



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Душко Кљакић

**Утицај експресије естрогених и прогестеронских рецептора на  
ангиогенезу, апоптозу и пролиферацију ћелија миома  
код жена у пре и постменопаузи**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: др сци. мед. Слободанка Митровић, ванредни професор

Крагујевац, 2019. године

## САЖЕТАК

Циљ ове студије је био да се утицај експресије стероидних рецептора на маркере ангиогенезе, пролиферације и апоптозе ћелија миома код жена у пременопаузи и постменопаузи. Ово је била студија пресека, клиничко-експериментална, ретроспективна, неинтервенцијска студија у пољу истраживања фундаменталних механизма патогенезе болести, коришћењем патохистолошких материјала из постојеће архиве. Истраживањем је обухваћено 76 пацијената са дијагностикованим лејомиоома утеруса, оперативно леченим на Клиници за гинекологију и акушерство, Клиничког центра Крагујевац, Србија. Према менструалном статусу, формиране су две експерименталне подгрупе. Прва група биле су жене у пременопаузи (ПреМ) ( $n = 35$ ;  $46,2 \pm 5,02$  година), а друга група биле су жене у постменопаузи (ПостМ) ( $n = 41$ ;  $60,25 \pm 5,41$  година). Коришћено је Н &Е бојење за миом и миометријум, као и имунохистохемија за ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR $\alpha$ , VEGF, CD105, Ki678 и каспаза-3. Прогестеронски рецептор је био више изражен у миому и миометријуму у пременопаузи у поређењу са миомом и миометријумом жена у постменопаузи. Експресија Caspase 3 је статистички значајно повећана у групи ПостМ жена у поређењу са ПреМ групом. ER $\alpha$  и ER $\beta$  нису били различити између група ни у узорцима миома ни миометријума. Према нашим подацима, ПР је имао већи утицај на апоптозу и раст ћелија него на естрогенске рецепторе. Пошто је ПР повећан код жена у ПреМ у миому и миометријуму, вероватно је ова експресија довела до смањења експресије апоптотског маркера код ПреМ жена.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to determine the effects of the estrogen and progesterone receptor status on angiogenesis, proliferation and apoptosis of myoma cells in premenopausal and postmenopausal women. This was a cross section; clinical-experimental, retrospective, non-interventional study in the field of the study of fundamental pathogenesis mechanisms of disease using pathohistological materials from the existing archive. The research included 76 patients diagnosed with uterine leiomyomas, operatively treated in the Clinic for Gynecology and Obstetrics, Clinical Centre Kragujevac, Serbia. According to the menstrual status, two experimental subgroups were formed. The first group was premenopausal women (PreM) (n=35; 46.2±5.02 year old), and the second group was postmenopausal women (PostM) (n=41; 60.25±5.41 year old). H&E staining for myoma and myometrium was conducted as well as immunohistochemistry for ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR $\alpha$ , VEGF, CD105, Ki678 and Cas-3. Progesterone receptor was over expressed in myoma and myometrium of premenopausal compared to myoma and myometrium of postmenopausal women. Expression of Caspase 3 was statistically significant increased in PostM women compared to PreM group. ER $\alpha$  and ER $\beta$  were not changed among groups neither in myoma nor in myometrium samples. According to our data, PR $\alpha$  had higher influence on apoptosis and cell growth than estrogen receptors. Since PR $\alpha$  was increased in PreM in both myoma and myometrium, probably this expression led further to lower expression of apoptotic marker in PreM women.

# **1. УВОД**

## Перименопауза, менопауза и постменопауза

Менопауза се дефинише ретроспективно као престанак спонтаних менструација узастопних 12 месеци. Већина жена улази у менопаузу између 49 и 52 године, а са продужењем живота, очекује се да ће провести око 40% свог живота у постменопаузи. Фактори повезани са ранијом менопаузом укључују пушење, нижи индекс телесне масе, нулипаритет, и нижи степен образовања. Иако је менопауза често виђена као једна тачка у времену представљајући последњу менструацију у животу једне жене у корелацији са престанком производње јајних ћелија у јајницима, заправо као менопаузална транзиција јавља се током неколико година и представља динамичан период када жене доживљавају предвидљиве промене менструалног циклуса. *Stages of Reproductive Aging Workshop staging system (STRAW110)* се сматра златним стандардом за карактеризацију промена повезаних са репродуктивним старењем. Овај систем се састоји се од три фазе (репродуктивна, менопаузална транзиција и постменопауза) и укључује седам етапа. Описује типично трајање, карактеристике менструалног циклуса, нивое хормона, број фоликула и симптоме за сваку фазу. Жене се рађају са великом количином ооцита и током репродуктивног периода, број ооцита се постепено смањује кроз овулацију и атрезију. Смањен број ооцита излучује мање инхибина Б, умањујући на тај начин оваријалну негативну повратну спрегу на лучење хормона који стимулише фоликул (енг. *Follicle-Stimulating Hormone* - FSH). Резултат је повећање нивоа FSH које доводи до фоликуларног регрутовања и убрзаног губитка фоликула, уз очување нивоа естрадиола у раној менопаузалној транзицији. На крају, исцрпљење фоликула доводи до варијабилности у одговору јајника на FSH, широко флукутирајућих нивоа естрогена, и губитак нормалног репродуктивног циклуса. Када су сви фоликули јајника осиромашени, јајник није у стању да одговори чак и на високе нивое FSH и пад нивоа естрогена. Период у постменопаузи карактерише се хормонално повишеним FSH ( $>30$  mIU/mL), ниским нивоом естрадиола и ановулацијским циклусима. Менструални циклус се може скратити или продужити, јављају се пратеће појаве у виду таласа врућине, несанице и сувоће вагине. Перименопауза је завршена када жена нема менструацију узастопних 12 месеци, и тада наступа постменопауза (1).

Код жена са миомом у перименопаузи, често постоје неоправдани приступи у облику или занемаривања симптоматологије, очекујући да ће миоми након менопаузе реградирати или преагресивног приступа у облику хистеректомије. Не треба гледати на

материцу само као на орган који омогућава рађање, стога је у терапијском смислу неопходно размотрити мање инвазивне хируршке поступке, али и употребу лекова који ће омогућити многим женама са миомом да уђу у менопаузу без симптома узрокованих миомом (2).

## Патогенеза миома

Лејомиоми материце (познати и као фиброиди или миоми) су најчешћи облик бенигнух тумора материце. Етиологија настанка миома није позната, али је свакако последица сложених интеракција генетских и хормонских фактора, фактора раста и утицаја спољашње средине. Миоми су моноклонални тумори глатких мишића материце који настају из једног клона плурипотентних матичних ћелија из миометријума. Али да би се ова једна плурипотентна матична ћелија почела развијати према миому, у њој најпре морају настати генетске аберације. Ове генетске аберације се могу наследити директно преко X хромозома. Генетска оштећења и мутације могу се јавити током интраутериног живота услед феталне хипоксије или касније под утицајем неких епигенетских фактора као што су ксенобиотици (3). Соматска мутација је почетни догађај у туморогенези. Соматске мутације укључују различите хромозомске аберације од тачкастих мутација до смањења или увећања броја хромозома. Велике хромозомске абнормалности, као што су транслокације и делеције, често се откривају стандардним цитогенетичким кариотипима. Клонска пролиферација претходи развоју цитогенетских прерасподела, сугеришући да су соматске мутације које се не могу детектовати цитогенетски почетни догађаји у онкогенези миома. Четрдесет процената жена оболело од миома материце имају цитогенетске абнормалности које се састоје од преуређења у C-12q14-q15, C-6p21 и C-10q, делеције C-7q [7q22] и C-3, структурне аберације у C-6, и транслокације у C-12. Око 50% миома показује клоналне абнормалности које укључују хромозоме 1,7,12, и транслокација (12;14) (4).

Миоми се састоје од велике количине екстрацелуларног матрикса који садржи колаген тип I и тип III, фибронектин и протеогликане. Током свог раста, миом компримује околно ткиво, узрокујући формирање псеудокапсуле која га окружује. Механичке особине миома су кључни фактор који може допринети њиховом расту. Док су миоми суштински чврсте конзистенције, њихова псеудокапсула је еластичнија и заправо она омогућава адаптацију материце на растући миом. Дакле, псеудокапсула

изазива померање у миометријуму, што није деструктивно јер се одржава интегритет и контрактилност структуре материце (5).

Док миометријум материце изгледа анатомски униформно, унутрашња и спољашња зона миометријума су две зоне са различитом патофизиологијом. Миоми пореклом из различитих зона различито реагују на хормонске утицаје из јајника и њихов околни миометријум је биохемијски абнормалан са повећаном концентрацијом естрогенских рецептора на ћелијама, у поређењу са нормалним миометријумом. Унутрашњи миометријум опонаша ендометријум у одговору на утицај естрогена и прогестерона и субмукозни миоми имају мање кариотипских аберација него миоми локализовани у спољашње две трећине материчног зида (4).

### **Преваленца и симптоми**

Лејомиоми се јављају код 50-60% жена, до 70% у доби од 50 година и у 30% случајева, узрокују морбидитет због абнормалног крварења из материце (тешко менструално крварење које узрокује секундарну анемију) и притиска на суседне органе мале карлице (уринарни симптоми, констипација и тенезми). Многи лејомиоми су асимптоматски, али у 30–40% случајева они показују различите симптоме, зависно од локализације и величине. Миоми могу да изазову тешка менструална крварења са последичном анемијом, која може бити опасна по живот. Афро-америчке жене имају тежу симптоматологију, израженија крварења са пратећом анемијом у поређењу са белим женама. Велики фиброиди такође могу довести до симптоматологије везане за компресију околних анатомских структура који могу бити одговорни за дисфункцију црева и бешике, укључујући повећану учесталост уринарне инконтиненције. Абдоминална дистензија или дисторзија и притисак у карлици на уретере (узрокујући хидронефрозу) и крвне судове карлице (посебно карличне вене) такође могу ометати квалитет живота.

Дисменореја, бол у карлици, неплодност и понављани побачаји могу бити симптоми лејомиома, у зависности од њихове локализације и величине. Миоми могу да наруше плодност на неколико начина: променом анатомије материце, са накнадним променама функције ендометријума; функционалним променама, као што су повећана контрактилност материце и неадекватно снабдевање крвљу ендометријума и миометријума као и променом у лучењу хормона, што може да наруши транспорт гамета и/или имплантацију бластоцисте. Брзи раст ових тумора током трудноће може

довести до прераног порођаја, крварења из материце и спонтаног побачаја. Прогресиван раст лејомиома је једна од најчешћих клиничких индикација за хистеректомију или миомектомију (6).

## Класификација миома

Постоје бројне класификације миома, сви узимају у обзир степен интрамуралног ширења и/или дисторзију материце. Класификација лејомиома коју је усвојило Европско удружење гинеколошке ендоскопије (енг. *European Society for Gynecological Endoscopy* - ESGE ) има предност у томе што је врло једноставна (Г0 је интраутерини миом, Г1 има највећи део (>50%) у шупљини материце, а Г2 има највећи део (>50%) у миометријуму).

Међународна федерација гинеколога и акушерства (енг. *International Federation of Gynecology and Obstetrics* - FIGO) предложила је класификацију миома према њиховој локализацији, која описује осам типова фиброида као и хибридно класу (асоцијација два типа миома). Пошто су различити типови фиброида често присутни у исто време (у зависности од локализације), ова класификација нуди репрезентативнију 'мапу' дистрибуције фиброида.

Миоми се према локализацији деле на миоме тела утеруса (око 92%), миоме истмуса утеруса (око 8%), док су миоми цервикса веома ретки (свега 0,25 до 0,35%). Према правцу раста, FIGO класификација миома дели миоме на субмукозне, интрамуралне, субсерозне и трансмуралне.

- Субмукозни миоми (*leiomyoma submucosum*) (FIGO тип 0,1,2) потичу из миометријумских ћелија испод ендометријума и својим растом улазе у материчну шупљину. Типови 0 и 1 се могу уклонити хистероскопски.
- Интрамурални миоми (*leiomyoma intramurale*) (FIGO тип 3,4,5) се развијају из мишића материце. Могу се ширити тако да деформишу материчну шупљину или спољашњу, серозну површину. Неки миоми, као варијанта интрамуралних, могу бити трансмурални (*leiomyoma transmurale*) и протежу се од серозе до мукозе.
- Субсерозни миоми (*leiomyoma subserosum*) (FIGO тип 6,7) потичу од миометријума испод серозне површине материце. Могу имати широку базу, те могу бити и интралигаментарни.



- Цервикални миоми (FIGO тип 8) - локализовани су у грлићу материце (7, 8).

### **Утицај естрогена и прогестерона на раст миома**

Естрогени су стероидни хормони који посредством естрогенних рецептора - ER утичу на раст, диференцијацију и функцију многих циљних ткива, пре свега у женском репродуктивном систему (9, 10). Естрогени се синтетишу у оваријумима и у периферним ткивима. Најпотентнија форма естрогена је 17 $\alpha$ -естрадиол (E2), а постоје још и естриол (E3) и естрон (E1), који су лиганди са високим афинитетом за ER, али делују као слабији агонисти. Хормони лако пролазе кроз ћелијску мембрану, а у циљним ћелијама се везују за интрануклеарне протеине назване ER (10, 11).

Естроген се сматра главним промотером раста миома. Постоје значајни биохемијски докази који подржавају значајну улогу естрогена у стимулацији раста миома. Дуготрајна примена агониста гонадотропин-ослобађајућег хормона (енг. *Gonadotropin-Releasing Hormone* - GnRH) повезана је са хипоестрогенијом и смањењем волумена миома. Доказано је да је концентрација естрадиола значајно виша у миомима него у нормалном миометријуму. Такође је значајно нижа конверзија естрадиола у естрон у миомима у поређењу са миометријом, а присутна је значајно повишена концентрација естрогенских рецептора у миомима у поређењу са аутологним миометријумом. Иако ова запажања указују на то да је интрамиомско хормонско окружење хиперестрогено, нема доказа да естроген директно стимулише раст миома.

Основни фактори који узрокују раст миома, односно промотери, су стероидни хормони, како они из циркулације, тако и они који настају у самом миому. Поред стероидних хормона, различити фактори раста, паракрини хемокини и цитокини и компоненте екстраћелијског матрикса су укључене у прогресију раста миома. Због тога миоми ретко настају пре пубертета, имају највећу преваленцију током репродуктивног периода и реградирају након менопаузе. Сва стања која су повезана са продуженим ефектима естрогена, међу којима је синдром полицистичних јајника (енг. *Polycystic Ovary Syndrome* - PCOS) и гојазност, узрокују пролиферацију ћелија миома (12).

Смањена изложеност естрогенима, као што је то случај код пушача, жена које вежбају, и вишероткиња, делује протективно (13). Сматра се да примарно естрогени доводе до раста миома. Естрогени могу индуковати пролиферацију и активирати фибробласте, али њихова примарна улога је индукција рецептора за прогестерон.

Митогени ефекти естрогена су посредовани факторима раста. Слично као и код вредности естрогена, нивои прогестерона су циклично повишени током репродуктивних година, значајно повишени током трудноће и супримирани након менопаузе и током терапије GnRH агонистима (14). С обзиром да је доказано да се под дејством прогестерона повећава пролиферација, смањује апоптоза, повећава акумулација екстрацелуларног матрикса, долази се до закључка да је прогестерон одговоран за раст миома. Тиме се објашњава зашто миоми не расту током примене само естрогена, а расту код употребе комбиноване супституционе хормонске терапије. Управо се на овој чињеници заснива тумачење зашто блокатори естрогенских рецептора - селективни модулатори естрогенских рецептора (енг. *Selective Estrogen Receptor Modulator* - SERM), као што је ралоксифен, иако смањују миоме, знатно слабије делују од лекова који селективно модулирају рецепторе за прогестерон (енг. *Selective Progesteron Receptor Modulator* – SPRM).

### **Улога фактора раста у патогенези миома**

Лејомиоми су бенигни тумори пореклом од ћелије глатког мишића миометријума који експримирају рецепторе за факторе раста. Фактори раста који играју улогу у расту миома кроз синергистичко деловање естрогена и прогестерона, су: епидермални фактор раста (енг. *Epidermal Growth Factor* - EGF), васкуларни ендотелни фактор раста (енг. *Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF), фактор раста сличан инсулину (енг. *Insulin-Like Growth Factors* - IGFs I-II), фактор раста фибробласта (енг. *Fibroblast Growth Factor* - FGF) и трансформишући фактор раста бета (енг. *Transforming Growth Factor Beta* - TGF- $\beta$ ). Поменути фактори имају плејотропне ефекте на пролиферацију, ангиогенезу, хипертрофију и синтезу екстрацелуларног матрикса који представља својеврсни резервоар фактора раста који могу да подстакну раст тумора и фиброзу ткива. Екстрацелуларни матрикс је састављен од колагена, фибронектина и протеогликана, који су укључени у ремоделирање и раст миома. У самом миому постоји за 50% више компоненти екстрацелуларног матрикса него у одговарајућем здравом миометријуму.

EGF повећава синтезу ДНК у ћелијама миома, те стога је један од најважнијих митогених цитокина. Поред стимулације пролиферације, овај цитокин има ефекат на диференцијацију ћелија у пролиферацији. Рецептори за EGF су експримирани у свим

ткивима гениталног тракта. Јака веза између EGF и естрогена и њихов утицај на раст и диференцијацију ендометријума се огледа у томе да естрогени стимулишу синтезу и секрецију EGF, као и експресију EGF рецептора. У самом ткиву миома постоји значајно већа концентрација EGF и његових рецептора на ћелијама него у нормалном ткиву миометријума, као и за већину других фактора. Постоји повезаност између повишене концентрације естрогена која доводе до повећања секреције EGF и повећане експресије рецептора за EGF на ћелијама миометријума, што за последицу има интензивну пролиферацију ових ћелија и развој миома материце (15).

IGF I и II су полипептиди који испољавају биолошке ефекте сличне инсулину, тј. могу да се вежу за инсулински рецептор и олакшају транспорт глукозе у ћелију. Ткива репродуктивног тракта експримирају рецепторе за IGFs, преко којих IGF утиче на синтезу стероида, фоликулогенезу, обнову ендометријума, пролиферацију и диференцијацију трофобласта, као и миометријума. У секреторној фази менструалног циклуса IGF I рецептори су појачано експримирани на ћелијама миометријума, док IGF II рецептори не показују цикличну варијабилност у односу на фазу менструалног циклуса. Хормонске варијације утичу на експресију IGF-I и IGF се експримира у ниском нивоу у псеудокапсули и миометријуму утеруса. Број IGF I и II рецептора је значајно већи у миому него нормалним ћелијама миометрија, а однос њихове експресије се разликује у току менструалног циклуса. IGF-ови повећавају пролиферацију ћелија код миома активирањем митоген активирајућег протеинкиназног пута (енг: *Mitogen Activated Protein Kinase* -MAPK) који је укључен у пролиферацију ћелија миома (16).

FGFs представљају породицу цитокина који стимулишу пролиферацију и диференцијацију пре свега фибробласта, али и других ћелија као што су ендотелне ћелије крвних судова, што је важно за процес регенерације ткива, реваскуларизацију и неоваскуларизацију, раст и диференцијацију. У ендометријуму, миометријуму и ћелијама миома су експримирани рецептори за FGFs фамилију цитокина. Улога FGF је у процесу регенерације и васкуларизације ендометријума, као и у процесу пролиферације фибробласта у миоматском ткиву (17).

TGF- $\beta$  се синтетише и ослобађа у биолошки неактивном облику, те се посредством протеолитичких ензима из лизозома и плазмине активира како би стекао способност везивања за TGF- $\beta$  рецепторе. У зависности од типа ћелије, TGF- $\beta$  може да стимулише или да инхибира раст ћелија, односно да утиче на ангиогенезу, хипертрофију и хиперплазију ћелија, као и стварање депозита у екстрацелуларном

матриксу. Рецептори за TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  I, II и III) припадају трансмембранским гликопротеинским рецепторима и имају различит афинитет за сам молекул TGF- $\beta$ . Интересантно је да је експресија рецептора TGF- $\beta$  I и II значајно већа на ћелијама миома и фиброма, него што је у нормалном миометријуму, а уз то је и појачана синтеза и лучење самог TGF- $\beta$  у ћелијама миома (18, 19).

Показало се да експресија рецептора за прогестерон повећава митотску активност у лејомиому утеруса. Прогестеронски рецептор (ПР) се екпримира у две изоформе, ПРА и ПРБ, и постоје разлике у експресији ПР између лејомиома утеруса и нормалног миометријума. Висок степен експресије ПР је повезан са прогресијом лејомиома и погоршањем квалитета живота.

Већина доступних информација о расту лејомиома *in vivo* указује на централну улогу естрогена и прогестерона. Пацијенткиње са лејомиомом утеруса најчешће немају повећан ниво прогестерона или естрадиола у серуму. Ово сугерише да раст тумора настаје услед повећане осетљивости самог миометријума на ове стероидне хормоне. У прилог овом концепту, иде доказана повећана експресија рецептора за прогестерон у лејомиомима у поређењу са хистолошки нормалним миометријумом код исте пацијенткиње. Како је E2 главни ефектор одговоран за експресију гена који кодира синтезу рецептора за прогестерон у материци, повећана трансдукција сигнала естрогена је вероватан механизам који објашњава прекомерну експресију рецептора за прогестерон у миомима. Такође је могуће да лејомиоми аутономно доводе до прекомерне експресије рецептора за естроген и прогестерон (20).

Ламинен и сарадници (21) су поредили пролиферативну активност миома из узорак пременопаузалних и постменопаузалних жена. Индекс квантитативне пролиферације је дефинисан као проценат ћелија које експримирају пролиферативни нуклеарни антиген у зони интензивног раста тумора. Квантитативно изражен индекс ћелијске пролиферације је значајно виши у узорцима миома у пременопаузи него у узорцима жена у постменопаузи. Миоми жена у постменопаузи које су примале било какву хормонску супституциону терапију или само супституцију естрогена показали су ниску пролиферативну активност. Насупрот томе, миоми жена у постменопаузи које су примале заједно супституцију за естроген и прогестине показали су пролиферативни индекс једнак оном који је примећен код жена у пременопаузи.

Кавагучи и сарадници (22) проучавали су и ултраструктурне карактеристике култивисаних глатко-мишићних ћелија миома материце и нормалног миометријума. Миомске, туморске и миометријумске, глаткомишићне ћелије у медијуму који садржи и

естроген и прогестерон су активније под електронским микроскопом него ћелије које садрже само естроген или контролни медијум. Ћелије миома изложене естрогену и прогестерону експримирају повећан број миофиламената са густим телима, што евидентно указује да је прогестерон укључен у диференцијацију миома.

Брандон и сарадници (23) недавно су показали повећану експресију mRNA рецептора за прогестерон у ткиву миома у поређењу са околним миометријумом. Ови аутори су показали и да је експресија антигена пролиферације Ki-67 значајно већа у ткиву миома, што указује на то да је појачана сигнализација посредована рецептором прогестерона повезана са растом миома. *In vitro*, прогестерон повећава експресију Bcl-2 (енг. *B-cell lymphoma 2*) гена, што позитивно утиче на преживљавање ћелија у културама лејомиомских ћелија.

Имунохистохемијска испитивања лејомиома и нормалног ткива миометријума исте материце у пролиферативној фази менструалног циклуса показала су да је Bcl-2 протеин обилато присутан у цитоплазми лејомиомских ћелија, али и да је једва присутан у глаткомишићним ћелијама нормалног миометријума. Количина Bcl-2 протеина у ткивима лејомиома је много виша у секреторној него у пролиферативној фази менструалног циклуса, док интензитет имунохистохемијске експресије Bcl-2 антигена у нормалном миометријуму не показује ове разлике.

Bcl-2 прото-онкоген, јединствен ћелијски ген који има способност да блокира апоптотску ћелијску смрт, је ген за преживљавање који кодира синтезу протеина чија се количина повећава у култивисаном ткиву миома. Повећана експресија Bcl-2 протеина у лејомиомским ћелијама култивисаним *in vitro* може инхибирати нормалан процес програмиране смрти ћелије (апоптоза), проширујући потенцијал за раст тумора. Насупрот томе, мања експресија Bcl-2 протеина у нормалним ћелијама миометријума, повећава могућност да су нормалне ћелије миометријума подложније апоптотској смрти од лејомиомских ћелија. Повећана експресија Bcl-2 протеина у лејомиому је карактеристична за лејомиоме и омогућава несметан раст лејомиома у материци.

Пошто је доказано да Bcl-2 продужава преживљавање ћелија спречавањем апоптотске ћелијске смрти, прогестерон делује као стимулишући фактор раста у регулисању пролиферације лејомиома кроз појачану инхибицију апоптозе лејомиомских ћелија, док естрогени инхибирају индукцију Bcl-2 протеина. Сумирано, ефекти полних стероидних хормона на експресију Bcl-2 протеина су различити међу различитим типовима ћелија у материци, укључујући првенствено ћелије лејомиома и нормалног миометријума (24, 25).

Одређивање експресије Ki-67, p53 и ПР су обећавајући имунохистохемијски параметри за диференцијацију глаткомишићних тумора материце са суспектним малигним потенцијалом, а значајни биохемијски и хистолошки докази указују да прогестерон и рецептори за прогестерон имају централну улогу у пролиферацији и пропагацији миома (24).

### **Биолошка улога и структура рецептора за естроген и прогестерон**

Биолошка активност естрогена се остварује везивањем за један од два специфична рецептора ER $\alpha$  или ER $\beta$ , који припадају суперфамилији једарних рецептора (11, 26). Везивањем лиганда за ER долази до конформацијске промене рецептора које доводе до димеризације, интеракције протеин-ДНК, покретања фактора транскрипције и коначно формирања преиницијационог комплекса (11).

ER $\beta$  делује као доминантни регулатор дејства естрогена, који у коекспресији са ER $\alpha$  доводи до смањене транскрипције условљене ER $\alpha$ . Антагонистички ефекти ER $\alpha$  и ER $\beta$  могу бити резултат разлика у њиховим трансактивационим регионима.

ER $\alpha$  и ER $\beta$  имају структурне и функционалне области типичне за чланове фамилије нуклеарних рецептора, укључујући: област за везивање ДНК, димеризацију, везивање за лиганде и активацију транскрипције (11). Оба рецептора имају сличну специфичност и афинитет према одговарајућим ендогеним естрогенима, фито естрогенима и SERM (9, 27). Фитоестрогени имају већи афинитет за ER $\beta$  од ER $\alpha$  (28). Синтетски антагонисти естрогена: тамоксифен и ралоксифен су парцијални агонисти за ER $\alpha$ , али делују и као чисти антагонисти за ER $\beta$ . Структурна разлика NH<sub>2</sub>-терминалног домена је једно од објашњења за различите биолошке одговоре на бројне лиганде (9). Рецептори за естрогене имају јасно различите физичке карактеристике, различиту биолошку улогу, различите лиганде и као најважније различиту ткивну дистрибуцију (9, 11, 29). Функционални антагонизам ER $\alpha$  и ER $\beta$  се огледа у директној репресији ER $\beta$  неких ER $\alpha$  условљених ефеката укључујући редукцију масти и ћелијску пролиферацију у утерусу. Естрадиол дејством на ER $\alpha$  стимулише транскрипцију и ћелијску пролиферацију, док дејством на ER $\beta$  кочи активност ER $\alpha$  и супримира пролиферацију епитела.

Контаминација естрогенима из околине утиче на ендокрину сигнализацију и доводи до ендокриних поремећаја, оштећења репродуктивне функције, али и повећава

ризик за настанак карцинома дојке и ендометријума. Дијета богата фитоестрогенима из соје (генистеин) и житарица је удружена са смањеним ризиком од хормонски изазваних карцинома (11, 29). Рецептори за естрогене се налазе на мембрани једара, у инактивном мономерном облику. Након везивања хормона, долази до конформацијске промене ER, која га трансформише у активан облик који ствара хомодимере (ER $\alpha$ /ER $\alpha$ ; ER $\beta$ /ER $\beta$ ) или хетеродимере (ER $\alpha$ /ER $\beta$ ), показује повећану фосфорилацију и везује се за промоторе таргет гена. Рецептори за естрогене могу бити активирани и независно од присуства лиганда, преко интрацелуларног 'секундарног гласника' и других сигналних путева (фактори раста, протеин киназе). Фактори раста активирају киназе и фосфатазе, повећавају пролазак јона кроз мембране и на так начин активирају рецепторе за естрогене. Активација фосфорилацијом омогућава индукцију ER-таргет гена у одсуству стероидног лиганда и управо на овај начин фактори раста учествују у хормон независном расту тумора. Описана реакција доводи до активације каскадног механизма биохемијских промена у самој ћелији, што доводи до ћелијске пролиферације, апоптозе, ангиогенезе, промена у адхезивности и покретљивости ћелија. Поремећај било које фазе овог механизма доводи до прекомерне пролиферације ћелија, миграције и метастазирања. Дуготрајно излагање ендотелних ћелија дејству естрогена повећава експресију ER $\alpha$  и смањује број ER $\beta$ .

Највећа експресија ER $\beta$  је присутна у бубрегу, тимусу и танком цреву, затим у плућима, слезини, хипофизи, леукоцитима, коштаном сржи, дебелом цреву, материци и млечној жлезди. Естрогени имају велики утицај на имуни систем, већина аутоимуних болести је чешћа код жена. Локализација гена који кодира синтезу ER $\beta$  на 14q22-24 је у близини гена заслужног за настанак лејомиома утеруса (11, 30, 31).

Прогестерон је посебно битан за развој миома који имају повећану експресију ПР у поређењу са здравим миометријумом. Две главне ПР изоформе могу се наћи у материци на приближно еквивалентним нивоима: ПР-Б је у пуној дужини, док је ПР-А скраћен, ПР-А и ПР-Б се транскрибују са истог геномског локуса помоћу два различита промотора, што резултира стварањем 114-kDa ПР-Б и 94-kDa ПР-А тешких протеина. Ове две изоформе су независно регулисане и изазивају различите ефекте. Након остваривања везе прогестерона са ПР, димери се транслоцирају у нуклеус, везују за ДНК, регрутују кофакторе и индукују експресију Vcl-2 у геномском сигналном путу. Након везивања лиганда, ПР-А и ПР-Б добијају способност да модулирају низводно различите скупове циљних гена, што указује да је ефекат прогестерона посредован комбинованим деловањем обе ПР изоформе. Релативна заступљеност ПР-А и ПР-Б

повезана је са различитим физиолошким и патолошким стањима, укључујући контрактилност миометријума утеруса, али и прогресију и метастазирање карцинома дојке. Прогестерон се производи у јајницима, плаценти и надбубрежним жлездама, а његово деловање је првенствено посредовано путем рецептора за прогестерон. ПР се експримирају у централном нервном систему, јајницима, млечној жлезди и женском репродуктивном тракту, укључујући вагину, грлић материце, јајоводе, ендометријум и миометријум материце. ПР је важан за сексуално понашање жене, овулацију, успостављање и одржавање трудноће, као и развој млечних жлезда (32, 33).

### **Ангиогенеза**

Ангиогенеза или неоваскуларизација је процес формирања нових, функционалних крвних судова из преегзистирајуће васкуларне мреже, а све већи значај овом феномену као прогностичко-предиктивном фактору даје се због могућности примене анти-ангиогене терапије. Настанак нових крвних судова је стимулисан факторима микроокружења, онкогенима и цитокинима. Ангиогенеза је прецизно регулисана системом уравнотежених про- и анти-ангиогених фактора и омогућава раст тумора и повећава његов метастатски потенцијал отварањем путева за продор туморских ћелија у циркулацију.

Разне биолошки активне супстанце имају улогу у ангиогенези, међу њима најзначајнији стимулатори ангиогенезе су васкуларни ендотелни фактори раста (енг. *Vascular endothelial growth factor* – VEGF), који промовишу ангиогенезу у миомима и посредују у експресији хормона раста и гена повезаних са естрогеном. Породица VEGF протеина обухвата VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и фактор раста плаценте (енг. *Placental Growth Factor* - PlGF).

VEGF рецептори су мембрански гликопротеини који се састоје од три домена: екстрацелуларног, трансмембранског и интрацелуларног, који показују активност тирозин киназе. Породица VEGF мембранских рецептора укључује VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, и површинског VEGF-R1.

Породица VEGF протеина стимулише пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија и њихову организацију у тубуларне структуре, уједно и одређује пропустљивост крвних судова. Ова породица још обухвата и VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D. Експресија VEGF изоформи је потврђена у многим ћелијама, ткивима и органима.



Улога VEGF-а и његових рецептора је утврђена у малигним туморима, међутим, њихова улога у развоју миома материце није у потпуности разјашњена.

Примена антитела специфичних за ендотелне ћелије (фактор VIII, CD34 и/или CD31) омогућава лакшу имунохистохемијску детекцију новостворених крвних судова у тумору (34, 35).

Процењује се да је преваленца менометрорагије приближно 24% код жена у пременопаузи. У одсуству трудноће, смањена секреција прогестерона из жутог тела изазива менструацију. Разлози зашто смањени ниво прогестерона изазива менструацију укључују повећање експресије ткивног фактора (примарног иницијатора коагулације), као и инхибитора плазминоген активатора-1, прогестероном; инхибицију експресије матрикс металопротеиназа (ММП) 1, 3 и 9, како би се стабилизовала строма ендометријума и васкуларни екстраћелијски матрикс; повећана производња ангиогених фактора као што је VEGF и ангиопоетин-2 (Ang-2). Стога, смањени ниво прогестерона изазива менструацију, а са друге стране, континуирано, дуго лечење контрацептивним средствима која садрже само прогестин доводи до неконтролисане ангиогенезе која доводи до великих, крхких ендометријумских судова и абнормалног крварења, пошто прогестерон /прогестини повећавају производњу ангиогених фактора као што су VEGF и Ang-2. Патологија абнормалног ендометријског крварења услед нпр. субмукозног миома такође је повезана са аберантном ангиогенезом.

Експресија ангиогенезе је независна од величине самог миома. Васкуларна густина миометријума је већа у материци са лејомиомом, него у здравом миометријуму, али се не мења током менструалног циклуса. Повећана васкуларна густина миометријума може бити последица прекомерног ослобађања ангиогених стимуланса из лејомиома, стимулишући ангиогенезу у околном миометрију. Жене које имају екстремно високу васкуларну густину миометријума или повећану експресију VEGF-А или aFGF и bFGF могу бити предиспониране за развој лејомиома. Висок ниво VEGF експресије у лејомиомима представља потенцијалну терапијску мету, која би се циљала антителима специфичним за VEGF. Доказано је да уклањање VEGF сигнализације доводи до апоптозе васкуларних ћелија и смањења неопластичних лезија.

VEGF-R1 се налази у мембранама ендотелних ћелија, моноцита, макрофага и неопластичних ћелија солидних тумора и његовом активацијом долази до стимулације пролиферације, миграције и повећања инвазивног потенцијала туморских ћелија. Постоји повећана експресија овог рецептора, код великих миома, што је индикација појачане пролиферације и веће стопе раста, у поређењу са малим миомима.

VEGF-R2 је главни рецептор преко кога VEGF-A оставрује своје ефекте – митогени и ангиогени ефекат и доводи до повећане пропусности крвних судова. С друге стране, VEGF-R1 показује и инхибиторни и стимулативни ефекат према ангиогенези. Тако да је могуће, да повећање масе миома није повезано са бољом васкуларизацијом. Врло је вероватно да при вишем нивоу VEGF-A, крвни судови у миому показују изразит пораст пермеабилности, што може побољшати исхрану миома, услед појачане дифузије. Тако да, VEGF-R1 и VEGF-R2 имају различите улоге у процесу физиолошке и патолошке ангиогенезе (35).

Улипристал ацетат (чист антагонист прогестерона из групе SPRM) инхибира пролиферацију култивисаних лејомиомских ћелија путем смањене експресије нуклеарног антигена ћелијске пролиферације (енг. *proliferating cell nuclear antigen* – PCNA) и индукује апоптозу што се рефлектује повећаном експресијом каспазе-3 и poly(ADP-ribose) poly-merase (PARP) и смањеном експресијом Bcl-2 протеина. Доказано је да улипристал ацетат нарушава VEGF/VEGF рецептор и адренормедулин (АДМ)/АДМ рецепторске системе у култивисаним лејомиомским ћелијама, те се сматра да је спречавање крварења код жена са лејомиомом, посредовано механизмом који укључује и ангиогенезу (36).

### **Експресија ароматазе код миома**

Експресија ароматазе у ћелијама миома је значајна са становишта патогенезе тумора, с обзиром да бројне студије указују да код жена у постменопаузи, естрогени локализовани у тумору ћелије потичу из *in situ* ароматизације у патолошки измењеном ткиву и делују локално као митогени фактор, олакшавајући раст тумора независно од концентрације естрогена у серуму. Ткиво глатког мишића миома поседује сопствену ароматазу, која катализује конверзију андрогена у естроген и аутокрини промовише раст миома. Применом GnRH агониста, инхибира се производња естрогена у глатким мишићима миома због инхибиције активности ароматазе.

Величина миома, тумора глаткомишићних ћелија је директно повезана са експресијом ароматазе mRNA у различитим миомима унутар исте материце. У ћелијама миома конверзија естрогена у естрадиол је троструко интензивнија него у одговарајућем миометријуму, што одговара вишој експресији mRNA за 17 $\beta$ -хидроксистероид дехидрогеназу тип I, која катализује конверзију андростенедиона и тестостерона, као и естрогена и естрадиола.

Код жена у постменопаузи циркулишући естрогени потичу, пре свега, из периферне конверзије андрогена синтетисаних и у јајницима и у надбубрежним жлездама. Иако нема директних доказа за улогу естрогена у *in situ* расту ћелија миома, ћелије миома су способне да синтетишу довољне количине естрогена да би промовисале сопствени раст. Код већине миома нема значајне регресије током првих 6 месеци природне менопаузе упркос наглом смањењу концентрације естрадиола у плазми и регресија је очигледно спорија код жена које су третиране агонистима GnRH, док се величина миома може смањити са годинама.

Механизам помоћу ког лејомиом одржава висок ниво експресије ароматазе је непознат, али када се ћелије миома изолују из ткива и култивишу *in vitro*, експресија ароматазе се смањује за 5-20% у поређењу са вредностима забележеним у ткиву. Потенцијално објашњење за прекомерну експресију ароматазе код миома укључује активност митогена различитих екстрацелуларних сигнала, укључујући факторе раста. Активност MAPK-а је неопходна за потпуну индукцију mRNA за ароматазу и за њену активност. Експресија MAPK и његова активност је већа у ткиву миома него у миометријуму, вероватно због већег присуства екстрацелуларног матрикса. Може се рећи да повећање активности MAPK може учествовати у експресији ароматазе у миомима (37).

## **2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ**

## ЦИЉЕВИ

Циљ овог истраживања је био да се одреди утицај статуса прогестеронских и естрогених рецептора на пролиферацију, ангиогенезу и апоптозу ћелија миома код пре и постменопаузних жена.

1. Испитати експресију рецептора за естроген  $\alpha$  и  $\beta$  ( $ER\alpha$  и  $ER\beta$ ) и рецептора за прогестерон ( $PR$ ) у ткиву миома, околном ендометријуму и миометријуму, као и њихове међусобне односе
2. Одредити пролиферативни и апоптотски индекс у ткиву миома, околном ендометријуму и миометријуму преко експресије маркера пролиферације Ki-67 и апоптозе caspase-3
3. Одредити експресију VEGF-а у ткиву миома, околном ендометријуму и миометријуму, као и микроваскуларну гусину преко експресије Endoglin-а у ендотелним ћелијама новоформираних васкуларних простора.
4. Одредити тачку раздвајања (*cutoff point*), испитивањем експресије стероидних рецептора, маркера ангиогенезе, апоптозе и пролиферације у контролној групи (ткивни исечци нормалног ендометријума и миометријума)
5. Упоредити односе пролиферативног и апоптотског индекса са експресијом стероидних рецептора
6. Упоредити односе експресије VEGF-а и микроваскуларне густине са експресијом стероидних рецептора
7. Утврдити могућу везу између експресије стероидних рецептора, ангиогенезе, апоптозе и пролиферације са менструалним статусом и фазом менструалног циклуса

8. Утврдити могућу везу између експресије стероидних рецептора, апоптозе и пролиферације са пато-морфолошким карактеристикама миома (број, величина, локализација у зиду, хистолошки тип, регресивне промене)

## **ХИПОТЕЗЕ**

1. Експресија естрогених и прогестеронских рецептора у ендометријуму и миометријуму утиче на ангиогенезу, пролиферативни и апоптотски индекс у миомима без обзира на менструални статус.
2. Експресија естрогених и прогестеронских рецептора у ендометријуму и миометријуму се налази у позитивној корелацији са експресијом ових рецептора у ћелијама миома.
3. Пролиферативни и апоптотски индекс ћелија миома је у позитивној корелацији са добијеним вредностима ових индекса у ткиву ендометријума и миометријума.
4. Експресија VEGF-а и микроваскуларна густина се налазе у позитивној корелацији са експресијом стероидних рецептора.
5. Миоми морфолошки различити по положају у зиду, величини и хистолошко-специфичним особинама, имају различит пролиферативни и апоптотски капацитет.

# **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

## **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

Ова студија је била студија пресека; клиничко-експериментална, ретроспективна, неинтервентна студија у области проучавања основних механизма патогенезе болести коришћењем патохистолошког материјала из постојећег архива.

Истраживањем је обухваћено 76 пацијената са дијагнозом лејомиома утеруса, оперативно лечених у Клиници за гинекологију и акушерство Клиничког центра Крагујевац, Крагујевац, Србија, у трогодишњем периоду од 2007-2010. Према менструалном статусу формиране су две експерименталне подгрупе. Прва групу чиниле су жене у пременопаузи ( $n = 35$ ;  $46.2 \pm 5.02$  година старости), а другу групу чиниле су жене у постменопаузи ( $n = 41$ ;  $60.25 \pm 5.41$  година старости).

Клинички подаци су прикупљени увидом у историју болести и оперативне протоколе прегледаних пацијенткиња. Прикупљене су информације које се односе на гинеколошки статус (менструални циклус, менархе, менопаузу, број порођаја, итд.) и податке добијене макроскопском анализом оперативног препарата (број, положај и величина миома, промене у јајницима, морфометријске карактеристике материце).

Експериментални део студије је изведен на оперативном ткивном материјалу добијеном хистеректомијом. Испитивање је спроведено у Служби за патолошко-анатомску дијагностику Клиничког центра у Крагујевцу. Студија је одобрена од стране Етичког комитета Клиничког центра Крагујевац, Крагујевац, Србија.

### **Бојење хематоксилин-еозином**

Узорци ткива припремљени из оперативног материјала су фиксирани у формалину, укалупљени у парафин, а ткивни пресеци од 5 $\mu$  су обојени стандардном,



хематоксилин-еозином [H&E] методом, и даље испитиване имунохистохемијом (38). Све слике су снимане у оригиналној резолуцији са x200 зумом. За имунохистохемијску анализу издвојени су репрезентативни узорци миома и зида материце.

## **Имунохистохемија**

Узорци ткива су 24-48 сати фиксирани у 10% неутралном пуферисаном формалину и укалупљени у парафинске блокове коришћењем стандардних патохистолошких протокола. Имунохистохемијска анализа је изведена на једном репрезентативном блоку из сваке серије или два (када околни миометријум није видљив заједно са миомом у првом блоку). Антигенско проналажење је обрађено потапањем узорка у 10 mM цитратни пуфер (pH 6) или комерцијални пуфер (10 mM EDTA Buffer for Heat-Induced Epitope Retrieval (pH8), AP-9004-125, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Примарна моноклонска антитела су била усмерена против EP Ab11 (mouse: 1:500, MS-354-R7, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), EP бета антитело (mouse/human: 1:200 dilution, MA1-23217, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), VEGF (rabbit: 1:100 dilution, RB-9031-RQ, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), Ki-67 (rabbit: 1:100 dilution, RB-9106-R7, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), PRa Ab-8 (mouse: 1:25 dilution, MS-298-R7, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), CD105 (rabbit: 1:25 dilution, RB-9291-R7, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) и каспаза-3 Ab-3 (human: 1:100 dilution, MS-1123-R7, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Пресеци ткива су инкубирани са одговарајућим примарним антителом и комерцијалним биотинизованим секундарним анти-имуноглобулином, на собној температури, у складу са упутствима произвођача (UltraVision LP Large Volume Detection System: HRP Polymer (Ready-To-Use), TL-125-HL, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Евалуација имунохистохемијске анализе извршена је семи-квантитативном проценом експресије испитиваних маркера, скоровањем према скалама специфичним за сваки маркер. Све слике су снимане у оригиналној резолуцији са увеличањем x200.

## **Експресија естрогена, прогестерона, VEGF, Ki-67 и каспазе-3**

Експресија рецептора за естрогене и прогестерон је квантификована на основу *Allred score* резултата, тј. додавањем параметара који указују на процентуалну заступљеност (од 0 до 5) и интензитет експресије у једрима ћелија (од 1 до 3) (39). Збир

ових параметара ће представљати вредност укупног резултата (од 0 до 8), где су вредности  $\geq 3$  сматране позитивним. Експресија VEGF, Ki-67 и каспазе-3 је одређена на основу процента имунореактивних ћелија. На основу овог израза, формиране су групе са ниским (0-15%), умереним (16-30%) и високим пролиферативним или апоптотским индексом (31-100%).

### **Експресија CD105**

Имунохистохемијска анализа експресије ендоглина (CD105) односно процена степена ангиогенезе извршена је на следећи начин. Прави индекс интензитета ангиогенезе је густина интра и перитуморалне микроциркулације или густина крвних судова. Анализа се извршила квантитативно бројањем крвних судова у зонама са њиховом највећом густином (подручја врућих тачака). Користили смо препоруке Вајднера о величини поља и методу бројања (40). Вруће тачке или фокуси највеће густине крвних судова су одређени на малом микроскопском увеличању (x40). Одређивање фокуса највеће микроваскуларне густине вршила су два истраживача независно, без познавања клиничких и патохистолошких података. Након тога је извршено пребројавање појединачних крвних судова на средњем микроскопском увеличању (x200), што подразумева површину од  $0,739 \text{ mm}^2$ . Коначан резултат је средња вредност резултата добијених бројањем у 3 видна поља. Код бројања крвних судова у свакој "врућој зони", рачуната је и експресија у појединачним ендотелним ћелијама, а не само лумен крвног суда са видљивим еритроцитима. Након добијања података о броју крвних судова за сваки случај посебно, израчуната је средња вредност од 3 очитана поља, а затим и медијана у односу на коју су сви миоми класификовани у две групе, оне са ниским степеном и оне са високим степеном ангиогенезе, сходно томе, да ли је број крвних судова мањи, једнак или већи од вредности израчунате медијане.

Сва имунохистохемијска бојења су извршена уз контролу квалитета и специфичност обојења, користећи позитивне и негативне контроле у складу са Британским националним водичем за имунохистохемију (*UK National Quality Assessment for Immunocytochemistry*). Микроскопска анализа тумора и процена

експресије маркера изведени су на микроскопу типа Carl Zeiss, Axioscop 40. Припреме са репрезентативним пољима су осликане коришћењем три микроскопска увећања (x100, x200 и x40) коришћењем камере Canon PC 1089.

### **Узимање узорка**

Што се тиче начина одабира узорака из целе популације, критеријуми за укључивање пацијенткиња у истраживање били су патохистолошки верификована болест лејомиома утеруса и пременопаузални или постменопаузални статус. Искључујући критеријуми за избор субјеката били су: повезане малигне болести јајника и грлића материце, непотпуни клинички подаци о менструалном статусу, употреба оралних контрацептива и други облици хормонске терапије.

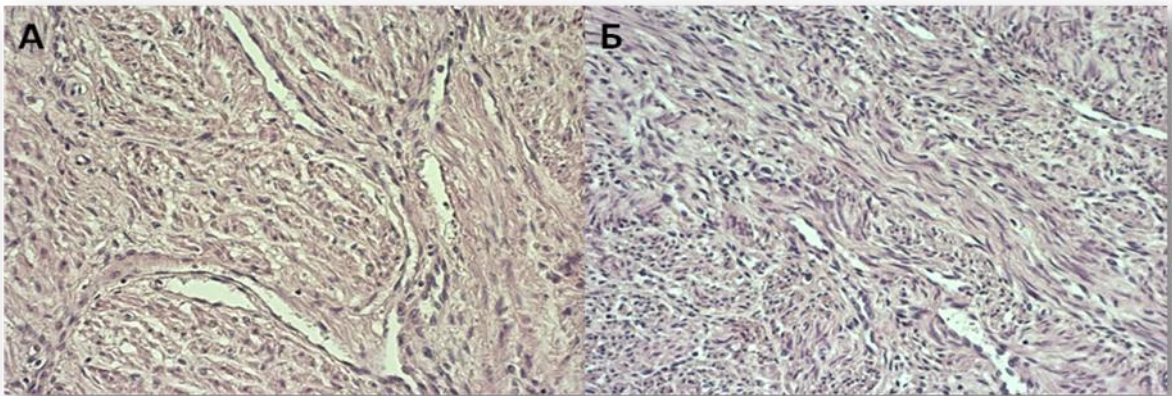
### **Статистичка анализа**

Статистичка обрада резултата извршена је помоћу комерцијалног софтверског пакета SPSS (верзија 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL). У анализи добијених резултата, дескриптивна статистика је прво коришћена за описивање општих карактеристика узорка: апсолутни бројеви и пропорције (фреквенције, проценти), медијана и мере варијабилности (стандардна девијација), максимум и минимум. Правилност расподеле процењена је Колмогоров-Смирновим тестом. За поређење средњих вредности варијабилне популације, коришћени су независни Т тест, Крушкар-Валис и Ман-Витнијев тест и за поређење средњих варијабилних популација. Зависност две дескриптивне варијабле спроведена је помоћу  $\chi^2$ -квадрат теста и Фишеровог теста, зависност две нумеричке варијабле испитана је коришћењем Пирсоновог и Спирмановог коефицијента корелације, док је утицај више варијабли на бинарну варијаблу испитан помоћу мултиваријатне бинарне логистичке регресије.

## **4. РЕЗУЛТАТИ**

## ХЕМАТОКСИЛИН-ЕОЗИН БОЈЕЊЕ МИОМА И МИОМЕТЕРИЈУМА

Репрезентативне слике миома и миометријума обојених Х&Е методом

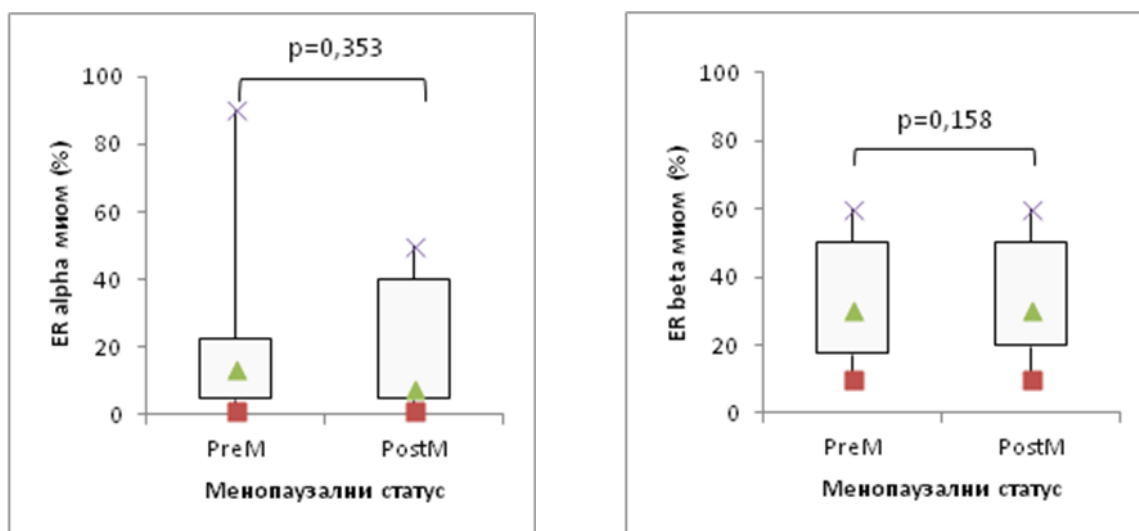


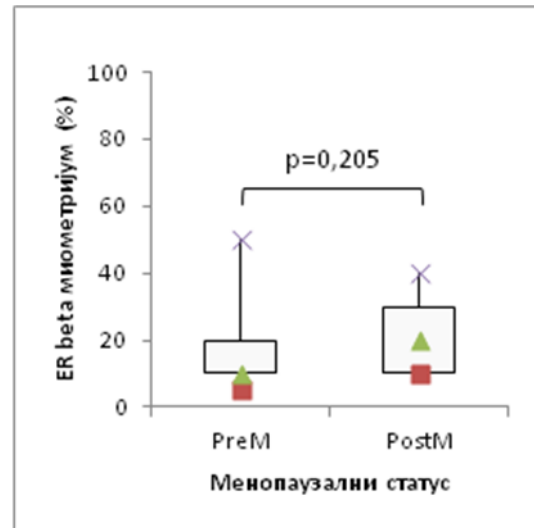
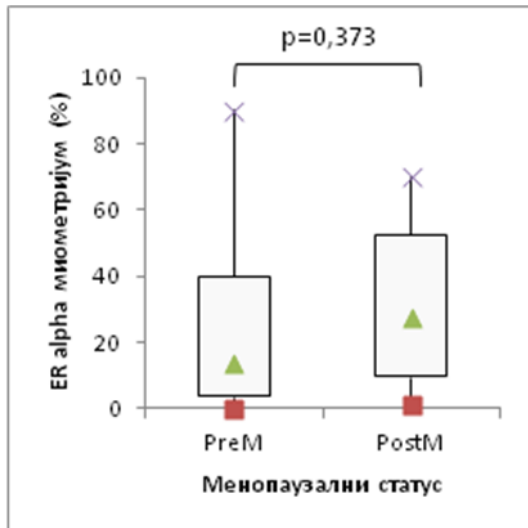
Слика 1. А: Репрезентативна микрофотографија миома (Х&Е x200); Б: Репрезентативна микрофотографија миометријума (Х&Е x200)

## ЕКСПРЕСИЈА СВИХ ИСПИТИВАНИХ ПАРАМЕТАРА У МИОМУ И/ИЛИ МИОПЕТРИЈУМУ ПРЕ И ПОСТМЕНОПАУЗНИХ ЖЕНА

### Експресија ЕРа и ЕРβ у миому и миометријуму пре и постменопаузних жена

Није постојала статистички значајна разлика у експресији нити једног испитиваног естрогенског рецептора у миому и миометријуму код пацијенткиња било да су оне припадале пре или постменопаузалној групи (График 1).

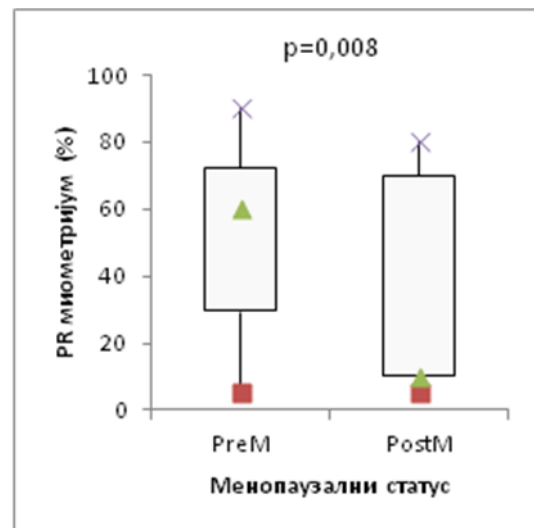
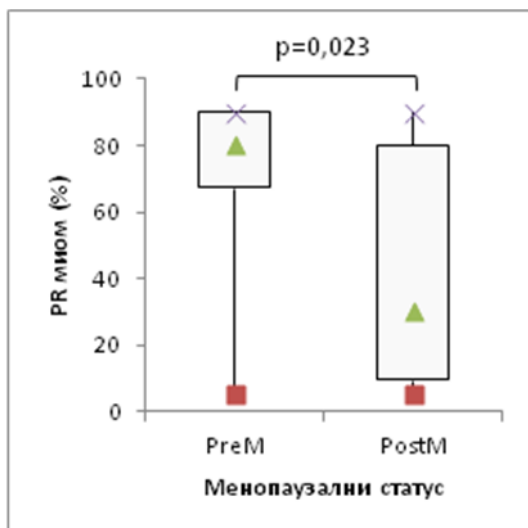




**График 1. Експресија ЕРа и ЕРβ у миому и миометријуму пре и постменопаузних жена,  $p<0.05$**

### Експресија ПР у миому и миометријуму пре и постменопаузних жена

Експресија прогестеронског рецептора се није статистички значајно разликовала у миому испитаница док је експресија истог рецептора у миометријуму била статистички значајно повишена у групи пременопаузних жена у односу на жене у постменопаузи (График 2).



**График 2. Експресија прогестеронског рецептора у миому и миометријуму пре и постменопаузних жена,  $p<0.05$**

### Експресија VEGF у миому и миометријуму пре и постменопаузних жена

Експресија VEGF се није статистички значајно разликовала у миому испитаница док је експресија VEGF у миометријуму била статистички значајно повишена у групи пременопаузних жена у односу на жене у постменопаузи (График 3).

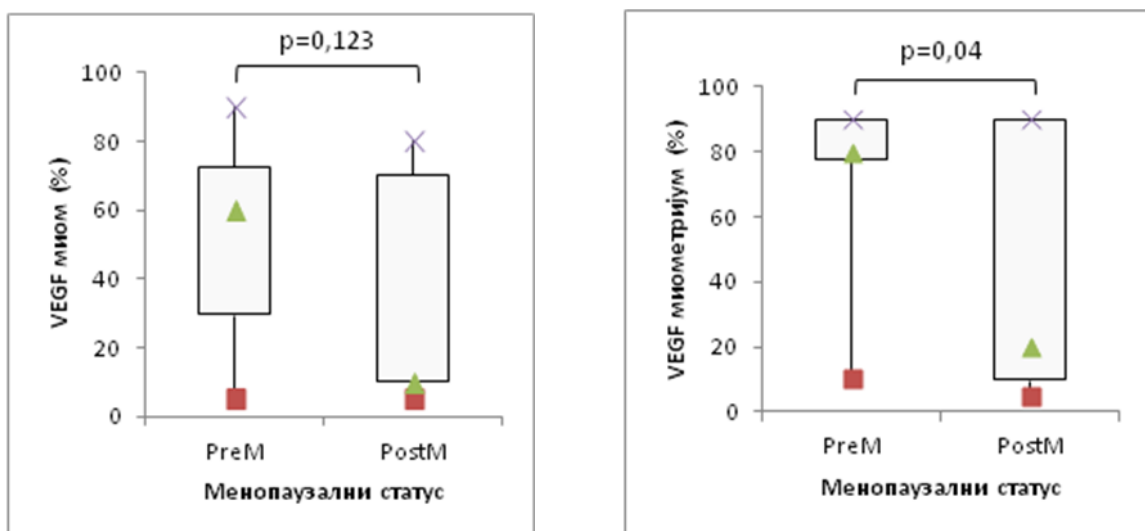


График 3. Експресија VEGF у миому и миометријуму пре и постменопаузних жена,  $p < 0.05$



#### Експресија CD105 у миому и миометријуму пре и постменопаузних жена

Експресија CD105 се није разликовала у миому док је у миометријуму била значајно повишена у групи пре у односу на жене у постменопаузи (График 4).

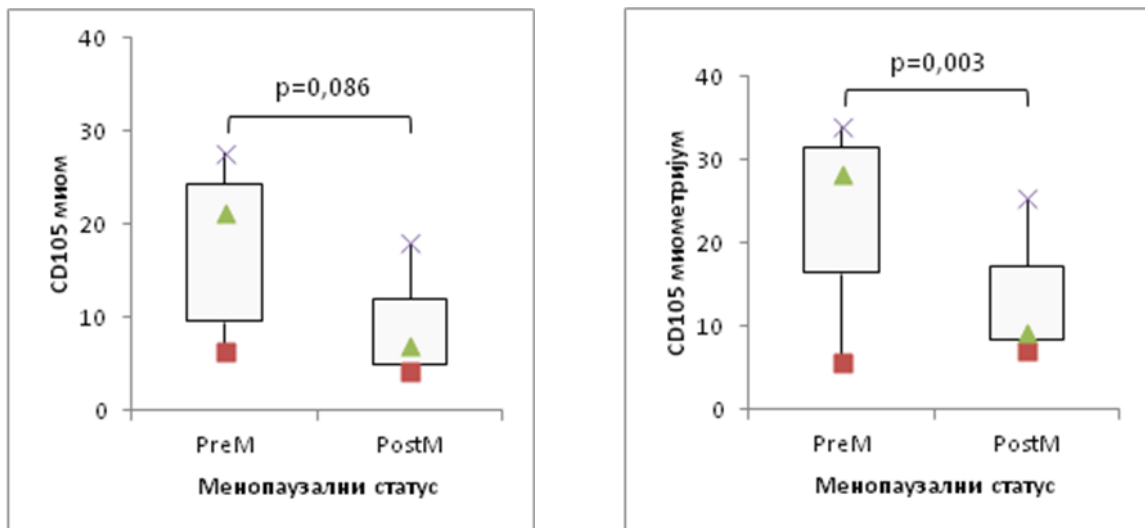


График 4. Експресија CD105 у миому и миометријуму пре и постменопаузних жена,  $p < 0.05$

#### Експресија Ki-67 у миому пре и постменопаузних жена

Експресија Ki-67 није се статистички значајно разликовала међу испитиваним групама (График 5).

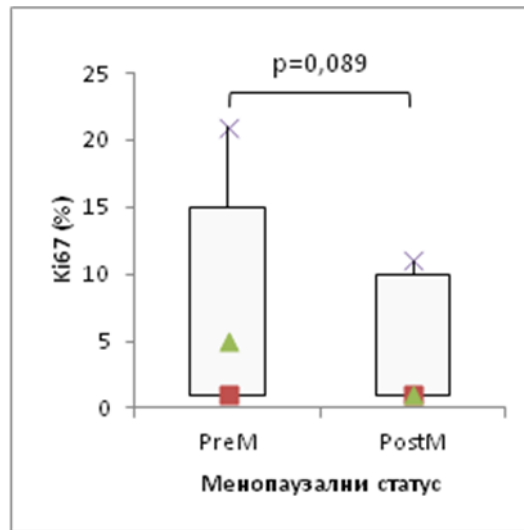


График 5. Експресија Ki-67 у миому пре и постменопаузних жена,  $p < 0.05$

#### Експресија каспазе-3 у миому пре и постменопаузних жена

Експресија каспазе-3 се статистички значајно разликовала међу испитиваним групама. У групи пременопаузних жена експресија каспазе-3 била је значајно нижа него у групи постменопаузних жена (График 6).

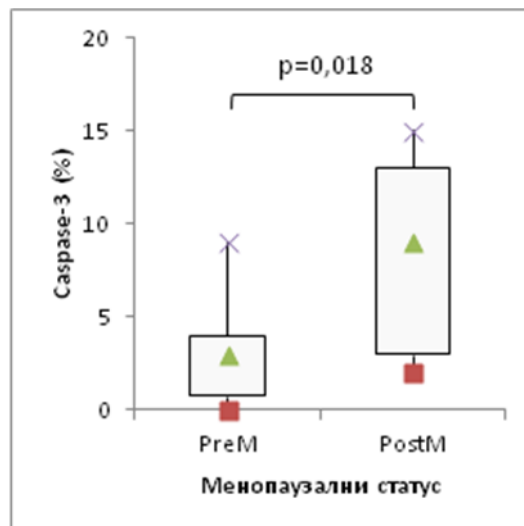
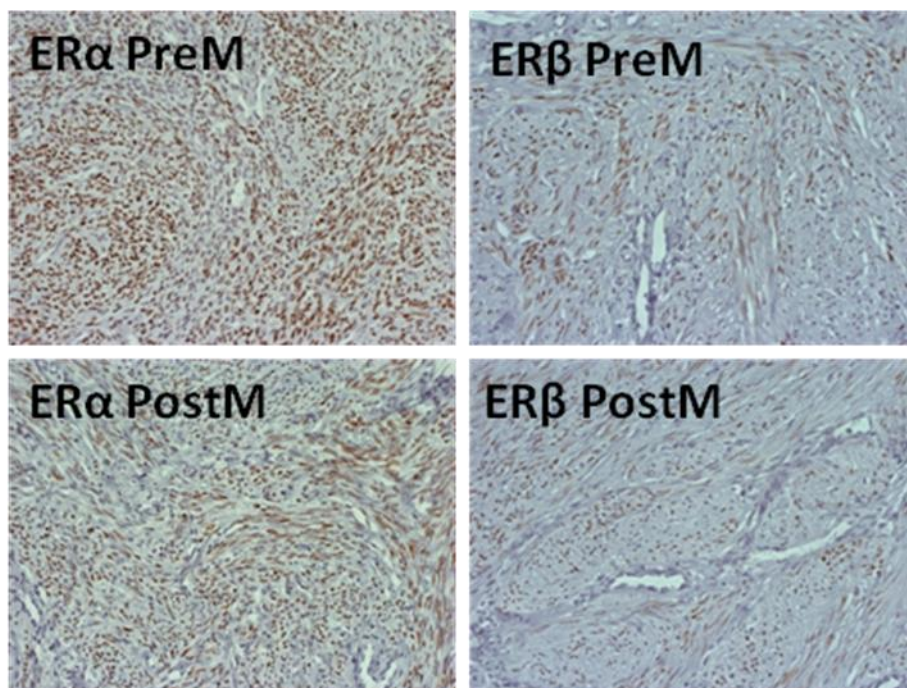


График 6. Експресија каспазе-3 у миому пре и постменопаузних жена,  $p < 0.05$

**ЕКСПРЕСИЈА СВИХ ИСПИТИВАНИХ ПАРАМЕТАРА У МИОМУ ПРЕ И ПОСТМЕНОПАУЗНИХ ЖЕНА – РЕПРЕЗЕНТАТИВНЕ СЛИКЕ**

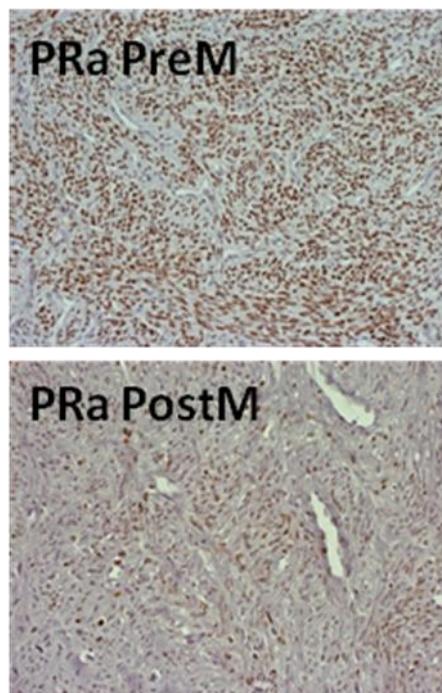
Експресија ER $\alpha$  и ER $\beta$  у миому пре и постменопаузних жена



Слика 2. Репрезентативне слике експресија ER $\alpha$  и ER $\beta$  у миому пре и

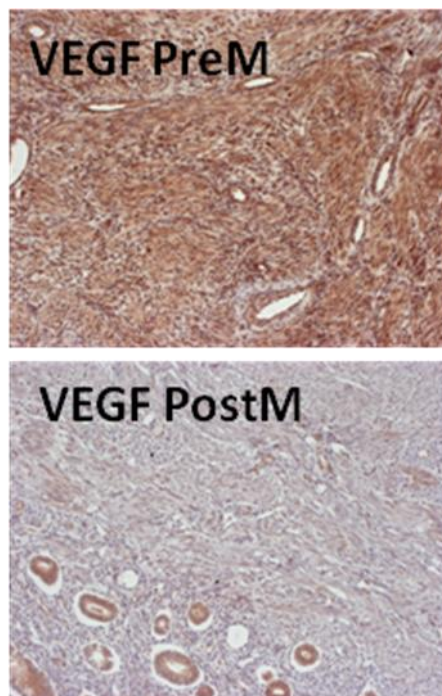
постменопаузних жена (x200)

Експресија ПР у миому пре и постменопаузних жена



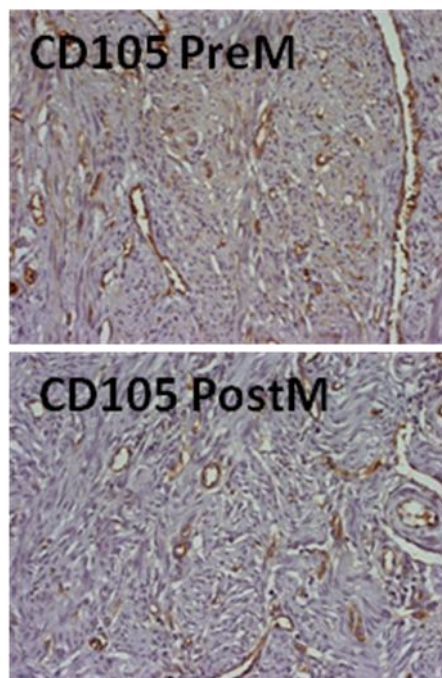
Слика 3. Репрезентативне слике експресија ПР у миому пре и постменопаузних жена (x200)

**Експресија VEGF у миому пре и постменопаузних жена**



**Слика 4. Репрезентативне слике експресија VEGF у миому пре и постменопаузних жена (x200)**

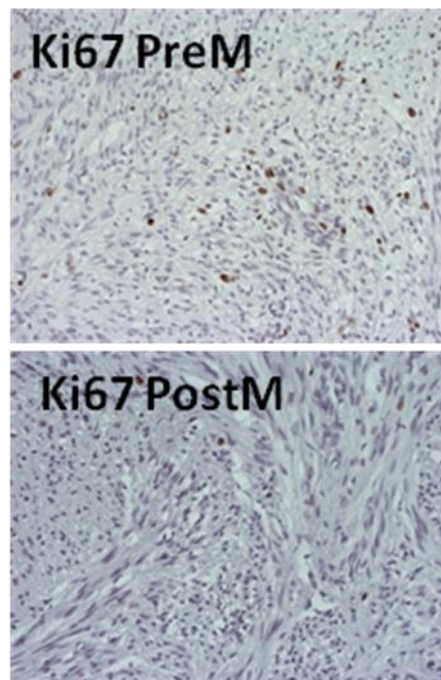
**Експресија CD105 у миому пре и постменопаузних жена**



**Слика 5. Репрезентативне слике експресија CD105 у миому пре и постменопаузних жена (x200)**

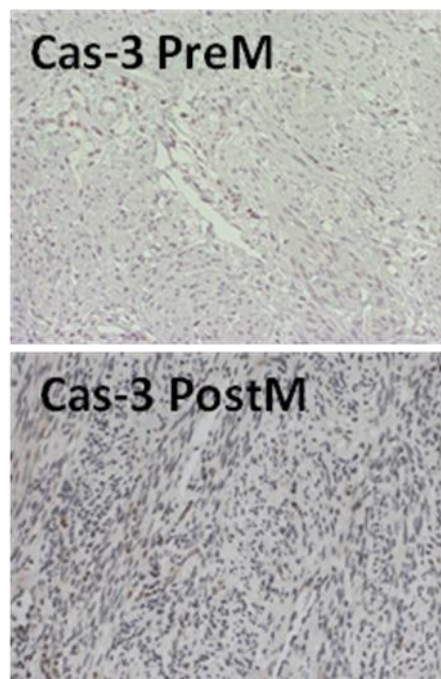


**Експресија Ki-67 у миому пре и постменопаузних жена**



**Слика 6. Репрезентативне слике експресија Ki-67 у миому пре и постменопаузних жена (x200)**

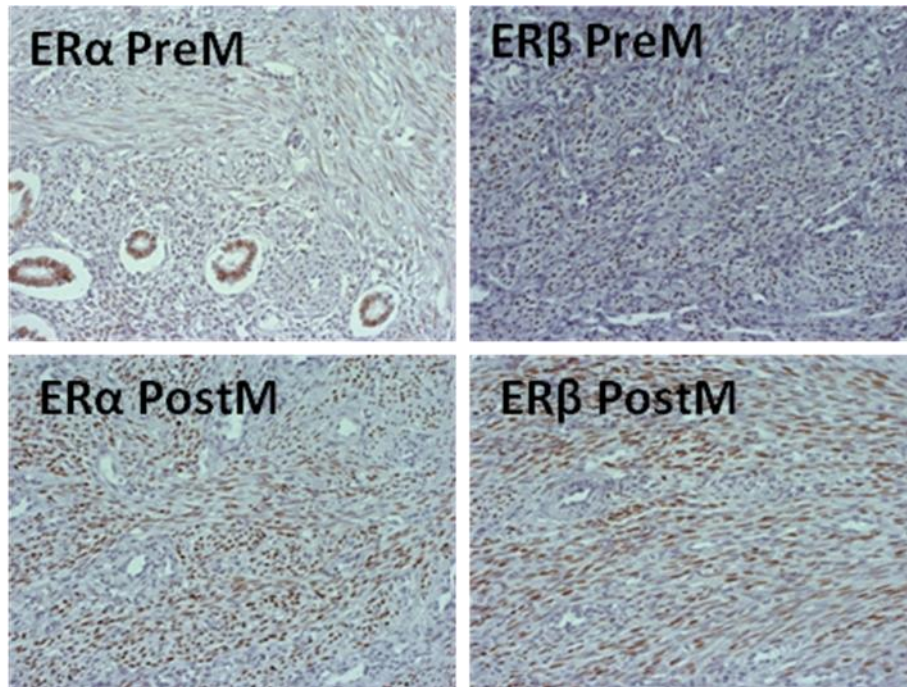
**Експресија каспазе-3 у миому пре и постменопаузних жена**



**Слика 7. Репрезентативне слике експресија каспазе-3 у миому пре и постменопаузних жена (x200)**

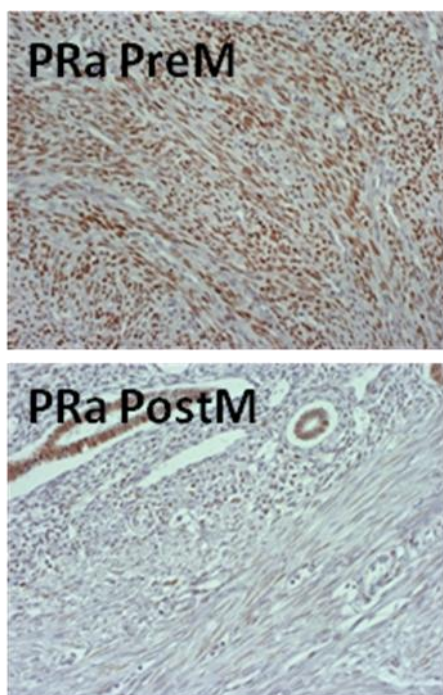
**ЕКСПРЕСИЈА СВИХ ИСПИТИВАНИХ ПАРАМЕТАРА У МИОМЕТРИЈУМУ  
ПРЕ И ПОСТМЕНОПАУЗНИХ ЖЕНА – РЕПРЕЗЕНТАТИВНЕ СЛИКЕ**

**Експресија ER $\alpha$  и ER $\beta$  у миометријуму пре и постменопаузних жена**



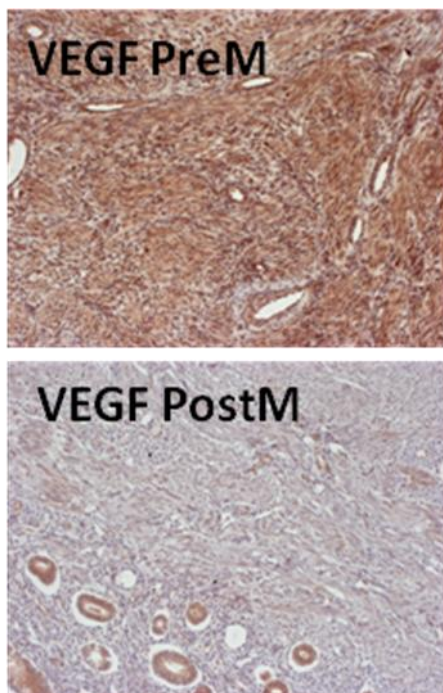
**Слика 8. Репрезентативне слике експресија ER $\alpha$  и ER $\beta$  у миометријуму пре и постменопаузних жена (x200)**

**Експресија ПР у миометријуму пре и постменопаузних жена**



**Слика 9. Репрезентативне слике експресија ПР у миометријуму пре и постменопаузних жена (x200)**

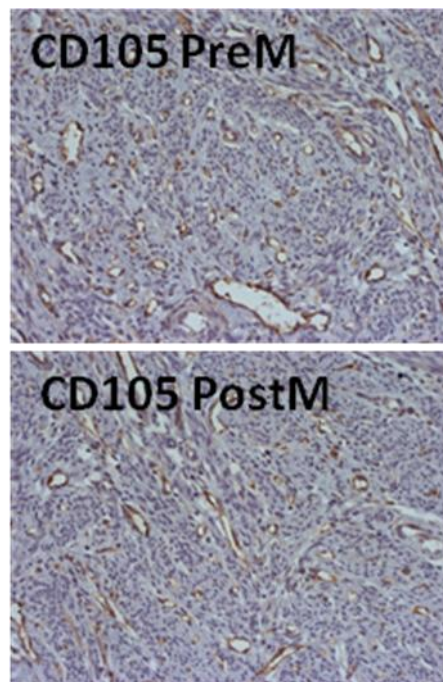
**Експресија VEGF у миометријуму пре и постменопаузних жена**



**Слика 10. Репрезентативне слике експресија VEGF у миометријуму пре и постменопаузних жена (x200)**



**Експресија CD105 у миометријуму пре и постменопаузних жена**



**Слика 11. Репрезентативне слике експресија CD105 у миометријуму пре и постменопаузних жена (x200)**

## КОРЕЛАЦИЈА ЕКСПРЕСИЈЕ СВИХ ИСПИТИВАНИХ ПАРАМЕТАРА У МИОМУ ПРЕ И ПОСТМЕНОПАУЗНИХ ЖЕНА

### Корелација између експресије рецептора за естроген и прогестерон у миому пре и постменопаузних жена

Није постојала значајна корелација између експресије испитиваних параметера у свеобухватно гледано миомима испитаница (График 7).

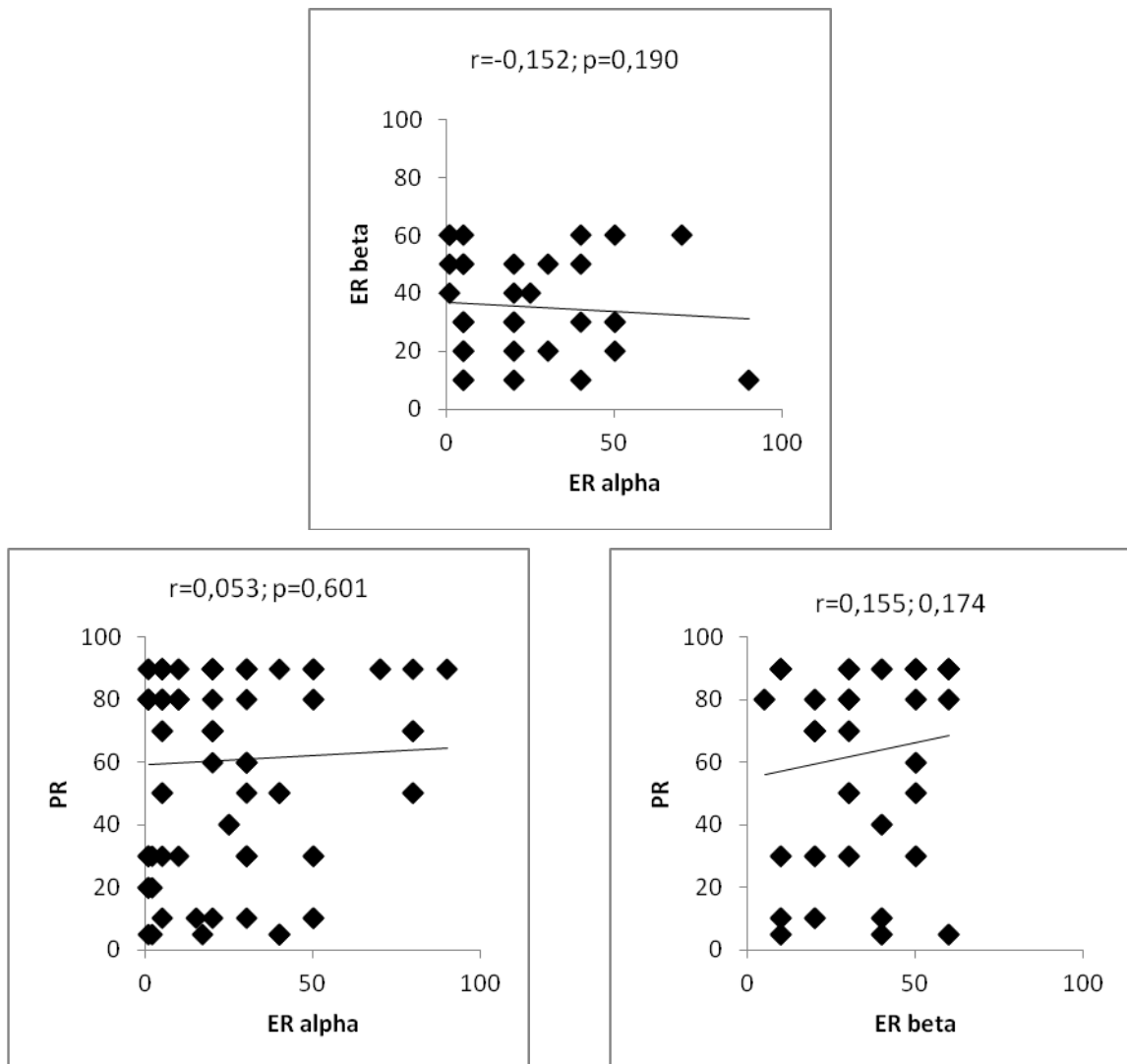


График 7. Корелација између рецептора за естроген и прогестерон у миому испитаница,  $p < 0.05$

## Корелација између експресије VEGF и рецептора за естроген и прогестерон у миому пре и постменопаузних жена

Експресија VEGF није била у статистички значајној корелацији у миому испитаница са експресијом различитих типова естрогенских рецептора, међутим јака корелација се показала у односу на експресију рецептора за прогестерон (График 8).

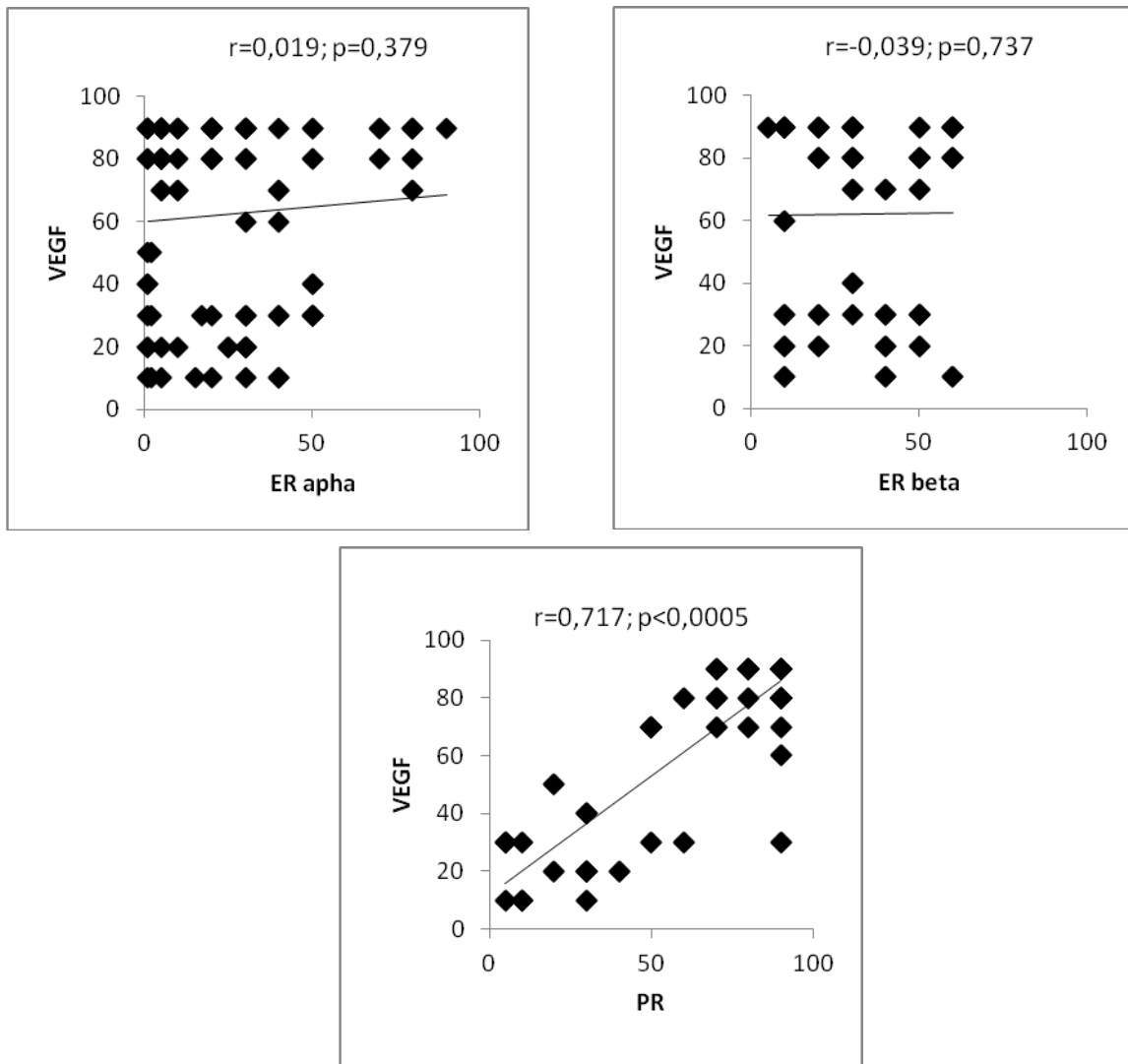


График 8. Корелација између VEGF и рецептора за естроген и прогестерон у миому испитаница,  $p<0.05$

## Корелација између експресије CD105 и рецептора за естроген и прогестерон у миому пре и постменопаузних жена

Експресија CD105 у миомима пацијенткиња није била у корелацији са експресијом рецептора са естроген док је ова експресија била у статистички значајној корелацији са експресијом рецептора за прогестерон (График 9).

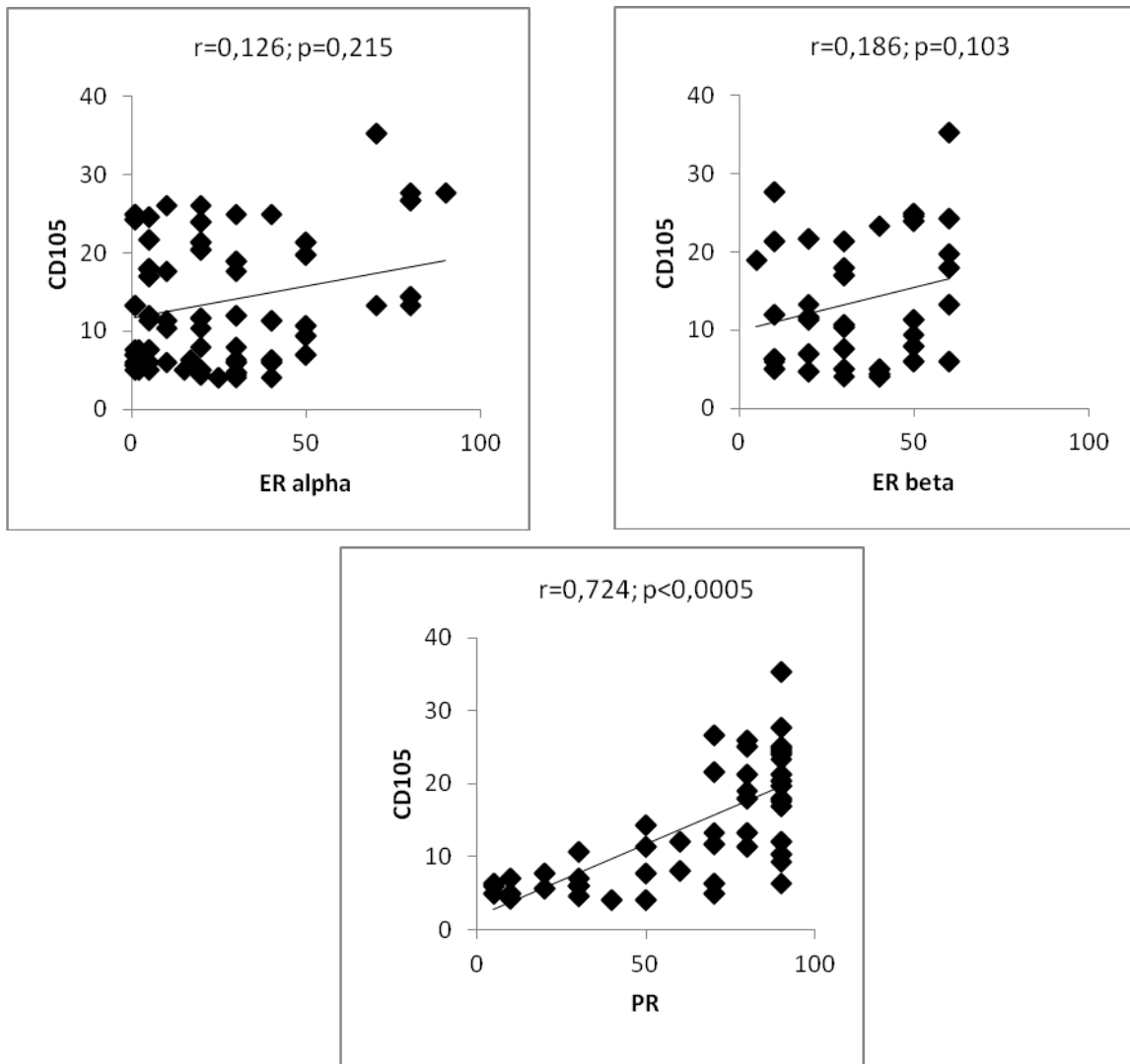


График 9. Корелација између CD105 и рецептора за естроген и прогестерон у миому испитаница,  $p<0.05$

## Корелација између експресије Ki67 и рецептора за естроген и прогестерон у миому пре и постменопаузних жена

Експресија Ki67 није била у корелацији са експресијом рецептора за естроген алфа, међутим позала се статистички значајна корелација како са рецептором за естроген бета тако и са експресијом рецептора за прогестерон (График 10).

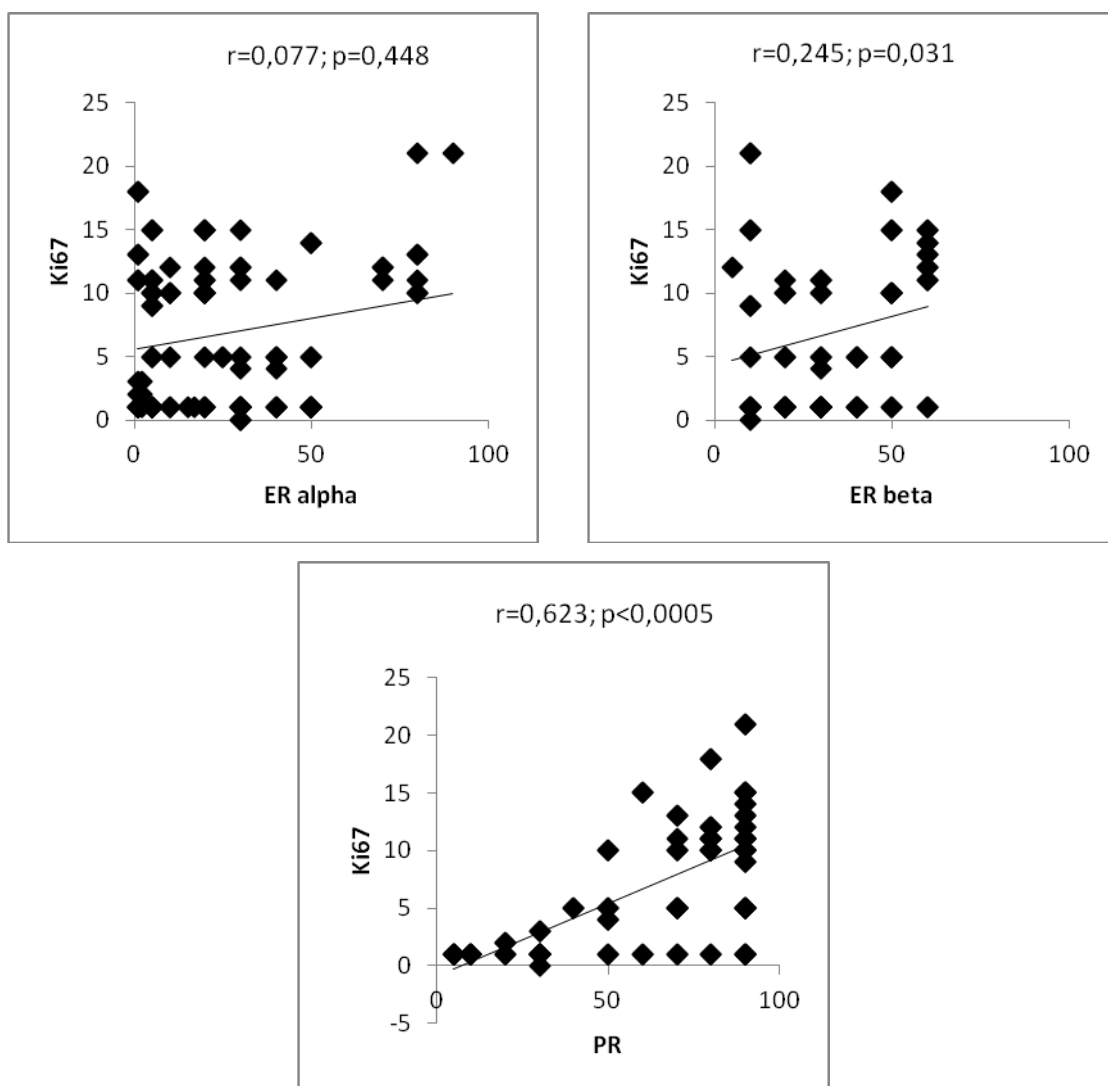


График 10. Корелација између Ki67 и рецептора за естроген и прогестерон у миому испитаница,  $p<0.05$

## Корелација између експресије каспазе-3 и рецептора за естроген и прогестерон у миому пре и постменопаузних жена

Експресија каспазе-3 није била у корелацији са експресијом рецептора за естроген алфа, међутим позала се статистички значајна корелација како са рецептором за естроген бета тако и са експресијом рецептора за прогестерон (График 11).

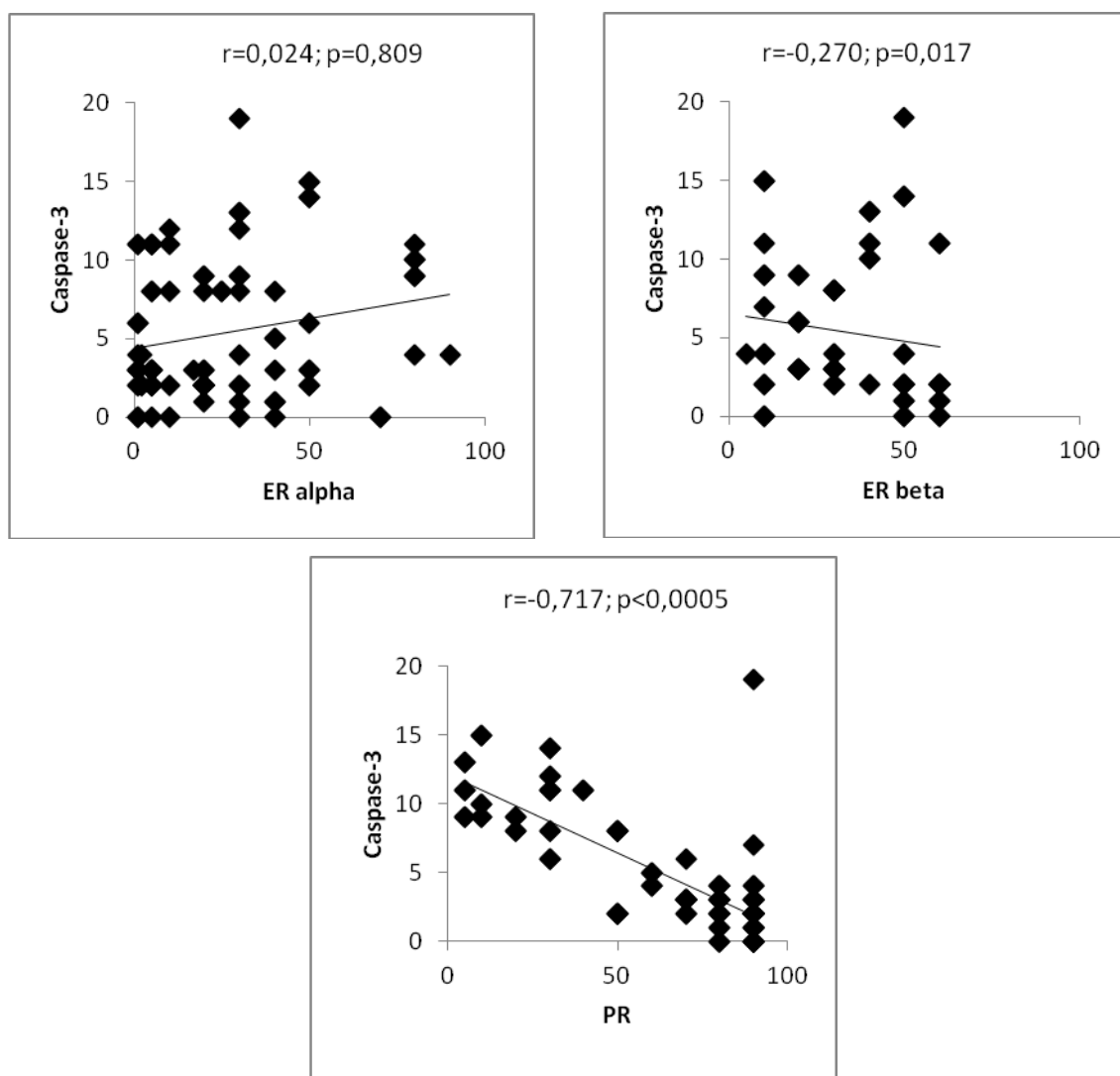


График 11. Корелација између каспазе-3 и рецептора за естроген и прогестерон у миому испитаница,  $p<0.05$

## КОРЕЛАЦИЈА ЕКСПРЕСИЈЕ СВИХ ИСПИТИВАНИХ ПАРАМЕТАРА У МИОМЕТРИЈУМУ ПРЕ И ПОСТМЕНОПАУЗНИХ ЖЕНА

### Корелација између експресије рецептора за естроген и прогестерон у миометријуму пре и постменопаузних жена

Корелација између експресије рецептора за пролактин и експресије естрогенских рецептор у миометријуму свих испитаница није била статистички значајна, с друге стране експресија ER $\alpha$  и ER $\beta$  су биле у високо статистички значајној корелацији (График 12).

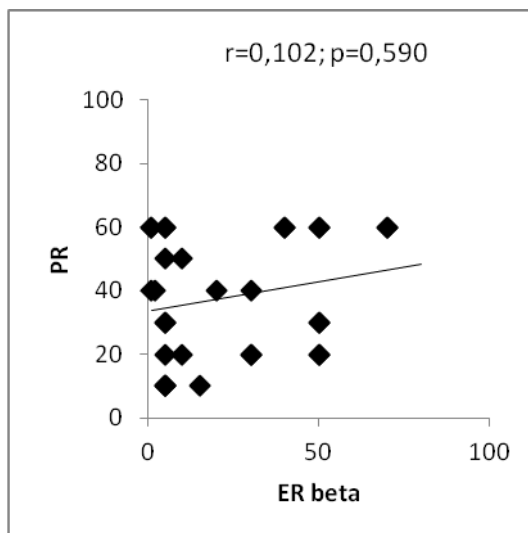
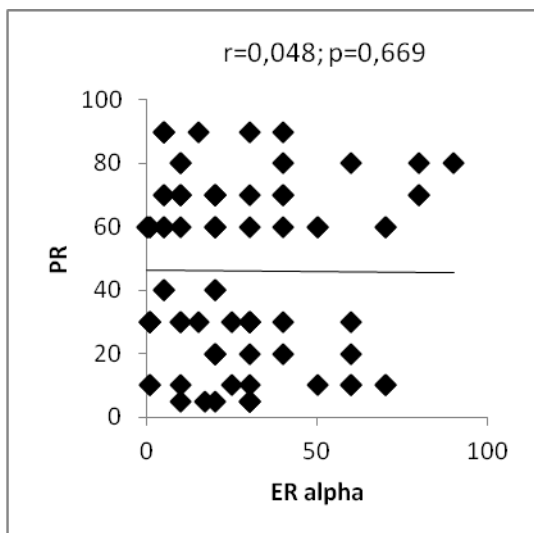
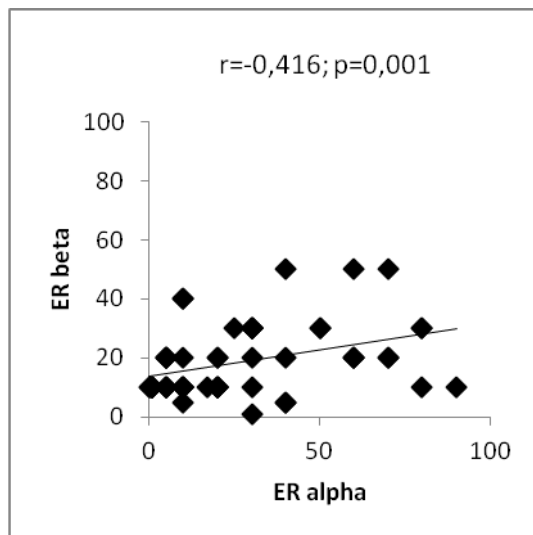


График 12. Корелација између рецептора за естроген и прогестерон у миометријуму испитаница,  $p < 0.05$

### Корелација између експресије VEGF и рецептора за естроген и прогестерон у миометријуму пре и постменопаузних жена

Експресија VEGF се није показала као статистички значајна у смислу корелације са експресијом естрогенских рецептора, међутим постоји значајна корелација у односу на експресију рецептора за прогестерон (График 13).

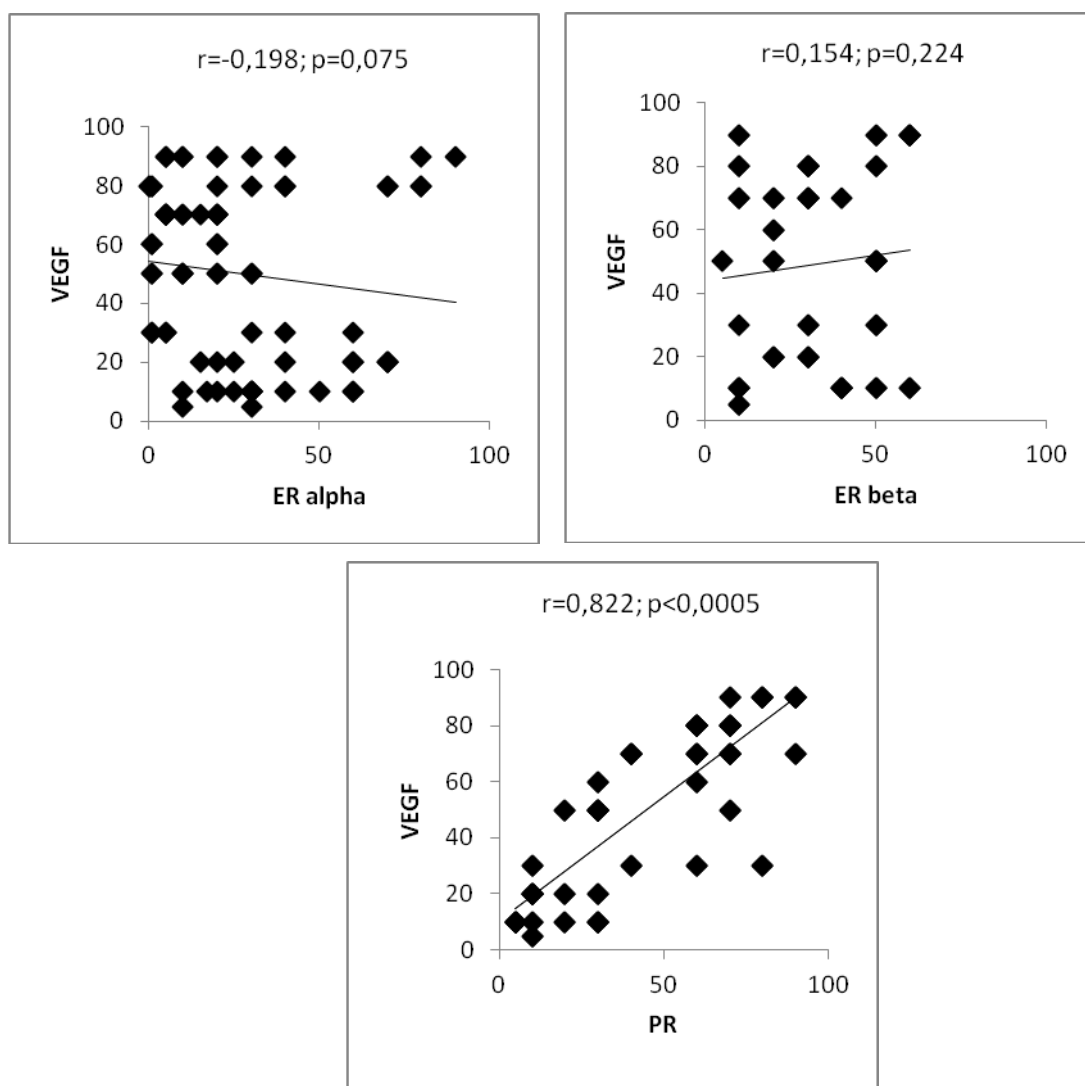


График 13. Корелација између VEGF и рецептора за естроген и прогестерон у миометријуму испитаница,  $p < 0.05$



## Корелација између експресије CD105 и рецептора за естроген и прогестерон у миометријуму пре и постменопаузних жена

Експресија CD105 се није показала као статистички значајна у смислу корелације са експресијом естрогенских рецептора у миометријуму испитаница, док у односу на експресију рецептора за прогестерон постоји значајна статистичка корелација (График 14).

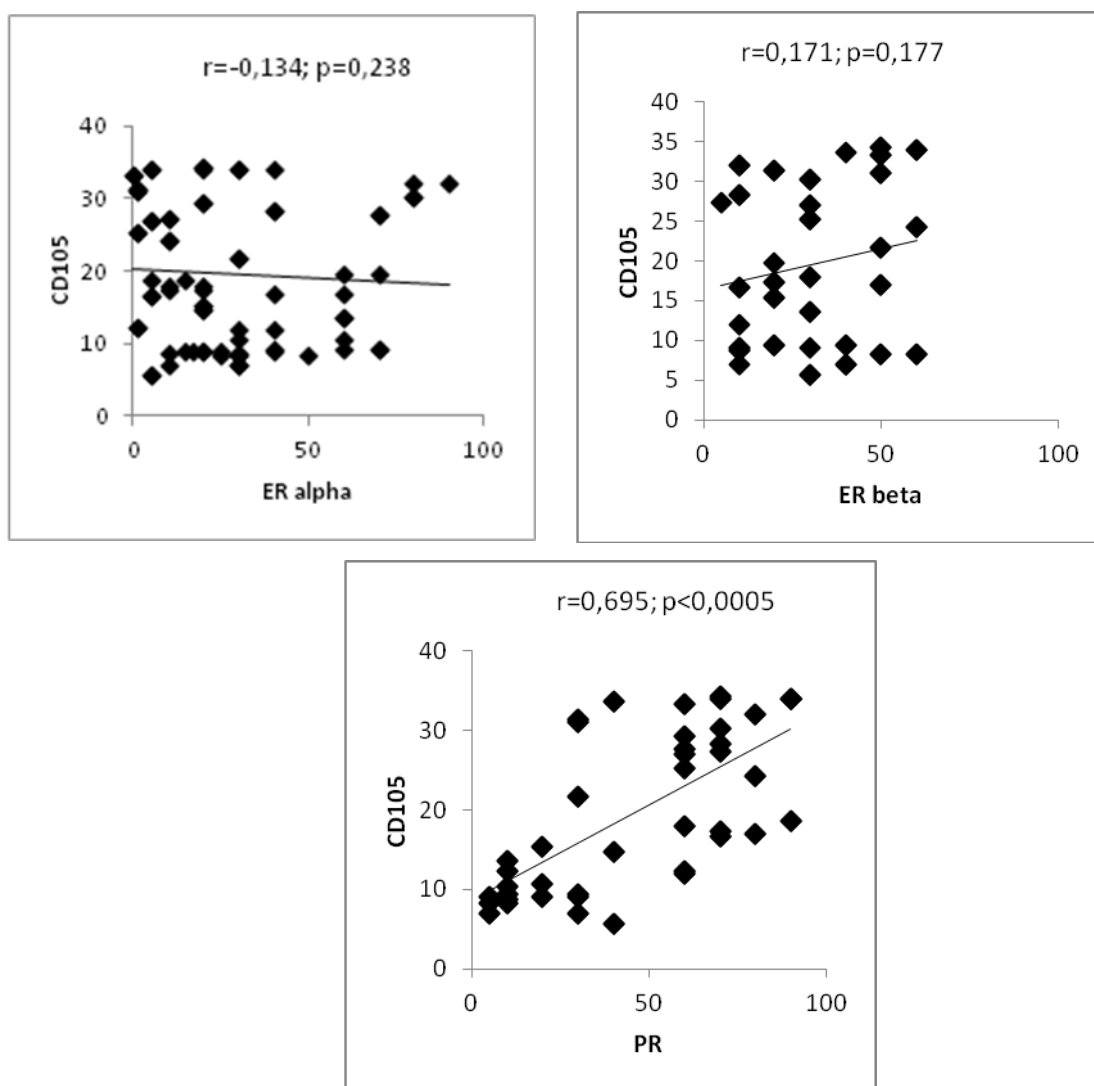


График 14. Корелација између CD105 и рецептора за естроген и прогестерон у миометријуму испитаница,  $p < 0.05$

## **5. ДИСКУСИЈА**

Лејомиом материце је најчешћи бенигни тумор, упркос честим појавама, етиологија и патогенеза ове абнормалности остају непознате. Опсежна знања су се акумулирала о улози хормона у расту лејомиома, јер појава лејомиома материце током репродуктивног периода и регресија након менопаузе указују да су гонадални стероиди кључни за развој ових тумора (41, 42). У последњој деценији посебна пажња је посвећена улози естрогена и прогестерона у патогенези лејомиома. Лејомиоми материце се сматрају туморима зависним од естрогена, а његову улогу подржала је и чињеница да континуирано лечење хормонима који ослобађају гонадотропин (GRH) значајно смањује производњу естрогена у јајницима, као и саму величину тумора (43). Да би постигли своје ефекте, естрогени, делују кроз активацију естрогенских рецептора ER $\alpha$  и ER $\beta$ . Оба ова рецептора показују очување секвенце ДНК и лиганд-везујућег домена и кодирана су помоћу два различита гена, такође имају и различите домене транскрипционе активације као и различиту дистрибуцију у ткивима (43).

Слично, као што је то случај и са рецепторима за естроген, веома мало се зна о специфичним улогама и интеракцијама рецептора за прогестерон у миомима. У литератури се могу наћи докази да прогестерон игра значајну улогу у експанзији миома утеруса и да је од суштинског значаја за раст миома који су у вези и са естрогеном (44). У последњих неколико година улога прогестерона у патогенези миома утеруса постала је све израженија. Као и у случају ER, рецептори нуклеарног прогестерона функционишу као транскрипциони фактори активирани лигандом, са две доминантне изоформе ПР код људи: ПРА и ПРБ (43).

Поред чињенице да је преваленција пролиферације преко апоптозе главни услов за раст миома, овом студијом смо покушали да покажемо да сличности и разлике у ангиогенези, пролиферативним и апоптотским индексима у миомима и околном ткиву, првенствено зависе од експресије рецептора за стероидне хормоне. У складу са претходним, циљ ове студије био је да се утврди утицај статуса рецептора естрогена и прогестерона на ангиогенезу, пролиферацију и апоптозу ћелија миома код жена у пременопаузи и постменопаузи.

Ми смо показали да експресија рецептора за прогестерон није у директној корелацији са експресијом рецептора  $\alpha$  и  $\beta$  за естроген ни у миому нити у миометријуму пре и постменопаузних жена (График 7 и График 12) међутим ПР је значајно експримиран како у миому тако и у миометријуму пременопаузних жена у односу на постменопаузне (График 2, Слика 3 и Слика 9) што говори у прилог

чињеници да је прогестерон циклички повишен током репродуктивних година, да је заједно са естрогеном значајно повишен током трудноће, и да су потиснути након менопаузе, али је ипак веома тешко разликовати релативну важност естрогена од прогестерона (45, 46).

У нашој студији показали смо да експресија естрогенских рецептора није била различита код миома пременопаузних у поређењу са постменопаузним женама (График 1, Слика 2). Експресија ER $\alpha$  и ER $\beta$  није се значајно разликовала ни у миометријуму тих жена (График 1, Слика 8). Слично томе, *Sakaguchi* и сарадници показали су да координисана експресија ER $\alpha$  и ER $\beta$  може бити неопходна за нормално деловање естрогена у миометрију (47, 48). Такође, показано је да је ER $\alpha$  фосфорилисан већом брзином на серину у лејомиому у поређењу са околним миометријом, из тог разлога је могуће да је фосфорилисан ER $\alpha$  регулисана p44 / 42 MAPK сигналним путем, и може имати улогу у развоју лејомиома утеруса (49, 50).

Пошто је већ историјска чињеница да раст и преживљавање лејомиома зависи од ангиогенезе, до овог датума је такође пронађено да естрогени и прогестерон регулишу експресију неколико моћних ангиогених фактора, укључујући фактора раста васкуларног ендотела (VEGF) и фактора раста фибробласта (FGF) (51).

Присуство микро РНК (mRNA) рецептора хормона раста сугерише да је материца циљно ткиво за активацију хормона раста јер је и показано да лејомиосарком материце продукује веће количине хормона раста (52). Експресија микро РНК фактора раста је регулисана женским полним хормонима. Естроген може вршити своје митогене ефекте на лејомиом преко естроген-зависних фактора раста (53, 54).

Нашом студијом смо установили да у миому експресија VEGF није значајно промењена без обзира на менопаузални статус (График 3, Слика 4), супротно томе експресија VEGF је била измењена у миометрију. Заправо открили смо да је експресија VEGF значајно већа у групи пременопаузних у поређењу са постменопаузним женама (График 3, Слика 10). Слично томе, *Hague* и сарадници, према менопаузалном статусу, установили су да је експресија VEGF значајно повишена у пременопаузалном у поређењу са постменопаузним ендометријумом. Испитујући пременопаузална ткива показало се да је значајно виши ниво експресије нађен у епителу, али не и у строми или крвним судовима (55, 56).

Иако се у литератури спомиње веза између експресије рецептора за естрогене и прогестерон са експресијом VEGF, ми ову везу нисмо успели да уочимо када се радило о корелацији експресије VEGF са рецепторима за естроген, ни у миому ни у

миометријуму (График 8, График 13). Са друге стране, опет неvezано за менструални циклус, веза између експресије рецептора за прогестерон и VEGF била је јасна и јака било да се радило о корелацији експресије ова два маркера у миому или миометријуму (График 8, График 13). Наши налази су у корелацији са студијом Хи и сарадника који указују да заправо прогестерон доводи до повишене регулације VEGF протеина у лејомиому материце. Међутим којим сигналним путевима и (пато)физиолошким процесима се ово догађа још увек није у потпуности разјашњено (57).

Током туморске ангиогенезе, ендотелне ћелије интензивно експримирају ендоглин (CD105), док васкуларни ендотел, стромалне и инфламаторне ћелије једва или уопште не експримирају CD105 (58). Поред тога, заправо један од најчешће процењиваних и коришћених маркера ангиогенезе је микроваскуларна густина која се одређује на основу специфичне експресије ендотелног антигена (CD34, CD105) (59).

У самом миому нисмо приметили никакве промене између група у експресији CD105 у вези са менопаузалним статусом (График 4, Слика 5), међутим CD105 је статистички значајно смањен у миометријуму постменопаузних у поређењу са пременопаузним женама (График 4, Слика 11).

Као што је то био случај и у експресији VEGF, показали смо да рецептор за прогестерон у својој експресији статистички значајно корелира са експресијом CD105 како у миому тако и у анализираном миометријуму независно од менструалног циклуса (График 9 и График 14). Смањена експресија рецептора за прогестерон у миометријуму постменопаузних жена очигледно је условио и смањену експресију CD105 у истом. Са друге стране, у случају када су вредности експресије рецептора за прогестерон у миому више у пременопаузној групи изгледа да експресија CD105 се не испољава као статистички значајна у самом миому.

Кључни патолошки процеси који су укључени у раст миома су пролиферација и хипертрофија миомских ћелија, апоптоза, ангиогенеза, стромалне и секундарне промене (60). Најпоузданији маркер пролиферације ћелија је Ki-67 или нуклеарни антиген пролиферације ћелија, који означава не само ћелије у деоби, већ све оне у синтетској фази ћелијског циклуса (41). Висок ниво антигена Ki-67, откривен током секреторне фазе, указује на то да прогестерон има синергистички ефекат у патогенези миома (61).

Апоптоза је процес програмиране ћелијске смрти која елиминише дисфункционалне и непожељне ћелије. То је процес, високо регулисан комплексном интеракцијом између про и анти-апоптотичких молекула, захвата једну ћелију

независно од околине, и индукован је активацијом каспаза, специфичних ендопротеаза које уништавају структурне компоненте укључујући и генетски материјал ћелија (62).

Што се тиче смрти ћелија, ми смо процењивали два протеина позната као маркери укључени у контролу раста леиомиома. Каспаза-3, због своје специфичности и осетљивости, је поуздан маркер ћелија које пролазе процес програмиране ћелијске смрти. Њена активност се не може открити пре апоптозе. Регистрована је у раним фазама и детекција расте са прогресијом, док се смањује само у завршној фази апоптотског процеса (63).

Наше истраживање указује да у миому не постоји статистички значајна разлика у експресије Ki-67 између испитиваних група (График 5, Слика 6). Сама корелација са експресијом стероидних рецептора се показала јаким и статистички значајном када се радило о експресији рецептора за ЕРβ и ПР (График 10). Даљом анализом експресије каспазе-3, уочено је да је експресија овог маркера била значајно повишена у миому постменопаузних у односу на пременопаузне жене (График 6, Слика 7). Слично као што је то био случај и са Ki-67, експресија каспазе-3 је показала статистички значајну корелацију са експресијом ЕРβ и ПР (График 11). Уколико само посматрамо ситуацију у миому везану за менструални циклус, примећујемо да експресија Ki-67 није пратила тренд изражавања каспазе-3, слично томе, Plewka и сарадници показали су да апоптоза није праћена пролиферацијом, а Tinelli и сарадници да имунолокализација Ki-67 у лејомиомима који манифестују апоптозу није детектована (41, 64).

## **6. ЗАКЉУЧЦИ**

Иако ER $\beta$  има ефекат на пролиферацију ћелија и апоптозу, чини се да су сви релевантнији подаци на страни јаснијег ефекта прогестерона на сигналне путеве. Према нашим подацима, експресија рецептора за прогестерон је имала већи утицај на апоптозу и раст ћелија од естрогенских рецептора. Пошто је експресија рецептора за прогестерон повећана у групи пременопаузних жена и код миома и код миометријума, вероватно је ова експресија довела до смањења експресије апоптотског маркера, повећане пролиферације ћелија и ангиогенезе код жена у пременопаузи.



# **7. ЛИТЕРАТУРА**

1. Takahashi TA, Johnson KM. Menopause. *Med Clin North Am.* 2015;99(3):521-34.
2. McKinlay SM, Brambilla DJ, Posner JG. The normal menopause transition. *Maturitas.* 2008;61(1-2):4-16.
3. Fletcher JA, Morton CC, Pavelka K. Chromosome aberrations in uterine smooth muscle tumors: potential diagnostic relevance of cytogenetic instability. *Cancer Res* 1990; 94: 4092-97.
4. Rafael F. Valle. Pathophysiology of uterine myomas and its clinical implications. In, *Uterine myoma, myomectomy and minimally invasive treatments.* Tinelli, A., Malvasi, A. (Eds.) Springer Science-BusinessMed. Cham. hildelberg. New York Diddre.det, London. 2015.
5. Tinelli A, Sparic R, Kadija S, Babovic I, Tinelli R, Mynbaev OA, Malvasi A. Myomas: anatomy and related issues. *Minerva Ginecol.* 2016;68(3):261-73. Review
6. Donnez J, Dolmans MM. Uterine fibroid management: from the present to the future. *Hum Reprod Update.* 2016;22(6):665-686.
7. Munro MG, Critchley HO, Fraser IS, FIGO Menstrual Disorders Working Group. The FIGO classification of causes of abnormal uterine bleeding in the reproductive years. *Fertil Steril* 2011; 95:2204.
8. Laughlin-Tommaso SK, Hesley GK, Hopkins MR, Brandt KR, Zhu Y, Stewart EA. Clinical limitations of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) classification of uterine fibroids. *Int J Gynaecol Obstet.* 2017;139(2):143-148.
9. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(12):4258-4265.
10. Enmark E, Gustafsson JA. Estrogen receptor  $\beta$  – a novel receptor opens up new possibilities for cancer diagnosis and treatment. *End Rel Cancer,* 1998;5:213-222.
11. Matthews J, Gustafsson JA. Biological Actions of ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Molecular interventions Review.* 2003;3(5):281-289.
12. Chabbert-Buffet N, Esber N, Bouchard P. Fibroid growth and medical options for treatment. *Fertil Steril.* 2014 102(3):630-9.

13. Smith YR, Berman DR, Quint EH. Premenarchal vaginal discharge: findings of procedures to rule out foreign bodies. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2002; 15: 227-230.
14. Rein MS, Barbieri RL, Friedman AJ. Progesterone: a critical role in the pathogenesis of uterine myomas. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172(1 Pt 1):14-8. Review.
15. Nikpey P, Nazari T, Khalili S, Ebrahimi A. The role of epidermal growth factor receptor (EGFR) common gene mutations in Iranian women with uterine fibroids. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2018;229:103-107.
16. Tommola P, Pekonen F, Rutanen EM. Binding of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I in human myometrium and leiomyomata. *Obstet Gynecol.* 1989;74(4):658-62.
17. Pekonen F, Nyman T, Rutanen EM. Differential expression of keratinocyte growth factor and its receptor in the human uterus. *Mol Cell Endocrinol.* 1993;95(1-2):43-9.
18. Stoica RA, Bistriceanu I, Sima R, Iordache N. Laparoscopic myomectomy. *J Med Life.* 2014;7(4):522-4.
19. 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.
20. James HS. Uterine Fibroid Research. *Reprod Sci.* 2014; 21(9): 1065–1066.
21. Lamminen S, Rantala I, Helin H, Rorarius M, Tuimala R. Proliferative activity of human uterine leiomyoma cells as measured by automatic image analysis. *Gynecol Obstet Invest* 1992;34:111-114.
22. Kawaguchi K, Fujii S, Konishi I, Okamura H, Mori T. Ultrastructural study of cultured smooth muscle cells from uterine leiomyoma and myometrium under the influence of sex steroids. *Gynecol Oncol* 1985;21:32-41.
23. Brandon DD, Bethea CL, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Harrington MS, Erickson TE, Warner C, Keenan EJ, Clinton GM. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are overexpressed in human uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:78-85.
24. Rein MS. Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis. *Environ Health Perspect.* 2000;108 Suppl 5:791-3. Review.
25. Maruo T, Matsuo H, Samoto T, Shimomura Y, Kurachi O, Gao Z, Wang Y, Spitz IM, Johansson E. Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids.* 2000 Oct-Nov;65(10-11):585-92. Review.

26. Lau KM, LaSpina M, Long J, Ho SM. Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer Res.* 2000;60(12):3175-3182.
27. Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA. The estrogen receptor  $\beta$  subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 1998;19(4):253-286.
28. Gustafsson JA. Estrogen receptor  $\beta$  - a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol.* 1999;163:379-383.
29. Leav I, Lau KM, Adams JY, McNeal JE, Taplin ME, Wang J, Singh H, Ho SM. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol.* 2001;159(1):79-92
30. Lahita RG. The connective tissue diseases and the overall influence of gender. *International journal fertility & menopausal studies.* 1996;41:156-165.
31. Cheng J, Lee EJ, Madison LD, Lazennec G. Expression of estrogen receptor beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis. *FEBS Lett.* 2004;566(1-3):169-172.
32. Wu SP, DeMayo FJ. Progesterone Receptor Signaling in Uterine Myometrial Physiology and Preterm Birth. *Curr Top Dev Biol.* 2017;125:171-190.
33. Courtoy GE, Donnez J, Marbaix E, Barreira M, Luyckx M, Dolmans MM. Progesterone Receptor Isoforms, Nuclear Corepressor-1 and Steroid Receptor Coactivator-1 and B-Cell Lymphoma 2 and Akt and Akt Phosphorylation Status in Uterine Myomas after Ulipristal Acetate Treatment: A Systematic Immunohistochemical Evaluation. *Gynecol Obstet Invest.* 2018;83(5):443-454.
34. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med.* 1995; 333(26):1757-63.
35. Plewka D, Morek M, Bogunia E, Waloszek J, Plewka A. Expression of VEGF isoforms and their receptors in uterine myomas. *Ginekol Pol.* 2016;87(3):166-77.
36. Bouchard P. Current and future medical treatments for menometrorrhagia during the premenopause. *Gynecol Endocrinol.* 2011;27 Suppl 1:1120-5.
37. Madej P, Plewka A, Plewka D, Paleń P, Nowaczyk G, Bogunia E, Marczyński J, Waloszek J. The aromatase expression in myomas and myometriums of women in reproduction and perimenopausal age. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009;47(3):497-504.

38. Heidenhain M. Noch einmal über die Darstellung der Centrialkörper durch Eisenhamatoxylin. Nebst einigen allgemeinen Bemerkungen über die Hamatoxylinfarben. *Wiss Mikrosk*, 1896; 13:186.
39. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques*. 5th edition. Churchill Livingstone: Edinburgh, London, New York, Oxford; 2002.
40. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991;324:1-8. [doi: 10.1056/NEJM199101033240101] [PMID: 1701519]
41. Plewka A, Plewka D, Madej P, Nowaczyk G, Sieron-Stoltny K, Jakubiec-Bartnik B. Processes of apoptosis and cell proliferation in uterine myomas originating from reproductive and perimenopausal women. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2011; 49: 398–404. [PMID: 22038217]
42. Wu X, Blanck A, Olovsson M, Möller B, Favini R, Lindblom B. Apoptosis, cellular proliferation and expression of p53 in human uterine leiomyomas and myometrium during the menstrual cycle and after menopause. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000; 79:397-404. [PMID: 10830768]
43. Borahay MA, Al-Hendy A, Kilic GS, Boehning D. Signaling Pathways in Leiomyoma: Understanding Pathobiology and Implications for Therapy. *Mol Med*. 2015; 21:242-56. [doi: 10.2119/molmed.2014.00053] [PMID: 25879625]
44. Moravek MB, Bulun SE. Endocrinology of uterine fibroids: steroid hormones, stem cells, and genetic contribution. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2015 Aug;27(4):276-83. doi: 10.1097/GCO.0000000000000185. Review. PubMed PMID:26107781; PubMed Central PMCID: PMC4734398.
45. Flake GP, Andersen J, Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ Health Perspect*. 2003; 111:1037-54. [PMID: 12826476]
46. Laganà AS, Vergara D, Favilli A, La Rosa VL, Tinelli A, Gerli S, Noventa M, Vitagliano A, Triolo O, Rapisarda AMC, Vitale SG. Epigenetic and genetic landscape of uterine leiomyomas: a current view over a common gynaecological disease. *Arch Gynecol Obstet*. 2017; 296(5):855-867. [doi: 10.1007/s00404-017-4515-5] [PMID: 28875276]
47. Sakaguchi H, Fujimoto J, Aoki I, Tamaya T. Expression of estrogen receptor alpha and beta in myometrium of premenopausal and postmenopausal women. *Steroids*. 2003; 68:11-9. [PMID: 12475719].

48. Plewka D, Marczyński J, Morek M, Bogunia E, Plewka A. Receptors of hypothalamic-pituitary-ovarian-axis hormone in uterine myomas. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:521313. [doi: 10.1155/2014/521313] [PMID:25050358]
49. Hermon TL, Moore AB, Yu L, Kissling GE, Castora FJ, Dixon D. Estrogen receptor alpha (ERalpha) phospho-serine-118 is highly expressed in human uterine leiomyomas compared to matched myometrium. *Virchows Arch*. 2008; 453:557-69. [doi: 10.1007/s00428-008-0679-5] [PMID: 18853184]
50. Levy G, Hill MJ, Plowden TC, Catherino WH, Armstrong AY. Biomarkers in uterine leiomyoma. *Fertil Steril*. 2013; 99(4):1146-52. [doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.10.048] [PMID: 23200685]
51. Soares R, Reis-Filho JS, Gartner F, Schmitt FC. Vascular endothelial growth factor, transforming growth factor-alpha, and estrogen receptors: possible cross-talks and interactions. *Am J Pathol*. 2002; 160:381-2. [PMID: 11786431]
52. Vu TH, Yballe C, Boonyanit S, Hoffman AR. Insulin-like growth factor II in uterine smooth-muscle tumors: maintenance of genomic imprinting in leiomyomata and loss of imprinting in leiomyosarcomata. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1670–6.
53. Magri KA, Benedict MR, Ewton DZ, Florini JR. Negative feedback regulation of insulin-like growth factor-II gene expression in differentiating myoblasts in vitro. *Endocrinology* 1994;135:53–62
54. Chang CC, Hsieh YY, Lin WH, Lin CS. Leiomyoma and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms: a systematic review. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2010 Sep;49(3):247-53. doi: 10.1016/S1028-4559(10)60056-3. Review. PubMed PMID: 21056306.
55. Hague S, Manek S, Oehler MK, MacKenzie IZ, Bicknell R, Rees MC. Tamoxifen induction of angiogenic factor expression in endometrium. *Br J Cancer*. 2002; 86:761-7. [PMID: 11875740]
56. Javid S, Ziamajidi N, Foroughi S, Abbasalipourkabir R. Effects of tamoxifen-loaded solid lipid nanoparticles on the estrogen receptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) genes expression in the endometrial tissue of ovariectomized female Sprague-Dawley rats. *Int J Biol Macromol*. 2017; 96:706-712. [doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.055] [PMID: 28017765]
57. Xu Q, Ohara N, Chen W, Liu J, Sasaki H, Morikawa A, Sitruk-Ware R, Johansson ED, Maruo T. Progesterone receptor modulator CDB-2914 down-regulates vascular endothelial growth factor, adrenomedullin and their receptors and modulates

- progesterone receptor content in cultured human uterine leiomyoma cells. *Hum Reprod.* 2006 Sep;21(9):2408-16. Epub 2006 May 23. PubMed PMID: 16720624.
58. Saarelainen SK, Staff S, Peltonen N, Lehtimäki T, Isola J, Kujala PM, Vuento MH, Mäenpää JU. Endoglin, VEGF, and its receptors in predicting metastases in endometrial carcinoma. *Tumour Biol.* 2014; 35(5):4651-7. [doi:10.1007/s13277-014-1609-6] [PMID: 24420153]
  59. Bednarek W, Mazurek M, Cwiklińska A, Barczyński B. Expression of selected angiogenesis markers and modulators in pre-, peri- and postmenopausal women with ovarian cancer. *Ginekol Pol.* 2009; 80(2):93-8. [PMID: 19338204].
  60. Maruo T, Ohara N, Wang J, Matsuo H. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update.* 2004; 10:207–220. [PMID: 15140868]
  61. Borahay MA, Al-Hendy A, Kilic GS, Boehning D. Signaling Pathways in Leiomyoma: Understanding Pathobiology and Implications for Therapy. *Mol Med.* 2015; 21:242-56. [doi: 10.2119/molmed.2014.00053] [PMID: 25879625]
  62. Commandeur AE, Styer AK, Teixeira JM. Epidemiological and genetic clues for molecular mechanisms involved in uterine leiomyoma development and growth. *Hum Reprod Update.* 2015; 21(5):593-615. [doi: 10.1093/humupd/dmv030] [PMID: 26141720]
  63. Reis FM, Petraglia F, Taylor RN. Endometriosis: hormone regulation and clinical consequences of chemotaxis and apoptosis. *Hum Reprod Update.* 2013; 19(4):406-18. [doi: 10.1093/humupd/dmt010] [PMID: 23539633]
  64. Tinelli A, Sparic R, Kadija S, Babovic I, Tinelli R, Mynbaev OA, Malvasi A. Myomas: anatomy and related issues. *Minerva Ginecol.* 2016; 68(3):261-73. [PMID: 26785282]