy. *Med. Prakt. Ginekol. Menop.* 2004; 4: 35–37.
3. Burdan F., Chałas A., Szumiło J. Cyklooksygenaza i prostanoidy – znaczenie biologiczne. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2006; 60: 129–141.
4. Murakami A., Ohigashi H. Targeting NOX, iNOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer* 2007; 121: 2357–2363.
5. Mbomye U.R., Song I. Posttranscriptional and posttranslational determinants of cyclooxygenase expression. *BMB Rep.* 2009; 42: 552–560.
6. Banu S.K., Lee J., Speights V.O., Starzinski-Powitz A. Jr, Arosh J.A. Cyclooxygenase-2 regulates survival migration and invasion of human endometriotic cells through multiple mechanisms. *Endocrinology* 2008; 149: 1180–1189.
7. Maul H., Longo M., Saade G.R., Garfield R.E. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr. Pharm. Des.* 2003; 9: 359–380.
8. Sappayatosok K., Maneerat Y., Swadison S. i wsp. Expression of pro-inflammatory protein, iNOS, VEGF and COX-2 in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC), relationship with angiogenesis and their clinico-pathological correlation. *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.* 2009; 14: E319–E324.
9. Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A. i wsp. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in ovarian cancer: correlation with clinical outcome. *Gynecol. Oncol.* 2004; 92: 806–812.
10. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain R.K. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6: 521–534.
11. Stepniak M. Roles of nitric oxide in cancerogenesis. Protumorigenic effects. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 2002; 15: 219–227.
12. *Ginekologia kliniczna.* Red. R. Dębski. Tom 1. Wrocław: Elsevier Urban&Partner; 2009: 187–212.
13. Walker C.L., Stevart E.A. Uterine Fibroids: The elephant in the room. *Science* 2005; 308: 1589–1592.
14. Madej P. Ekspresja aromatazy oraz wybranych cytokin, ich receptorów i białek sygnalizacyjnych w mięśniakach macicy u kobiet w wieku rozrodczym i pomenopauzalnym. *Rozprawa habilitacyjna* Nr 11/2009. Katowice: Śląski Uniwersytet Medyczny 2009.
15. Maeda S., Omata M. Inflammation and cancer: Role of nuclear factor κ B activation. *Cancer Sci.* 2008; 99: 836–842.
16. Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. Cancer – related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436–444.
17. Jing-jing Z., Zhi-ming X., Chun-mei Z., i wsp. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits nuclear factor κ B pathway activation, and regulates adhesion, migration, invasion and apoptosis of endometriotic stromal cells. *Mol. Hum. Reprod.* 2011; 17: 175–181.
18. Miura S., Khan K.N., Kitajima M. i wsp. Differential infiltration of macrophages and prostaglandin production by different uterine leiomyoma. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 2545–2554.
19. Comunoglu N., Durak H., Comunoglu C. i wsp. Expression of cyclooxygenase-2, c-kit progesterone and estrogen receptors in uterine smooth muscle tumors: differential diagnosis. *Ampis* 2007; 155: 726–735.
20. Thomsen L.L., Lavton F.G., Knowles J.R.G. Beesley J.E., Riveras-Moreno V., Mo-neda S. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res.* 1994; 54: 1352–1354.
21. Li S., Miner K., Fannin R., Carlbarret J., Davis B.J. Cyclooxygenase-1 and 2 in normal and malignant human ovarian epithelium. *Gynecol. Oncol.* 2004; 92: 622–627.