

## **Ekspresja IL-1 i TNF- $\alpha$ w mięśniakach macicy i tkance otaczającej u kobiet w różnym wieku**

### **Expression of IL-1 and TNF- $\alpha$ in uterine myomas and myometrium in women of different age**

Edyta Bogunia<sup>1</sup>, Michał Morek<sup>1</sup>, Danuta Plewka<sup>2</sup>, Andrzej Plewka<sup>1</sup>, Piotr Wittek<sup>1</sup>,  
Czarosław Kijonka<sup>1</sup>, Marcin Binkowski<sup>3</sup>, Rafał Bilski<sup>3</sup>, Paweł Madej<sup>3</sup>

#### STRESZCZENIE

##### **WSTĘP**

Mięśniaki macicy są najczęstszymi nowotworami o łagodnym charakterze żeńskiego narządu rodowego. W ich komórkach stwierdza się zaburzoną ekspresję niektórych cytokin i czynników wzrostu.

##### **CEL PRACY**

Celem badań była ocena ekspresji interleukiny-1 (IL-1) i czynnika martwicy nowotworu- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) w mięśniakach macicy kobiet w różnym wieku.

##### **MATERIAŁY I METODY**

W badaniach uczestniczyło 60 kobiet. Kontrolę czystą stanowiły pacjentki, u których nie stwierdzono zmian mięśniakowatych, zarówno w wieku reprodukcyjnym (10 kobiet), jak i okołomenopauzalnym (10 kobiet). 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 (45–56 rok życia, FSH > 30 mIU/ml).

W badaniu immunohistochemicznym pobranych skrawków oceniono gęstość optyczną komórek z ekspresją IL-1 oraz TNF- $\alpha$ , która stanowi odzwierciedlenie stężenia produktu reakcji immunocytochemicznej.

##### **WYNIKI**

Ekspresja badanych cytokin w mięśniaku oraz otaczającym go miometrium w była wyższa niż w miometrium macicy kobiet zdrowych.

##### **WNIOSKI**

Zwiększona ekspresja cytokin na obrzeżu mięśniaków macicy może decydować o pojawieniu się nowych guzów, dlatego należy rozważyć wykorzystanie poziomu ekspresji IL-1 i TNF- $\alpha$  jako czynnika prognostycznego.

##### **SŁOWA KLUCZOWE**

IL-1, TNF- $\alpha$ , mięśniak macicy, wiek reprodukcyjny, wiek okołomenopauzalny

<sup>1</sup>Zakład Proteomiki Wydziału Farmaceutycznego

z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

<sup>2</sup>Katedra Histologii Wydziału Lekarskiego w Katowicach

<sup>3</sup>Klinika Ginekologii Endokrynologicznej

Katedry Położnictwa i Ginekologii

Wydziału Lekarskiego w Katowicach

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego

w Katowicach

##### **ADRES DO KORESPONDENCJI:**

Dr n. med. Edyta Bogunia

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: proteomika@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2013, 67, 6, 345–352

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny

w Katowicach

eISSN 1734-025X

www.annales.sum.edu.pl

## ABSTRACT

**INTRODUCTION**

Fibroids are the most common benign tumors of the female reproductive organ. In uterine myoma cells, a disturbed expression of some cytokines and growth factors is found.

**AIM OF STUDY**

The aim of the study was to evaluate IL-1 and TNF- $\alpha$  expression in uterine myomas and myometrium in women of different age.

**MATERIAL AND METHODS**

The studies included 60 women. The control was a group of 20 patients in whom there were no fibroidal changes. The subjects were both in the reproductive and menopausal age. 20 women of childbearing age with fibroidal changes in the uterus (under age 45, FSH < 30 mIU/ml) and 20 women with fibroids at menopausal age (age 45–56, FSH > 30 mIU/ml) also qualified for the study.

Immunohistochemical studies were performed on the sampled material. In the examined tissue fragments, the optical density of cells expressing IL-1 and TNF- $\alpha$  was evaluated, which reflects the concentration of the immunocytochemical reaction product.

**RESULTS**

Expression of the studied cytokines was higher in the myoma and surrounding myometrium comparing to the uterine myometrium of healthy women.

**CONCLUSIONS**

Increased expression of cytokines at the edge of uterine myomas may be a signal of the appearance of new tumors. Therefore, use of the expression levels of IL-1 and TNF- $\alpha$  as a prognostic factor should be considered.

**KEY WORDS**

IL-1, TNF- $\alpha$ , myomas, reproductive age, menopausal age

## WSTĘP

Mięśniaki macicy (*uterine leiomyoma, fibroadenoma*) należą do z najczęstszych łagodnych nowotworów żeńskich dróg rodnych. Szacuje się, że występują u 25–30% kobiet powyżej 30 roku życia, przy czym 3–9 razy częściej w populacji negroidalnej [1]. Mięśniaki macicy zbudowane są z komórek mięśni gładkich oraz zrębu, który stanowi tkanka łączna włóknista. Mogą być umiejscowione w każdej części macicy oraz tworzyć guzy zarówno pojedyncze, jak i mnogie [2]. Objawy kliniczne lub ich brak zależą od umiejscowienia, liczby oraz rozmiarów mięśniaków [3,4]. Czynnikiem ryzyka ich wystąpienia są: wczesna miesiączka, nierództwo, dieta bogata w tłuszcze czy przyjmowanie niektórych leków. Kluczowe znaczenie w patogenezie przypisuje się jednak zaburzeniom genetycznym oraz działaniu hormonów steroidowych, w tym głównie estrogenów i progesteronu [5,6,7], na szczególną zaś rolę zasłużyły cytokiny, w związku z pełnionymi przez nie funkcjami [8,9,10].

Interleukina-1 (IL-1) oraz czynnik martwicy nowotworów- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) to prozapalne cytokiny, odgrywające główną rolę w układowej i lokalnej odpowiedzi na infekcje czy różnego rodzaju uszkodzenia. Biologiczna rola obu tych peptydów jest podobna, chociaż obie cytokiny oraz ich receptory należą do strukturalnie różnych klas.

Interleukina-1 pełni główną rolę w wywoływaniu różnego rodzaju odpowiedzi zapalnych przez kaskadę wewnątrzkomórkowych sygnałów, w tym aktywacji N-końcowej kinazy c-Jun (JNK) i jądrowego czynnika transkrypcji  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [11]. Szlak sygnału IL-1 jest inicjowany przez tworzenie kompleksu o wysokim powinowactwie, zbudowanego z IL-1 i receptora IL-1 (IL-1RI). Ułatwia to ostatecznie interakcję z TRAF6, niezbędnym czynnikiem indukcji JNK przez IL-1 i aktywacji NF- $\kappa$ B [12]. Interleukina-1 indukuje zarówno cyklooksygenazę 2, jak i indukowalną syntazę tlenu azotu. Jest silnym immunoregulacyjnym i prozapalnym czynnikiem cytokinowym wydzielanym przez szereg komórek w odpowiedzi na zapalenie czy inne bodźce [13,14].

Czynnik martwicy nowotworów- $\alpha$  należy do najbardziej wszechstronnych cytokin, produkowanych nie tylko przez aktywowane makrofagi, ale również przez wiele typów komórek w żeńskich narządach płciowych [15,16]. Mało jest jednak informacji dotyczących jego roli we wzroście mięśniaków gładkokomórkowych (*leiomyoma*) i wpływu płciowych hormonów steroidowych na jego ekspresję w komórkach mięśniaków gładkokomórkowych. Kurachi i wsp. [17] pierwsi wykazali wyższą ekspresję TNF- $\alpha$  w komórkach mięśniaków niż w komórkach miometrium, sugerując jednocześnie, że jest ona wyższa w fazie proliferacyjnej niż w fazie wydzielniczej cyklu miesięcznego. Liczne badania donosiły o zdolności TNF- $\alpha$  do indukowania apoptozy różnych typów komórek [18]. Z uwagi na niewyjaśniony mechanizm patogenezy mięśniaków macicy, uzasadnione wydaje się określenie ekspresji wybranych cytokin w niezłośliwych komórkach nowotworowych mięśniaków macicy. W celu dokładniejszej analizy na pobrano także fragmenty obrzeża mięśniaków i porównano zaobserwowaną w nich ekspresję badanych czynników z ekspresją w komórkach mięśniaków.

## MATERIAŁ I METODY

### Schemat badania

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 grup badawczych 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 (45–56 rok życia, FSH > 30 mIU/ml). Badany materiał został pozyskany śródoperacyjnie. Pobrano fragment tkanki o wielkości 1 × 0,5 cm z mięśniaka oraz z okolicy około 4 cm od jego granicy. Badane wycinki natychmiast umieszczano w zbuforowanej formalinie. Kontrolę stanowił materiał pobrany z macic kobiet operowanych z innych powodów.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

### Badanie immunohistochemiczne

Przed oznaczeniami immunohistochemicznymi preparaty odparafinowano w cieplarni (15 minut, 60°C) i w ksylenie, uwodniono w szeregu alkoholowym o malejącym stężeniu: od alkoholu absolutnego do 50%, płukano w wodzie destylowanej, a następnie w 10-milimolowym buforze PBS o pH = 7,5.

W celu zwiększenia dostępności antygenów IL-1 oraz TNF- $\alpha$  dla stosowanych przeciwciał (królicze poliklonalne przeciwciała firmy Abcam) preparaty umieszczano na 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 95°C w buforowanym roztworze o pH = 9,0. Miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciała zablokowano przez inkubację z nieimmunizowaną surowicą końską przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Po usunięciu surowicy, naniesieniu odpowiednich przeciwciał pierwotnych, preparaty przenoszono na całą noc do lodówki. Aktywność endogennej peroksydazy blokowano przez inkubację skrawków w 1,5% (v/v) roztworze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w PBS przez 10 minut. Związane przeciwciała pierwszorzędowe uwidocznilo metodą ABC (*avidin-biotin-enzyme complex*) z wykorzystaniem zestawu reagentów Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories). Do wizualizacji utworzonego kompleksu zastosowano substrat peroksydazy zawierający 3,3'-diaminobenzodynę (DAB) i nadtlenek wodoru, zgodnie z protokołem firmowym (Vector Laboratories). Preparaty podbarwiono hematoksyliną Gilla, odwodnione w odwróconym szeregu ksylenowo-alkoholowym i zamknięte szkiełkiem nakrywkowym. Negatywną kontrolę stanowiły skrawki, w których przeciwciała pierwszorzędowe zastąpiono nieimmunizowaną surowicą. Kontrolę wykonywano równolegle na każdym szkiełku w celu wyeliminowania reakcji niespecyficzných.

### Archiwizacja

Dokumentację fotograficzną sporządzono za pomocą mikroskopu świetlnego wyposażonego w przystawkę fotografującą. Dla oceny nasilenia reakcji immunohistochemicznej każdy odczyn fotografowano pod powiększeniem x 200 (obiektyw x 20 i okular x 10) przy użyciu mikroskopu Nikon (Eclipse E200), wyposażonego w kamerę cyfrową (DS-Fi1).

Pomiary densytometryczne powstałego barwnego produktu reakcji immunohistochemicznej wykonano przy zastosowaniu komputerowego programu Nikon NIS-AR dla wszystkich wykonanych odczynów. Wyniki poddano analizie statystycznej.

### Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki wprowadzono do bazy danych. 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 średnich wykonano analizę wariancji dwuczynnikowej (*two-way ANOVA*). Wartości zostały przedstawione jako średnie arytmetyczne ± odchylenie standardowe. Za istot-

ne statystycznie uznano różnice przy poziomie istotności  $p < 0,05$ . Do analizy statystycznej wykorzystano program Statistica firmy Stat Soft, USA.

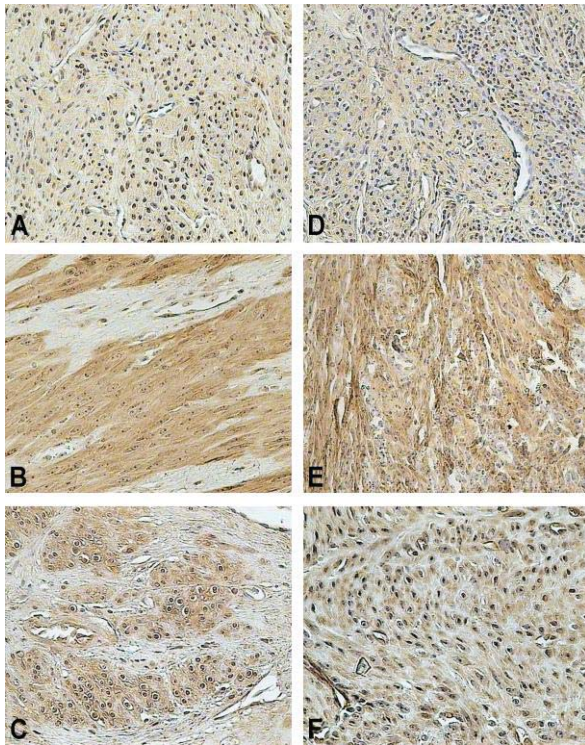
## WYNIKI

W badanych wycinkach tkankowych oceniano gęstość optyczną produktu reakcji w komórkach z ekspresją IL-1 i TNF- $\alpha$ , która stanowi odzwierciedlenie stężenia produktu reakcji immunocytochemicznej. Reprezentatywne obrazy mikroskopowe preparatów, w których oznaczano immunohistochemicznie badane białka, przedstawiają ryciny 1 i 2. Wyniki dotyczące ekspresji IL-1 oraz TNF- $\alpha$  ilustrują ryciny 3 i 4.

### Interleukina-1

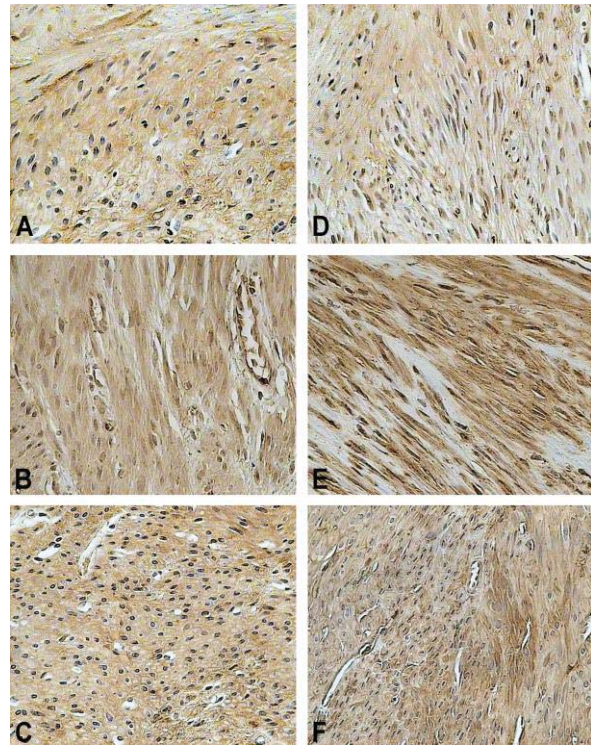
Zarówno u kobiet w wieku reprodukcyjnym, jak i okołomenopauzalnym zanotowano prawie 4,5-krotny

wzrost ekspresji IL-1 w mięśniakach macicy w porównaniu z miometrium macicy kobiet zdrowych. Ujawniono także większe natężenie reakcji immunohistochemicznej dla IL-1 w komórkach pochodzących z otoczenia mięśniaka. Gęstość optyczna produktu reakcji w komórkach z obrzeża mięśniaka wykazujących ekspresję IL-1 była wyższa niż w kontroli i osiągnęła wartość 160% kontroli w przypadku kobiet w wieku reprodukcyjnym, natomiast u kobiet w wieku okołomenopauzalnym był to poziom nieco wyższy – 165% kontroli. Ocena ekspresji IL-1 wykazała statystycznie znamienne różnice między wynikami u kobiet zdrowych oraz dotkniętych procesem chorobowym. U kobiet wchodzących w okres okołomenopauzalny intensywność reakcji (w tkance z mięśniaka i z jego otoczenia) była wyższa niż u kobiet młodych, zarówno u chorych, jak i zdrowych.



**Ryc. 1.** Ekspresja IL-1 w kontroli (A, D), mięśniakach (B, E) i w miometrium pobranym z obrzeża mięśniaka (C, F). Ryciny A, B, C dotyczą kobiet w wieku rozrodczym, a D, E, F w wieku okołomenopauzalnym. Powiększenie 200x.

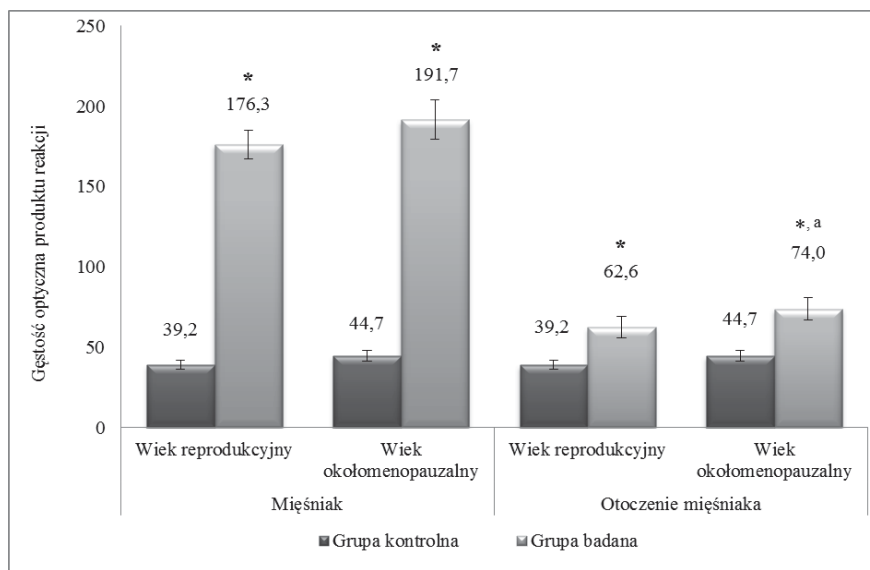
**Fig. 1.** Expression of IL-1 in the control (A, D), myomas (B, E) and in the myometrium from the periphery of the myoma (C, F). Figures A, B, C – reproduction age women. Figures D, E, F – perimenopausal age women. Magnification 200x.



**Ryc. 2.** Ekspresja TNF- $\alpha$  w kontroli (A, D), mięśniakach (B, E) i w miometrium pobranym z obrzeża mięśniaka (C, F). Ryciny A, B, C dotyczą kobiet w wieku rozrodczym, a D, E, F w wieku okołomenopauzalnym. Powiększenie 200x.

**Fig. 2.** Expression of TNF- $\alpha$  in the control (A, D), myomas (B, E) and in the myometrium from the periphery of the myoma (C, F). Figures A, B, C – reproduction age women. Figures D, E, F – perimenopausal age women. Magnification 200x.

## CYTOKINY W MIĘŚNIAKACH MACICY KOBIET



**Ryc. 3.** Gęstość optyczna produktu reakcji dla IL-1 w miometrium macicy kobiet zdrowych, w mięśniaku i w miometrium pobranym z jego obrzeża.

Symbole oznaczają zmiany statystycznie istotne dla  $p < 0,05$  pomiędzy:

\* – grupami kontrolnymi a grupami badawczymi

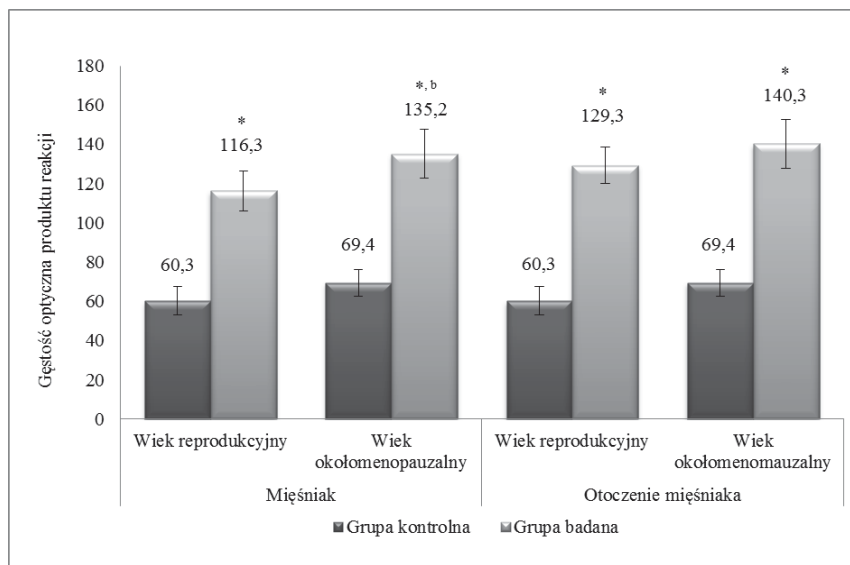
a – miometrium pobranym z obrzeża mięśniaka u kobiet w wieku rozrodczym i u kobiet w wieku okołomenopauzalnym

**Fig. 3.** The optical density of the reaction product of IL-1 in uterine myometrium (control group), in myomas and in the myometrium from the periphery of the myoma.

Symbols indicate statistically significant changes at  $p < 0.05$  between:

\* – control groups and research groups

a – myometrium from the periphery of the myoma from reproduction age women and from perimenopausal age women



**Ryc. 4.** Gęstość optyczna produktu reakcji dla TNF- $\alpha$  w miometrium macicy kobiet zdrowych, w mięśniaku i w miometrium pobranym z jego obrzeża.

Symbole oznaczają zmiany statystycznie istotne dla  $p < 0,05$  pomiędzy:

\* – grupami kontrolnymi a grupami badawczymi

b – mięśniakiem u kobiet w wieku rozrodczym i mięśniakiem u kobiet w wieku okołomenopauzalnym.

**Fig. 4.** The optical density of the reaction product of TNF- $\alpha$  in uterine myometrium (control group), in myomas and in the myometrium from the periphery of the myoma.

Symbols indicate statistically significant changes at  $p < 0.05$  between:

\* – control groups and research groups

b – myometrium from the periphery of the myoma from reproduction age women and from perimenopausal age women

### Czynnik martwicy nowotworów- $\alpha$

Oceniając TNF- $\alpha$  zauważono, że bez względu na wiek kobiet objętych badaniem znamienność statystyczna odnosiła się do różnic ekspresji tej cytokiny w mięśniakach macicy w porównaniu z adekwatną kontrolą. Zanotowano prawie 2-krotny wzrost intensywności immunoreakcji TNF- $\alpha$  w obu grupach wiekowych. Jeszcze wyższe w porównaniu z kontrolą natężenie ekspresji tego peptydu wystąpiło w komórkach pochodzących z obrzeża mięśniaka. U kobiet w wieku reprodukcyjnym komórki wykazujące ekspresję TNF- $\alpha$  charakteryzowała wyższa gęstość optyczna sięgająca 225% kontroli. W grupie kobiet starszych wartość ta osiągnęła poziom 200% kontroli. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w intensywności reakcji immunohistochemicznej dla TNF- $\alpha$  w komórkach mięśniaka, jego obrzeża oraz kontroli między grupami kobiet w wieku reprodukcyjnym i okołomenopauzalnym. Uzyskane wyniki pozwalają jedynie mówić o pewnej tendencji do wzrostu ekspresji TNF- $\alpha$  wraz z wiekiem.

### DYSKUSJA

Dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazują, że wśród czynników podejrzewanych o udział w powstawaniu mięśniaków ważne miejsce zajmuje stan zapalny, rozwijający się nie tylko w samym guzie, ale i w jego okolicy. Cytokiny to grupa cząsteczek biologicznie czynnych, które modyfikują wiele procesów w organizmie. Kaskada cytokin prozapalnych wywołuje reakcje w postaci aktywacji genów. Do głównych czynników pobudzających należą IL-1 oraz TNF- $\alpha$ , działające synergistycznie. Duża biodostępność uwalnianej IL-1 stwarza szeroki wachlarz możliwości oddziaływania na procesy toczące się w organizmie; np. w procesach zapalnych, fizjologicznych, metabolicznych czy immunologicznych. W warunkach fizjologicznych stężenie IL-1 jest niskie, tylko w tkankach neuroendokrynowych synteza IL-1 jest zazwyczaj na wysokim poziomie [19,20].

Za pojawienie się w organizmie czynników wzmagających ekspresję genów dla IL-1 mogą być odpowiedzialne różne stany chorobowe. Co ciekawe, zależność ta opisywana jest również dla TNF- $\alpha$ , co może wskazywać na udział tych czynników w zwalczaniu procesów chorobowych. W związku z tym autorzy ocenili ekspresję tych kluczowych dla procesu zapalnego cytokin w miometrium otaczającym mięśniaki macicy i w samym mięśniaku. Zważywszy, że wiek kobiety jest niezwykle ważnym czynnikiem ryzyka występowania mięśniaków, dla właściwej oceny zjawisk biologicznych zachodzących w mięśniówce

sąsiadującej z guzem, jak i samym mięśniaku, ekspresję badanych białek odniesiono do wieku kobiet.

Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że zarówno IL-1, jak i TNF- $\alpha$  ulegają w macicy fizjologicznej ekspresji, której stopień zmienia się w zależności od fazy cyklu miesięcznego. Poziom mRNA tych cytokin w komórkach endometrium jest najniższy w fazie proliferacyjnej, stopniowo wzrasta w środkowej oraz osiąga szczyt w późnej fazie sekrecyjnej. Opisane zależności pozwalają przypuszczać, że białka te mają znaczący udział w krytycznych dla reprodukcji procesach o charakterze zapalnym, tj. w implantacji i menstruacji [21,22]. Uważa się, że skurcz tętnic spiralnych prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcji jądrowej NF- $\kappa$ B, czego konsekwencją jest produkcja cytokin. Niepodważalną rolę w stymulacji wylewów krwawych przypisuje się TNF- $\alpha$ , który zaburza homeostazę naczyń w obrębie błony śluzowej macicy oraz wykazuje działanie proapoptotyczne względem komórek endotelialnych [23,24].

Inagaki i wsp. [25] oraz Tokyol i wsp. [26] jako pierwsi podjęli próbę ilościowej oceny płynu pochodzącego z jamy macicy u kobiet, u których rozwinęły się mięśniaki i/lub polipy endometrium oraz u kobiet zdrowych. Wykorzystując metodę ELISA oznaczyli poziom takich cytokin, jak IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oraz TGF- $\beta$ . Zauważyli, że wszystkie analizowane peptydy charakteryzowały się istotnie wyższym stężeniem w płynie macicy ze zmianą mięśniakowatą. Znamienny jest również wynik dotyczący interesujących nas cytokin – stwierdzono, że ilość IL-1 była znacząco większa niż TNF- $\alpha$ . Wspomniani autorzy sugerują, że badane cytokiny współtworzą mikrośrodowisko sprzyjające proliferacji mięśni gładkich oraz fibroblastów. Nie rozstrzygnęli jednak, czy stany patologiczne w macicy determinują zmiany biochemiczne w płynie, czy też są one ich wynikiem.

Inna grupa badaczy [27,28], stosując metody immunohistochemiczne oraz technikę Western blot, dokonała oceny ekspresji TNF- $\alpha$  w wycinkach tkankowych uzyskanych z mięśniaka, w odniesieniu do normalnej tkanki miometrium z macicy tej samej kobiety. Stwierdzono, że mięśniaki macicy charakteryzują się zwiększoną, zależną od fazy cyklu miesięcznego, ekspresją TNF- $\alpha$ , wzrastającą w fazie proliferacyjnej, a malejącą w fazie sekrecyjnej cyklu. Otrzymane wyniki pozwoliły wysunąć wniosek, że ekspresja TNF- $\alpha$  podlega ujemnej regulacji ze strony progesteronu. Co ciekawe, stężenie TNF- $\alpha$  w prawidłowej tkance miometrium pochodzącej spoza zmiany mięśniakowatej było prawie nieoznaczalne i nie ulegało wahaniom podczas fazy cyklu miesięcznego. Niestety, nie podano dokładnej lokalizacji pobieranych tkanek, stąd nie wiemy, z jakiej odległości od guza pochodziły pobierane tkanki kontrolne [27,28].

Wyraźny wzrost ekspresji IL-1 oraz tendencja wzrostowa ekspresji TNF- $\alpha$  zauważone u kobiet w wieku

okołomenopauzalnym, zarówno w otoczeniu mięśniaka, jak i w kontroli, wydają się korelować z zanikającą w okresie klimakterium zdolnością jajników do produkcji hormonów steroidowych. Pfeilschifter i wsp. [29] podają, że aktywacja syntezy oraz wydzielania cytokin prozapalnych stanowi bezpośredni skutek obniżenia stężenia estrogenów krążących we krwi. Precyzyjnie nie wyjaśniono tego procesu na poziomie molekularnym [30], aczkolwiek wiadomo, że pod nieobecność estrogenów dochodzi do odblokowania aktywności czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B dla IL-1 oraz AP-1 w przypadku TNF- $\alpha$ , czego skutkiem jest indukcja transkrypcji genów analizowanych cytokin.

Doniesienia literaturowe [31,32,33,34,35], mogą stanowić podstawę do wysunięcia hipotezy, że podwyższona w otoczeniu guza ekspresja cytokin prozapalnych: IL-1 oraz TNF- $\alpha$ , którą zaobserwowaliśmy także w naszych badaniach, odgrywa istotną rolę w kształtowaniu mikrośrodowiska hormonalnego, sprzyjającego wzrostowi zmian mięśniakowatych. Ich działanie wydaje się sprzężone z aktywnością enzymów metabolizmu estrogenów, co bezpośrednio przekłada się na poszczególne etapy ich biosyntezy lub inaktywacji. Można wysunąć tezę, że obecność znacznych ilości IL-1 oraz TNF- $\alpha$  w najbliższym sąsiedztwie mięśniaków macicy przyczynia się do akumulacji *in situ* frakcji estrogenów charakteryzujących się najwyższą aktywnością biologiczną, których ostateczny efekt działania stanowi promocja wzrostu guza.

Czynnikiem limitującym wzrost mięśniaków macicy, podobnie jak innych guzów nowotworowych, jest angiogeneza. W procesie tym zarówno TNF- $\alpha$ , jak i IL-1 wydają się zaznaczać swój udział. Zrąb guzów wykazuje cechy pobudzenia podobnego do obserwowanego w procesach naprawy uszkodzonych tkanek, charakteryzującego się zmienionym fenotypem fibroblastów, przekształceniami macierzy pozakomórkowej, naciekaniami przez komórki odczynowe, angiogenezą, podwyższoną aktywnością proteaz oraz nadmiarem biologicznie czynnych cytokin. Badania nowych antagonistów IL-1 $\beta$  oraz TNF- $\alpha$  blokujących zdolności tego białka do wiązania się z jego receptorem powinno tłumić angiogenezę, inwazyjność i chemoodporność.

Sądzymy, że wykazana w niniejszej pracy nadekspresja omawianych cytokin prozapalnych ujawnia związek nie tylko z będącym wynikiem destrukcji tkanek procesem zapalnym. Prawdopodobnie bierze on udział w inicjacji kaskady zdarzeń, których efektem końcowym jest wytworzenie zmiany mięśniakowatej macicy. Co więcej, przyczynia się do progresji wzrostu tego guza. Wzmoczona ekspresja zarówno IL-1, jak i TNF- $\alpha$ , zauważona w najbliższym otoczeniu guza, znacząco wpływa na kształtowanie się sprzyjającego rozwojowi mięśniaka macicy środowiska hormonal-

nego. Oddziałuje ona również na homeostazę między procesami apoptozy oraz proliferacji jego komórek, a także przyczynia się do wzmoczonego tworzenia nowego łożyska naczyniowego w jego najbliższym sąsiedztwie.

Nie można pominąć również faktu, że nadekspresja cytokin wykazana w naszej pracy w materiale tkankowym spoza obszaru nazywanego chirurgicznym marginesem bezpieczeństwa wydaje się świadczyć o tym, że zasięg patologicznych zmian w macicy jest dosyć duży i nie ogranicza się tylko do guza. Dodatkowo znajduje to potwierdzenie w fakcie, że mięśniaki rzadko pojawiają się jako guzy pojedyncze, bowiem w 90% występują w postaci mięśniaków mnogich.

Należy bardzo wyraźnie podkreślić, że cytokiny IL-1 $\beta$  czy TNF- $\alpha$  są wydzielane nie tylko przez zaktywowane makrofagi i monocyty, ale także przez same komórki mięśniaka, skąd prawdopodobnie dyfundują do miometrium otaczającego guza. Dowodem mogą być wyniki naszych wcześniejszych prac [36,37], w których wykazaliśmy zwiększoną ekspresję IL-1 $\beta$  oraz TNF- $\alpha$  w mięśniaku. Podobną sytuację zaobserwowano w otoczeniu mięśniaka, a zatem obszar ten sam w sobie może stanowić źródło tych cytokin. Warto wspomnieć, że poziom omawianych cytokin, szczególnie IL-1 $\beta$ , jest podwyższony w surowicy kobiet z mięśniakami macicy. Możliwe, że pasaż tych czynników z łożyska naczyniowego przyczynia się do uruchomienia kinaz fosforylujących. IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  pobudzając NF- $\kappa$ B wpływają pośrednio na poziom COX-2 i iNOS [38,39].

Jak dowiedziono, badane przez nas cytokiny wywierają wieloraki wpływ na przebieg procesu nowotworzenia w obrębie mięśniówki macicy. Często celem tego typu badań jest potwierdzenie przydatności pomiaru poziomu cytokin jako czynników prognostycznych dla osób chorujących na nowotwory. Ze swojej natury cytokiny należą do czynników wzrostowych, regulujących różnicowanie się komórek. W trakcie rozwoju guza obserwowana jest wzmoczona synteza mRNA dla grupy cytokin prozapalnych i ich receptorów [40,41]. Badania obejmujące porównanie poziomu TNF- $\alpha$  oraz IL-1 u kobiet ze zdiagnozowanymi mięśniakami dały obiecujące wyniki. Można stwierdzić jednoznacznie, że obie cytokiny odgrywają ważną rolę w patogenezie mięśniaków macicy. Zdrowe kobiety, niezależnie od wieku, charakteryzowały się niskim poziomem TNF- $\alpha$ . W przypadku IL-1 wiek pacjentek okazał istotny się – u kobiet w wieku okołomenopauzalnym stężenie badanego białka było wyższe. Trudno jednoznacznie określić jeden mechanizm działania TNF- $\alpha$  oraz IL-1 w obrębie mięśniaka i w jego okolicy. Warto jednak prowadzić dalsze badania nad udziałem tych białek oraz ich receptorów w tworzeniu zmiany nowotworowej. Podwyższona ekspresja badanych cytokin, w otoczeniu mięśniaków macicy, jak i samych mię-

śniakach wskazuje na udział procesów zapalnych w patogenezie tego typu guzów, jednak precyzyjne zdefiniowanie ich znaczenia wymaga dalszych badań.

## WNIOSKI

1. Ekspresja IL-1, TNF- $\alpha$  jest wyższa zarówno w mięśniaku, jak i w otaczającym go miometrium w porównaniu z ekspresją tych białek w miometrium macicy kobiet zdrowych.

2. Wiek kobiety wywiera istotny wpływ na ekspresję IL-1. U kobiet w wieku okołomenopauzalnym miometrium otaczające zmianę mięśniakowatą oraz miometrium prawidłowe charakteryzują się wyższą ekspresją IL-1 niż u kobiet w wieku reprodukcyjnym.
3. Nadekspresja IL-1 oraz TNF- $\alpha$  odnotowana w miometrium macicy pochodzącym z otoczenia mięśniaka świadczy o tym, że zasięg procesów patologicznych w macicy jest szeroki i nie ogranicza się jedynie do samej zmiany mięśniakowatej.

## PIŚMIENNICTWO

- 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.
- Reroń A., Huras H. Leczenie mięśniaków macicy. *Ginekol. Pol.* 2008; 3: 43–53.
- Wallach E., Vlahos F. Uterine myomas: An overview of development, clinical features, and management. *Obstet. Gynecol.* 2004; 104: 393–406.
- Duhan N., Sirohiwal D. Uterine myomas revisited. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2010; 152: 119–125.
- Parker W.H. Etiology, symptomatology and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril* 2007; 87: 725–736.
- Cheng M.H., Wang P.H. Uterine myoma: a condition amenable to medical therapy? *Exp. Opin. Emerg. Drugs* 2008; 13: 119–133.
- Blok R., Latkowski K.J., Blok K. Etiology and diagnostic problems in pregnant women with uterine myomas. *Ginekol. Pol.* 2002; 73: 266–270.
- Reroń A., Huras H. Etiopatogeneza mięśniaków macicy i ich wpływ na płodność i przebieg ciąży. *Ginekol. Pol.* 2008; 2: 49–57.
- Sozen I., Arici A. Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. *Fertil. Steril.* 2002; 78: 1–12.
- Sozen I., Arici A. Cellular biology of myomas: interaction of sex steroids with cytokines and growth factors. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 2006; 33: 41–58.
- Rothwarf D.M., Karin M. The NF- $\kappa$ B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE* 1999; 26: 12–16.
- Knop J., Wesche H., Lang D. i wsp. Effects of overexpression of IL-1 receptor-associated kinase on NF- $\kappa$ B activation, IL-2 production and stress-activated protein kinases in the murine T cell line EL4. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 3100–3109.
- Arici A., Sozen I. Expression, menstrual cycle-dependent activation, and bimodal mitogenic effect of transforming growth factor- $\beta$ 1 in human myometrium and leiomyoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003; 188: 76–83.
- Arend W.P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002; 13: 323–340.
- Terranova P.F., Hunter V.J., Roby K.F. i wsp. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in the female reproductive tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1995; 209: 325–342.
- Marcinkiewicz J.L., Balchak S.K., Morrison L.J. The involvement of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF) as an intraovarian regulator of oocyte apoptosis in the neonatal rat. *Front. Biosci.* 2002; 7: 1997–2005.
- Kurachi O., Matsuo H., Samoto T., Maruo T. Tumor necrosis factor  $\alpha$  expression in human uterine leiomyoma and its down-regulation by progesterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86: 2275–2280.
- Maruo T., Laoag-Fernandez J.B., Takekida S. i wsp. Regulation of granulosa cell proliferation and apoptosis during follicular development. *Gynecol. Endocrinol.* 1999; 13: 410–419.
- Dinarello C.A. The biological properties of interleukin-1. *Eur. Cytokine Netw.* 1994; 5: 517–531.
- Dinarello C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27: 519–550.
- Von Wolff M., Thaler C.J., Strowitzki T. i wsp. Regulated expression of cytokines in human endometrium through the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Mol. Hum. Reprod.* 2000; 6: 627–634.
- Jasper M.J., Tremellen K.P., Robertson S.A. Reduced expression of IL-6 and IL-1 $\alpha$  mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. *J. Reprod. Immunol.* 2007; 73: 74–84.
- Kelly R.W., King A.E., Critchley H.O.D. Cytokine control in human endometrium. *Reproduction* 2001; 121: 3–19.
- King A.E., Collins F., Klonisch T. i wsp. An additive interaction between the NF- $\kappa$ B and estrogen receptor signaling pathways in human endometrial epithelial cells. *Hum. Reprod.* 2010; 25: 510–518.
- Inagaki N., Ung L., Otani T. i wsp. Uterine cavity matrix metalloproteinases and cytokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometria polyp. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2003; 111: 197–203.
- Tokyo C., Aktepe F., Dilek F.H. i wsp. Expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 in adenomyosis and endometrial polyps and its correlation with angiogenesis. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2009; 28: 148–156.
- Kurachi O., Matsuo H., Samoto T. i wsp. Tumor necrosis factor  $\alpha$  expression in human uterine leiomyoma and its down-regulation by progesterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86: 2275–2280.
- Maruo T., Matsuo H., Shimomura Y. i wsp. Effects of progesterone on growth factor expression in human uterine leiomyoma. *Steroids* 2003; 68: 817–824.
- Pfeilschifter J., Koditz R., Pfohl M. i wsp. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr. Rev.* 2002; 23: 90–119.
- Ozmen B., Kirmaz C., Aydin K. i wsp. Influence of the selective oestrogen receptor modulator (raloxifene hydrochloride) on IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 and bone turnover markers in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Eur. Cytokine Netw.* 2007; 18: 148–153.
- Sumitani H., Shozu M., Segawa T. i wsp. In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. *Endocrinology* 2000; 141: 3852–3861.
- Swartz C.D., Afshari C.A., Yu L. i wsp. Estrogen-induced changes in IGF-I, Myb family and MAP kinase pathway genes in human uterine leiomyoma and normal uterine smooth muscle cell lines. *Mol. Hum. Reprod.* 2005; 11: 441–450.
- Shozu M., Murakami K., Inoue M. Aromatase and leiomyoma of the uterus. *Semin. Reprod. Med.* 2004; 22: 51–60.
- Bulun S.E., Imir G., Utsunomiya H. i wsp. Aromatase in endometriosis and uterine leiomyomata. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2005; 95: 57–62.
- Imir A.G., Lin Z., Yin P. i wsp. Aromatase expression in uterine leiomyomata is regulated primarily by proximal promoters I.3/II. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 1979–1982.
- Madej P., Plewka A., Plewka D. i wsp. The aromatase expression in myomas and myometriums of women in reproduction and perimenopausal age. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2009; 47: 497–504.
- Plewka A., Madej P., Plewka D. i wsp. Immunohistochemical localization of selected pro-inflammatory factors in uterine myomas and myometrium in women of various ages. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2013; 51: 73–83.
- Tetsuka T., Daphna-Iken D., Miller B.W. i wsp. Nitric oxide amplifies interleukin 1-induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.* 1996; 97: 2051–2056.
- Morioka N., Inoue A., Hanada T. i wsp. Nitric oxide synergistically potentiates interleukin-1 $\beta$ -induced increase of cyclooxygenase-2 mRNA levels, resulting in the facilitation of substance P release from primary afferent neurons: involvement of cGMP-independent mechanisms. *Neuropharmacology* 2002; 43: 868–876.
- Kamińska J., Kowalska M., Kotowicz B. i wsp. Cytokiny jako niezależne czynniki prognostyczne u chorych na nowotwory złośliwe. *Współcz. Onkol.* 2006; 10: 259–262.
- Kamińska J., Kowalska M., Kotowicz B. i wsp. Pretreatment serum levels of cytokines and cytokine receptors in patients with non-small cell lung cancer, and correlations with clinicopathological features and prognosis. M-CSF – an independent prognostic factor. *Oncology* 2006; 70: 115–125.