

Ekspresja czynnika VEGF i receptora R1 w mięśniakach macicy kobiet w różnym wieku

Expression of VEGF factor and R1 receptor in uterine
myomas in women of different age

Edyta Bogunia¹, Michał Morek¹, Andrzej Plewka¹, Danuta Plewka³, Adam Miśkiewicz¹,
Piotr Wittek¹, Piotr Kurpas², Rafał Bilski², Paweł Madej²

STRESZCZENIE

Mięśniaki macicy należą do najczęstszych łagodnych nowotworów żeńskich narządów płciowych. Są to nowotwory zależne od wpływu steroidowych hormonów płciowych – estrogenów i progesteronu. W komórkach mięśniaków macicy stwierdza się zaburzoną ekspresję niektórych cytokin i czynników, w tym czynników angiogennych. Celem badań była ocena ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF (*vascular endothelial growth factor*) i receptora VEGF-R1 (*vascular endothelial growth factor receptor 1*) w mięśniakach macicy.

Badaniem objęto 20 kobiet ze zmianami mięśniakowatymi w macicy, w tym 10 w wieku rozrodczym i 10 w wieku okołomenopauzalnym. Materiał do badań stanowiły wycinki tkankowe pobrane z mięśniaka oraz próbki pobrane z prawidłowego miometrium. Ekspresję czynnika VEGF i receptora R1 oceniano na podstawie barwienia immunohistochemicznego, wykorzystując technikę ABC.

W ocenianych typach komórek macicy z mięśniakami, zarówno u kobiet młodych, jak i w wieku okołomenopauzalnym stwierdzono wyraźny wzrost ekspresji VEGF. Ekspresja ta była niezależna od wielkości mięśniaka. Stwierdzono także wyraźnie wyższą ekspresję VEGF-R1 w mięśniakach dużych niż w małych. Wysoki poziom ekspresji czynnika VEGF u kobiet w wieku okołomenopauzalnym może wskazywać na dodatkowy lokalny proces syntezy estrogenów. Wysoka ekspresja VEGF-R1 w mięśniakach dużych może świadczyć o bezpośredniej stymulacji wzrostu mięśniaków pod wpływem VEGF.

SŁOWA KLUCZOWE

angiogeneza, mięśniaki, kobieta, VEGF, VEGF-R1

ABSTRACT

Uterine myomas are the most common benign neoplasms of female reproductive organs. These neoplasms depend upon the impact of steroidal sex hormones – estrogen and progesterone. In uterine myoma cells a disturbed expression of some cytokines and factors is found, including angiogenic factors.

¹Zakład Proteomiki Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
²Klinika Ginekologii Endokrynologicznej Katedry Położnictwa i Ginekologii oraz ³Katedra Histologii Wydziału Lekarskiego w Katowicach
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

ADRES DO KORESPONDENCJI:

Prof. dr hab. n. med. Andrzej Plewka
Zakład Proteomiki Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
ul. Ostrogórska 30
41-200 Sosnowiec
tel. +48 32 364 14 30
e-mail: aplewka@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2013, 67, 5, 303–310
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
eISSN 1734-025X

The aim of the study was to evaluate the VEGF factor and VEGF-R1 receptor expression in uterine myomas. In the study there were 20 women with myomatous alterations in the uterus, including 10 women in reproductive age and 10 women in perimenopausal age. The study material consisted of tissue specimens taken from the myoma and specimens taken from normal myometrium. Evaluation of the VEGF factor and R1 receptor expression was conducted by means of immunohistochemical staining, using the ABC technique.

In the evaluated cells with uterine myoma, both in young women and those in perimenopausal age, a significant increase in VEGF expression was found. This expression was independent of the myoma size. Moreover, a significantly higher VEGF-R1 expression was found in large myomas compared to small ones. The high VEGF factor expression level in women in perimenopausal age may indicate an additional local process of estrogen synthesis. The high VEGF-R1 expression in large myomas may suggest a direct stimulation of myoma growth affected by VEGF.

KEY WORDS

angiogenesis, myoma, woman, VEGF, VEGF-R1

WSTĘP

Mięśniaki macicy należą do najczęstszych nowotworów u kobiet w wieku reprodukcyjnym, ale nadal przyczyny ich powstawania nie są do końca jasne. Stwierdza się je klinicznie i/lub histopatologicznie u co najmniej 50% kobiet w okresie okołomenopauzalnym [1,2,3]. Nowotwory te wykazują zależność od zmian poziomu estrogenu i progesteronu. Po menopauzie nie tworzą się już nowe mięśniaki, a istniejące ulegają nawet zmniejszeniu, co wiąże się przede wszystkim z niskim poziomem estrogenów.

Spośród licznych zbadanych czynników ryzyka rozwoju mięśniaków macicy żaden nie był sprzężony w sposób jednoznaczny etiologicznie z ich powstaniem. Wyjątkiem może się okazać transformujący czynnik wzrostu β (*transforming growth factor β* – TGF- β), który ulega wzmożonej ekspresji w mięśniakach gładkokomórkowych w porównaniu z miometrium autologicznym [4].

Od dawna znana jest zależność między wiekiem i czynnością hormonalną u kobiet a występowaniem mięśniaków [5]. Przykładowo, czynnikiem wzrostu ryzyka rozwoju mięśniaków jest wczesna pierwsza miesiączka [6], zauważono też, że kobiety po menopauzie wykazują ponad 90% mniejsze ryzyko progresji mięśniaków [240].

Dużo uwagi poświęca się angiogenezie w chorobach nowotworowych. Tkanki zmienione nowotworowo są zaopatrywane w niezbędne do wzrostu substancje przez własne komórki procesu nowotworzenia naczyń. Uważa się, że dalszy wzrost guza przekraczającego rozmiar 1–2 mm³ nie jest możliwy bez angiogenezy [7].

Głównym czynnikiem pobudzającym angiogenezę jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), będący silnym mitogenem dla komórek endotelialnych, które otrzymują wówczas tzw. fenotyp angiogeny. W następstwie proliferacji i migracji komórek endotelialnych

tworzą się nowe naczynia krwionośne. VEGF jest również czynnikiem przetrwania dla komórek śródbłonkowych i nowotworowych, indukując chemotaksję i aktywację monocytów, a jednocześnie upośledzając funkcje immunologiczne ustroju poprzez hamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych, które odpowiadają za prezentację antygenów. Ważną funkcją VEGF jest ponadto ułatwianie proteolizy otaczających tkanek podczas procesu angiogenezy.

Czynnik VEGF m.in. zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych [8], w wyniku czego białka osocza krwi przedostają się do środowiska okołonaczyniowego, co prowadzi do gromadzenia w tej okolicy płynu i wzrostu ciśnienia śródtkankowego w guzie nowotworowym. Konsekwencją biologiczną aktywności VEGF jest ucisk płynu na komórki guza, a także na naczynia krwionośne zaopatrujące guz w składniki odżywcze. Ponieważ naczynia krwionośne stanowią również drogę dostarczania cytostatyków do komórek nowotworu, wzrost ciśnienia śródtkankowego utrudnia przedostawanie się tych leków do komórek docelowych [9].

Działanie biologiczne VEGF zachodzi przez swoiste receptory. Związanie liganda z receptorem indukuje aktywację szlaków sygnałowych w komórce [10,11]. Głównym receptorem dla VEGF-A jest receptor R1, zwany również Flt-1. Funkcja tego receptora wciąż pozostaje przedmiotem dyskusji. Występuje on w błonie komórek śródbłonkowych, monocytów, makrofagów czy komórek nowotworowych guzów litych [11]. Ligandami dla VEGFR-1 są VEGF-A, VEGF-B oraz PlGF. Część cząsteczek VEGFR-1 przypisuje się funkcję receptora przywabiającego: wychwytuje on VEGF-A i w ten sposób nie dopuszcza do jego połączenia z VEGFR-2, co doprowadza do hamowania aktywności izoformy VEGF-A [12].

Zakładając istnienie licznych czynników ryzyka rozwoju mięśniaków macicy, z których żaden nie jest wystarczająco mocno sprzężony z ich rozwojem, można przyjąć, że odzwierciedlają one rolę środowiska hormonalnego, białek niebędących hormonami,

wieku, rodności czy odżywienia. Etiologicznie są one jednak ściśle powiązane z patogenezą mięśniaków macicy.

Żeby osiągnąć cel pracy, postanowiono określić ekspresję izoformy VEGF-A – najważniejszego czynnika wzrostu śródbłonna naczyń oraz receptora R1, dla którego ligandem jest izoforma VEGF-A. Głównym celem pracy było porównanie poziomu ekspresji izoformy VEGF-A i jej receptora w mięśniakach różnej wielkości, pochodzących od kobiet w różnym wieku.

MATERIAŁY I METODY

Schemat badania

W badaniach wykorzystano gotowe bloczki parafinowe, pochodzące z archiwum Pracowni Patomorfologii Beskidzkiego Centrum Onkologii w Bielsku-Białej.

Do badania włączono po 10 kobiet w każdej grupie badawczej, u których w macicy rozpoznano obecność mięśniaków małych (średnica do 3 cm) lub dużych (średnica powyżej 5 cm), wymagających leczenia operacyjnego. Materiał biologiczny pobierano od kobiet w wieku rozrodczym i niezależnie w wieku okołomenopauzalnym. Kontrolę (po 10 kobiet w każdej grupie wiekowej) stanowiło miometrium, które zostało pobrane z innych przyczyn niż wymienione powyżej jednostki chorobowe. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej SUM w Katowicach (nr KNW/0022/KB/139/09).

Z pozyskanych bloczków zostały przygotowywane preparaty, które posłużyły do wykonania zaplanowanych w harmonogramie pracy barwień immunohistochemicznych, z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał do określonych epitopów.

Badanie immunohistochemiczne

W celu odsłonięcia antygenów preparaty inkubowano w łaźni wodnej o temperaturze 95°C w roztworze Tris-EDTA o pH 6 przez 30 minut, a następnie chłodzono przez około 20 minut do temperatury pokojowej. Po ostudzeniu płukano w PBS i blokowano aktywność endogennej peroksydazy poprzez inkubację w 0,3% (v/v) nadtlenu wodoru w 0,1% roztworze NaN_3 w PBS przez 10 minut. Miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciała blokowano 1% roztworem BSA w PBS, przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po usunięciu surowicy, na skrawki naniesiono odpowiednie przeciwciała pierwszorzędowe. Inkubację prowadzono 22 godziny w temperaturze 4°C. Aby uwidocznić związane przeciwciała, stosowano technikę ABC. W tym celu na skrawki nakładano odpowiednie biotynylowane przeciwciała drugorzędowe,

a następnie kompleks awidyna–biotynylowana peroksydaza (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories).

Do wizualizacji kompleksu ABC zastosowano substrat peroksydazy zawierający 3,3-diaminobenzydinę (DAB) i nadtlenek wodoru, zgodnie z protokołem firmowym (Vector Laboratories). Preparaty podbarwiono hematoksyliną Gilla, odwadniono i zamykano. Negatywną kontrolę stanowiły skrawki, w których przeciwciała pierwotne zastąpiono odpowiednim IgG królika w takim rozcieńczeniu jak przeciwciała pierwotne. Kontrolę wykonywano równolegle na każdym szkiełku, w celu ujawnienia niespecyficznego wiązania przeciwciała pierwotnego.

W badaniach wykorzystano królicze, poliklonalne przeciwciała do ludzkich izoform anty-VEGF-A i anty-R1 firmy Santa Cruz Biotechnology Inc. Użyte odczyny immunohistochemiczne oceniano w mikroskopie świetlnym. Ocenie podlegała zarówno komórkowa lokalizacja wybranych białek, jak i – dzięki komputerowej analizie obrazu – ich ilość. Wyniki poddano analizie statystycznej.

Archiwizacja

Dokumentację fotograficzną sporządzono za pomocą mikroskopu świetlnego wyposażonego w przystawkę fotografującą. Dla oceny intensywności reakcji immunologicznej z każdego wykonanego odczynu zrobiono 10 zdjęć pod powiększeniem x 200 i x 400 (obiektyw x 20 lub x 40 i okular x 10) przy użyciu mikroskopu Olympus BX41 wyposażonego w aparat cyfrowy Olympus C3040.

Ocena reakcji immunocytochemicznej

Przeprowadzono ilościową analizę zawartości ocenianych białek w badanych wycinkach. Za pomocą komputerowego programu KS300 oceniano gęstość optyczną preparatów mikroskopowych w polach, gdzie nastąpiła immunocytochemiczna reakcja barwna na wybrane białko. Pomiar stopnia pochłaniania fali światła świadczy o gęstości optycznej komórek, w cytoplazmie których wykryto kompleksy przeciwciała–antygen, co odzwierciedla zawartość produktu reakcji.

Analiza statystyczna

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 w rozkładzie normalnym oceniano za pomocą testu t-Studenta, a między średnimi zmiennych o rozkładzie różnym od normalnego testem U Manna-Whitneya. W przypadku porównywania więcej niż dwóch śred-

nich wykonano analizę wariancji dwuczynnikowej (*two-way ANOVA*). Wartości zostały przedstawione jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe. Różnice były uznawane za znamienne statystycznie przy poziomie istotności $p < 0,05$. Analizę statystyczną oparto na programie Statistica firmy Stat Soft, USA.

WYNIKI

VEGF

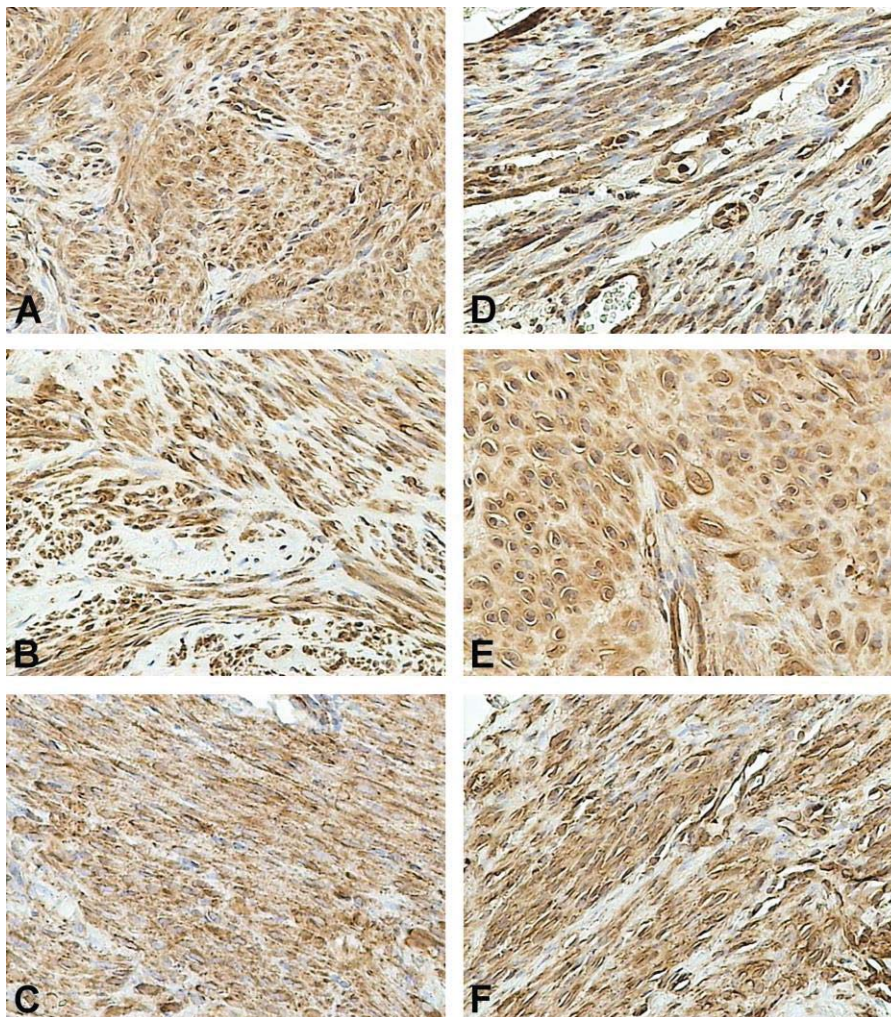
W grupie kobiet w wieku rozrodczym ocena ekspresji VEGF w mięśniakach małych i dużych wykazała wyższą intensywność reakcji immunohistochemicznej

we wszystkich ocenianych komórkach tkanki mięśniaków w porównaniu z kontrolą (tab. I; ryc. 1).

Tabela I. Gęstość optyczna czynnika VEGF w wybranych komórkach macicy z mięśniakami u kobiet w wieku rozrodczym
Table I. Optical density of VEGF in selected cells of uterus with fibroids in women of childbearing age

Typ komórki	VEGF		
	kontrola	mięśniak mały	mięśniak duży
Komórki śródbłonkowe	74,5 \pm 11,1	155,9 \pm 14,3*	139,6 \pm 11,2*
Mięśniówka naczynia	77,8 \pm 6,4	127,1 \pm 10,3*	117,5 \pm 9,3*
Miocyty	49,4 \pm 3,9	88,9 \pm 5,7*	70,7 \pm 8,9*

* znamienność statystyczną dla $p < 0,05$ między grupami badawczą i kontrolą.



Ryc. 1. Immunohistochemicznie wyrażona ekspresja VEGF-A w kontroli (A, D), mięśniakach małych (B, E) i dużych (C, F). Ryciny A, B, C dotyczą kobiet w wieku rozrodczym; D, E, F w wieku okołomenopauzalnym. Powiększenie 200x.
Fig. 1. Immunohistochemically expressed VEGF-A expression in control (A, D), small myomas (B, E) and large (C, F). Figures A, B, C are women of childbearing age; D, E, F, at the age of perimenopause. Magnification 200x.

Wszystkie ujawnione zmiany były statystycznie znacznie wyższe. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji VEGF między mięśniakami małymi i dużymi.

W grupie kobiet w wieku okołomenopauzalnym obserwacje były nieco inne. Statystycznie znamiennej wzrost ekspresji VEGF w mięśniakach małych ujawnił się tylko w mięśniówce naczyń krwionośnych (tab. II; ryc. 1).

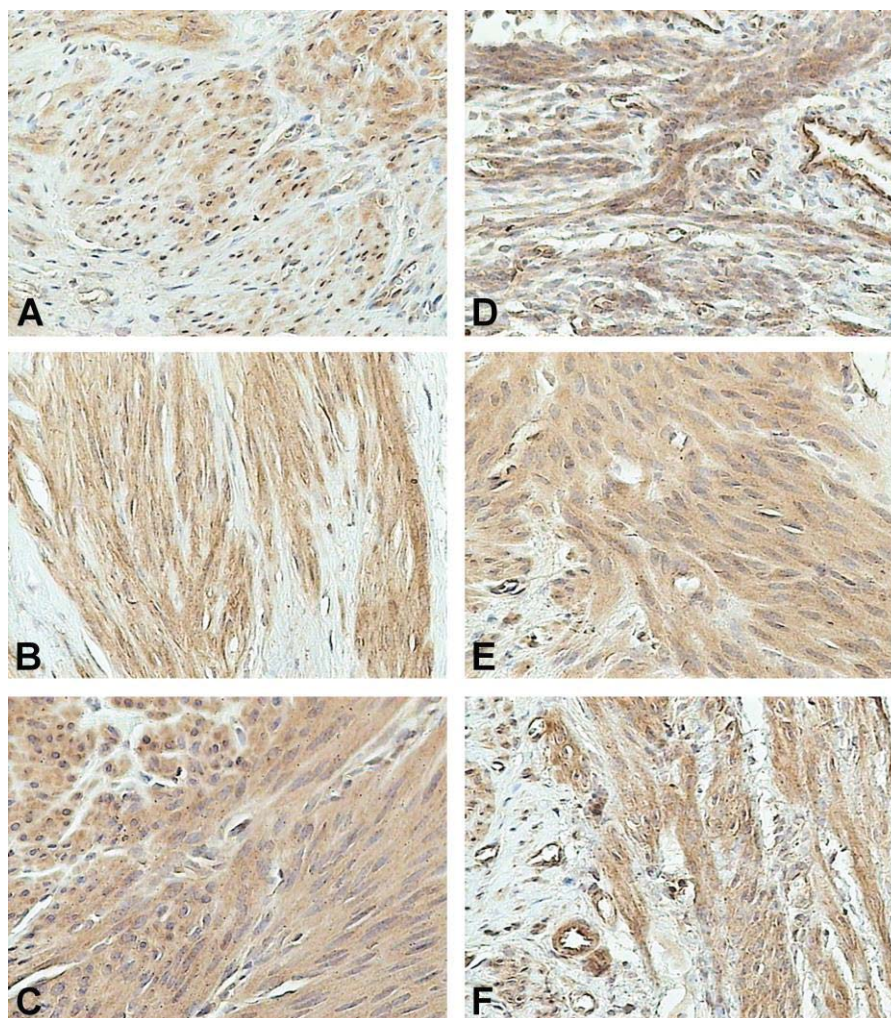
W dużych mięśniakach wzrost taki ujawniono zarówno w komórkach śródbłonkowych naczyń, jak i w mięśniówce naczyń krwionośnych. Ponadto zaobserwowano, że w mięśniakach dużych ekspresja VEGF wzrastała na tyle, że tak w śródbłonku, jak i w mięśniówce naczyń różniła się ona statystycznie znacznie od wartości ujawnionych w mięśniakach małych (tab. II).

Tabela II. Gęstość optyczna czynnika VEGF w wybranych komórkach macicy z mięśniakami u kobiet w wieku okołomenopauzalnym
Table II. Optical density of VEGF in selected cells of uterus with fibroids in women of perimenopausal age

Typ komórki	VEGF		
	kontrola	mięśniak mały	mięśniak duży
Komórki śródbłonkowe	125,9 ± 6,0	142,1 ± 12,8	171,4 ± 9,6* ^Δ
Mięśniówka naczyń	70,5 ± 5,8	105,5 ± 6,7*	140,8 ± 10,4* ^Δ
Miocyty	71,1 ± 6,8	70,7 ± 5,4	79,9 ± 7,3

* różnica znamienna statystycznie dla $p < 0,05$ między grupami badawczą i kontrolą.

^Δ różnica znamienna statystycznie dla $p < 0,05$ między grupami z mięśniakami małymi i dużymi.



Ryc. 2. Immunohistochemicznie wyrażona ekspresja VEGF-R1 w kontroli (A, D), mięśniakach małych (B, E) i dużych (C, F). Ryciny A, B, C dotyczą kobiet w wieku rozrodczym; D, E, F w wieku okołomenopauzalnym. Powiększenie 200x.

Fig. 2. Immunohistochemically expressed VEGF-R1 expression in control (A, D), small myomas (B, E) and large (C, F). Figures A, B, C are women of childbearing age; D, E, F, perimenopausal age. Magnification 200x.

Receptor R1

W grupach kobiet w wieku rozrodczym, zarówno z mięśniakami małymi, jak i dużymi, stwierdzono statystycznie znamienne wyższą ekspresję receptora R1 w porównaniu z kontrolą (tab. III; ryc. 2). Różnice te obejmowały wszystkie oceniane komórki w tkance mięśniaków. Stwierdzono ponadto, że wzrost ekspresji badanego receptora w mięśniakach dużych był na tyle znaczący, że statystycznie przewyższał poziom stwierdzony w mięśniakach małych. Obserwacja ta dotyczy wszystkich badanych komórek (tab. III).

U kobiet w wieku okołomenopauzalnym istotnie wyższa ekspresja receptora R1 w porównaniu z kontrolą dotyczyła tylko mięśniaków dużych (tab. IV; ryc. 2). Wzrost ten był tak znaczny, że statystycznie znamienne przewyższał nie tylko poziom kontroli, ale też poziom ujawniony w mięśniakach małych. Zmiany te dotyczyły wszystkich ocenianych komórek w tkance mięśniaka.

Tabela III. Gęstość optyczna receptora R1 w wybranych komórkach macicy z mięśniakami u kobiet w wieku rozrodczym
Table III. Optical density of R1 receptor in selected cells of uterus with fibroids in women of childbearing age

Typ komórki	R1		
	kontrola	mięśniak mały	mięśniak duży
Komórki śródbłonkowe	105,1 ± 9,3	144,5 ± 10,8*	188,6 ± 13,2* ^Δ
Mięśniówka naczynia	77,8 ± 7,5	133,4 ± 8,8*	157,5 ± 10,3* ^Δ
Miocyty	78,4 ± 6,6	129,6 ± 8,5*	147,7 ± 11,1* ^Δ

* różnica znamienista statystycznie dla $p < 0,05$ między grupami badawczą i kontrolą.

^Δ różnica znamienista statystycznie dla $p < 0,05$ między grupami z mięśniakami małymi i dużymi.

Tabela IV. Gęstość optyczna receptora R1 w wybranych komórkach macicy z mięśniakami u kobiet w wieku okołomenopauzalnym
Table IV. Optical density of R1 receptor in selected cells of uterus with fibroids in women of perimenopausal age

Typ komórki	R1		
	kontrola	mięśniak mały	mięśniak duży
Komórki śródbłonkowe	135,9 ± 6,0	129,0 ± 10,2	198,7 ± 17,5* ^Δ
Mięśniówka naczynia	93,3 ± 7,1	85,9 ± 7,7	162,3 ± 11,3* ^Δ
Miocyty	81,7 ± 7,5	76,7 ± 6,7	129,4 ± 10,5* ^Δ

* różnica znamienista statystycznie dla $p < 0,05$ między grupami badawczą i kontrolą.

^Δ różnica znamienista statystycznie dla $p < 0,05$ między grupami z mięśniakami małymi i dużymi.

DYSKUSJA

Mięśniaki macicy są najczęstszymi łagodnymi nowotworami układu rozrodczego kobiet. Związane z nimi dolegliwości, takie jak przewlekły ból i nieprawidłowe krwawienie z dróg rodnych, stanowią najczęstsze wskazania do usunięcia macicy [13]. Pomimo powszechnego występowania mięśniaków stosunkowo niewiele wiadomo na temat ich biologii oraz czynników wyzwalających wzrost, co stanowi istotny problem w badaniach nad rozwojem skutecznych metod leczenia zachowawczego, mogących stanowić alternatywę dla histerektomii [14].

Pomimo że wzrost wielkości nowotworów zależy od właściwego unaczynienia, trzeba pamiętać o istnieniu typów histopatologicznych guzów charakteryzujących się niezwykle skąpym unaczynieniem krwionośnym, których komórki odżywiają się np. drogą dyfuzji. Rozwój własnego unaczynienia nowotworu sprzyja powstawaniu przerzutów drogą naczyń krwionośnych i chłonnych, jednak bogate unaczynienie nowotworu nie przesądza o jego zdolności tworzenia przerzutów. Istnieją bowiem nowotwory o niezwykle rozwiniętej sieci naczyniowej, charakteryzujące się jedynie wzrostem miejscowym, należą do nich m.in. mięśniaki macicy. Ogniska przerzutowe mogą również pozostać przez długi czas w stanie spoczynku, do momentu gdy proces angiogenezy będzie w nich inicjowany *de novo*. Warto jednak podkreślić, że stan spoczynku nowotworu nie oznacza braku jego aktywności. Komórki nowotworowe ulegają podziałom, ale ich liczba jest równoważona przez ubytek komórek w wyniku apoptozy. Dopiero gdy dojdzie do pobudzenia angiogenezy, zmiana nowotworowa zwykle przejawia cechy inwazyjności [15].

W przeciwieństwie do angiogenezy obserwowanej w warunkach prawidłowych, w przypadku nowotworów nie następuje skoordynowane w czasie wyhamowanie angiogenezy, ale dochodzi do jej stałego pobudzania, wynikającego choćby z ciągłego lub przejściowego niedotlenienia tkanek w obrębie rozwijającego się nowotworu. Wzrost ciśnienia śródtkankowego, wynikający z aktywności czynników proangiogennych, np. czynnika VEGF, nasila niedotlenienie wewnątrz guza, stymulując tym samym postęp angiogenezy [16].

Funkcja receptora R1 wciąż pozostaje przedmiotem dyskusji. Występuje on w błonie komórek śródbłonkowych, monocytów, makrofagów czy komórek nowotworowych guzów litych [17]. Ligandami dla VEGFR-1 są VEGF-A, VEGF-B oraz PlGF. Stwierdzono, że rodzaj liganda łączącego się z VEGFR-1 definiuje rodzaj odpowiedzi komórki. Zaobserwowano ponadto, że VEGFR-1 zlokalizowany w komórkach innych niż endotelialne uczestniczy w pobudzeniu sygnału wewnątrzkomórkowego, co sugeruje

odmienność szlaków sygnałowych w różnych typach komórek [18]. Szczególnie ciekawe obserwacje pochodzą z badań eksperymentalnych nad biologią nowotworów. Wykazano np. pobudzenie proliferacji, migracji, zwiększenia zdolności inwazyjnych komórek nowotworowych w wyniku aktywacji VEGFR-1.

W naszej pracy stwierdziliśmy wyraźny wzrost ekspresji VEGF-A zarówno w mięśniakach małych, jak i dużych, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w kilku laboratoriach [19,20,21,22]. Może to świadczyć o wysokiej intensywności wzrostu guzów, czego wyrazem jest wzmożona angiogeneza. Ważnym spostrzeżeniem tych badań jest stwierdzenie niezależności ekspresji angiogenezy od wielkości mięśniaków. Gęstość nacyniowa i wskaźnik proliferacyjny śródbłonka były niezmienione przez cały cykl menstruacyjny w mięśniówce i śluzówce macicy oraz w mięśniaku gładkim. Jest to zgodne z wynikami wcześniejszych badań mięśniówki i śluzówki macicy [23,24]. Gęstość nacyniowa korelowała ze wskaźnikiem proliferacji w śluzówce i mięśniówce macicy oraz w mięśniaku gładkim.

W przeglądzie piśmiennictwa dotyczącego ekspresji VEGF-A w mięśniakach macicy nie znaleźliśmy artykułów jednoznacznie potwierdzających uzyskane przez nas wyniki. Gentry i wsp. [25] oceniali niezależnie ekspresję VEGF-A w mięśniakach macicy u kobiet poddanych wstępnemu leczeniu analogami gonadoliberyny (GnRH) oraz bez leczenia wstępnego. W obu grupach wykazano wyższą ekspresję VEGF-A w obrębie mięśniaków niż w przylegającym miometrium. Z dostępnych badań wynika, że VEGF-A nie jest czynnikiem mitogennym dla mięśni gładkich [26], a wzrost mięśniaka zachodzi głównie na drodze promowania angiogenezy. Mechanizm ten nie jest jednak estrogenozależny, ponieważ *down*-regulacja GnRH, znosząca endogenne tworzenie tego hormonu, nie tłumi ekspresji VEGF-A w mięśniakach. Co więcej, nie odnotowano różnic w ekspresji VEGF-A między estrogenozależną fazą proliferacyjną cyklu miesięcznego a fazą lutealną, zdominowaną przez działanie progesteronu.

Dixon i wsp. [27] stwierdzili ekspresję VEGF-A w cytoplazmie komórek mięśni gładkich naczyń, miometrium i mięśniaków. Uwidoczniła się również niewielka ekspresja VEGF-A w cytoplazmie komórek śródbłonka. Uzyskane wyniki nie wykazywały jednak istotnych znamienne różnic między badanymi próbami pobranymi z mięśniaków i miometrium. Doświadczenia Hague i wsp. [19] wykazały, że wśród czynników wzrostu związanych z rozwojem mięśniaków macicy największy potencjał proangiogeny ma VEGF-A. Ponadto ekspresja tego peptydu w obrębie

miometrium oraz endometrium wykazywała *up*-regulację w preparatach pobranych z mięśniaków w porównaniu z grupą kontrolną. Bezpośrednim przełożeniem tych wyników była stwierdzona w obu tkankach większa gęstość nacyniowa oraz indeks proliferacyjny. Hague i wsp. [19] kładą nacisk na bezpośrednią zależność hipoksji, jako czynnika indukującego ekspresję VEGF-A. W mięśniakach, podobnie jak w innych rosnących guzach, panuje środowisko o zmniejszonym ciśnieniu parcjalnemu tlenu, co aktywuje sekwencje promotorowe czynników angiogeny. Aktywność mitotyczna VEGF-A jest też ograniczona właściwie tylko do komórek śródbłonka nacyniowego. Można się zastanawiać, czy kobiety z podwyższoną gęstością nacyniową miometrium lub wzrostem ekspresji VEGF-A mają predyspozycję do wystąpienia mięśniaków macicy.

W kontekście przedstawionych rozważań nie wolno zapominać o receptorach, dla których ligandem jest czynnik nacyniowy VEGF. Jednym z nich jest receptor VEGFR-1. Funkcja tego receptora wciąż pozostaje przedmiotem dyskusji. Występuje on w błonie komórek śródbłonkowych, monocytów, makrofagów czy komórek nowotworowych guzów litych. Ligandami dla VEGF-R1 są VEGF-A, VEGF-B oraz PlGF. Częściej VEGF-R1 przypisuje się funkcję receptora przywabiającego: wychwytuje on izoformę VEGF-A i w ten sposób nie dopuszcza do jego połączenia z receptorem VEGF-R2, co doprowadza do hamowania aktywności izoformy VEGF-A [12].

Przeprowadzone przez nas badania oraz dostępne dane literaturowe pozwalają założyć, że VEGF-R1 i VEGF-R2 odgrywają różne role w fizjologicznej i patologicznej angiogenezie. We wczesnej embriogenezie charakteryzują się przeciwstawnym kierunkiem działania w celu uzyskania istotnej równowagi dla odpowiedniego poziomu angiogenezy. W dorosłej fazie życia działanie VEGF-R2 wydaje się głównie ograniczać do nacyniowych komórek śródbłonka/limfy, podczas gdy VEGF-R1 odgrywa rolę zarówno w nacyniowych komórkach śródbłonka i komórek makrofagowych: stymuluje proces zapalny, wzrost nowotworu oraz przerzuty przynajmniej częściowo w makrofagowozależny sposób. Stąd inhibitory, które specyficznie blokują VEGF-R1 lub VEGF-R2, mogą być przydatne w kontroli sygnalizacji VEGF-VEGF-R do leczenia chorób z maksymalną skutecznością i minimalnymi skutkami ubocznymi. Ponadto związek między ścieżką VEGF-R i innymi ścieżkami sygnalizacyjnymi powinien być szeroko przebadany, aby w pełni zrozumieć bazę molekularną regulującą układ krążenia krwi w naszym organizmie.

PIŚMIENNICTWO

1. Flake G.P., Andersen J., Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ. Health Perspect.* 2003; 111: 1037–1054.
2. Marshall L., Spiegelman D., Barbieri R. i wsp. Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstet. Gynecol.* 1997; 90: 967–973.
3. Wise L.A., Palmer J.R., Harlow B. i wsp. Risk of uterine leiomyomata in relation to tobacco, alcohol and caffeine consumption in the Black Women's Health Study. *Hum. Reprod.* 2004; 19: 1746–1754.
4. Arici A., Sozen I. Expression, menstrual cycle-dependent activation, and bimodal mitogenic effect of transforming growth factor-beta1 in human myometrium and leiomyoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003; 188: 76–83.
5. Esteban J.M., Allen W.M., Schaerf R.H. Benign metastasizing leiomyoma of the uterus: histologic and immunohistochemical characterization of primary and metastatic lesions. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1999; 123: 960–962.
6. Schwartz S.M., Marshall L.M., Baird D.D. Epidemiologic contributions to understanding the etiology of uterine leiomyomata. *Environ. Health Perspect.* 2000; 108: 821–827.
7. Grosiki S., Grosika A., Hołowiecki J. Kliniczne znaczenie angiogenezy i czynników ją modyfikujących w onkohematologii. *Wiad. Lek.* 2007; LX: 39–46.
8. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 2004; 25: 581–611.
9. Jain R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging view of anti-angiogenic therapy. *Science* 2005; 307: 58–62.
10. Barańska P., Jerczyńska H., Pawłowska Z. Vascular endothelial growth factor- structure and functions. *Post. Biochem.* 2005; 51: 12–21.
11. Gruchlik A., Chodurek E., Domal-Kwiatkowska D., Dzierżewicz Z. VEGF-A – celem antyangiogennej terapii przeciwnowotworowej. *Post. Biol. Kom.* 2007; 34: 557–580.
12. Scadden D.T. Cancer stem cells refined. *Nat Immunol* 2004; 5: 701–703.
13. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Rev* 2004; 25: 581–611.
14. Jain R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging view of anti-angiogenic therapy. *Science* 2005; 307: 58–62.
15. Kowanetz M., Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 5018–5022.
16. Dvorak H.F. Angiogenesis: Update 2005. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3: 1835–1842.
17. Kowanetz M., Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 5018–5022.
18. Dikov M.M., Ohm J.E., Ray N. i wsp. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J. Immunol.* 2005; 174: 215–222.
19. Hague S., Zhang L., Oehler M.K. i wsp. Expression of the hypoxically regulated angiogenic factor adrenomedullin correlates with uterine leiomyoma vascular density. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 2808–2814.
20. Ciarmela P., Islam M.S., Reis F.M. i wsp. Growth factors and myometrium: biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. *Hum. Reprod. Update* 2011; 17: 772–790.
21. Yu L., Moore A.B., Dixon D. Receptor tyrosine kinases and their hormonal regulation in uterine leiomyoma. *Semin. Reprod. Med.* 2010; 28: 250–259.
22. Maruo T., Ohara N., Wang J. i wsp. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum. Reprod. Update.* 2004; 10: 207–220.
23. Hickey M., Lau T.M., Russell P., Fraser I.S., Rogers P.A. Microvascular density in conditions of endometrial atrophy. *Hum. Reprod.* 1996; 11: 2009–2013.
24. Hickey M., Pillai G., Higham J.M. i wsp. Changes in endometrial blood vessels in the endometrium of women with hormone replacement therapy-related irregular bleeding. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 1100–1106.
25. Gentry C.C., Okolo S.O., Fong L.F. i wsp. Quantification of vascular endothelial growth factor-A in leiomyomas and adjacent myometrium. *Clin. Sci. (Lond)* 2001; 101: 691–695.
26. Brown L.F., Detmar M., Tognazzi K. i wsp. Uterine smooth muscle cells express functional receptors (flt-1 and KDR) for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab. Invest.* 1997; 76: 245–255.
27. Dixon D., He H., Haseman J.K. Immunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. *Environ Health Perspect.* 2000; 108(Suppl 5): 795–802.