



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

ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>	
Име и презиме: Душко Кљакић	
Датум и место рођења: 17.04.1968.	
Садашње запослење: специјалиста гинекологије и акушерства, Општа болница Бар, Црна Гора	
<i>II Докторска дисертација</i>	
Наслов: Утицај експресије естрогених и прогестеронских рецептора на ангиогенезу, апоптозу и пролиферацију ћелија миома код жена у пре и постменопаузи	
Број страница: 81	
Број слика и графика: 25	
Број библиографских података: 64	
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу	
Научна област (УДК): Хумана репродукција	
Ментор: проф. др Слободанка Митровић	
<i>III Оцена и одбрана</i>	
Датум пријаве теме: 05.02.2014.	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-317/5 од 07.05.2014.	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	
1. Проф. др Александар Живановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Гинекологија и акушерство, председник;	
2. Проф. др Ана Митровић Јовановић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, ужа научна област Гинекологија и акушерство, члан;	
3. Проф. др Ирена Танасковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Хистологија и ембриологија, члан;	
4. Доц.др Слободанка Митровић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Патолошка анатомија, члан	
5. Доц. др Владислав Воларевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Микробиологија и имунологија, члан.	
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:	
1. Проф. др Александар Живановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Гинекологија и акушерство, председник	
2. Проф. др Ирена Танасковић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Хистологија и ембриологија, члан	
3. Проф. др Саша Раичевић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Подгорици, ужа научна област Гинекологија и акушерство, члан	
Датум одбране дисертације:	

САЖЕТАК

Циљ ове студије је био да се одреди утицај експресије рецептора за естрогене и прогестерон на ангиогенезу, пролиферацију и апоптозу ћелија миома код жена у пре и постменопаузи. Ово је била студија пресека, клиничко-експериментална, ретроспективна, неинтервенцијска студија у пољу истраживања фундаменталних механизма патогенезе болести, коришћењем патохистолошког материјала из постојеће архиве. Истраживањем је обухваћено 76 пацијенткиња са дијагностикованим лејомиома 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). Коришћен је метод стандардног Н&Е бојења за исечке миома, миометријума и ендометријума, као и имунохистохемијски метод за одређивање експресије ER α , ER β , PR α , VEGF, CD105, Ki-68 и Caspase -3. Експресија рецептора за прогестерон је била више изражена у миомима и миометријуму код пременопаузних жена у поређењу са миомима и миометријумом код жена у постменопаузи. Експресија Caspase-3 је статистички значајно већа у групи ПостМ жена у поређењу са ПреМ групом. Експресија ER α и ER β није била значајно различита између група ни у узорцима миома ни миометријума. Према нашим подацима, експресија рецептора за прогестерон је имала већи утицај на апоптозу и пролиферацију ћелија него експресија рецептора за естрогене. Повећана експресија рецептора за прогестерон код жена у ПреМ у миому и миометријуму, вероватно је 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 α , ER β , PR α , 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 α and ER β were not changed among groups neither in myoma nor in myometrium samples. According to our data, PR α had higher influence on apoptosis and cell growth than estrogen receptors. Since PR α was increased in PreM in both myoma and myometrium, probably this expression led further to lower expression of apoptotic marker in PreM women.

Мојој породици, за сву љубав и подршку

Желео бих да изразим посебну ЗАХВАЛНОСТ

Проф. др Слободанки Митровић, свом ментору, на посвећеном времену, стручним саветима и искреном људском односу у току израде овог рада.

Проф. др Саши Раичевићу на пријатељској наклоности и подршци да завршим овај рад.

Захваљујем се колективу Службе за патологију Клиничког Центра Крагујевац, а посебно мојим драгим колегама Милени, Милошу и Далибору, који су ми пружили огромну помоћ у реализацији експерименталног дела овог рада.

И на крају, мојој породици и пријатељима, који нису дозволили да посустанем

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	8
1.1. Перименопауза, менопауза и постменопауза.....	9
1.2. Патогенеза миома.....	10
1.3. Преваленца и симптоми.....	11
1.4. Класификација миома.....	12
1.5. Утицај естрогена и прогестерона на раст миома.....	14
1.6. Улога фактора раста у патогенези миома.....	16
1.7. Биолошка улога и структура рецептора за естрогене и прогестерон.....	20
1.8. Ангиогенеза.....	22
1.9. Експресија ароматазе код миома.....	25
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ.....	27
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	30
3.1. Стандардни хематоксилин-еозин метод бојења.....	31
3.2. Имунохистохемијски метод.....	32
3.3. Експресија рецептора за естрогене, прогестерон, VEGF, Ki-67 и caspase-3.....	32
3.4. Експресија ендоглина (CD105).....	33
3.5. Узимање узорка.....	34
3.6. Статистичка анализа.....	34
4. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА.....	35
4.1. Хематоксилин-еозин бојење миома и миометријума.....	36
4.2. Експресија свих испитиваних параметара у миомима и миометријуму пре и постменопаузних жена.....	37
4.3. Експресија свих испитиваних параметара у миомима пре и постменопаузних жена.....	42
4.4. Експресија свих испитиваних параметара у миометријуму пре и постменопаузних жена.....	46
4.5. Корелација експресије свих испитиваних параметара у миомима пре и постменопаузних жена.....	49
4.6. Корелација експресије свих испитиваних параметара у миометријуму пре и постменопаузних жена.....	54
5. ДИСКУСИЈА.....	57
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	62
7. ЛИТЕРАТУРА.....	64
8. ПРИЛОГ.....	74

1. УВОД

1.1. 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 дефинисање 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 миомима у перименопаузи, често постоје неоправдани, супростављени приступи у виду, или занемаривања симптоматологије (очекујући да ће миоми након менопаузе реградирати) или преагресивног приступа у виду радикалног оперативног захвата-хистеректомије. У терапијском смислу увек је неопходно размотрити примену мање инвазивних хируршких поступака, али и употребу лекова који ће омогућити многим женама да уђу у менопаузу без клиничке симптоматологије узроковане миоматозом утеруса. (2).

1.2. 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 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. Чetrдесет процената жена оболелих 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).

1.3.Преваленца и симптоми

Лејомиоми се јављају код 50-60% жена, до 70% у доби од 50 година, а у 30% случајева узрокују морбидитет због ирегуларног крварења из материце (обилна менструална крварења која узрокују 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 превременог порођаја, крварења из материце и спонтаног побачаја. Прогресиван раст лејомиома је једна од најчешћих клиничких индикација за хистеректомију или миомектомију (6).

1.4.Класификација миома

Постоје бројне класификације које миоме сврставају у различите групе према локализацији, начину раста, степену интрамуралног ширења и/или дисторзији материце, према макроскопском или микроскопском изгледу. 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 хибридную 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%) и веома ретке, миоме цервикса (свега 0,25 до 0,35%). Према правцу раста, FIGO класификација миома дели миоме на субмукозне, интрамуралне, субсерозне и интралигаментарне.

- 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).

Миоми најчешће настају интрамурално, унутар самог зида материце. Својим растом доводе до концентричне хипертрофије зида утеруса, компресије на околни миометријум и ендометријум, деформације и промене положаја у малој карлици. Због специфичне васкуларизације подлежу регресивним променама. Субсерозни миоми прелазе границу зида материце према трбушној дупљи и налазе се испод перитонеалне серозе. Расту на широкој основи или на петелци, путем чијих се крвних судова исхрањују. Код поремећаја у циркулацији, услед притиска или торзије, долази до дегенеративних промена, у смислу хијалине, муцинозне или цистичне дегенерације, исхемије или инфаркта. Врло често, миоми се вишеструко развијају, до великих размера, вршећи притисак на околне органе, доводећи тиме до диференцијално дијагностичких дилема и потешкоћа. Могу се некада причврстити за околне структуре, најчешће за оментум, успостављајући циркулаторну

комуникацију са њговим крвним судовима. У субсерозним миомима, обично је више заступљена везивноткивна компонента, у односу на глаткомишићну. Субмукозни миоми су локализовани испод слузнице, својим растом се померају према материчној дупљи, притискају и истежу ендометријумизазивајући његову атрофију и некрозу. Контракцијама мишићног слоја, субмукозни миоми често добијају полипоидну форму, а уколико дође до компромитовања циркулације у петелци и некрозе тумора, може бити избачен кроз цервикални канал у вагину што се клинички описује као „рађање миома“ (*myoma nascens*).

Миоми се макроскопски најчешће презентују као округласте формације са сопственом псеудокапсулом, чврсте конзистенције, на пресеку седефасто-беличасте боје и луковичасто-вртложасте грађе. Варирају по броју и величини. Могу бити микроскопских димензија или тежити више килограма, некад достижући дијаметар од двадесет и више центриметра када испуњавају скоро целу трбушну дупљу. Најчешће су у виду мултиплих тумора, ређе појединачних. Углавном су јасно одвојени од околног ткива сопственом везивном псеудокапсулом, која код миома мањих димензија није присутна због изостанка компресије везивних ћелија и влакана на периферији тумора.

1.5.Утицај естрогена и прогестерона на раст миома

Естрогени су стероидни хормони који посредством естрогених 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 α -естрадиол (E2), а постоје још и естриол (E3) и естрон (E1), који су лиганди са високим афинитетом за естрогене рецепторе, али делују као слабији агонисти. Хормони лако пролазе кроз ћелијску мембрану, у циљним ткивима се везују за интрануклеарне протеине назване рецепторима за естрогене (10, 11).

Подаци из литературе указују да естроген представља главни промотер 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 хипоестрогенемијом 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 поузданих 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. Такође и сва друга патолошка стања која су повезана са пролонгираним дејством естрогена, узрокују пролиферацију ћелија миома и њихову експанзију (12).

Смањена изложеност естрогенима делује протективно, као што је то случај код пушача, жена које вежбају, вишероткиња и тд. (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).

1.6. 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- β). 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 протеин-киназног 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- β се синтетише и ослобађа у биолошки неактивном облику, те се посредством протеолитичких ензима из лизозома и плазмина активира како би стекао способност везивања за TGF- β рецепторе. У зависности од типа ћелије, TGF- β 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- β (TGF- β PI, II и III) припадају трансмембранским гликопротеинским рецепторима и имају различит афинитет за сам молекул TGF- β . Интересантно је да је експресија рецептора TGF- β 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- β у ћелијама миома (18, 19).

Показало се да експресија рецептора за прогестерон повећава митотску активност у лејомиому утеруса. Прогестеронски рецептор (PR) се експримира у две изоформе, PRA и PRB, и постоје разлике у експресији рецептора за прогестерон у лејомиома утеруса и

нормалном миометријуму. Висок степен експресије рецептора за прогестерон 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 и доказана повећана експресија рецептора за прогестерон у лејомиомима у поређењу са хистолошки нормалним миометријумом код исте пацијенткиње. Како је Е2 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 узорака 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 апоптотски ген, мутиран и трансформисан у онкоген кодира синтезу онкопротеина који има способност да блокира апоптотску ћелијску смрт. Повећана експресија Bcl-2 протеина у лејомиомским ћелијама култивисаним *in vitro* може инхибирати нормалан процес апоптотске, програмиране смрти ћелије, 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 рецептора за прогестерон 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).

1.7. Биолошка улога и структура рецептора за естрогене и прогестерон

Биолошка активност естрогена се остварује везивањем за један од два специфична рецептора ER α или ER β , који припадају суперфамилији једарних рецептора (11, 26). Везивањем лиганда за ER долази до конформацијске промене рецепторског молекула што води до димеризације, интеракције протеин-ДНК, покретања фактора транскрипције и коначно формирања преиницијационог комплекса (11).

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

ER α и ER β 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 β од ER α (28). Синтетски антагонисти естрогена: тамоксифен и ралоксифен су парцијални агонисти за ER α , али делују и као чисти антагонисти за ER β . Структурна разлика NH₂-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 α и ER β се огледа у директној репресији ER β неких ER α условљених ефеката укључујући редукцију масти и ћелијску пролиферацију у утерусу. Естрадиол дејством на ER α стимулише транскрипцију и ћелијску пролиферацију, док дејством на ER β кочи активност ER α 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 α /ER α ; ER β /ER β) или хетеродимере (ER α /ER β), 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 α и смањује број ER β .

Највећа експресија ER β 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 β 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 рецептора за прогестерон у поређењу са здравим миометријумом. Две главне изоформе рецептора за прогестерон могу се наћи у материци на приближно еквивалентним нивоима: PR-B је у пуној дужини, док је PR-A скраћен, PR-A и PR-B се транскрибују са истог геномског локуса помоћу два различита промотора, што резултира стварањем 114-kDa PR-B и 94-kDa PR-A тешких протеина. Ове две изоформе су независно регулисане и изазивају различите ефекте. Након остваривања везе прогестерона са рецепторима за прогестерон,

димери се транслоцирају у нуклеус, везују за ДНК, регрутују кофакторе и индукују експресију Vcl-2 у геномском сигналном путу. Након везивања лиганда, PR-A и PR-B добијају способност да модулирају низводно различите скупове циљних гена, што указује да је ефекат прогестерона посредован комбинованим деловањем обе изоформе рецептора за прогестерон. Релативна заступљеност PR-A и PR-B 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. Рецептори за прогестерон су присутни у централном нервном систему, јајницима, млечној жлезди и женском репродуктивном тракту, укључујући вагину, грлић материце, јајоводе, ендометријум и миометријум материце. Експресија рецептора за прогестерон је важна за сексуално понашање жене, овулацију, успостављање и одржавање трудноће, као и развој млечних жлезда (32, 33).

1.8.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.

Различите биолошки активне супстанце имају улогу у ангиогенези, а 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 естрогенима. Породица VEGF протеина обухвата VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и фактор раста плаценте (енг. *Placental Growth Factor* - PlGF).

VEGF породица рецептора обухвата трансмембранске гликопротеине који се

састоје од три домена: екстрацелуларног, трансмембранског и интрацелуларно-цитоплазматског, који показују активност тирозин киназе. Породица VEGF мембранских рецептора укључује већи број чланова, од којих у онкогенези најзначајнију улогу играју VEGF-R1, VEGF-R2 и VEGF-R3.

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.

VEGF и његови рецептори играју значајну улогу у малигном потенцијалу бројних неоплазми, међутим, њихова улога у онкогенези и пролиферацији 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 репродуктивном периоду жене, у одсуству трудноће, пад секреције прогестерона изазива менструацију. Разлози зашто смањени ниво прогестерона изазива менструацију укључују повећање експресије ткивног фактора (примарног иницијатора коагулације) 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, као и повећану производњу ангиогених фактора VEGF и ангиопоетин-2 (Ang-2). Са друге стране, континуирано, дуго лечење контрацептивним средствима која садрже само прогестин индукује неконтролисану ангиогенезу која подразумева стварање бројних крвних судова фрагилних зидова и последичног обилног и ирегуларног 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.

Ангиогенеза 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 гуштину миометријума или повећану експресију VEGF-A или FGF, могу бити предиспониране за развој лејомиома. Висок ниво експресије VEGF у лејомиомима представља потенцијалну терапијску мету, која би се у персонализованом третману миома циљала антителима специфичним за VEGF. Доказано је да блокирање VEGF сигнализације доводи до апоптозе ендотелних ћелија и смањења величине тумора.

VEGF-R1 се налази на мембрани ендотелних ћелија, моноцита, макрофага и неопластичних ћелија солидних тумора. Његовом активацијом долази до стимулације пролиферације, миграције и повећања инвазивног потенцијала туморских ћелија. Постојање значајно веће експресије овог рецептора код миома већих димензија у односу на оне мање величине, указује на његову значајну улогу у расту и прогресији ових тумора.

VEGF-R2 је главни рецептор преко кога VEGF-A оставрује своје ефекте – митогени и ангиогени ефекат, доводећи до повећане пермеабилности зидова крвних судова. Са друге стране, VEGF-R1 показује и инхибиторни и стимулативни ефекат према ангиогенези. Тако да је могуће, да повећање масе и величине самог миома није повезано са бољом васкуларизацијом, већ је вероватно да при вишем нивоу VEGF-A, крвни судови у миому показују изразит пораст пермеабилности, што побољшава исхрану миома појачаном дифузијом. Сумирано, подаци из литературе указују да VEGF-R1 и VEGF-R2 имају различите улоге у процесу физиолошке и патолошке ангиогенезе (35).

Улипристал-ацетат (чист антагонист прогестерона из групе селективних модулятора прогестеронских рецептора) инхибира пролиферацију култивисаних лејомиомских ћелија индукцијом апоптозе што се рефлектује повећаном експресијом Caspase-3 и poly(ADP-ribose)-polymerase (PARP), смањеном експресијом Bcl-2 протеина и нуклеарног антигена ћелијске пролиферације (енг. *proliferating cell nuclear antigen* – PCNA). Доказано је да улипристал ацетат нарушава комплекс VEGF/VEGF рецептор и адренотуморин (АДМ) / АДМ-рецепторске системе у култивисаним лејомиомским

ћелијама, те се сматра да је спречавање крварења код жена са лејомиомом, посредовано механизмима који укључују и ангиогенезу (36).

1.9. 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 потичу из *in situ* ароматизације у патолошки измењеном ткиву ендометријума и миометријума, те делују локално као митогени фактор форсирајући раст тумора независно од концентрације естрогена у серуму. Ћелије лејомиома поседују сопствену ароматазу која катализује конверзију андрогена у естроген и аутокриним ефектом промовишу сопствени раст. Применом агониста гонадотропин-ослобађајућег хормона (GnRH – *gonadotropin releasing hormone*), инхибира се активност ароматазе чиме се смањује стварање естрогена у глаткомишићним ћелијама лејомиома.

У материци са већим бројем миома нађен је различит ниво експресије ароматазе mRNA која је у позитивној корелацији са величином тумора. У ћелијама миома конверзија естрогена у естрадиол је троструко интензивнија него у околном миометријуму, што одговара вишој експресији mRNA за 17 β -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 у јајницима и 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 напредовањем менопаузе.

Механизам помоћу кога 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, првенствено сигналних путева који иду преко фактора раста и њихових рецептора. Ангажовање MAPK сигналног пута је неопходно за потпуну активацију mRNA за ароматазу. Ниво индукције MAPK сигналног пута је доказано већи у ткиву миома него у миометријуму, вероватно због присуства обилнијег екстрацелуларног матрикса. Може се рећи, да повећање активности MAPK сигнализације учествује у експресији ароматазе у глаткомишићним туморима утеруса (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 α и β ($ER\alpha$ 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. Упоредити односе пролиферативног и апоптотског индекса са експресијом стероидних рецептора
5. Упоредити односе експресије VEGF-а и микроваскуларне густине са експресијом стероидних рецептора
6. Утврдити могућу везу између експресије стероидних рецептора, ангиогенезе, апоптозе и пролиферације са менструалним статусом и фазом менструалног циклуса
7. 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 пацијенткиња 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 ± 5.02 година старости), а другу групу чиниле су жене у постменопаузи ($n = 41$; 60.25 ± 5.41 година старости).

Клинички подаци су прикупљени увидом у историју болести оперисаних 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.

3.1. Стандардни хематоксилин-еозин метод бојења

Узорци ткива припремљени из оперативног материјала су фиксирани у формалину, укалупљени у парафин, а ткивни пресеци од 5 μ су обојени стандардном, хематоксилин-еозином [H&E] методом бојења. За даљу, имунохистохемијску анализу су издвојени репрезентативни узорци миома и мишићног омотача зида материце (38).

3.2.Имунохистохемијски метод

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 *ER α* , Ab11 (mouse: 1:500, MS-354-R7, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), *ER β* 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 *caspase-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 увећањем $\times 200$.

3.3.Експресија рецептора за естрогене, прогестерон, VEGF, Ki-67 и caspase-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

≥ 3 сматране позитивним. Експресија VEGF, Ki-67 и *caspase* -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%).

3.4. Експресија ендоглина (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 увећању (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 увећању (x200), што подразумева површину од 0,739 mm². 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.

3.5. 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 испитаница били су: повезане малигне болести јајника и грлића материце, непотпуни клинички подаци о менструалном статусу, употреба оралних контрацептива и други облици хормонске терапије.

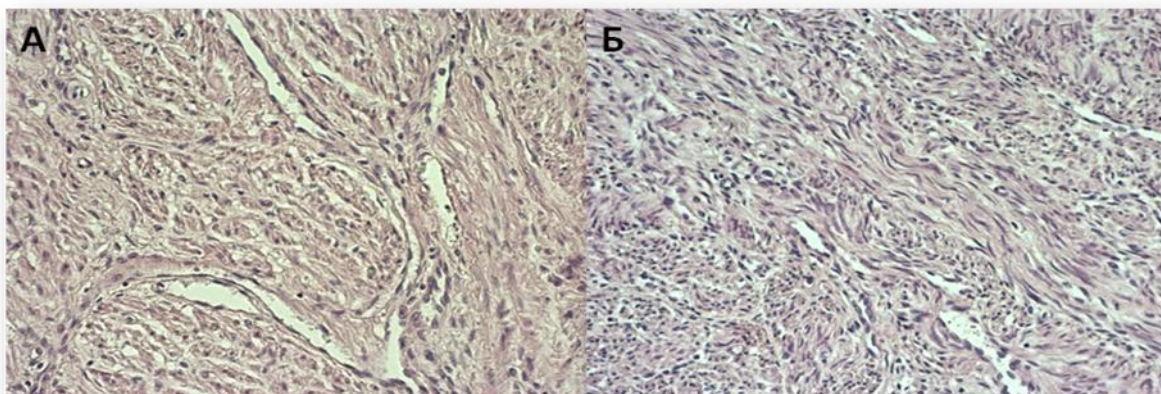
3.6. Статистичка анализа

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 варијабли варијабилних популација. Зависност две дескриптивне варијабле спроведена је помоћу χ -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 мултиваријанте бинарне логистичке регресије.

4. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

4.1. Хематоксилин-еозин бојење миома и миометријума

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)

4.2. Експресија свих испитиваних параметара у миомима и миометријуму пре и постменопаузних жена

Експресија ER α и ER β у миому и миометријуму пре и постменопаузних жена

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

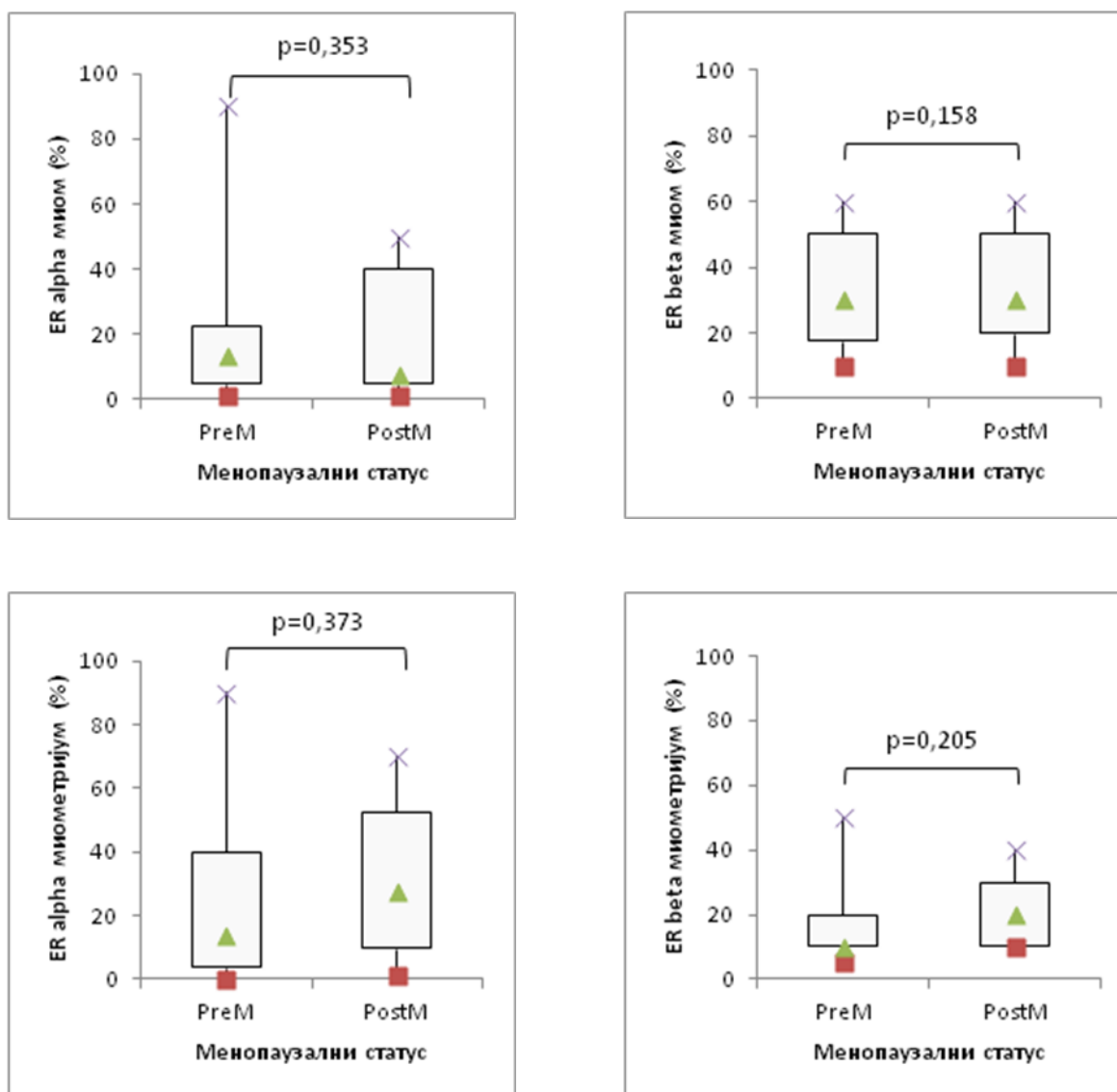


График 1. Експресија ER α и ER β у миому и миометријуму пре и постменопаузних жена, $p < 0.05$

Експресија PR 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).

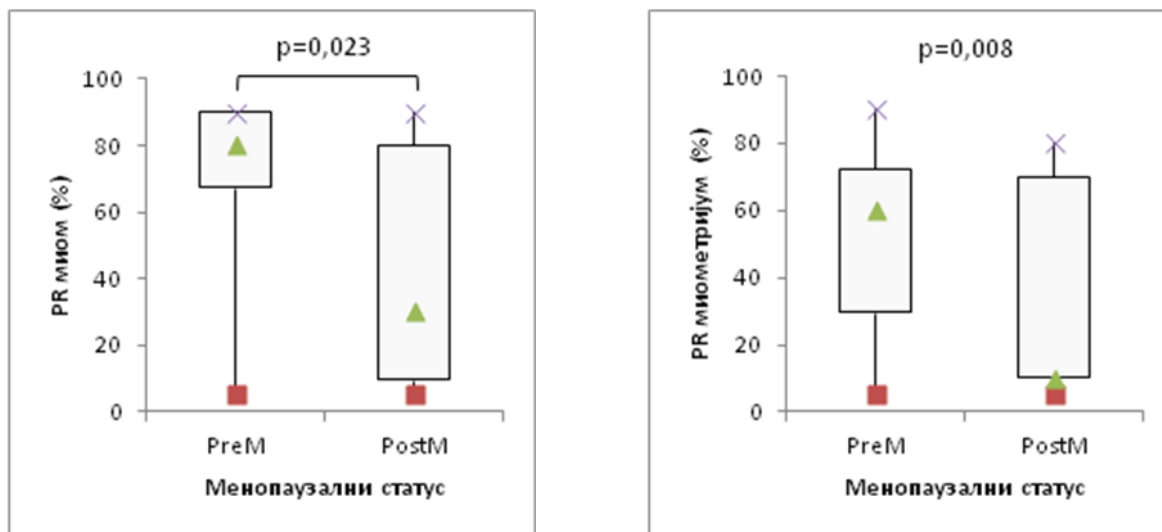


График 2. Експресија прогестеронског рецептора у миому и миометријуму пре и постменопаузних жена, $p < 0.05$

Експресија VEGF у миому и миометријуму пре и постменопаузних жена

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

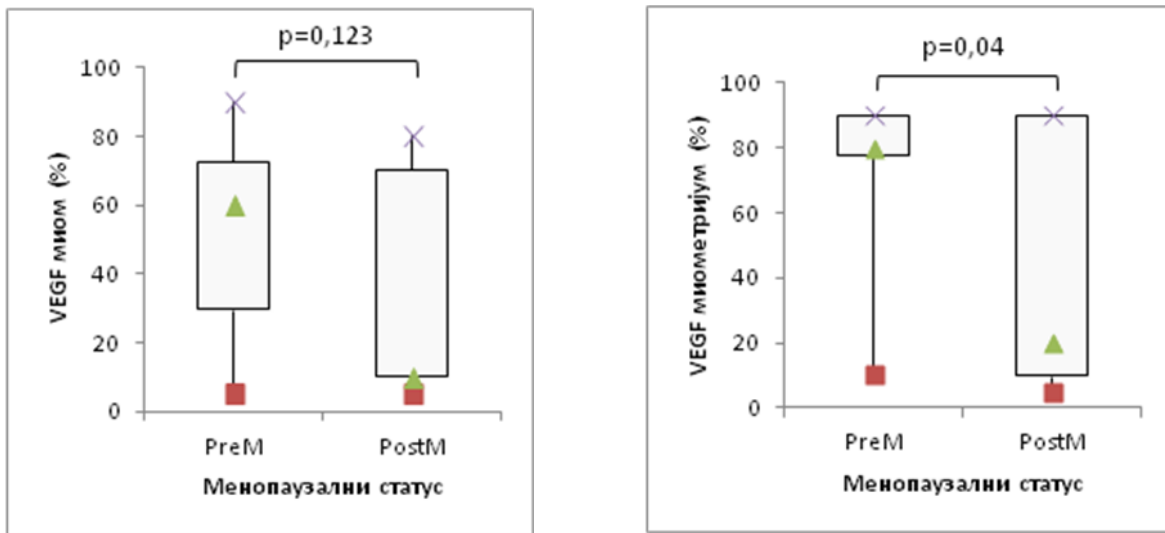


График 3. Експресија VEGF у миому и миометријуму пре и постменопаузних жена, $p < 0.05$

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).

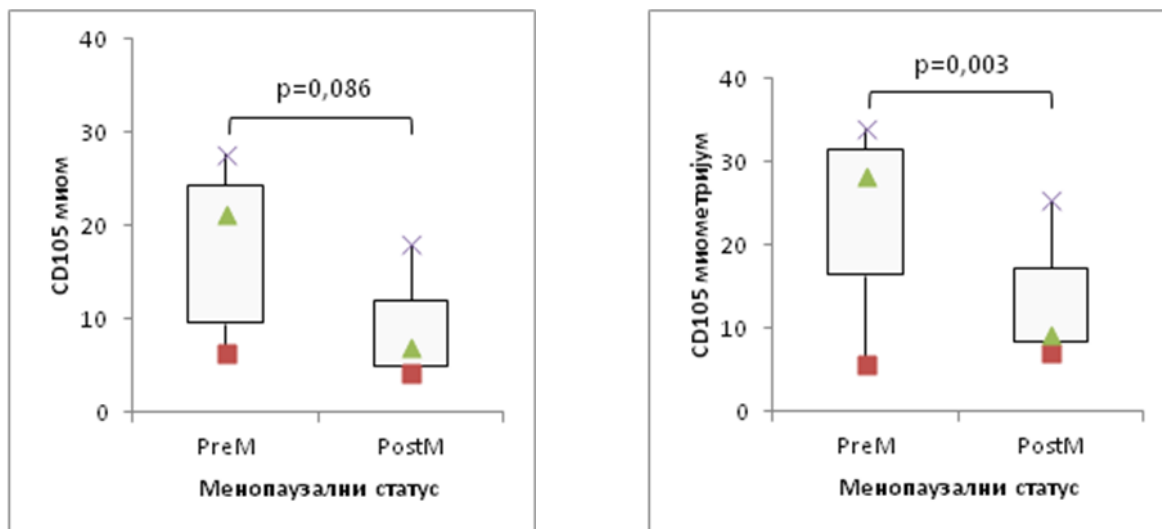


График 4. Експресија CD105 у миому и миометријуму пре и постменопаузних жена, $p < 0.05$

Експресија Ki-67 у миому пре и постменопаузних жена

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

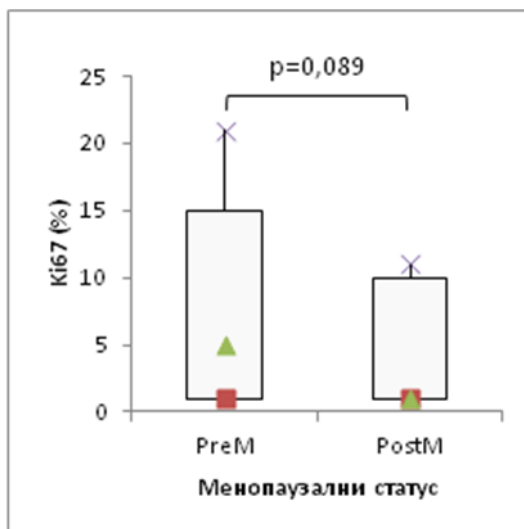


График 5. Експресија Ki-67 у миому пре и постменопаузних жена, $p < 0.05$

Експресија caspase-3 у миому пре и постменопаузних жена

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

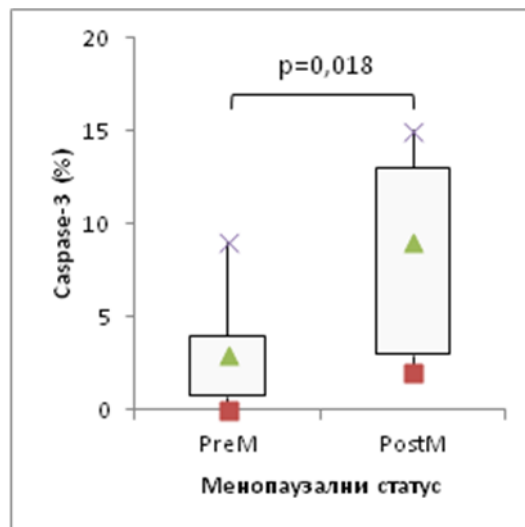
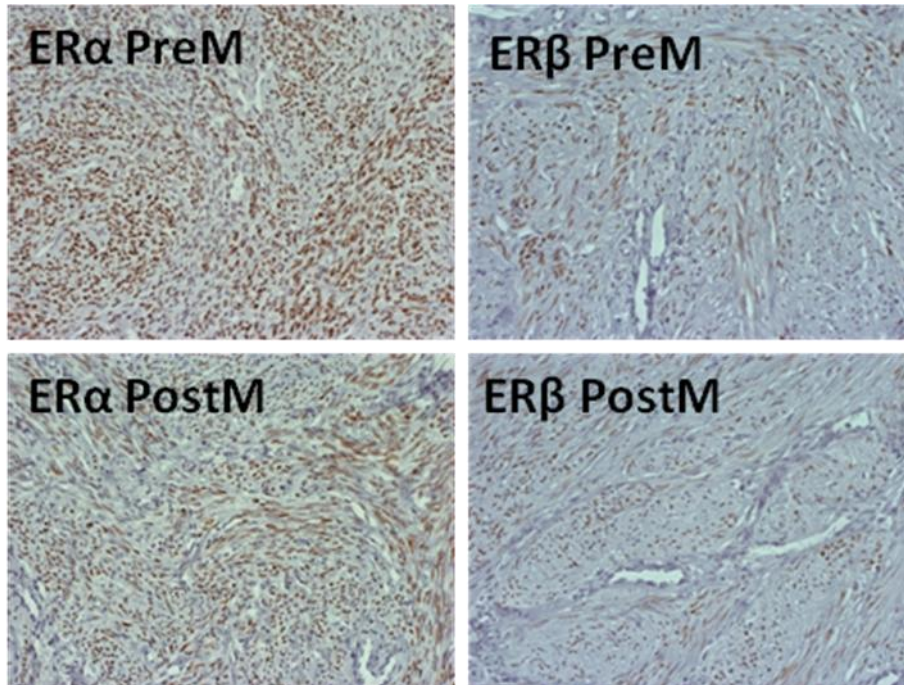


График 6. Експресија caspase-3 у миому пре и постменопаузних жена, $p < 0.05$

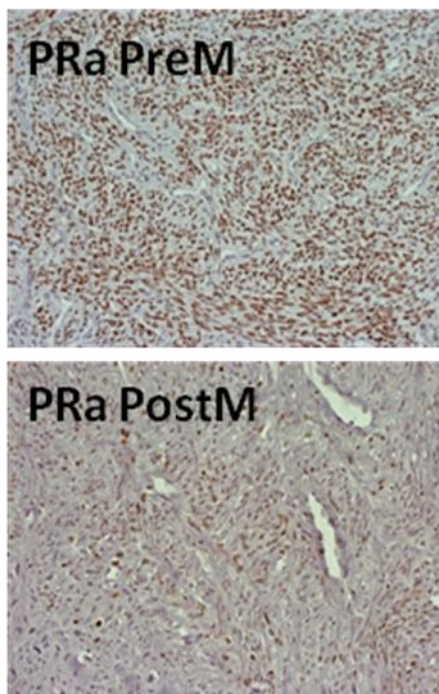
4.3. Експресија свих испитиваних параметара у миомима пре и постменопаузних жена – репрезентативне слике

Експресија ER α и ER β у миому пре и постменопаузних жена



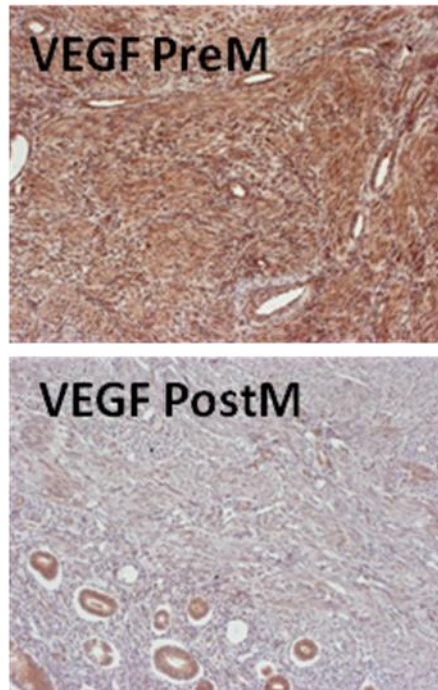
Слика 2. Репрезентативне слике експресија ER α и ER β у миому пре и постменопаузних жена (x200)

Експресија рецептора за прогестерон у миому пре и постменопаузних жена



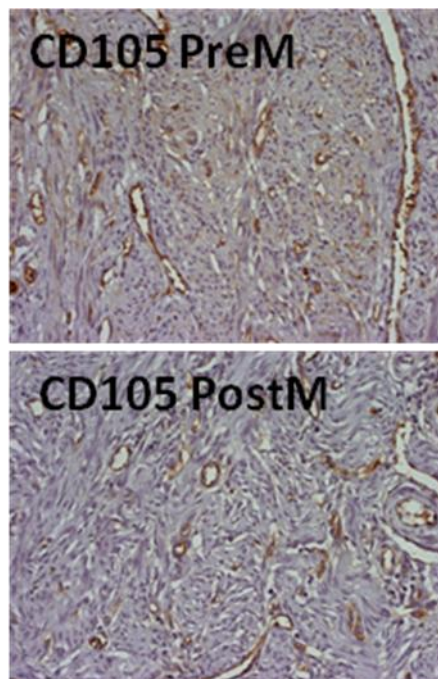
Слика 3. Репрезентативне слике експресије рецептора за прогестерон у миому пре и постменопаузних жена (x200)

Експресија VEGF у миому пре и постменопаузних жена



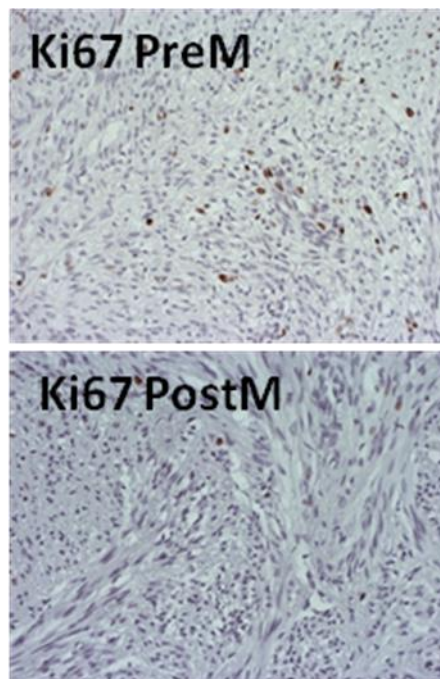
Слика 4. Фотографија експресије VEGF у миому пре и постменопаузних жена (x200)

Експресија CD105 у миому пре и постменопаузних жена



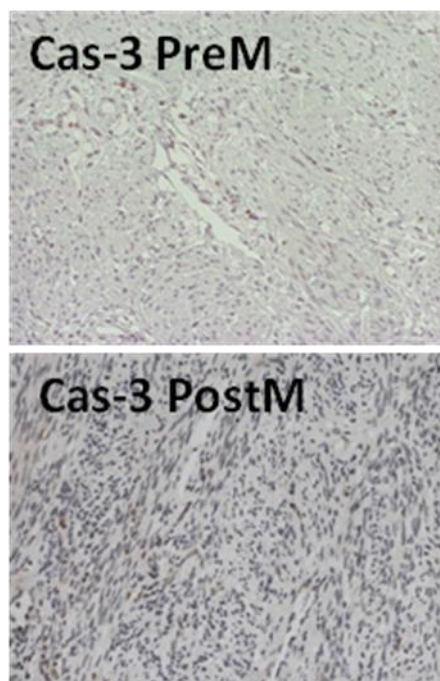
Слика 5. Репрезентативне слике експресија CD105 у миому пре и постменопаузних жена (x200)

Експресија Ki-67 у миому пре и постменопаузних жена



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

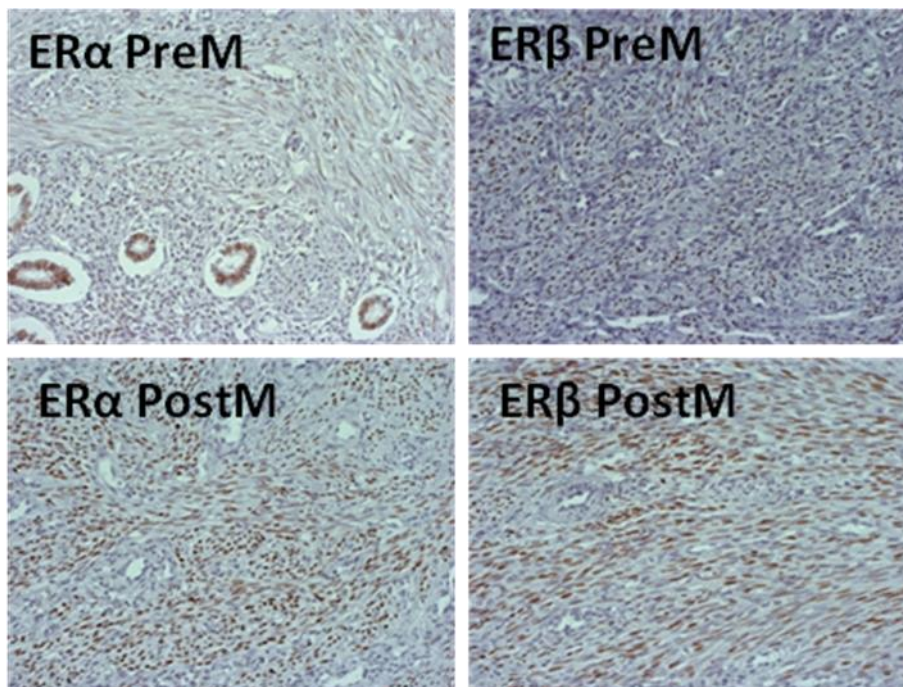
Експресија caspase-3 у миому пре и постменопаузних жена



Слика 7. Репрезентативне слике експресија caspase-3 у миомима пре и постменопаузних жена (x200)

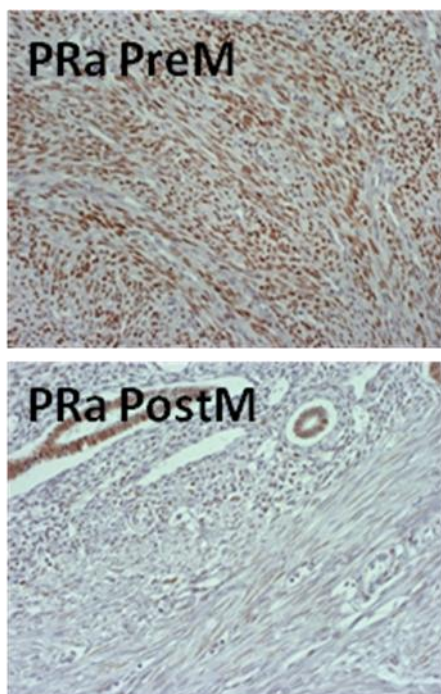
4.4. Експресија свих испитиваних параметара у миометријуму пре и постменопаузних жена

Експресија ER α и ER β у миометријуму пре и постменопаузних жена



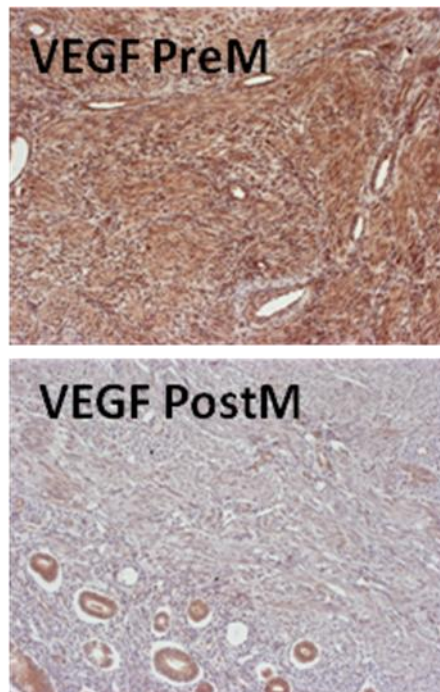
Слика 8. Репрезентативне слике експресија ER α и ER β у миометријуму пре и постменопаузних жена (x200)

Експресија рецептора за прогестерон у миометријуму пре и постменопаузних жена



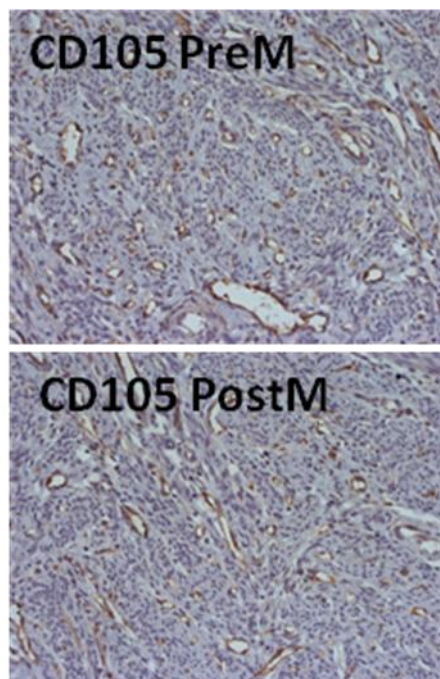
Слика 9. Репрезентативне слике експресије рецептора за прогестерон у миометријуму пре и постменопаузних жена (x200)

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)

4.5. Корелација експресије свих испитиваних параметара у миомима пре и постменопаузних жена

Корелација између експресије рецептора за естрогене и прогестерон у миомима пре и постменопаузних жена

Није постојала значајна корелација између експресије испитиваних параметара у миомима, без обзира на менопаузни статус испитаница (График 7).

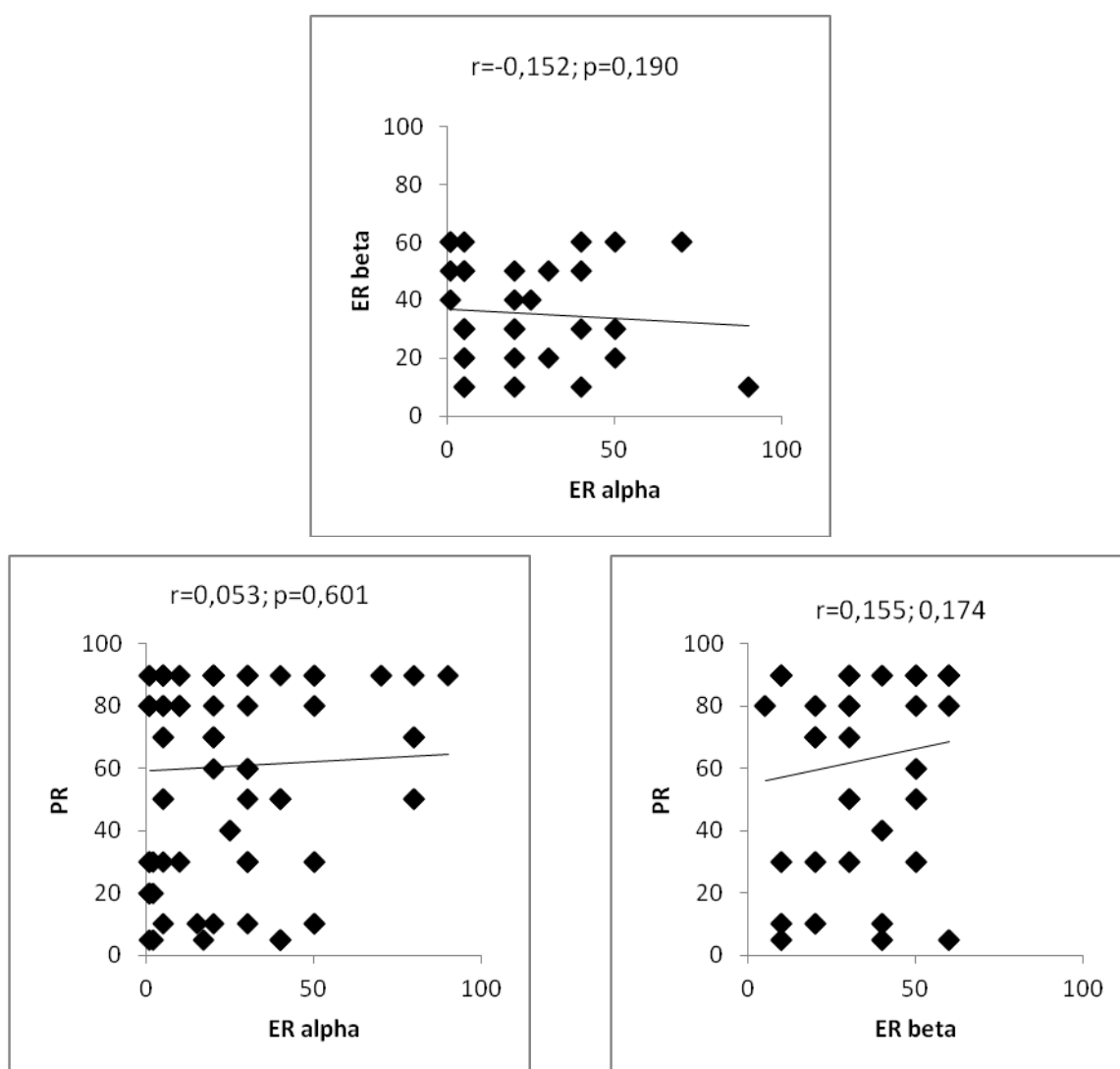


График 7. Корелација између рецептора за естрогене и прогестерон у миомима пре и постменопаузних жена, $p < 0.05$

Корелација између експресије VEGF и експресије рецептора за естрогене и прогестерон у миомима пре и постменопаузних жена

Експресија VEGF у миомима није била у статистички значајној корелацији са експресијом ER α и ER β . Јака корелација је присутна између експресије VEGF и експресије рецептора за прогестерон (График 8).

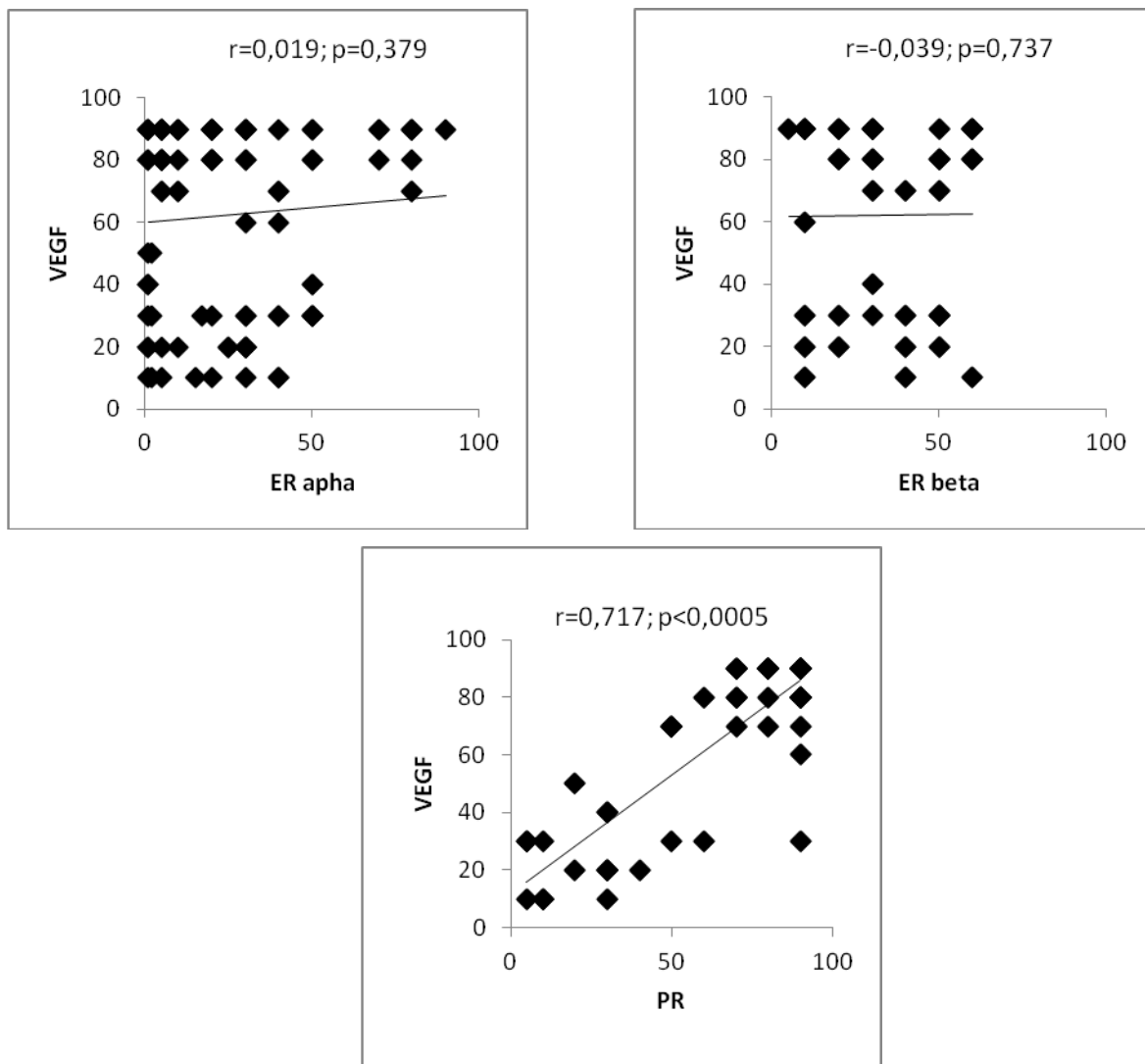


График 8. Корелација између експресије VEGF и експресије рецептора за естрогене и прогестерон у миомима пре и постменопаузних жена, $p<0.05$

Корелација између експресије CD105 и експресије рецептора за естрогене и прогестерон у миомима пре и постменопаузних жена

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

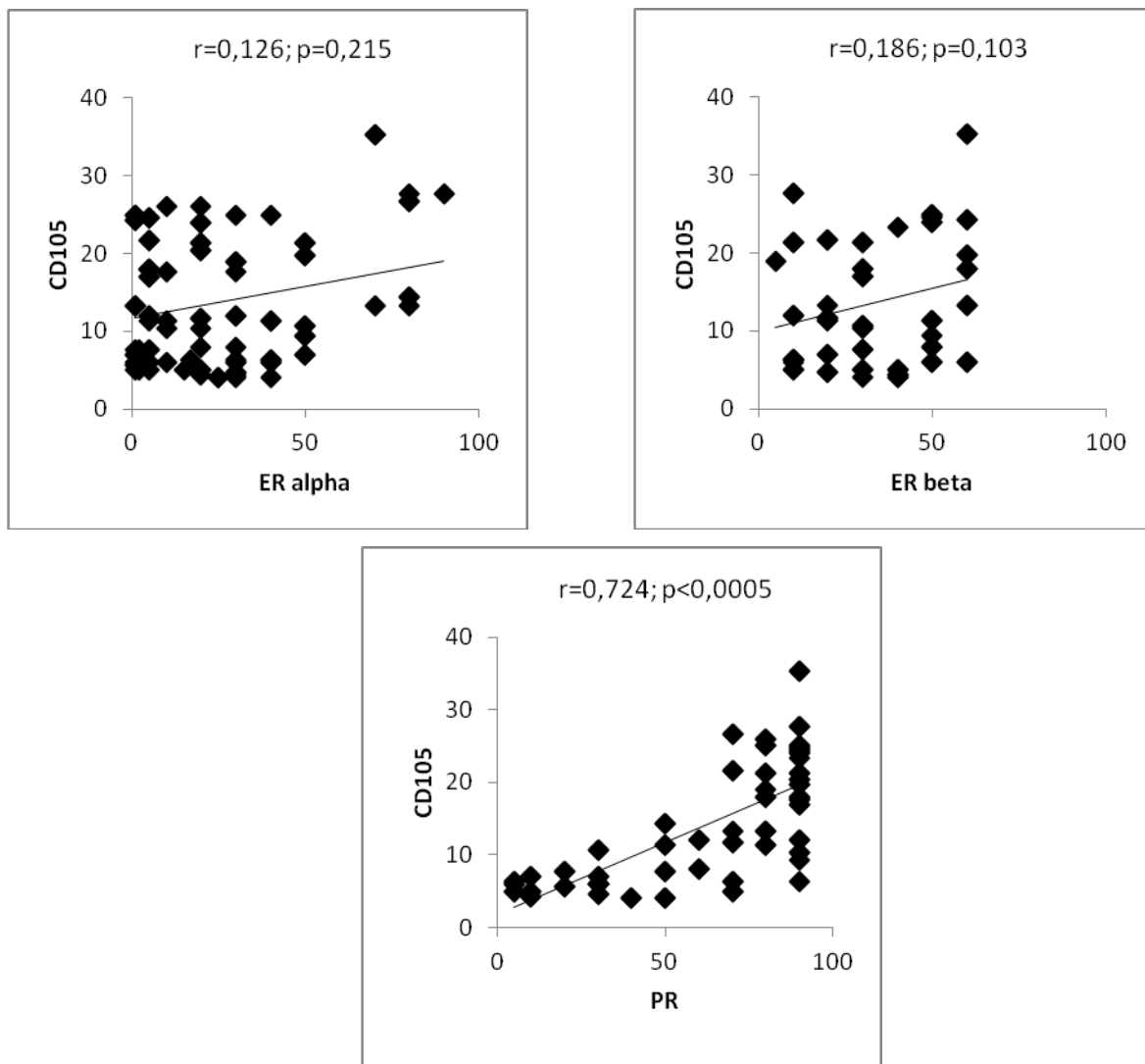


График 9. Корелација између експресије CD105 и експресије рецептора за естрогене и прогестерон у миомима пре и постменопаузних жена, $p<0.05$

Корелација између експресије Ki-67 и експресије рецептора за естрогене и прогестерон у миомима пре и постменопаузних жена

Експресија Ki-67 није била у корелацији са експресијом рецептора за естроген алфа, међутим показала се статистички значајна корелација како са експресијом рецептора за естроген бета тако и са експресијом рецептора за прогестерон (График 10).

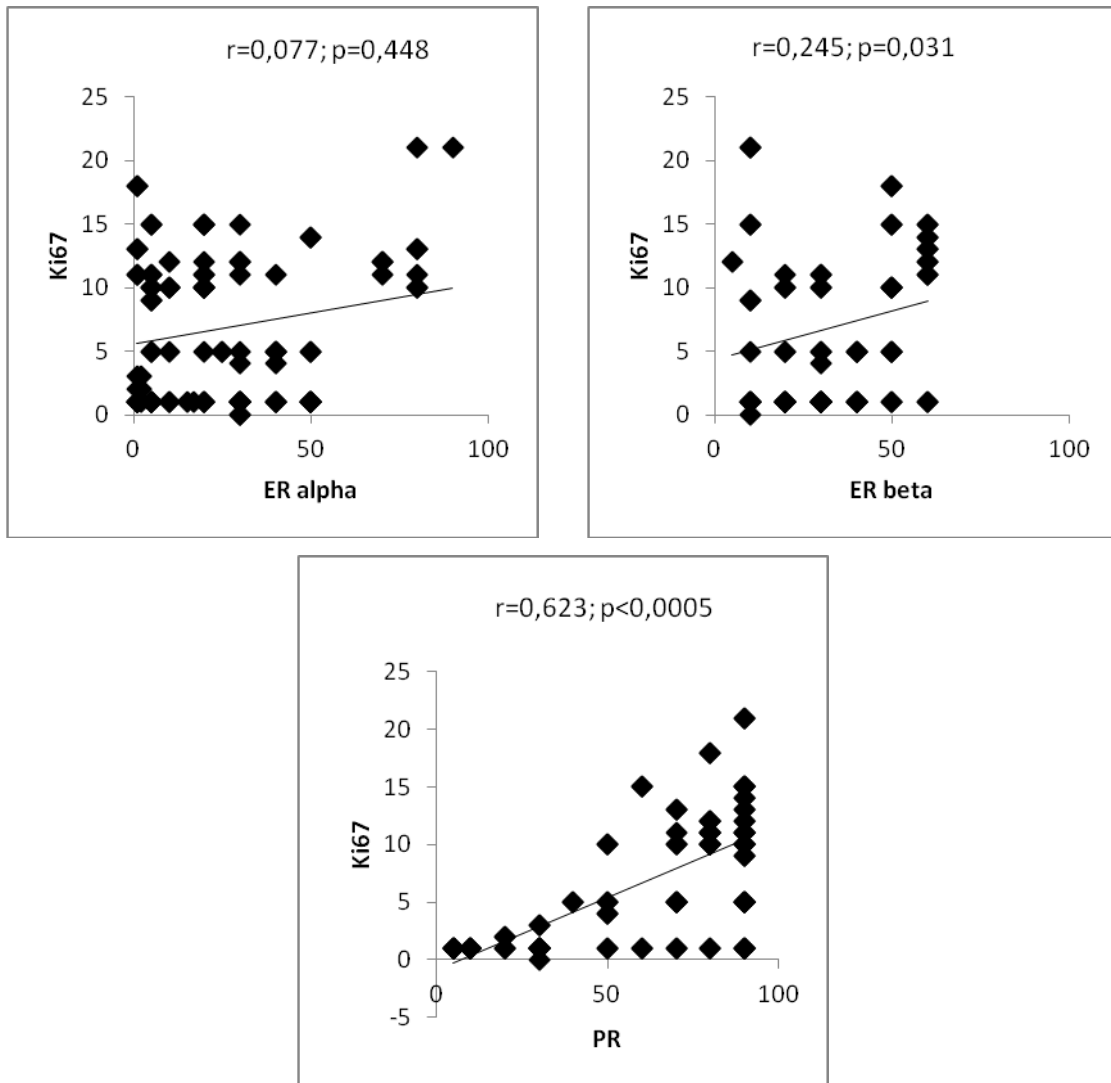


График 10. Корелација између експресије Ki-67 и експресије рецептора за естрогене и прогестерон у миомима пре и постменопаузних жена, $p<0.05$

Корелација између експресије caspase-3 и експресије рецептора за естрогене и прогестерон у миомима пре и постменопаузних жена

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

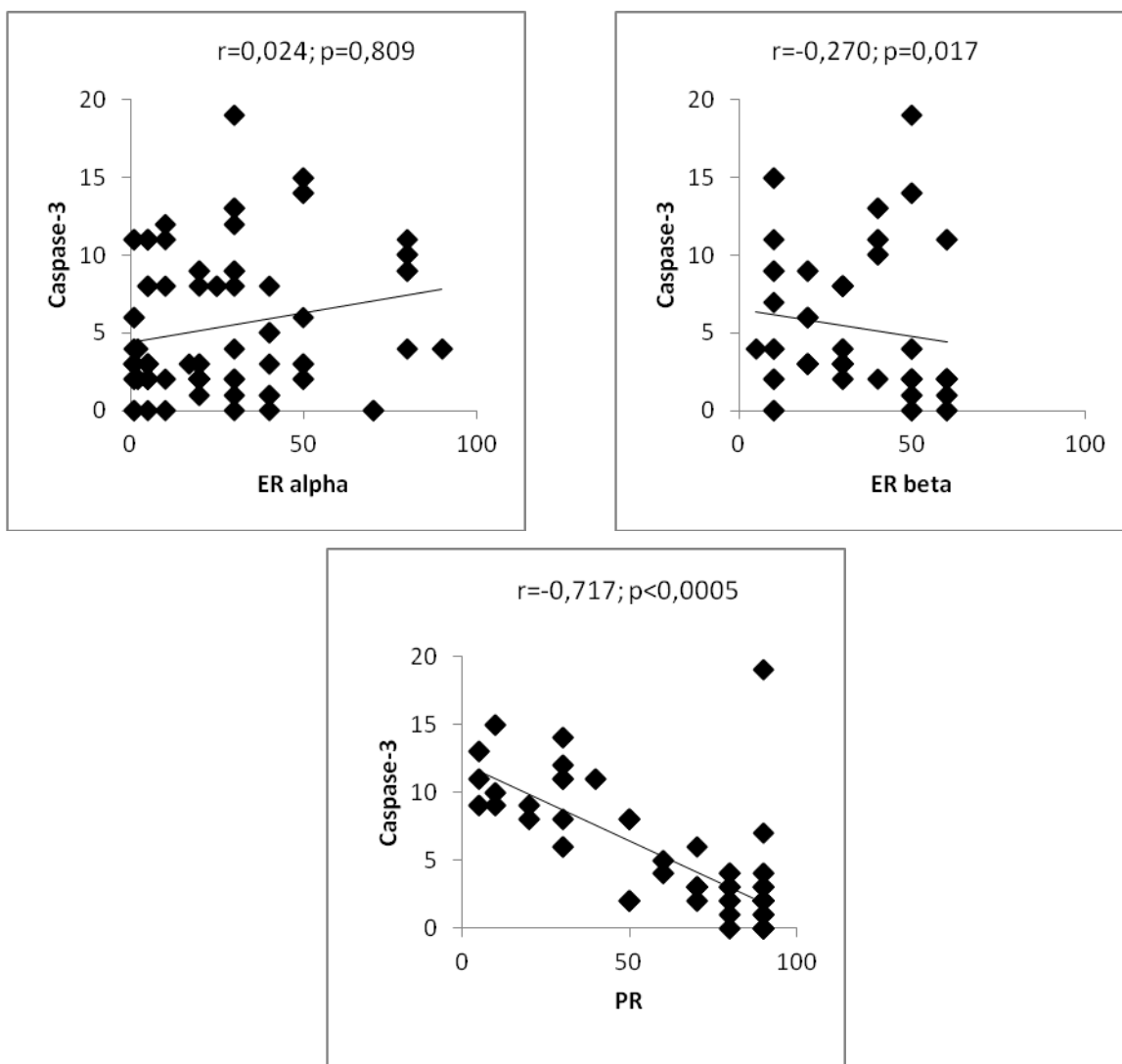


График 11. Корелација између експресије caspase-3 и експресије рецептора за естрогене и прогестерон у миомима пре и постменопаузних жена, $p<0.05$

4.6. Корелација експресије свих испитиваних параметара у миометријуму пре и постменопаузних жена

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

Корелација између експресије рецептора за прогестерон и експресије рецептора за естрогене у миометријуму свих испитаница није била статистички значајна, с друге стране експресија ER α и ER β су биле у високо статистички значајној корелацији (График 12).

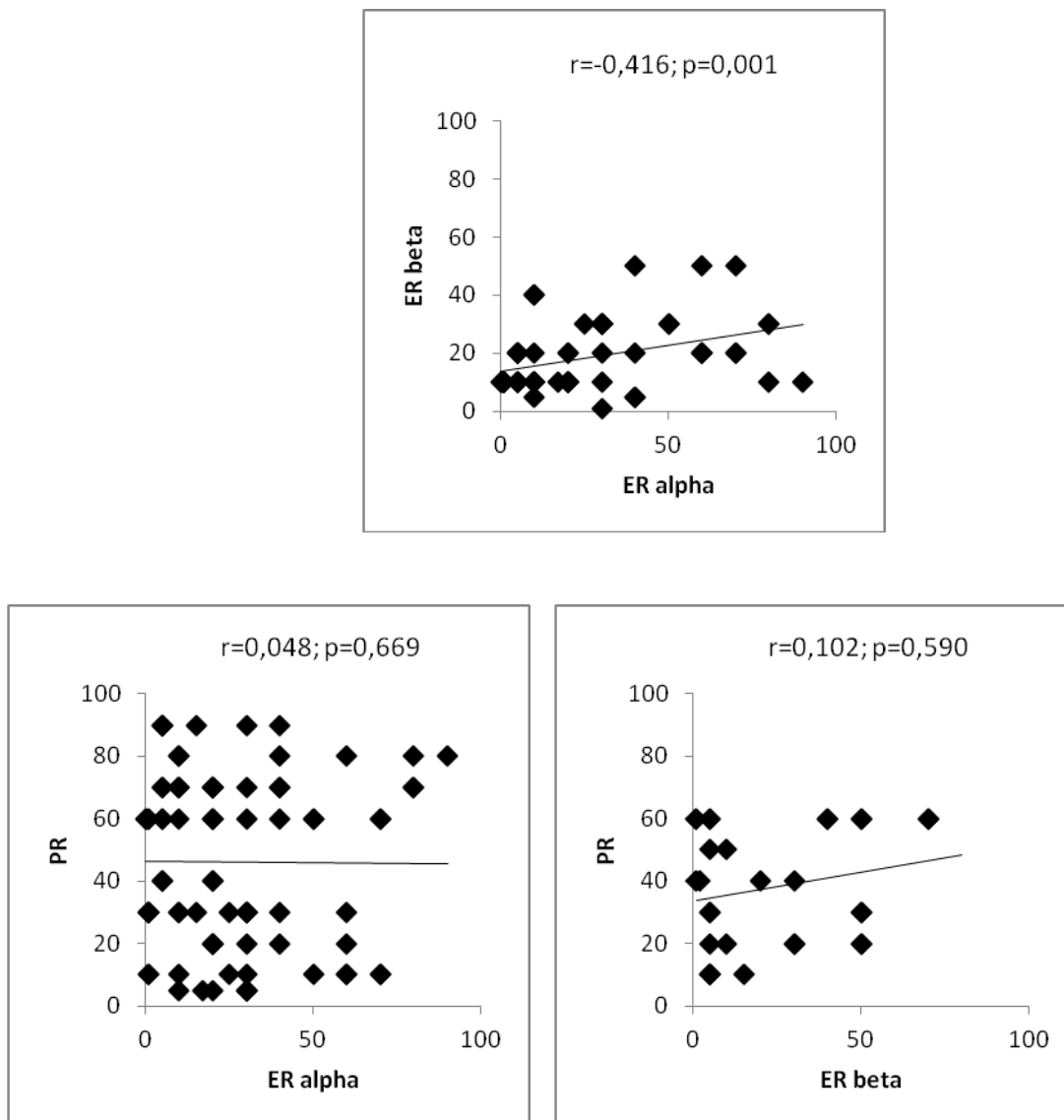


График 12. Корелација између експресије рецептора за естрогене и прогестерон у миометријуму пре и постменопаузних жена, $p < 0.05$

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

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

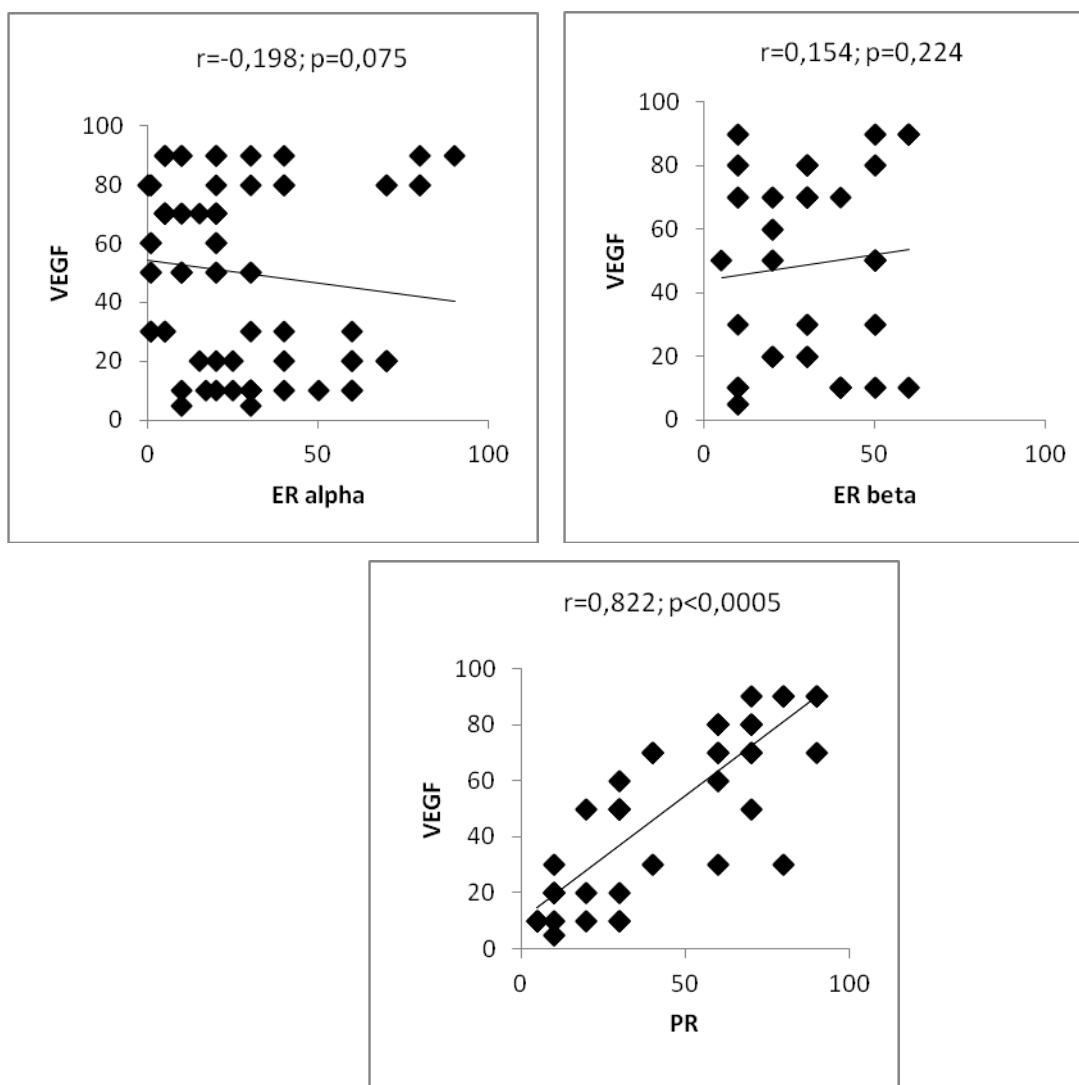


График 13. Корелација између VEGF и рецептора за естроген и прогестерон у миометријуму пре и постменопаузних жена, $p < 0.05$

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

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

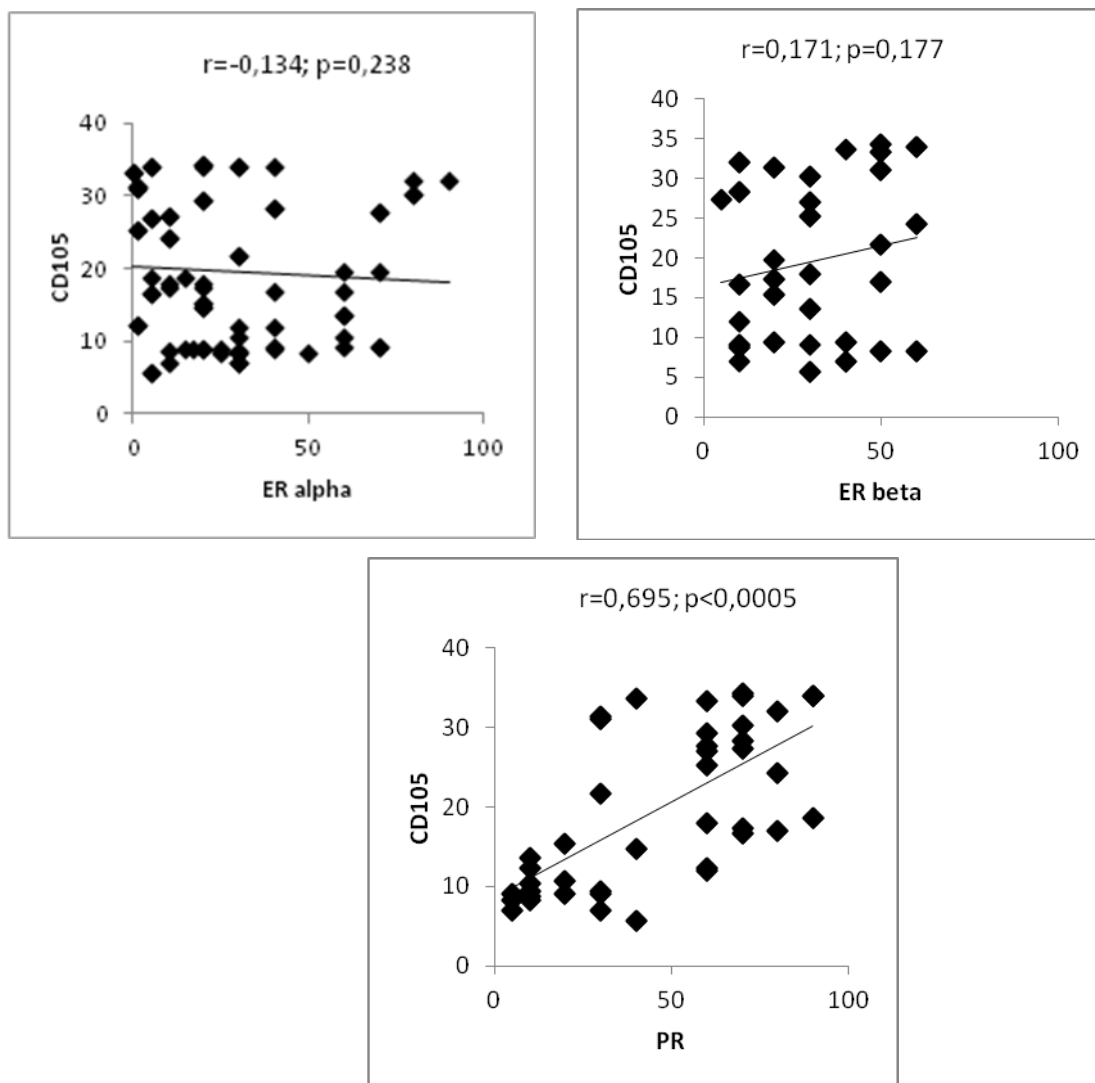


График 14. Корелација између CD105 и експресије рецептора за естрогене и прогестерон у миометријуму пре и постменопаузних жена, $p < 0.05$

5. ДИСКУСИЈА

Лејомиом материце је најчешћи бенигни тумор гениталног тракта, порекла глаткомишићних ћелија, још увек недовољно познате етиологије и патогенезе. Настанак лејомиома материце током репродуктивног периода и регресија након менопаузе указују да хормонски статус игра централну улогу у развоју ових тумора (41, 42). У последњој деценији посебна пажња је посвећена улози естрогена и прогестерона у патогенези лејомиома. Лејомиоми материце се сматрају естроген зависним туморима, што је подржала и чињеница да континуирано лечење хормонима који ослобађају гонадотропин (GRH) значајно смањује величину тумора преко блокаде производње естрогена (43). Да би постигли своје ефекте, естрогени делују везивањем и активацијом својих рецептора алфа и бета ($ER\alpha$ и $ER\beta$). Молекули оба ова рецептора показују очуване секвенце лиганд-везујућег домена, њихову синтезу кодирају два различита гена који имају различите домене транскрипционе активације као и различиту дистрибуцију у ткивима (43).

Слично, као што је то случај и са рецепторима за естрогене, веома мало се зна о специфичним улогама и интеракцијама рецептора за прогестерон у миомима. Подаци из литературе указују да прогестерон и рецептори за прогестерон А и В играју значајну улогу у експанзији миома утеруса и да су од суштинског значаја за пролиферацију ћелија миома (44). У последњих неколико година улога прогестерона у патогенези миома утеруса постала је све израженија. Као и у случају рецептора за естрогене, нуклеарно локализовани рецептори за прогестерон функционишу као транскрипциони фактори активирани лигандом, са две изоформе код људи: PRA и PRB (43).

Поред чињенице да је доминација пролиферације у односу на апоптозу 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 за естрогене и прогестерон на ангиогенезу, пролиферацију и апоптозу ћелија миома код жена у пременопаузи и постменопаузи.

Резултати нашег истраживања су показали да експресија рецептора за прогестерон није у директној корелацији са експресијом α и β рецептора за естрогене, ни у миому, нити

у миометријуму пре и постменопаузних жена (График 7 и График 12). Међутим, рецептори за прогестерон су значајно више експримирани, 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 циклично повишен током репродуктивних година, да је заједно са естрогеном значајно повишен током трудноће, и да су потиснути након менопаузе, али је ипак веома тешко проценити разлике и важност утицаја естрогена од прогестерона (45, 46).

У нашој студији показали смо да експресија естрогених рецептора није била различита у миомима пременопаузних у поређењу са постменопаузним женама (График 1, Слика 2). Експресија ER α и ER β није се значајно разликовала ни у миометријуму пре и постменопаузних жена (График 1, Слика 8). Слично томе, *Sakaguchi* и сарадници показали су да координисана експресија ER α и ER β може бити неопходна за физиолошко деловање естрогена у миометрију (47, 48). Такође, показано је да је ER α фосфорилисан већом брзином на серину у лејомиому у поређењу са околним миометријом, због чега је могуће да је фосфорилизација ER α регулисана p44/42 MAPK сигналним путем и самим тим може имати улогу у развоју лејомиома утеруса (49, 50).

Пошто је већ добро познато да раст и преживљавање ћелија лејомиома зависи од ангиогенезе, до данас је такође пронађено да естрогени и прогестерон преко својих рецептора регулишу експресију неколико моћних ангиогених фактора, укључујући факторе 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, што потврђују и резултати неких студија да лејомиосаркоми материце продукују веће количине хормона раста (52). Експресија микро РНК фактора раста је регулисана и зависна од нивоа женских полних хормона, естрогени могу вршити свој митогени утицај на лејомиома преко естроген-зависних фактора раста (53, 54).

Нашом студијом смо установили да у миомима експресија VEGF није значајно различита без обзира на менопаузални статус (График 3, Слика 4). Супротно томе открили смо да је експресија VEGF у миометријуму 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 пременопаузном у поређењу са постменопаузним ендометријумом. Испитујући узорке ткива пременопаузалних жена показано је да је значајно виши ниво VEGF 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 естрогене, ни у миому ни у миометријуму (График 8, График 13). Са друге стране, опет невезано за менструални циклус, веза између експресије рецептора за прогестерон и VEGF експресије била је јасна и јака, било да се радило о корелацији експресије ова два маркера у миому или миометријуму (График 8, График 13). Наши резултати су у корелацији са студијом *Хи* и сарадника који указују да заправо прогестерон значајно утиче на ниво експресије VEGF у лејомиому материце. Међутим којим сигналним путевима и патофизиолошким процесима се ово догађа још увек није у потпуности разјашњено (57).

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

У самом миому нисмо приметили никакве разлике 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 код VEGF експресије, показали смо да експресија рецептора за прогестерон статистички значајно корелира са експресијом CD105, како у миомима тако и у анализираном миометријуму независно од менструалног статуса (График 9 и График 14). Индиректно, јасна је веза између VEGF експресије и ангиогенезе односно броја новоформираних крвних судова мерених експресијом CD105 молекула. Мања експресија рецептора за прогестерон у миометријуму постменопаузних жена

очигледно је условила и смањену експресију CD105 у истом. Са друге стране, више вредности експресије рецептора за прогестерон у миому у пременопаузној групи прате повишену CD105 експресију, али се ова корелација не испољава као статистички значајна.

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 обележава не само ћелије у деоби, већ и све оне у G1, синтетској фази ћелијског циклуса (41). Висок ниво експресије Ki-67, откривен током секреторне фазе циклуса, указује на улогу прогестерона и његових рецептора у пролиферацији ћелија ендометријума и миометријума (61).

Апоптоза је процес програмиране ћелијске смрти која елиминира дисфункционалне и непожељне ћелије. То је процес, високо регулисан комплексном интеракцијом између про и анти-апоптотичких молекула, захвата једну ћелију независно од околине, и индукована је активацијом каспаза, специфичних ендопроотеаза које уништавају структурне компоненте укључујући и генетски материјал ћелија (62).

Што се тиче смрти ћелија, ми смо процењивали експресију два маркера укључена у контролу раста леиомиома. Caspase-3, због своје специфичности и осетљивости, је поуздан белег 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 миомима не постоји статистички значајна разлика у експресији Ki-67 између испитиваних група (График 5, Слика 6). Сама корелација са експресијом стероидних рецептора се показала јаком и статистички значајном када се радило о експресији рецептора за естрогене и прогестерон (График 10). Даљом анализом експресије caspase-3, уочено је да је експресија овог маркера била значајно повишена у миомима постменопаузних у односу на пременопаузне жене (График 6, Слика 7). Слично, као што је то био случај и са експресијом Ki-67, експресија caspase-3 је показала статистички значајну корелацију са експресијом рецептора за прогестерон и само са експресијом бета рецептора за естроген (График 11). Уколико само посматрамо ситуацију у миому везану за менструални циклус, примећујемо да експресија Ki-67 није пратила

тренд нивоа експресије caspase-3. Слично томе, Plewka и сарадници показали су да апоптоза није праћена пролиферацијом, а Tinelli и сарадници да експресија Ki-67 у лејомиомима који манифестују апоптозу није детектована (41, 64).

6. ЗАКЉУЧЦИ

Иако експресија ER β има значајан ефекат на пролиферацију ћелија и апоптозу, чини се да су сви добијени подаци на страни јаснијег утицаја експресије прогестеронских рецептора на сигналне путеве. Према нашим резултатима, експресија рецептора за прогестерон је имала значајно већи утицај на ангиогенезу, апоптозу и пролиферацију ћелија миома од експресије естрогенских рецептора. Пошто је експресија рецептора за прогестерон већа у групи пременопаузних жена и у миомима и у миометријуму у односу на жене у постменопаузи, вероватно је ова експресија довела до редукције апоптозе, повећања пролиферације туморских ћелија и израженије ангиогенезе код жена у пременопаузи.

Закључак је изведен на основу следећих експерименталних доказа:

1. Експресија PR статистички значајно корелира са експресијом Ki-67 и експресијом caspase-3 у ћелијама миома код пре и постменопаузних жена
2. Експресија PR је у статистички значајној корелацији са експресијом VEGF и микроваскуларном густином мереном преко експресије CD105
3. Експресија ER β је у статистички значајној корелацији са експресијом Ki-67 и caspase-3 код жена у постменопаузи, док је утицај експресије ER α без статистичке значајности
4. Експресија caspase-3 је значајно нижа у миомима пременопаузних жена у односу на групу постменопаузних жена
5. Експресија VEGF и микроваскуларна густина мерена експресијом CD105 су биле статистички значајно веће код пременопаузних жена у односу на постменопаузне.

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.* Tinnelli, 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 β – 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 α and ER β . *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 β subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 1998;19(4):253-286.
28. Gustafsson JA. Estrogen receptor β - 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 centralkörper durch eisenhamotoxylin. Nebst einigen allgemeinen bemerkungen über die hamatoxylinfarben.2. *Wiss Mikrosk,*1896; 13:186.
39. Bancroft JD , Gamble M. *Theory and practice of histological techniques.* 5th edition. Churchill Livingstone: Edeinburgh, 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- α (ER- α) 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]

БИОГРАФИЈА

Др Душко Кљакић је рођен 17.04.1968. године у Бару, Република Црна Гора. Завршио је Гимназију “Нико Роловић” у Бару, а дипломирао на Медицинском факултету Универзитета у Београду 1993. године. Специјализацију из Гинекологије и акушерства је уписао 1995. и успешно завршио 1999. године на Медицинском факултету Универзитета у Београду са одличном оценом. Од 2004.године је запослен на Гинеколошко-акушерском одељењу Опште болнице у Бару, где ради и данас. Докторске академске студије уписао је 2008. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Похађао је већи број стручних усвашавања, а 2010. године Министарство здравља Црне Горе му додељује звање примаријуса. Ожењен је, отац двоје деце.

Др Душко Кљакић је аутор више оригиналних научних радова и први аутор у једном раду објављеном у часопису индексираном на *SCI* листи.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Kljakić D**, Raičević S, Milosavljević M, Ilić M, Živanović A, Radonjić D, Mitrović S. The influence of the expression of steroid receptors on angiogenesis, proliferation and apoptosis in myomas of pre- and postmenopausal women. *Srp Arh Celok Lek.* 2019; doi: 10.2298/SARH181030023M.
2. Mitrovic SLj, Arsenijevic PS, **Kljakic D**, Djuric JM, Milosavljevic MZ, Protrka ZM, Vojinovic RH. Gestational choriocarcinoma of the cervix. *Arch Iran Med.* 2014;17(11):783-5.
3. Iovic J, **Kljakic D**, Raicevic S. Abdominal Colposacropexy With Permanent Polypropylen Mesh. *The Internet Journal of Gynecology and Obstetrics.*2012; 16(3).

8. ПРИЛОГ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

ТД

Монографска публикација

Тип записа:

ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада:

ВР

Докторска дисертација

Аутор:

АУ

Душко Д. Кљакић

Ментор/коментор:

МН

проф. др Слободанка Љ. Митровић

Наслов рада:

НР

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

Језик публикације: ЈП	Српски (ћирилица)
Језик извода: ЈИ	Српски / енглески
Земља публиковања: ЗП	Србија
Уже географско подручје: УГП	Србија
Година: ГО	2019.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МС	Крагујевац, Светозара Марковић 69.
Физичи опис рада: ФО	Дисертација има 81 стране, садржи 7 поглавља, 11 слика, 14 графикана и 64 референце
Научна област:	Медицина
Научна дисциплина: ДИ	Хумана репродукција
Предметна одредница/ кључне речи ПО	лејомиоми материце, стероидни рецептори, пролиферација, апоптоза, ангиогенеза.
УДК	
Чува се: ЧУ	У библиотеци Факултета медицинских наука у Крагујевцу, 34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69.

Важна напомена:**МН****Извод:****ИД**

Циљ ове студије је био да се одреди утицај експресије рецептора за естрогене и прогестерон на ангиогенезу, пролиферацију и апоптозу ћелија миома код жена у пре и постменопаузи. Ово је била студија пресека, клиничко-експериментална, ретроспективна, неинтервенцијска студија у пољу истраживања фундаменталних механизма патогенезе болести, коришћењем патохистолошког материјала из постојеће архиве. Истраживањем је обухваћено 76 пацијенткиња са дијагностикованим лејомиома 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). Коришћен је метод стандардног Н&Е бојења за исечке миома, миометријума и ендометријума, као и имунохистохемијски метод за одређивање експресије ER α , ER β , PR α , VEGF, CD105, Ki-68 и Caspase -3. Експресија рецептора за прогестерон је била више изражена у миомима и миометријуму код пременопаузних жена у поређењу са миомима и миометријумом код жена у постменопаузи. Експресија Caspase-3 је статистички значајно већа у групи ПостМ жена у поређењу са ПреМ групом. Експресија ER α и ER β није била значајно различита између група ни у узорцима миома ни миометријума. Према нашим подацима, експресија рецептора за прогестерон је имала већи утицај на апоптозу и пролиферацију ћелија него експресија рецептора за естрогене. Повећана експресија рецептора за прогестерон код жена у ПреМ у миому и миометријуму, вероватно је довела до смањења експресије апоптотског маркера код ПреМ жена.

Датум прихватања теме од стране ННВ:

16.04.2014.

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

4. Проф. др Александар Живановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, председник
5. Проф. др Ирена Танасковић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Хистологија и ембриологија*, члан
6. Проф. др Саша Раичевић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Подгорици за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, члан

8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type:

DT

Monographic publication

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

PhD thesis

Author:

AU

Duško D. Kljakić

Menthor/co-mentor

MN

prof. dr Slobodanka Lj. Mitrović

Title:

TI

The influence of the expression estrogens and progesterone receptors on angiogenesis, proliferation and apoptosis of myoma cells in premenopausal and postmenopausal women

Language of text:

LT

Serbian (Cyrilic)

Language of abstract: Serbian/English
Country of publication: Serbia
CP

Locality of publication: Serbia
LP

Publication year: 2019.
PY

Publisher: Author reprint
PU

Publication place: 34000 Kragujevac, Svetozara Markovića 69
PP

Physical description
PD Thesis contains 81 pages, 7 chapters, 11 pictures, 14 graphs and 64 citations

Scientific field: Medicine
SF

Scientific discipline: Human reproduction
SD

Subject/key words: Uterine leiomyoma, steroid receptors, proliferation, apoptosis, angiogenesis.
SKW

UDC

Holding data: Library of Faculty of Medical Sciences
Kragujevac, Serbia, 34000 Kragujevac, Serbia
Svetozara Markovića 69

Note:
N

Abstract:**AB**

The aim of this study was to determine the effects of the estrogens and progesterone receptors 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 α , ER β , PR α , 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 α and ER β were not changed among groups neither in myoma nor in myometrium samples. According to our data, PR α had higher influence on apoptosis and cell growth than estrogen receptors. Since PR α was increased in PreM in both myoma and myometrium, probably this expression led further to lower expression of apoptotic marker in PreM women.

Accepted by the Scientific Board on:
ASB

16.04.2014.

Defended on:
DE

Thesis defended board
(Degree/name/surname/title/faculty)
DB

1. Prof.dr Aleksandar Živanović, Full professor of Gynaecology and Obstetrics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, president
2. Prof. dr Irena Tanasković, Full professor of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member
3. Prof.dr Saša Raičević, Associate professor of Gynaecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, University of Podgorica, member.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

која је одбрањена на _____
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У _____, _____ године,

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

која је одбрањена на _____

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У _____, _____ године,

потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>



СРПСКИ АРХИВ
ЗА ЦЕЛОКУПНО ЛЕКАРСТВО
SERBIAN ARCHIVES
OF MEDICINE

Address: 1 Kraljice Natalije Street, Belgrade 11000, Serbia

+381 11 4092 776, Fax: +381 11 3348 653

E-mail: office@srpskiarhiv.rs, Web address: www.srpskiarhiv.rs

Paper Accepted*

ISSN Online 2406-0895

Original Article / Оригинални рад

Duško Kljakić¹, Saša Raičević², Miloš Milosavljević³, Milena Ilić³, Aleksandar Živanović⁴,
Dragan Radonjić⁵, Slobodanka Mitrović^{3,†}

**The influence of the expression of steroid receptors on angiogenesis,
proliferation and apoptosis in myomas of pre- and postmenopausal women**

Утицај експресије стероидних рецептора на ангиогенезу,
пролиферацију и апоптозу у миомима пре- и постменопаузних жена

¹Bar General Hospital, Bar, Montenegro;

²Clinical Centre of Montenegro, Clinical of Gynaecology and Obstetrics, Podgorica, Montenegro;

³University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pathology, Kragujevac, Serbia;

⁴University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Gynaecology and Obstetrics,
Kragujevac, Serbia;

⁵Blood Transfusion Institute of Montenegro, Bar Organizational Unit, Bar, Montenegro

Received: October 30, 2018

Revised: March 15, 2019

Accepted: March 15, 2019

Online First: March 20, 2019

DOI: <https://doi.org/10.2298/SARH181030023M>

* **Accepted papers** are articles in press that have gone through due peer review process and have been accepted for publication by the Editorial Board of the *Serbian Archives of Medicine*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text may be changed before the final publication.

Although accepted papers do not yet have all the accompanying bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: the author's last name and initial of the first name, article title, journal title, online first publication month and year, and the DOI; e.g.: Petrović P, Jovanović J. The title of the article. *Srp Arh Celok Lek*. Online First, February 2017.

When the final article is assigned to volumes/issues of the journal, the Article in Press version will be removed and the final version will appear in the associated published volumes/issues of the journal. The date the article was made available online first will be carried over.

† **Correspondence to:**

Slobodanka MITROVIĆ

Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69,
34000 Kragujevac, Serbia

E-mail: smitrovic@medf.kg.ac.rs

The influence of the expression of steroid receptors on angiogenesis, proliferation and apoptosis in myomas of pre- and postmenopausal women

Утицај експресије стероидних рецептора на ангиогенезу, пролиферацију и апоптозу у миомима пре- и постменопаузних жена

SUMMARY

Introduction/Objective 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.

Methods 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 α , ER β , PR α , VEGF, CD105, Ki678 and Cas-3.

Results 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 α and ER β were not changed among groups neither in myoma nor in myometrium samples.

Conclusion According to our data, PR α had higher influence on apoptosis and cell growth than estrogen receptors. Since PR α was increased in PreM in both myoma and myometrium, probably this expression led further to lower expression of apoptotic marker in PreM women.

Keywords: steroid receptors; apoptosis; angiogenesis; premenopausal; postmenopausal

САЖЕТАК

Увод/Циљ 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.

Метод 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 лејомиома 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 *H & E* бојење за миом и миометријум, као и имунохистохемија за *ER α* , *ER β* , *PR α* , *VEGF*, *CD105*, *Ki678* и *Cas-3*.

Резултати 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 α* и *ER β* нису били различити између група ни у узорцима миома ни миометријума.

Закључак Према нашим подацима, *PR α* је имао већи утицај на апоптозу и раст ћелија него на естрогенске рецепторе. Пошто је *PR α* повећан код жена у ПреМ у миому и миометријуму, вероватно је ова експресија довела до смањења експресије апоптотског маркера код ПреМ жена.

Кључне речи: рецептори за стероиде; апоптоза; ангиогенеза; пременопауза; постменопауза

INTRODUCTION

Uterine fibroids, also known as uterine leiomyomas or fibroids are well-limited, pseudo-encapsulated, benign, monoclonal tumors, composed mainly of smooth muscle cells of the uterus uterine leiomyomas is one of the most frequent gynecological tumors in the reproductive period of women. Independently or in association with hyperplasia and adenomyosis, they reach an incidence of 77%, often cause clinically complicated bleeding,

which is why they are the leading cause for hysterectomy and a major global health problem [1, 2]. It has been known that uterine leiomyomas is a hormone-dependent disease. However, the mechanism of action is still unknown, and there is increasing evidence that steroid hormones, estrogen (ER) and progesterone (PR) are not the only modulators of myoma growth [2, 3, 4]. This can be explained with a presence of similar level of circulating hormone in women with and without myoma, with the occurrence of hormone independent extrauterine leiomyoma and the possible absence of their regression in postmenopausal women [5].

Through last decade, high effort is being invested to clarify the role of gonadal steroids, the expression of local growth factors, and factors associated with apoptosis in myeloma cells. Recently studies showed local tissue-specific factors (for example, growth factors), as well as somatic mutations in pro and antiapoptotic genomes, participate in the pathogenesis and progression of these tumors, with or without cross-linking with mechanisms of action of steroid hormones. Among the environmental factors, particular attention is drawn to the presence and effect of estrogen and progesterone receptors on endometrium and myometrial cells in the uterine wall with myoma [3].

The key pathological processes involved in myoma growth are proliferation and hypertrophy of leiomyocytes, apoptosis, angiogenesis, stromal and secondary changes [6]. The most reliable marker of cell proliferation is Ki-67 or a proliferation-cell nuclear antigen, which denotes not only the cells in the divide, but all those in the synthetic phase of the cell cycle [7]. A high level of Ki-67 antigen, detected during the secretory phase, suggests that progesterone has a synergistic effect in the pathogenesis of myoma [8].

Apoptosis is a process of programmed cell death that eliminates dysfunctional and undesirable cells. It is highly regulated by the complex interaction between the pro and the anti-apoptotic molecules, is performed in one cell independently of the surrounding, and is induced by the activation of caspases, specific endoproteases that destroy the essential structural components including the genetic material of the cell [9]. Caspase-3, due to its specificity and sensitivity, is a reliable marker of cells that pass the process of programmed cell death. Its activity cannot be detected before apoptosis. It is registered in early stages and detection grows with progression while is reduced only in the final phase of the apoptotic process [10].

Furthermore, angiogenesis is mediated by numerous angiogenetic growth factors; the most powerful among them is the vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF affects the degree of microvascular tumor density by stimulating the proliferation of endothelial cells. Variable concentrations of VEGF, depending on the phase of menstrual cycle, are detected in myometrium, stromal and epithelial endometrial elements [11].

During tumor angiogenesis, endothelial cells intensely express endoglin (CD105), while vascular endothelium, stromal and inflammatory cells barely or do not express at all CD105 [12].

Beside the fact that the prevalence of proliferation over apoptosis is a major condition for myoma growth, with this study we tried to indicate that similarities and differences in angiogenesis, proliferative, and apoptotic indexes in myomas and surrounding tissue, are primarily dependent on the expression of steroid hormone receptors. According to previous, 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.

METHODS

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, Kragujevac, Serbia, in a three-year period from 2007-2010. According to the menstrual status, two experimental subgroups were formed. The first group was premenopausal women (n=35; 46.2±5.02 year old), and the second group was postmenopausal women (n=41; 60.25±5.41 year old).

Clinical data were collected by insight into disease history and operational protocols of examined patients. We collected information related to gynecological status (menstrual cycle, menarche, menopause, number of deliveries, etc.) and data obtained by macroscopic analysis

of the operative preparations (number, position and size of the myoma, changes in the ovaries, morphometric characteristics of the uterus).

The experimental part of the study was carried out on the operative tissue material obtained by hysterectomy.

The study was conducted at Department of Pathology, Clinical Centre of Kragujevac, Serbia. The study was approved by Ethical Committee of Clinical Center of Kragujevac, Kragujevac, Serbia.

Haematoxylin-Eosin staining

Tissue materials were fixed in formalin, embedded in paraffin, and 5- μ m sections were stained with haematoxylin-eosin [H&E], and further examined by immunohistochemistry [13]. All pictures are taken in original resolution with x200 zoom. A representative sample of the myoma without regressive changes is separated for immunohistochemical analysis.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded tissue sections were fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin using standard pathological protocols. Immunohistochemistry was performed on a single representative block from each case or two (when the surrounding myometrium is not visible along with the myoma on the first block). Antigenic retrieval was processed by submerging the sample in 10mM citrate buffer (pH 6) or commercial buffer (10mM EDTA Buffer for Heat-Induced Epitope Retrieval (pH8), AP-9004-125, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and microwaving for 20 minutes at 96°C. Primary monoclonal antibodies were directed against ER Ab11 (mouse: 1:500, MS-354-R7, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), ER beta antibody (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), and caspase-3 Ab-3 (human: 1:100 dilution, MS-1123-R7,

Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Tissue sections were incubated with appropriate primary antibody and commercial biotinylated secondary anti-immunoglobulin, at room temperature, according to the manufacturer's instructions (UltraVision LP Large Volume Detection System: HRP Polymer (Ready-To-Use), TL-125-HL, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). An evaluation of the immunohistochemical analysis was carried out by a semi-quantitative assessment of the expression of the examined markers, by scaling to the scales specific to each marker. All pictures are taken in original resolution with x200 zoom.

Expression of Estrogens, Progesterone, VEGF and Ki-67

The expression of estrogen and progesterone receptors will be quantified based on the Allred score, i.e. by adding parameters that indicate percentage representation (from 0 to 5) and intensity of cell expression (from 1 to 3) [14]. The sum of these parameters will represent the values of the total score (from 0 to 8), where the values ≥ 3 was considered positive. The expression of VEGF, Ki-67 and caspase-3 was determined based on the percentage of immunoreactive cells. Based on this expression, groups with low (0-15%), moderate (16-30%) and high proliferative or apoptotic index (31-100%) were formed.

Expression of CD105

Immunohistochemical analysis of the expression of endoglin (CD105), an assessment of the degree of angiogenesis will be performed. The right index of intensity of angiogenesis is the density of intra and peritumoral microcirculation or microvessel density. The analysis will be carried out quantitatively by counting blood vessels in zones with their highest density (hot spot areas). We used the recommendations given by Weidner on the magnitude of the field of vision and the counting method [15]. The focal points of the highest density of blood vessels were determined on a small microscopic enlargement (x40). Determination of the focus of the largest microvascular density were performed by two researchers independently, with no clinical and pathohistological data available. After that, the counting of individual blood vessels was performed at a mean microscopic enlargement (x200), which implies an area of 0.739 mm^2 . The mean value of the results obtained by counting in 3 visible fields was the final result. When counting blood vessels in each "hot zone", the expression of individual

endothelial cells, and not just the lumen of a blood vessel with visible red blood cells, was calculated. After obtaining the data on the number of blood vessels for each case separately, the mean value of the 3 read fields were calculated, and then the median in relation to which all myomas were classified into two groups, those with low degree and those with a high degree of angiogenesis, accordingly whether the number of blood vessels is less than or equal to or greater than the value of the calculated median.

All immunohistochemical staining were carried out with quality control and specificity of colouring, using positive and negative controls according to the UK National Quality Assessment for Immunocytochemistry. Microscopic tumor analysis and evaluation of marker expression were performed on a microscope of the Carl Zeiss, Axioscop 40 type. Preparations with representative fields were painted using three microscopic enlargements (x40 and x200) using a Canon PC 1089 camera.

Sampling

Regarding the method of selecting a study sample from the entire population, all samples of the material archive will be potentially considered for inclusion. The criteria for the involvement of subjects in the study were a pathohistologically verified uterine leiomyomas disease and premenopausal or postmenopausal status. Excluding criteria for selecting subjects were: associated malignant diseases of the ovary and cervix, incomplete clinical data on menstrual status, use of oral contraceptives and other forms of hormonal therapy.

Statistical analysis

Statistical processing of results will be performed using a commercial software package SPSS (version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL). In the analysis of the obtained results, descriptive statistics was first used to describe the general characteristics of the sample: absolute numbers and proportions (frequencies, percentages), median and variability measures (standard deviation), maximum and minimum. The regularity of the distribution was evaluated by Kolmogorov-Smirnov test. For the comparison of the mean values of the

variable two populations, the independent T test, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test were used, and for comparison of the mean variables of variable populations Analysis of variance. The dependence of two descriptive variables were carried out using the χ -square test and the Fisher test, the dependence of two numerical variables using Pearson's and Spearman's correlation coefficient, while the influence of more variables on the binary variable were investigated using a multivariate binary logistic regression.

RESULTS

H&E staining

The standard light microscopic analysis is defined histological type of myoma, the mitotic index expressed through the number of mitotic figures on 10 fields of great enlargement, the presence of regressive changes (necrosis, hyaline and myxomatous degeneration, foci of hemorrhage and etc), the condition of the endometrium and surrounding myometrium (Figure 1A, B).

Expression of estrogens receptors alpha and beta in myoma and myometrium

ER alpha neither ER beta showed statistically significant expression in myoma of premenopausal compared to postmenopausal women (Figures 2A, B and Figures 2E, F). Similarly, those parameters were not different among examined groups in myometrium samples (Figures 4A, B and Figures 4E, F).

Expression of progesterone receptor in myoma and myometrium

Progesterone receptor was over expressed in myoma of premenopausal compared to myoma of postmenopausal women (Figure 2C and 2G). Also, statistically significant increased values of PRa were detected in myometrium of PreM compared to PostM women (Figure 4C and 4G).

Expression of VEGF in myoma and myometrium

In myoma tissue VEGF was not significantly different among groups (Figure 1D and 1H). Similarly, same result was obtained in myometrium of PreM women compared to PostM women (Figure 4D and 4H).

Expression of CD105 in myoma and myometrium

In myoma of PreM and PostM women CD105 didn't show any difference in its expression (Figure 3A and 3D). However, in myometrium CD105 was statistically significant increased in PreM women compared to PostM women (Figure 5A and 5B).

Expression of Ki67 in myoma

Ki67 was not significantly different among PreM and PostM women (Figure 3B and 3E).

Expression of Caspase-3 in myoma

Expression of Caspase 3 was statistically significant increased in PostM women compared to PreM group (Figure 3C and 3F).

Correlation between all examined parameters in myoma tissue

Expression of cas-3 in myoma tissue of all examined groups was in weak but statistically significant negative correlation with expression of ER β in the same tissue (Figure 6A). Moreover, expression of cas-3 was in strong and significant negative correlation with PRa in myoma tissue of both PreM and PostM women (Figure 6B).

In strong correlation with expression of PRa was expression of CD105, VEGF and Ki67 as it is showed in Figures (Figures 6C, E and F). Moreover, expression of Ki67 was in

weak but statistically significant correlation with expression of ER β (Figure 6D) while cas-3 was in negative correlation with ER β (Figure 6A). Correlations between other examined parameters in tissue of myoma didn't show to be significant.

DISCUSSION

Uterine leiomyoma is the most common benign tumor, despite its frequent manifestation the etiology and pathophysiology of this abnormality remain unknown. Extensive knowledge has accumulated on the role of hormones in the growth of leiomyomas because the occurrence of uterine leiomyomas during the fertile period and the regression after menopause indicate that gonadal steroids are central for development of these tumors [7, 16]. In the last decade, special attention was given to the role of estrogens and progesterone in the pathophysiology of leiomyomas. Uterine leiomyomas have been considered estrogen-dependent tumors, and this role was supported also by the finding that continuous gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) treatment, significantly decreases ovarian estrogen production, is as well associated with reduction in tumor size [17]. In order to achieve their effects, estrogens, act through the activation of estrogen receptors (ER alpha and ER beta). Both of these receptors exhibit DNA- and ligand-binding domain sequence conservation and they are encoded by two distinct genes, they also have different transcriptional activation domains as well as different tissue distribution [17]. In our study we showed that expressions of those receptors were not different in myoma of PreM compared to PostM women (Figure 1E, F). Nevertheless, expression of ER alpha and ER beta was not significantly different neither in myometrium of those women (Figure 3E, F). Similarly, Sakaguchi et al. showed that coordinated expression of ER alpha and ER beta might be necessary for normal estrogen action in myometrium [18, 19]. Also, it has been shown ER alpha is phosphorylated at a higher rate on serine in leiomyoma compared with surrounding myometrium, for that reason it is possible that phosphorylated ER α regulated by p44/42 MAPK, may have a role in development of uterine leiomyoma [20, 21].

In recent years the role of progesterone in uterine leiomyoma pathophysiology has become more established. As in case of ERs, nuclear progesterone receptors (PRs) work as ligand-activated transcription factors and there is two predominant isoforms of PR in humans: PRa and PRb [17]. In our study, PRa showed to be significantly unregulated in myoma of

PreM compared to myoma of PostM women which showed to be same in myometrium tissue (Figure 1G, 3G). Those finding correlate with fact that progesterone is cyclically elevated during the reproductive years, are significantly elevated during pregnancy, and are suppressed after menopause, however it is still very difficult to distinguishing the relative importance of estrogens versus progesterone [22, 23].

Since it is already historical fact that leiomyomas are dependent on angiogenesis for their growth and survival, to this date is also found that estrogens and progestins regulate the expression of several potent angiogenic factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) [24]. We found that in myoma VEGF was not significantly changed regardless menopausal status (Figure 2H), opposite VEGF was changed between groups in myometrium (Figure 4H). We found that VEGF is significantly increased in PreM compared to the PostM women. Similarly, Hague et al., according to menopausal status found that VEGF was significantly increased in PreM compared with PostM endometrium. With the premenopausal tissue exhibiting a significantly higher level of expression was found in the epithelium but not in the stroma or the blood vessels [25, 26].

Furthermore, one of the most commonly assessed angiogenesis markers is microvessel density which is determined on the bases of specific endothelial antigen expression (CD34, CD105) [27]. In the tumor we didn't notice any change between groups in expression of CD105 regarding menopausal status (Figure 3D), however CD105 was statistically significantly decreased in myometrium of PostM compared to PreM women (Figure 5B).

Moreover, regarding cell death, we evaluated two proteins known as markers involved in growth control of leiomyoma. There were no difference among two examined groups in expression of Ki67 (Figure 3E), however cas-3 was significantly increased in PostM compared to PreM women (Figure 3F). We notice that expression of Ki67 didn't follow trend of cas-3 expression, regarding that Plewka et al. showed that the apoptosis was not accompanied by proliferation. There were no immunolocalization of Ki-67 detected in leiomyomas manifesting apoptosis [7, 28].

Additionally, as we can see from Figure 6 that in myoma cells PR α is in positive correlation with VEGF, CD105 and Ki67 (Figure 6C, E and F), and in negative correlation with cas-3 (Figure 6B). On the other hand, ER β was in negative correlation with cas-3 and positive correlation with Ki67 (Figure 6A, D).

CONCLUSION

Although, ER β have effect on cell proliferation and apoptosis, through all data more relevant seems to be PRa. According to our data, PRa had higher influence on apoptosis and cell growth then estrogen receptors. Since PRa was increased in PreM in both myoma and myometrium, probably this expression led further to lower expression of apoptotic marker, increased cell proliferation and angiogenesis in PreM women.

Further studies need to be conducted in order to better understand the mechanisms associated with progesterone driven according to our data, in order to develop more efficient therapies.

Conflict of interest: None declared

REFERENCES

1. Stewart EA, Cookson CL, Gandolfo RA, Schulze-Rath R. Epidemiology of uterine fibroids: a systematic review. *BJOG*. 2017; 124(10):1501–12. [doi:10.1111/1471-0528.14640] [PMID: 28296146]
2. Patel B, Elguero S, Thakore S, Dahoud W, Bedaiwy M, Mesiano S. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Hum Reprod Update*. 2015; 21(2):155–73. [doi: 10.1093/humupd/dmu056] [PMID: 25406186]
3. Yun BS, Seong SJ, Cha DH, Kim JY, Kim ML, Shim JY, et al. Changes in proliferating and apoptotic markers of leiomyoma following treatment with a selective progesterone receptor modulator or gonadotropin-releasing hormone agonist. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015; 191:62–7. [doi:10.1016/j.ejogrb.2015.05.022] [PMID: 26093349]
4. Sparić R. Uterine myomas in pregnancy, childbirth and puerperium. *Srp Arh Celok Lek*. 2014; 142(1-2):118–24. [PMID: 24684044]
5. Sen N, Demirkan NC, Colakoglu N, Duzcan SE. Are there any differences in the expression of hormonal receptors and proliferation markers between uterine and extrauterine leiomyomas? *Int J Surg Pathol*. 2008; 16:43–7. [doi:10.1177/1066896907309576] [PMID: 18203783]
6. Maruo T, Ohara N, Wang J, Matsuo H. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update*. 2004; 10:207–20. [PMID: 15140868]
7. 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]
8. 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]
9. 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]
10. 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]
11. Konarska M, Wrona AN, Aleksandrovych V, Bereza T, Sajewicz M, Gach-Kuniewicz B, Lis M, Komnata K, Paziewski M, Maleszka A, Depukat P, Solewski B, Warchoń Ł. Angiogenesis and pro-angiogenic factors in uterine fibroids - facts and myths. *Folia Med Cracov*. 2016;56(2):37-43. Review. PubMed PMID: 28013320.
12. Saarelainen SK, Staff S, Peltonen N, Lehtimäki T, Isola J, Kujala PM, et al. 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]
13. Heidenhain M. Noch einmal über die darstellung der centralkörper durch eisenhamotoxylin. Nebst einigen allgemeinen bemerkungen über die hamatoxylinfarben.2. *Wiss Mikrosk*,1896; 13:186.
14. Suvarna KS, Layton Ch, Bancroft JD, Editors. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 8th edition. Churchill Livingstone/Elsevier Science, 2018.
15. 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]
16. 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]
17. 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]
18. 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].
19. 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]
20. Awowole IO, Makinde ON, Badejoko OO, Omoniyi-Esan GO, Tijani AM, Ajenifuja KO, Loto OM. Clinical correlates of leiomyoma estrogen and progesterone receptors among Nigerian women. *Int J Gynaecol Obstet*. 2016; 135(3):314-318. doi: 10.1016/j.ijgo.2016.06.019
21. 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]

22. Tsigkou A, Reis FM, Lee MH, Jiang B, Tosti C, Centini G, Shen FR, Chen YG, Petraglia F. Increased progesterone receptor expression in uterine leiomyoma: correlation with age, number of leiomyomas, and clinical symptoms. *Fertil Steril*. 2015; 104(1):170-5.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.04.024. Epub 2015;23. PubMed PMID: 26006736.
23. Laganà AS, Vergara D, Favilli A, La Rosa VL, Tinelli A, Gerli S, et al. Epigenetic and genetic landscape of uterine leiomyomas: a current view over a common gynaecological disease. *Arch Gynecol Obstet*. 2017; 296(5):855–67. [doi: 10.1007/s00404-017-4515-5] [PMID: 28875276]
24. Konarska M, Wrona AN, Aleksandrovych V, Bereza T, Sajewicz M, Gach-Kuniewicz B, et al. Angiogenesis and pro-angiogenic factors in uterine fibroids - facts and myths. *Folia Med Cracov*. 2016; 56(2):37–43. [PMID: 28013320]
25. 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]
26. Javid S, Ziamajidi N, Foroughi S, Abbasalipourkabir R. Effects of tamoxifen-loaded solid lipid nanoparticles on the estrogen receptor- α (ER- α) 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; 96:706–12. [doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.055] [PMID: 28017765]
27. Tal R, Segars JH. The role of angiogenic factors in fibroid pathogenesis: potential implications for future therapy. *Hum Reprod Update*. 2014 Mar-Apr;20(2):194-216. doi: 10.1093/humupd/dmt042. Epub 2013 Sep 29. Review. PubMed PMID: 24077979; PubMed Central PMCID: PMC3922145.
28. Tinelli A, Sparic R, Kadija S, Babovic I, Tinelli R, Mynbaev OA, et al. Myomas: anatomy and related issues. *Minerva Ginecol*. 2016; 68(3):261–73. [PMID: 26785282]

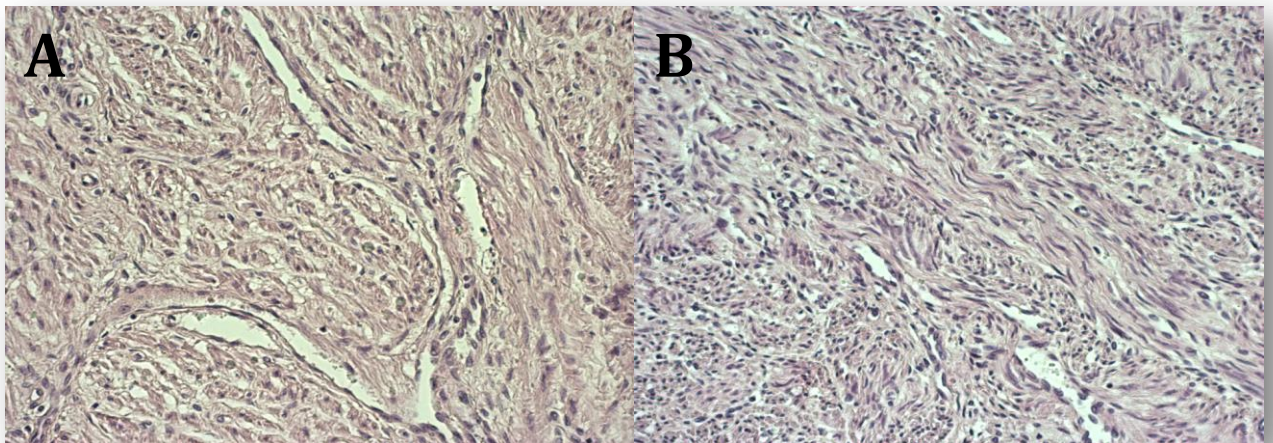


Figure 1. A: Representative image of human myoma (H&E, original magnification: $\times 200$); B: representative image of human myometrium (H&E, original magnification: $\times 200$)

Paper acc

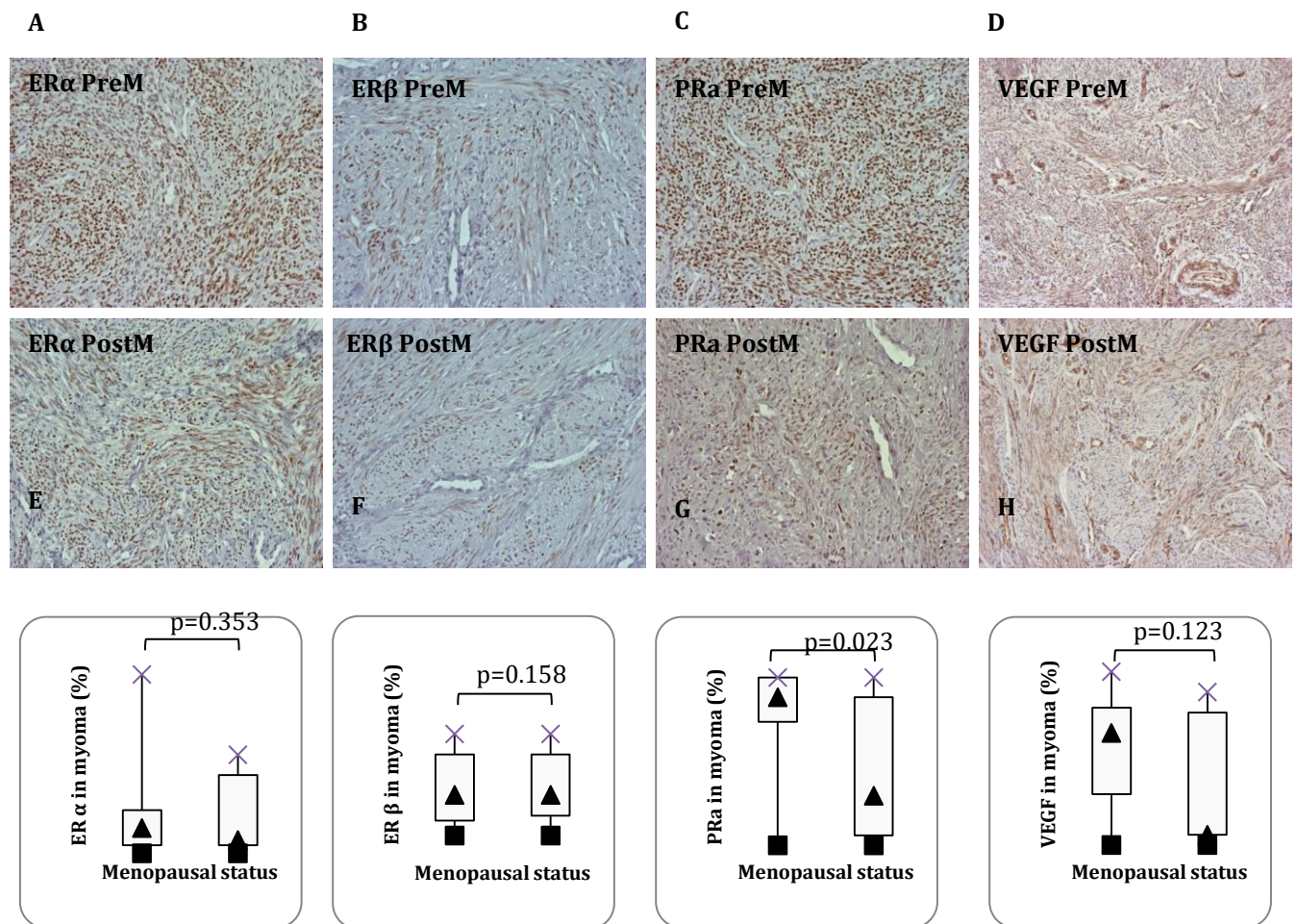


Figure 2. A–D: Immunohistochemical expression of ER α , ER β , PRa and VEGF (original magnifications: $\times 200$) in myoma tissue of PreM and PostM women, representative tissue sections; E–H: percentage of expression of ER α , ER β , PRa and VEGF and statistical difference in percentage of myoma cells between PreM and PostM women; \blacktriangle – median; \blacksquare – minimum; X – maximum

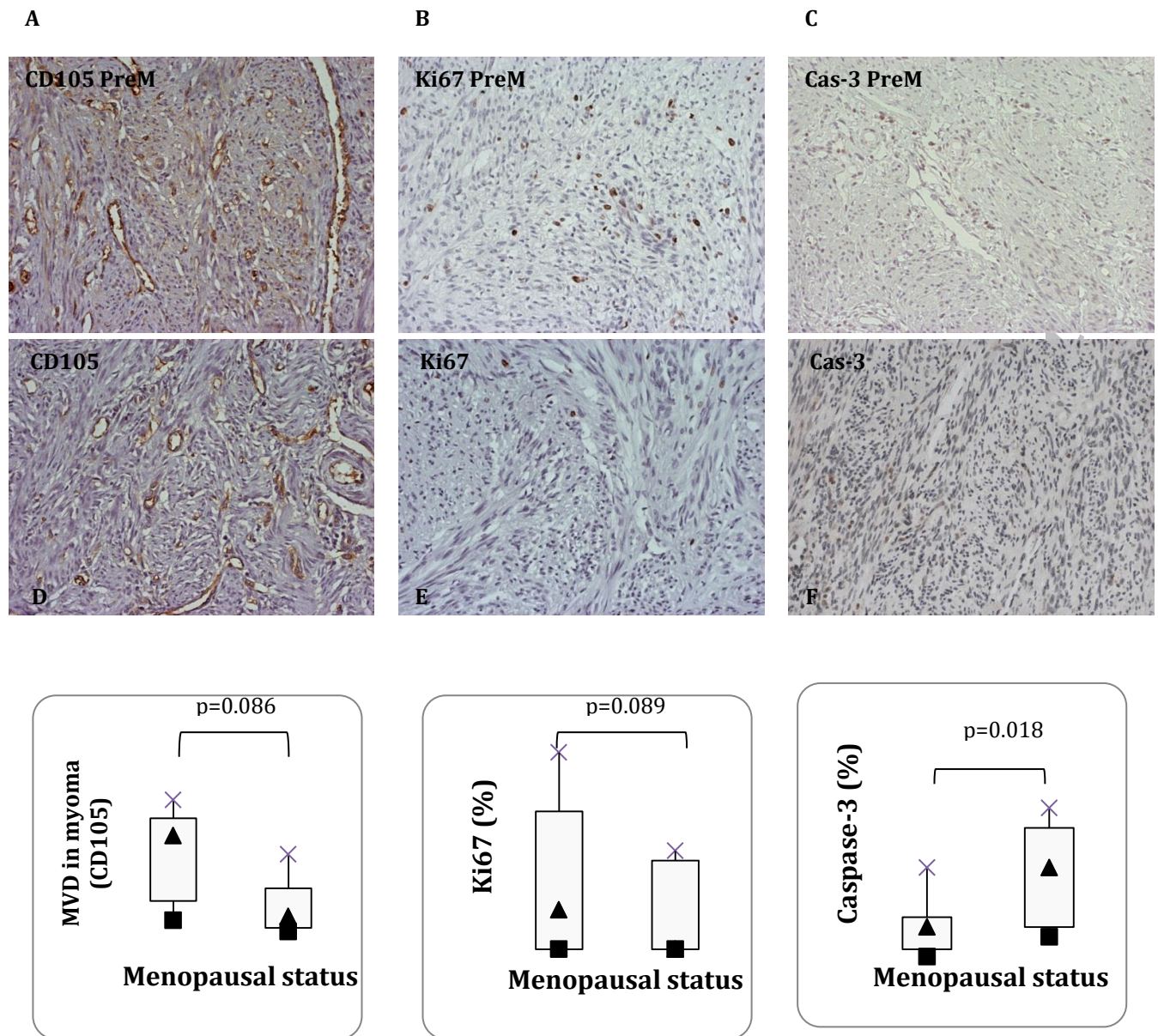


Figure 3. A–C: Immunohistochemical expression of CD105, Ki67 and Cas-3 (original magnifications: $\times 200$) in myoma tissue of PreM and PostM women, representative tissue sections; D–F: percentage of expression of CD105, Ki67, and Cas-3 and statistical difference in percentage of myoma cells between PreM and PostM women; \blacktriangle – median; \blacksquare – minimum; X – maximum

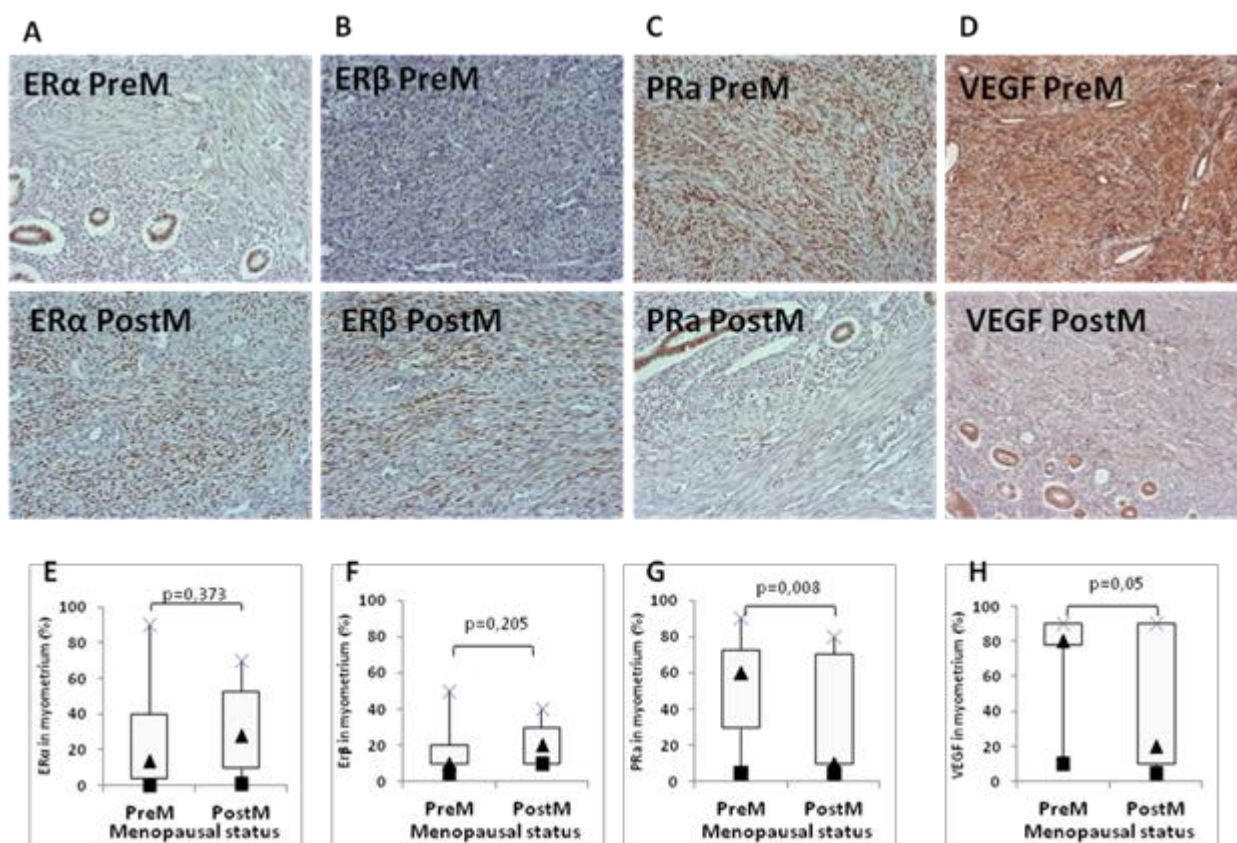
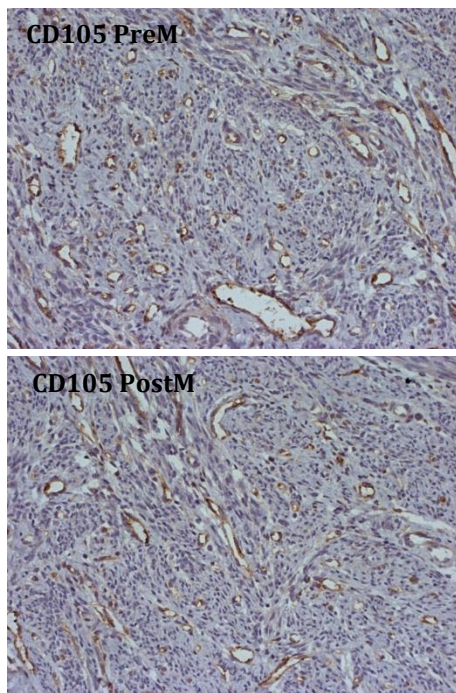


Figure 4. A-D: Immunohistochemical expression of ER α , ER β , PRa and VEGF (original magnifications: $\times 200$) in myometrium tissue of PreM and PostM women, representative tissue sections; E-H: percentage of expression of ER α , ER β , PRa, and VEGF and statistical difference in percentage of myometrium cells between PreM and PostM women; \blacktriangle – median; \blacksquare – minimum; X – maximum

A



B

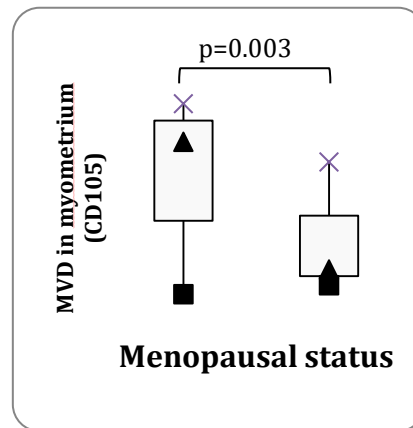


Figure 5. A: Immunohistochemical expression of CD105 (original magnification: $\times 200$) in myometrium tissue of PreM and PostM women, representative tissue sections; B: percentage of expression of CD105 and statistical difference in percentage of myometrium cells between PreM and PostM women;

▲ – median; ■ – minimum; X – maximum

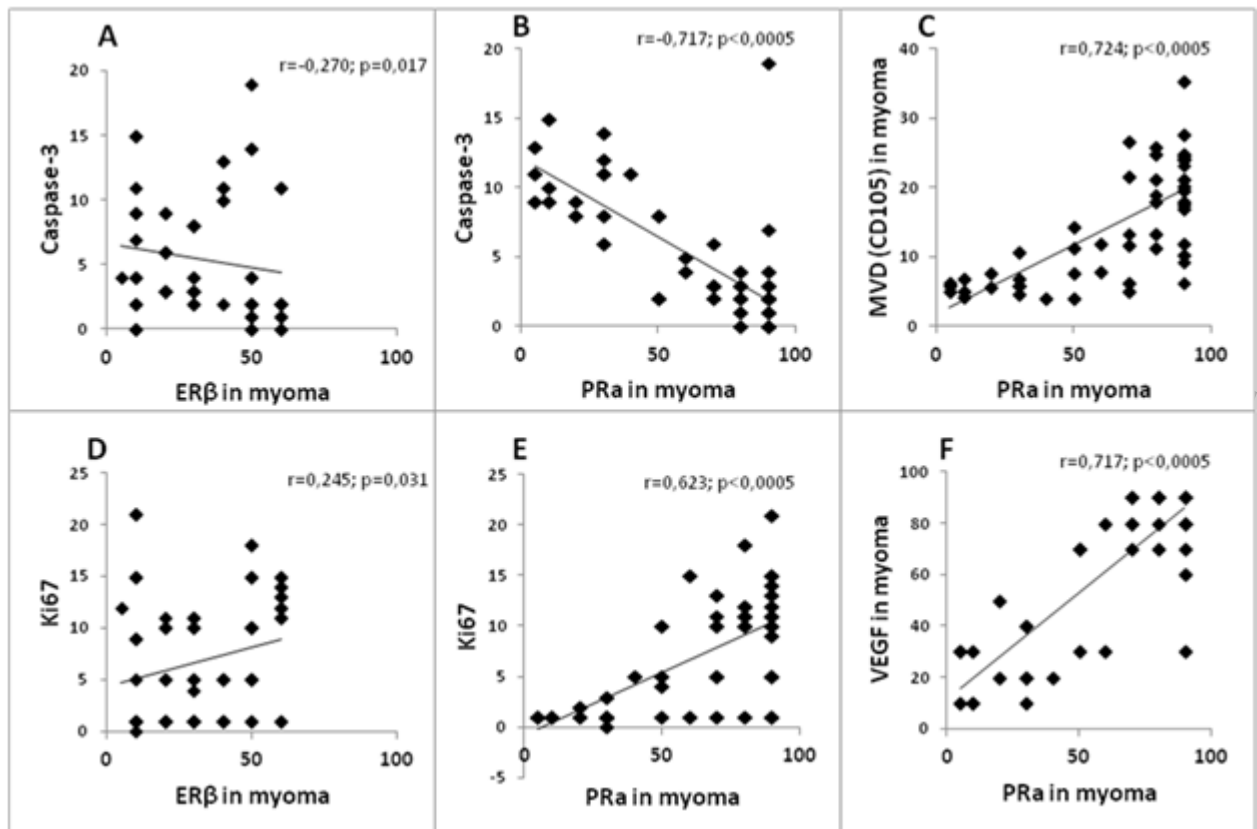


Figure 6. Correlation between all examined parameters in myoma tissue

Paper a

Case Report

Gestational Choriocarcinoma of the Cervix

Slobodanka Lj. Mitrovic PhD^{1,3}, Petar S. Arsenijevic MD^{1,2}, Dusko Kljatic MD¹, Janko M. Djuric PhD^{1,2}, Milos Z. Milosavljevic MD^{1,3}, Zoran M. Protrka PhD^{1,2}, Radisa H. Vojinovic PhD^{1,4}

Abstract

Choriocarcinoma is the most aggressive, malignant form of gestational trophoblastic disease and has varying incidence, increasing in patients older than 40 years. It usually develops after a malignant alteration in a molar pregnancy, but rarely after an abortion or normal or ectopic pregnancies. The most common localization is the uterus, but it can also be found rarely in the ovaries, fallopian tubes, vagina, vulva, cervix or pelvic region.

A 38-year-old multiparous woman, with no complications in three previous labors and four miscarriages, presented to her gynecologist one year after the last miscarriage complaining of abnormal vaginal bleeding. Clinical examinations showed normal ultrasound and histopathology findings. Blood analysis demonstrated moderate anemia and low elevated serum b-human chorionic gonadotropin. Due to profuse hemorrhage and anemia after the curettage, the medical council decided that a total hysterectomy should be performed. Macroscopic examination of the post-operative material showed regular morphology of the uterus, fallopian tubes and ovaries. However, a whitish brown lesion with a maximum diameter of 22 mm was noted in a longitudinal section of the cervix. Using standard histopathology and immunohistochemical analysis, a cervical gestational choriocarcinoma was diagnosed.

Knowledge of the characteristics of the choriocarcinoma is very important for accurate diagnosis and treatment, especially when the tumor is localized on the rare locations and where a high level of serum b-human chorionic gonadotropin is absent.

Keywords: Choriocarcinoma, Chorionic gonadotropin beta subunit human, Immunohistochemistry, uterine cervical neoplasms

Cite this article as: Mitrovic SL, Arsenijevic PS, Kljatic D, Djuric JM, Milosavljevic MZ, Protrka ZM, et al. Gestational choriocarcinoma of the cervix. *Arch Iran Med.* 2014; **17(11)**: 783 – 785.

Introduction

Choriocarcinoma (CC) is a rare, malignant form of gestational trophoblastic disease. It usually develops after a malignant alteration in a molar pregnancy and rarely after an abortion, or normal or ectopic pregnancies.^{1,2} The most common localization of gestational CC is the uterus; it can be found only rarely in the fallopian tubes, vagina, vulva, cervix or pelvic region.^{3,4} Some cases of an intraplacental CC coexisting with a uterine pregnancy have also been reported.⁵

The diagnostic criteria for extrauterine CC described by Saito, et al. are absence of disease in uterine cavity, pathologic confirmation of disease, exclusion of molar pregnancy and exclusion of a coexisting normal intrauterine pregnancy.⁶ Here we present a patient with gestational cervical CC occurring 13 months after an induced abortion.

Case Report

The patient, 38 years of age, multiparous, with no complications during three previous labors and four previous abortions, contacted her gynecologist because of an irregular vaginal hemorrhage. The bleeding was occasional and sparse and lasted for 13 months

Authors' affiliations: ¹Faculty of Medical Science, Kragujevac, Serbia, ²Department of Gynaecology and Obstetrics, Clinical Center Kragujevac, Kragujevac, Serbia, ³Department of Pathology, Clinical Center Kragujevac, Kragujevac, Serbia, ⁴Department of Radiology, Clinical Center Kragujevac, Kragujevac, Serbia. **Corresponding author and reprints:** Milos Z. Milosavljevic MD, Faculty of Medical Science and Department of Pathology, Clinical Center Kragujevac, 30 Zmaj Jovina Str., Kragujevac, Serbia. Tel: +381 64 950 10 39, Fax: +381 34 370 073, E-mail: dmmilosavljevic@sbb.rs.

Accepted for publication: 20 August 2014

after the last induced abortion. During that period, the patient underwent ultrasonography of the pelvis, followed by explorative curettage of the endometrium. Endovaginal ultrasonography was not available at that time and transabdominal ultrasound findings were normal, with no signs of pregnancy; both adnexa had regular morphology and the uterine cavity was empty. Microscopy of the material obtained by curettage showed the occasional decidual transformation of endometrial tissue.

The patient underwent blood tests and repeated exploratory curettage. On the fourth day after the intervention, a total hysterectomy was performed because of the profuse hemorrhage and anemia. Blood analysis demonstrated moderate anemia (hematocrit 26%) and low elevated serum b-human chorionic gonadotropin (b-hCG) level (13 mIU/mL; normal value > 5 mIU/mL).

Apart from occasional irregular desquamated cells and decidual transformation of the endometrium, histopathology of the material obtained from explorative curettage showed the presence of clusters and individual polymorphic cells resembling cytotrophoblasts with markedly atypical nuclei. These indicated the possible presence of a trophoblast-derived tumor. Macroscopic examination of the operative material showed regular morphology of the uterus, Fallopian tubes and ovaries, while a longitudinal section of the cervix showed a whitish brown lesion with a maximum diameter of 22 mm covering the isthmus and infiltrating most part of the cervical wall (Figure 1a, 1b). Standard histopathology and immunohistochemistry confirmed the diagnosis of a gestational CC in the cervix. Tumorous tissue was confirmed on routine hematoxylin and eosin (H&E) stained sections of the cervix, consisting of all three trophoblastic cell types, with areas of necrosis and hemorrhage as well as irregular infiltrating edges (Figure 2a).

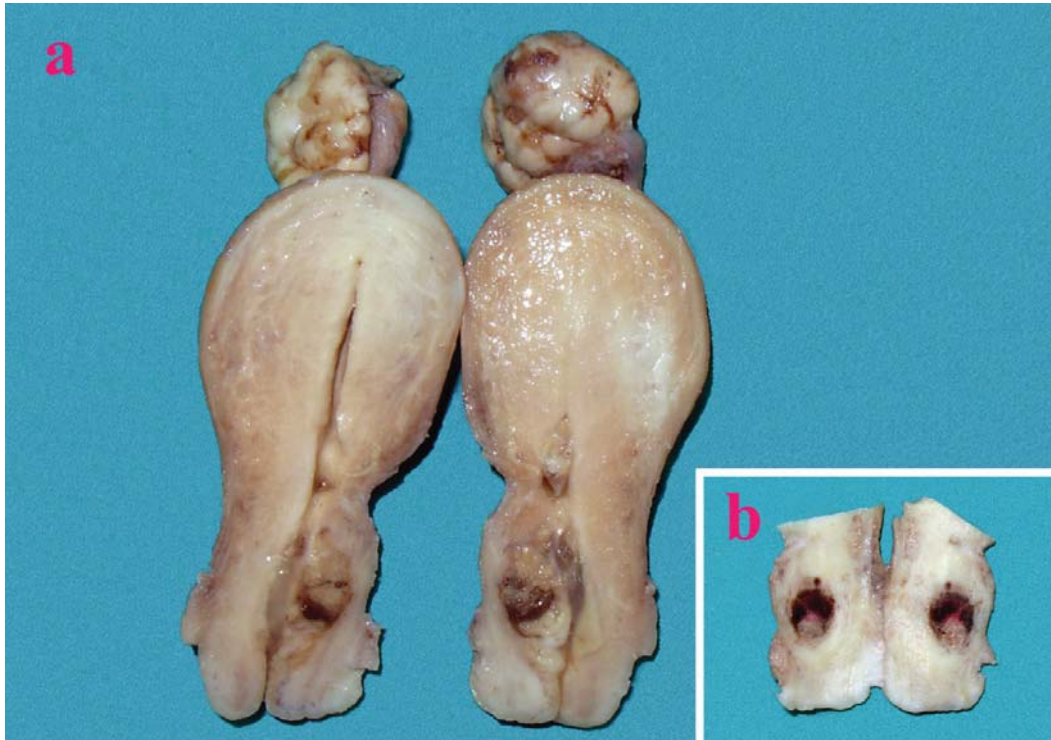


Figure 1. Macroscopic examination of the surgically removed specimen showed normal morphology of the uterus, Fallopian tube and ovaries, but a pale brown lesion was noted in a longitudinal section of the cervix with a largest diameter of 22 mm (a and b).

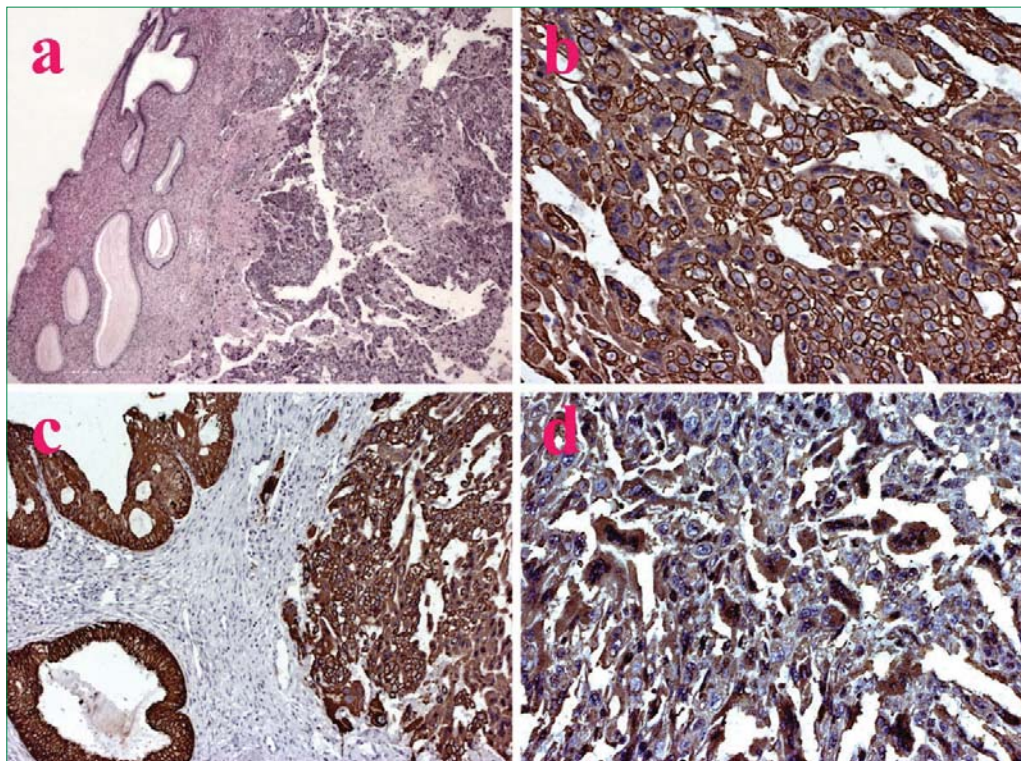


Figure 2. Tumorous tissue was confirmed on routine H&E stained sections of the cervix, consisting of all three trophoblastic cell types with areas of necrosis and hemorrhage and with **a)** irregular infiltrating edges, x100; **b)** Immunohistochemistry showed diffuse positivity in most cells for CK18, x400 **c)** A1/3, x200; **d)** hCG, x400.

The tumor consisted of alternately and randomly scattered zones of cytotrophoblasts, with marginally distributed syncytiotrophoblasts and inserted areas of intermediary trophoblasts. Numerous foci of vascular invasion were identified. Immunohistochemically, the tumor cells were CK18, CK A1/3 and hCG positive (Figure 2b – 2d), while the proliferation index was very high with about

70% of the nuclei expressing Ki-67.

Postoperatively, positive emission tomography (PET) scanning, pathological tumor–node–metastasis (pTNM) staging and normal b-hCG levels defined a FIGO stage I of the disease. Adjuvant chemotherapy was advised, but the patient refused to take it and one year after surgery, there is no sign of recurrence or any other ailments.

Discussion

Choriocarcinoma is the most aggressive malignant form of gestational trophoblastic disease, with varying incidence, increasing in cases of molar pregnancy and in patients older than 40 years.⁷ Data suggest that 0.76% – 4% of all cases of gestational CC arise from an ectopic pregnancy.⁸ The latent period between the last pregnancy and the occurrence of CC can be from a few months up to 15 years.⁹

Cervical CC is very rare. A MEDLINE search with the key words “cervical gestational choriocarcinoma” shows 36 published papers. Among them, there are only two series with four cases each, whereas the others report individual presentations.^{10,11}

Several hypotheses have been postulated to explain the pathogenesis of cervical CC. It might develop via cervical metastases from a primary tumor in the corpus that later spontaneously regresses, from the malignant transformation of a cervical pregnancy, or by transport of chorionic cells from a previous pregnancy that have undergone malignant transformation after a dormant period.^{12–14} The macroscopic presentation of a typical CC is a hemorrhagic mass with areas of necrosis and irregular edges. Microscopically, they show a typical biphasic image. The central area consists of cytotrophoblasts, with marginal syncytiotrophoblasts being distributed alternately. Rarely these two cell types can rotate in an alternating sequence with insertions of intermediate trophoblast. There are nuclear atypia with numerous mitotic figures with clear zones of necrosis and hemorrhage. There are also numerous foci of vascular invasion.

For a differential diagnosis, a CC must be distinguished from an undifferentiated carcinoma and variants of epithelioid smooth muscle tumors. Accurate diagnosis is facilitated by immunohistochemistry, because the CC cells express variable trophoblastic markers such as hCG, inhibin, human leukocyte antigen-G and Mel-CAM (CD146).¹⁵ It is very important to diagnostically exclude intermediate variants such as placental trophoblastic and epithelioid trophoblastic tumors. Intermediate trophoblastic tumors are not sensitive to chemotherapy, and in the clinical treatment of affected patients hysterectomy is the procedure of choice.^{16,17} Finally, in the case of extrauterine localization of the tumor, it is necessary to differentiate whether it has a gestational or non-gestational origin. This is achieved by molecular genotyping and finding unique paternal genetic material in the tumor, as well as demonstrating immunohistochemical positivity for p57KIP2.^{18,19} We did not have the technical means for this analysis, therefore we declared this cervical CC as being of gestational origin based on data from an induced abortion 13 months previously.

Trophoblastic tumors, particularly CCs, produce up to 100 times the amount of b-hCG compared to a normal pregnancy. Therefore, the measurement and monitoring of the b-hCG concentration are of great diagnostic significance, and after therapy this hormone is the most important marker of disease recurrence.²⁰ However, in some cases of ectopic pregnancy, there have been cases of a very small increase or even a normal level of β -hCG.^{20–22} In our case, the serum b-hCG level of 13 mIU/mL created additional diagnostic confusion. In general, the diagnosis of a primary extrauterine CC is challenging because the clinical symptoms can be nonspecific and often mimic other pathological conditions.³

Choriocarcinomas show a great ability for vascular invasion

and can metastasize into the lungs, brain, liver and bone, and very rarely into the fetus.⁷ Because of the high metastatic potential, in cases of an extrauterine localization of a CC some authors recommend surgical resection followed by adjuvant chemotherapy.³ In most cases, a CC is treated effectively with chemotherapy, whereas hysterectomy is the option only in cases of extensive uterine hemorrhage, as with our patient.^{16,23}

References

- Dehner LP. Gestational and nongestational trophoblastic neoplasia: a historic and pathobiologic survey. *Am J Surg Pathol.* 1980; **4**: 43 – 58.
- Lurain JR, Sand PK, Brewer JI. Choriocarcinoma associated with ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1986; **68**: 286 – 287.
- Chen MJ, Yang JH, Lin MC, Ho HN, Yang YS. An unusual gestational choriocarcinoma occurring primarily on the surface of a subserous leiomyoma. *BJOG.* 2004; **111**: 188 – 190.
- Weiss S, Amit A, Schwartz MR, Kaplan AL. Primary choriocarcinoma of the vulva. *Int J Gynecol Cancer.* 2001; **11**: 251 – 254.
- Zanetta G, Maggi R, Colombo M, Bratina G, Mangioni C. Choriocarcinoma coexistent with intrauterine pregnancy: two additional cases and a review of the literature. *Int J Gynecol Cancer.* 1997; **7**: 66 – 77.
- Saito M, Azuma T, Nakamura K. On ectopic choriocarcinoma. *World Obstet Gynecol.* 1965; **17**: 459 – 484.
- Robboy SJ, Anderson MC, Russell P. Pathology of the female reproductive tract. Philadelphia; Churchill Livingstone, 2002.
- Nayama M, Lucot J, Boukerrou M, Collinet P, Cosson M, Vinatier D. Tubal choriocarcinoma: a case report and review of the literature. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 2007; **36**: 83 – 86.
- Fox H. Gestational trophoblastic disease: neoplasia or pregnancy failure? *BMJ.* 1997; **314**: 1363 – 1364.
- Fu Y, Lu W, Zhou C, Xie X. Primary cervical choriocarcinoma: report of four cases and literature review. *Int J Gynecol Cancer.* 2007; **17**: 715 – 719.
- Tsai YS, Su SC, Wang TT, Hsu CT, Lin YN. Primary choriocarcinoma in the uterine cervix: report of 4 cases. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol.* 1988; **14**: 285 – 292.
- Kairi-Vassilatou E, Papakonstantinou K, Grapsa D, Kondi-Paphiti A, Hasiakos D. Primary gestational choriocarcinoma of the uterine cervix: Report of a case and review of the literature. *Int J Gynecol Cancer.* 2007; **17**: 921 – 925.
- Maestá I, Michelin OC, Traiman P, Hokama P, Rudge MV. Primary non-gestational choriocarcinoma of the uterine cervix: A case report. *Gynecol Oncol.* 2005; **98**: 146 – 150.
- Wang D, He Y, Hu Y, Xie C, Yin R. Placental site trophoblastic tumor with unusual presentation in the uterine cervix. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010; **148**: 100 – 101.
- Kalhor N, Ramirez PT, Deavers MT, Malpica A, Silva EG. Immunohistochemical studies of trophoblastic tumors. *Am J Surg Pathol.* 2009; **33**: 633 – 638.
- Morgan JM, Lurain JR. Gestational trophoblastic neoplasia: an update. *Curr Oncol Rep.* 2008; **10**: 497 – 504.
- Hassadia A, Gillespie A, Tidy J, Everard RGNJ, Wells M, Coleman R, et al. Placental site trophoblastic tumour: clinical features and management. *Gynecol Oncol.* 2005; **99**: 603 – 607.
- Popiolek DA, Yee H, Mittal K, Chiriboga L, Prinz MK, Caragine TA, et al. Multiplex short tandem repeat DNA analysis confirms the accuracy of p57 (KIP2) immunostaining in the diagnosis of complete hydatidiform mole. *Hum Pathol.* 2006; **37**: 1426 – 1434.
- Zhao J, Xiang Y, Wan XR, Feng FZ, Cui QC, Yang XY. Molecular genetic analyses of choriocarcinoma. *Placenta.* 2009; **30**: 816 – 820.
- Speroff L, Fritz MA. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 7th eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
- Mehra R, Huria A, Gupta P, Mohan H. Choriocarcinoma with negative urinary and serum beta human chorionic gonadotropin (betaHCG) - a case report. *Indian J Med Sci.* 2005; **59**: 538 – 541.
- Chumworathayi B, Kleebkaow P. Primary Non-Gestational Uterine Cervical Choriocarcinoma with Metaplastic Transformation from Squamous Cells. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2007; **8**: 642 – 644.
- Horowitz NS, Goldstein DP, Berkowitz RS. Management of trophoblastic neoplasia. *Semin Oncol.* 2009; **36**: 181 – 189.

Abdominal Colposacropexy With Permanent Polypropylen Mesh

J Ivovic, D Kljakic, S Raicevic

Citation

J Ivovic, D Kljakic, S Raicevic. *Abdominal Colposacropexy With Permanent Polypropylen Mesh*. The Internet Journal of Gynecology and Obstetrics. 2012 Volume 16 Number 3.

Abstract

Introduction: Colposacropexy presents the gold standard for the treatment of vaginal prolapse. The incidence for vaginal vault prolapse is about 15% of women who underwent hysterectomy due to uterine prolapse, and in about 1% of women who had any other reasons for hysterectomy. **The aim of the study:** We describe here our experience with abdominal colposacropexy in the treatment of the vaginal vault prolapse occurring after hysterectomy with and without urinary stress incontinence. **Material and methods:** From 1999 to 2009 we treated 15 women with vaginal vault prolapse occurring due to hysterectomy. Our procedure included the use of non-absorbable permanent polypropylen mesh by abdominal approach. The women treated with colposacropexy using polypropylen mesh by abdominal approach reported satisfactory improvement of quality of life, no recurrent vaginal prolapse, urinary stress incontinence, no dyspareunia, no bowel dysfunction. **Results:** Follow up was between 9 months and 10 years (3.7 years). All patients reported satisfactory results with significant improvement of quality of life. There was no recurrence of the prolapse, no de novo urinary stress incontinence or dyspareunia. **Conclusions** : Abdominal sacrocolpopexy with permanent mesh is a safe and effective treatment of the vaginal vault prolapse after hysterectomy.

INTRODUCTION & OBJECTIVES

Vaginal vault prolapse is a rare event after hysterectomy, affecting quality of life by its local physical effects (pressure, bulging, heaviness or discomfort) or its effect on urinary, bowel or sexual function. Urinary symptoms include both symptoms related to incontinence or urinary retention (incomplete emptying), bowel symptoms include constipation or faecal incontinence, and symptoms of sexual dysfunction include dyspareunia (pain during intercourse) or avoiding intercourse due to embarrassment.(1)

Vaginal vault prolapse is mostly a preventable complication of hysterectomy. Adequate suspension of the vaginal apex after hysterectomy with use of shortened cardinal and uterosacral ligaments will draw the proximal vagina over the levator plate. This results in support for the distal vagina. The essence of surgical repair of vaginal vault prolapse is to create a new suspension with the same vaginal support. Transvaginal sacrospinous fixation and transabdominal sacrocolpo-suspension accomplish this.(2)

The goal of this work is to reveal cure of the vaginal vault prolapse after hysterectomy with polypropylene non –

absorbable permanent mesh, Prolene monofilament (totally macroporous).

We describe here our experience with abdominal colposacropexy in the treatment of the vaginal vault prolapse occurring after hysterectomy with and without urinary stress incontinence.

MATERIAL AND METHODS

From 1999 to 2010 fifteen colposacropexy were performed at women with extended vaginal vault prolapse (mean age 58 years). In all of these patients a hysterectomy was performed many years ago.

Vaginal vault prolapse outside of the introitus vagine and extended cystoenterorectocoele which dramatical augmentation with cough, was found in all patients. Mucosa of the vagina was torrid and choppy and sometimes bleeding. Nine women did not have a preoperative incontinence. While in six women urinary incontinence was present. In these six women abdominal colposacropexy was performed with midleurethral sling by transobturator approach.

Classification of vaginal vault prolapse stages with Pelvic Organ Prolapse – Quantification System which devised International Continence Society (table – 1).

Figure 1

Table 1: Classification of vaginal vault prolapse

PELVIC ORGAN PROLAPSE QUANTIFICATION SYSTEM				
Stage 0 No descent of pelvic structures during straining	Stage I The leading edge of the prolapse is >1 cm above the hymenal ring	Stage II The leading edge of the prolapse extends from 1 cm above the hymen to 1 cm below the hymenal ring.	Stage III The leading edge of the prolapse extends from 1 cm above the hymen to >1 cm below the hymenal ring, but no further than 2 cm less than TVL. (total vaginal length)	Stage IV The vagina is completely everted.
N° of patients				
0	0	0	7	8

Seven women had stage III with prolapsed vaginal vault below the hymenal ring, and eight had completely everted vagina (Fig.1).

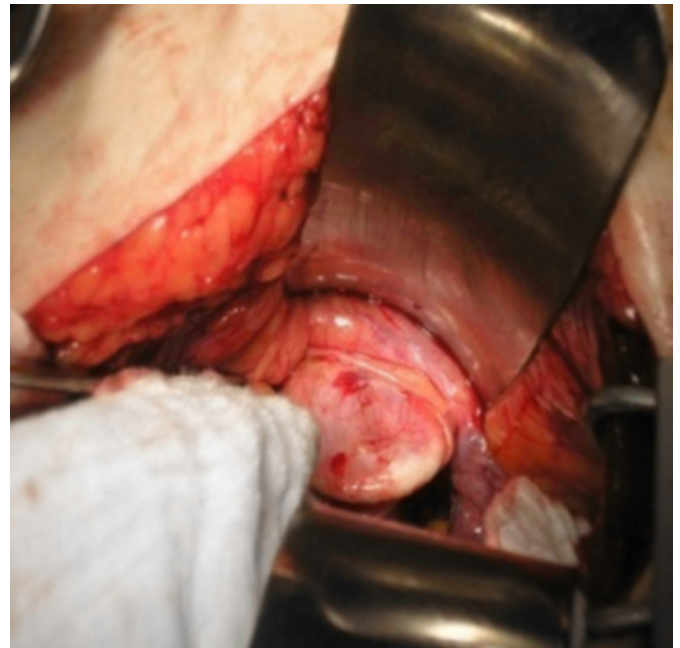
Figure 2

Fig. 1 – Appearance preoperatively



Figure 3

Fig. 2 - Vaginal wall back in the abdomen



All of them had to strain to urinate and six had to pass water, one patient had residual urine 150 cm.

At follow - up the patients were interviewed about bladder, bowel and sexual symptoms.

A pelvic examination and measurement of residual urine was done. Perioperative complications and any interim surgery were recorded.

Transabdominal approach was performed in all patients, in 11 patients by Pfannenstiel incision (because hysterectomy was performed by same incision), and in 4 patients by medial laparotomy. Enfranchise vaginals sides (Fig.2). Back to the mm. levatores ani (Fig. 3), and ahead to the bladder neck, where touch balloon catheter (Fig. 4).

Figure 4

Fig. 3 – rectovaginal space

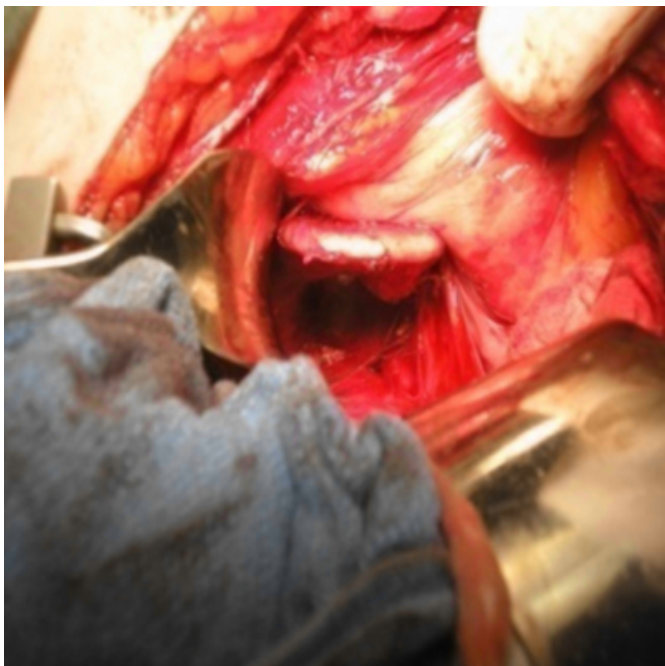


Figure 5

Fig. 4 – vesicovaginal space



the sutures in a transverse line 1 to 2 cm apart and 3 to 4 cm distal to the vaginal apex. On the top of the vaginal apex, we place 1 -3 stitches for posterior leaf of the mesh. Above sacral promontorium opening peritoneum right lateraly of the mesosigma (Fig.5), and fixation mesh for promontorium with one non - absorbable stitch 3/0 (Fig.6).

Figure 6

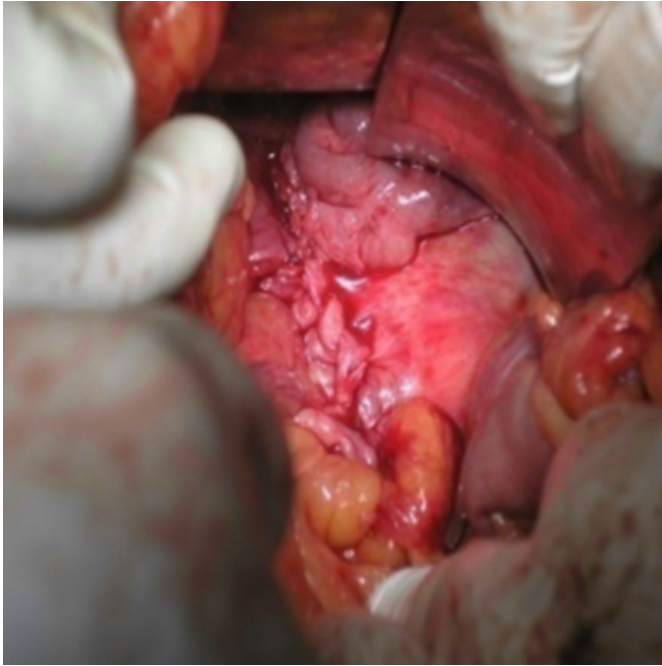
Fig. 5 – Fixation mesh for promontorium



Placement polypropylene mesh, which fixation along vaginal wall and for mm.levatoris ani with absorbable stitches 3/0. Thread each suture initially through the posterior leaf of the mesh, placed deeply through the fibromuscular thickness of the posterior vaginal wall, then bring it back out through the mesh at the same point. Place

Figure 7

Fig.6 - Mesch covering



Peritoneum was closed above polypropylene graft (Fig.6). After operation vaginal wall is retraction inside (Fig.7).

Figure 8

Fig. 7 – Appearance after surgery



No serious perioperative complication were seen. Drainage was removed after 24 hours. Patients discharged from hospital after 3 days.

RESULTS

Average follow – up was 3.7 years, range 9 months – 10 years, finding one (6.6%) recurrent vaginale prolapse, no reject grafts, no residual urine, no bowel dysfunction. No patients had coital problems due to the colposacropexy. Sexual activity did not change after surgery. Five patients with preoperative sexual inactivity did not resume sexual activity after surgery.

All of patients had no problems with urination. In the patients with preoperativ Stress Urinary incontinence, after implantation tension – free midurethral tape by transobturator approach success cure rate was 83.3%. In one woman there was no improvement after procedure.

DISCUSSION

The essence of surgical repair of vaginal vault prolapse is to create a new suspension with the new vaginal support.

Transabdominal sacrocolpo-suspension accomplish this.(2)

Sexual activity also did not change after surgery. The impact of prolapse itself on sexual activity may be little.(3) The main causes of postoperative sexual inactivity were absent partner in 3 cases and in two patients were fear of the sexual activity.

Recurrent pelvic organ prolapse is not an uncommon finding after colpexy and it may adversely affect patient satisfaction.(4)

It emphasizes that abdominal repair of rectoceles is not easily achieved and may be confounded by persistent or even deteriorating bowel dysfunction.(5)

Due the prevention bowel dysfunction, we pulled the mesh under the sigmoid colon to the sacral promontorium, when is necessary, especially when is redundant colon. We believe that it contributed to no bowel dysfunction. (6)

The abdominal approach yields better results than the vaginal route. Fixation of the vaginal vault using a prosthesis is more rational and was the method of choice. (7)

Abdominal sacrocolpexy with permanent mesh is a safe and effective treatment of the vaginal vault prolapse after hysterectomy.

Vaginal approach often results in a narrowed and shortened vagina with diminished of the function. If maximum vaginal length is the objective, it is best maintained with a sacral colpexy.(8)

Although the vaginal approach was associated with a shorter operative time and decreased hospital stay in the short term, longer postoperative catheter use was necessary. In addition more urinary tract infections and postoperative incontinence and a higher overall failure rate have been recorded. Native tissues are not as strong as synthetic materials. In postmenopausal women, a repair in which the thin, atrophic vaginal apex is secured to the sacrospinous ligament will not have the same durability as a repair involving mesh. In vaginal paravaginal repair, the extensive periurethral dissection required can damage fine branches of the pudendal nerve that innervate and control the urethral sphincter.

Such extensive dissection is not required for paravaginal repair from the abdominal approach. In the vaginal approach, it can be difficult to gain adequate exposure high in the retroperitoneum to reattach the endopelvic fascia of the vaginal apex to the arcus at its origin just distal to the ischial spine.

Abdominal approach avoids these problems and restores physiological position of the vagina. Therefore the abdominal approach is more durable, and should be used in this indication. Abdominal sacral colpopexy with polypropylene graft is a safe and efficacious treatment of the posthysterectomy vaginal vault prolapse. Vaginal repair often results in a narrowed and shortened vagina with diminished function. Abdominal sacral colpopexy attaches

the vaginal walls to the sacral promontory and restores the physiological position of the vagina. Peritonisation of the graft is easy and does not prolong operation time (6).

CONCLUSIONS

Abdominal sacrocolpopexy with permanent mesh is a safe and effective treatment of the vaginal vault prolapse after hysterectomy.

References

1. Bai SW, Kwon HS, Chung DJ. Abdominal high uterosacral colpopexy and abdominal sacral colpopexy with mesh for pelvic organ prolapse. *Int J Gynecol Obstet*; 2006; 92:147-8.
2. Dony JM. Treatment of vaginal vault prolapse. *Neth J Surg*; 1989 Dec; 41(6):152-5.
3. Jeon MJ, Moon YJ, Jung HJ, Lim KJ, Yang HI, Kim SK, Bai SW. A Long-Term Treatment Outcome of Abdominal Sacrocolpopexy. *Yonsei Med J*; 2009 Dec 31;50(6):807-13. Epub 2009 Dec 18.
4. Blanchard KA, Vanlangendonck R, Winters JC. Recurrent Pelvic Floor Defects After Abdominal Sacral Colpopexy. *J Urol*. 2006 Mar;175(3 Pt 1):1010-3; discussion 1013.
5. Snyder TE, Krantz KE. Abdominal-retroperitoneal sacral colpopexy for the correction of vaginal prolapse. *Obstet Gynecol*; 1991;77:944-9.
6. Ivovic J, Djordjevic M, Zejnilovic N. Repair of vaginal vault prolapse with colposacropexy using polypropylene mesh graft material. *Eur Urol*; 2008;3(9):59.
7. Traiman P, De Luca LA, Silva AA, Antonini R, Dias R, Rodrigues JR. Abdominal colpopexy for complete prolapse of the vagina. *Int Surg*; 1992;77:91-5.
8. Given FT Jr, Muhlendorf IK, Browning GM. Vaginal length and sexual function after colpopexy for complete uterovaginal eversion. *Am J Obstet Gynecol*; 1993 Aug;169(2 Pt 1):284-7; discussion 287-8.

Author Information

Jovan Iovic

Department of Urology, General Hospital

Dusko Kljatic

Department of Gynecology, General Hospital

Sasa Raicevic

Obs&Gyn Clinic, Clinical Center of Montenegro