

Czynnik martwicy nowotworów (TNF) w przebiegu wzrostu mięśniaków macicy

Tumor necrosis factor in uterine leiomyomas at various stages of tumor growth

Wolańska Małgorzata¹, Taudul Ewelina¹,
Bańkowska-Guszczyn Emilia¹, Kinalski Maciej²

¹ Zakład Biochemii Lekarskiej Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

² Oddział Ginekologii, Wojewódzki Szpital Zespolony w Białymstoku

Streszczenie:

Cel pracy: Celem pracy była ocena ekspresji czynników martwicy nowotworów (TNF) α i β oraz ich receptora TNF RI oraz pomiar zawartości TNF- α w przebiegu wzrostu masy mięśniaków.

Materiał i metody: Materiałem były operacyjnie wyluszczone, małe (do 10g) i duże (powyżej 100g) mięśniaki trzonu macicy. Stosowano metody Western immunoblot oraz metodę immunoenzymatyczną (ELISA).

Wyniki: Wykazano zmiany w ekspresji czynników martwicy nowotworów α i β i ich receptorów oraz różnice w zawartości TNF- α w przebiegu wzrostu masy mięśniaków.

Wnioski: Przemianie myometrium w kierunku mięśniaka i wzrostowi jego masy towarzyszy zmiana ekspresji oraz zawartości TNF i TNF RI.

Słowa kluczowe: **czynniki martwicy nowotworów / mięśniaki macicy / TNF / TNF RI /**

Summary

Objectives: The aim of the study was to evaluate the expression of tumor necrosis factors - α and β (TNF), their receptor and content in human uterine leiomyomas at various stages of tumor growth.

Material and Methods: Studies were performed on human myometrium and uterine leiomyomas of various weights (small: less than 10g and large: more than 100g). Presence of both growth factors and their receptor was detected by Western Immunoblotting technique. The content of TNF- α was evaluated by immunoenzymatic method (ELISA).

Results: Changes in the expression of tumor necrosis factors and their receptor and difference in content of TNF- α during the tumor growth were found.

Conclusions: Myometrium conversion into leiomyoma and an increase in its mass is accompanied by changes in the expression and contents TNF and TNF RI.

Key words: **tumor necrosis factor / leiomyoma / TNF / TNF RI /**

Adres do korespondencji:

Małgorzata Wolańska
Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
15-089 Białystok, ul. Mickiewicza 2c
tel. 85 748 56 10, fax 85 748 55 78,
e-mail: ma.wolanska@interia.pl

Otrzymano: 15.03.2010
Zaakceptowano do druku: 30.05.2010

Wstęp

Mięśniaki należą do łagodnych zmian rozrostowych macicy. Za powstawanie mięśniaków odpowiadają przede wszystkim zmiany zawartości hormonów steroidowych jajnika, głównie estrogenów. Wiadomo również, że za procesy wzrostu i różnicowania odpowiadają peptydowe czynniki wzrostowe [1, 2].

Rola peptydowych czynników wzrostowych w rozwoju mięśniaków wydaje się tym ważniejsza, ponieważ mogą one modulować działanie estrogenów. Z drugiej strony estrogeny zwiększają syntezę czynników wzrostowych oraz ich receptorów. W ten sposób w mięśniakach macicy może dochodzić do stałej, samostymulującej się proliferacji i hiperplazji [1, 3].

Nasze wcześniejsze badania wykazały przebudowę macierzy pozakomórkowej w przebiegu wzrostu mięśniaków, przy udziale peptydowych czynników wzrostowych [4, 5, 6, 7].

Peptydowe czynniki wzrostowe mogą wywierać efekty regulacyjne na komórkę tylko wtedy, gdy zwiążą się ze specyficznym dla siebie receptorem błonowym i przekażą sygnał do wnętrza komórki [8, 9]. Wysoka zawartość niektórych peptydowych czynników wzrostowych i ich receptorów w mięśniakach sugeruje, iż w przebiegu wzrostu tych guzów dochodzi do hiperstymulacji komórek.

Nasze wcześniejsze badania wykazały, że w przebiegu wzrostu mięśniaków dochodzi do akumulacji peptydowych czynników wzrostowych, takich jak IGF-I, EGF, PDGF, TGF- β czy FGF [10, 11]. Zawartość niektórych zwiększa się wraz ze wzrostem masy mięśniaków, co niewątpliwie sprzyja rozrostowi mięśniaków. Zasadniczy wpływ na ilość peptydowego czynnika wzrostowego w tkance odgrywa proces ekspresji kodującego go genu. Wzrost mRNA najczęściej skutkuje wzrostem zawartości konkretnego białka – czynnika wzrostowego.

Cel pracy

Czynniki martwicy nowotworów stanowią ważną grupę cytokin, wykazujących plejotropowe działanie. Hamują proliferację komórek nowotworowych oraz pobudzają proces apoptozy, a z drugiej strony sprzyjają powstawaniu przerzutów. Ten ostatni proces związany jest z wpływem TNF na wzrost syntezy i aktywacji metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej [12].

Biologicznie aktywny TNF wydzielany jest do przestrzeni pozakomórkowej i działa poprzez specyficzne receptory błonowe. Jeden z nich – TNF RI jest charakterystyczny dla większości komórek zawierających jądro i ma podobne powinowactwo zarówno do formy błonowej, jak i wydzielniczej TNF [13, 14, 15]. Interesujące zatem wydaje się określenie roli TNF w przebiegu wzrostu mięśniaków macicy.

Materiał i metody

1. Materiał tkankowy

Materiałem do badań były operacyjnie wyluszczone, małe mięśniaki trzonu macicy o masie nieprzekraczającej 10g, uzyskane od 15 kobiet (średnia wieku 43,4 \pm 4,1) oraz duże mięśniaki – o masie powyżej 100g, pochodzące od 15 kobiet (średnia wieku 46,4 \pm 3,6).

Mięśniaki uzyskiwano po amputacji nadpochwowej trzonu macicy lub po jej całkowitym usunięciu. Badano mięśniaki o jednakowym typie histologicznym – *leiomyoma* i o jednakowych cechach morfologicznych: MI<5, bez martwicy,

o nieznamiennej atypii. Materiałem kontrolnym były fragmenty niezmięnionej mięśniakowato macicy (*myometrium*). Pochodził on od 12 kobiet (średnia wieku 52,1 \pm 4,5), u których usuwano macicę z innych przyczyn niż nowotwory łagodne i złośliwe. Od wszystkich kobiet materiał pobierano w fazie proliferacyjnej cyklu miesięcznego.

Na przeprowadzone badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UMB.

2. Ocena zawartości peptydowych czynników wzrostowych

Tkanki homogenizowano przy pomocy homogenizatora nożowego (25 000 obrotów/min, 45 sek., 4°C) i homogenizatora ultradźwiękowego (20 kHz, 4 x 15 sek., 4°C) i ekstrahowano w środowisku 0,05M buforu Tris\HCl, pH 7,6. Po odwirowaniu (10 000 x g, 15 min., 4°C) w uzyskanych ekstraktach dokonywano dalszych oznaczeń.

Zawartość TNF- α w ekstraktach oceniano przy pomocy metody immunoenzymatycznej (ELISA), stosując gotowy zestaw firmy R&D Systems, USA i procedury zalecane przez producenta w załączonych instrukcjach.

3. Ocena ekspresji TNF i jego receptorów

Ekspresję badanych czynników wzrostowych i receptora TNF RI oceniano metodą *Western immunoblot* [16]. Stosowano jako pierwsze: monoklonalne przeciwciała w mianie 1:1000 przeciwko ludzkim TNF- α , TNF- β , oraz TNF RI. Jako drugie stosowano przeciwciała (miano 1:7500) przeciwko koziej IgG, sprzężone z fosfatazą alkaliczną.

4. Analiza statystyczna

Wyniki pomiarów ilościowych poddawano analizie matematycznej. Obliczano wartości średnie oraz odchylenia standardowe (SD). Analizy statystycznej dokonano przy pomocy testu „t”-studenta, po uprzedniej weryfikacji wyników badań testem Shapiro-Wilka i Lillieforsa. Za znamienne statystycznie przyjęto różnice pomiędzy średnimi przy $p < 0,05$.

Wyniki badań wykonywanych techniką *Western immunoblot*, przedstawiono w postaci immunoblotów, reprezentatywnych dla poszczególnych analiz.

Wyniki

Rycina 1 przedstawia zawartość TNF- α . Wynika z niej, że w największej ilości czynnik ten występuje w macicy kontrolnej, a jego zawartość wynosi 0,20ng/g tkanki. Mięśniaki, niezależnie od wielkości zawierają mniejszą ilość tego czynnika. Mięśniaki duże odpowiednio – 0,16ng/g, mięśniaki małe – 0,09ng/tkanki.

Rycina 2 przedstawia ekspresję TNF- α w badanych tkankach. Wykazano przy pomocy przeciwciał przeciwko TGF- α , iż badane ekstrakty tkankowe zawierają endogenne czynniki wzrostowe. Masa cząsteczkowa wolnego TGF- α wynosi około 17kDa. Elektroforeza i *Western immunoblot* wykazują pasmo odpowiadające takiej masie cząsteczkowej. Analiza wyników pozwala sądzić, że ekspresja tego czynnika jest najbardziej widoczna w mięśniach macicy, nieco mniej w mięśniakach dużych, a najmniejsza w mięśniakach małych. Spostrzeżenia te są zgodne z pomiarami ilościowymi metodą ELISA przedstawionymi na ryc. 1.

Rycina 3 wskazuje na ekspresję czynnika martwicy nowotworów β . Wykazano, przy pomocy przeciwciał przeciwko TNF- β , iż badane ekstrakty tkankowe zawierają endogenne

Czynnik martwicy nowotworów (TNF) w przebiegu wzrostu mięśniaków macicy.

TNF. Masa cząsteczkowa wolnego czynnika wynosi około 18kDa. Elektroforeza i *Western immunoblot* wykazują obecność pasma odpowiadającego takiej masie cząsteczkowej. Na *Western immunoblot* widoczne jest jedno intensywne pasmo, reagujące z przeciwciałem przeciw TNF- β . Jest ono widoczne w ekstrakcie z mięśnia macicy (ścieżka 1), w ekstraktach z mięśniaków małych (ścieżka 2), a najbardziej intensywne w przypadku ekstraktów z mięśniaków dużych (ścieżka 3).

Rycina 4 wykazuje obecność TNF-RI w badanych tkankach. Wykazano przy pomocy przeciwciał przeciwko temu receptorowi, iż badane ekstrakty tkankowe zawierają TNF-RI. Masa cząsteczkowa tego receptora wynosi około 55kDa. Elektroforeza i *Western immunoblot* wykazują obecność pasma odpowiadającego takiej masie cząsteczkowej. Szczególnie intensywne jest pasmo widoczne w ekstrakcie z mięśnia macicy (ścieżka 1), nieco mniej intensywne w materiale pochodzącym z mięśniaków małych (ścieżka 2) i mięśniaków dużych (ścieżka 3).

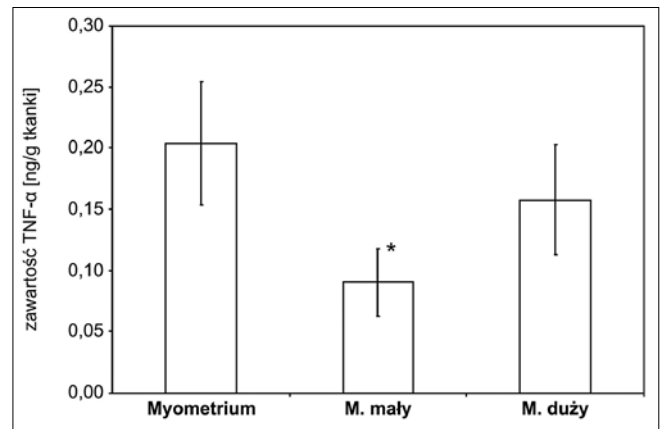
Dyskusja

W wielu procesach, a szczególnie rozrostowych dochodzi do zmiany morfologii i funkcji komórek, jak również do przebudowy otaczającej je macierzy pozakomórkowej. Nasze wcześniejsze badania wykazały, iż skład macierzy pozakomórkowej mięśnia macicy i mięśniaków tego narządu różni się znacząco. Wspomniane guzy zawierają więcej kolagenu, zmieniają się relacje ilościowe pomiędzy kolagenami różnych typów. Wzrasta zawartość siarczanowanych glikozoaminoglikanów, a w szczególności siarczanu heparanu [4].

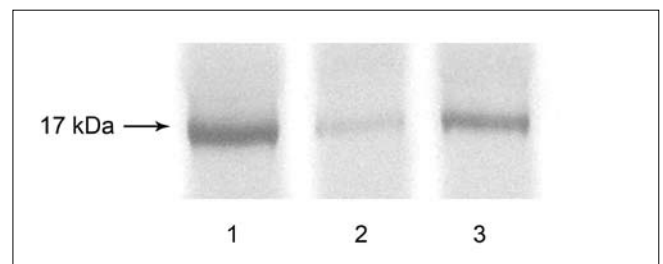
Peptydowy czynnik wzrostowy może wyrzucić efekt regulacyjny na komórkę tylko wtedy, gdy zwiąże się ze specyficznym dla siebie receptorem błonowym i przekaże sygnał do wnętrza komórki [17, 18]. Stan taki jest możliwy po uwolnieniu czynnika z kompleksów ze składnikami macierzy. Wykazaliśmy, iż w badanych tkankach zarówno TNF- α , jak i TNF- β występują w postaci wolnej, zdolnej do aktywacji receptora. Czynniki te działają poprzez dwa typy receptorów: TNF-RI o masie cząsteczkowej 55kDa oraz TNF RII o masie cząsteczkowej 75kDa. Różnią się one stopniem glikozylacji oraz powinowactwem do TNF, przez co mogą przekazywać komórce odmienne sygnały. Receptory tych czynników są obecne prawie we wszystkich jądrzastych komórkach ssaków [14].

W niniejszej pracy wykazaliśmy, iż badane tkanki zawierają TNF-RI. Elektroforeza i *Western immunoblot* wykazują obecność pasma odpowiadającego masie cząsteczkowej tego receptora. Interesującym wydaje się fakt, iż intensywne pasmo widoczne jest w ekstrakcie z mięśnia macicy i mięśniaków dużych. Wyniki te korelują z zawartością i ekspresją TNF- α , który to działa głównie przez ten typ receptora i łącząc się z nim rozpoczyna kaskadę reakcji, których efektem jest działanie biologiczne. Receptor TNF RI zwany również receptorem p55 jest odpowiedzialny za cytotoksyczność czynników martwicy nowotworów wobec komórek nowotworowych.

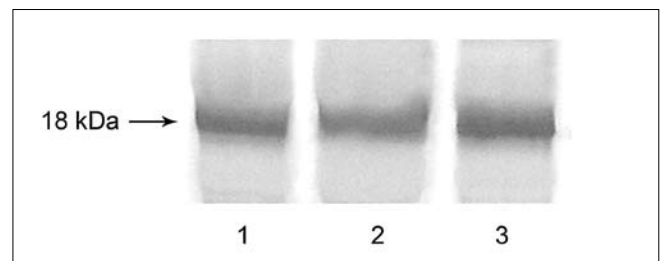
Natomiast TNF RII (p75) jest odpowiedzialny za efekty ostrej fazy. TNF- α jest czynnikiem wykazującym wiele przeciwstawnych efektów biologicznych. Wykazuje właściwości przeciwnowotworowe poprzez bezpośrednie działanie na komórki rakowe, hamowanie angiogenezy oraz pobudzanie odpowiedzi immunologicznej przeciw nowotworowi. Z drugiej strony może indukować apoptozę komórek nowotworowych lub hamować



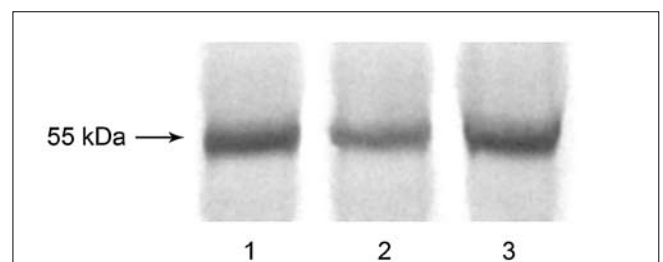
Rycina 1. Zawartość TNF- α w badanych ekstraktach* - p < 0,05.



Rycina 2. *Western immunoblot* wskazujący na ekspresję TNF- α w *myometrium* (ścieżka 1), w mięśniakach małych (ścieżka 2) i w mięśniakach dużych (ścieżka 3). Elektroforezie poddano 20 μ g białka zawartego w ekstraktach. Po lewej stronie zaznaczono pozycję standardu mas cząsteczkowych.



Rycina 3. *Western immunoblot* wskazujący na ekspresję TNF- β w *myometrium* (ścieżka 1), w mięśniakach małych (ścieżka 2) i w mięśniakach dużych (ścieżka 3). Elektroforezie poddano 20 μ g białka zawartego w ekstraktach. Po lewej stronie zaznaczono pozycję standardu mas cząsteczkowych.



Rycina 4. *Western immunoblot* wskazujący na ekspresję TNF-RI w *myometrium* (ścieżka 1), w mięśniakach małych (ścieżka 2) i w mięśniakach dużych (ścieżka 3). Elektroforezie poddano 20 μ g białka zawartego w ekstraktach. Po lewej stronie zaznaczono pozycję standardu mas cząsteczkowych.

proliferaację komórek nowotworowo zmienionych. W działaniu przeciwnowotworowym TNF współdziała z interferonem alfa, czy też interleukinami -1 i -2 [13, 14, 15].

Ponieważ receptory dla tego czynnika są obecne w wielu komórkach, cytokina ta jest ważnym regulatorem ekspresji wielu genów, np. z grupy transkrypcyjnych czynników jądrowych. Konsekwencją współdziałania czynników i ich receptorów jest amplifikacja szlaków sygnałowych w komórkach, indukująca ekspresję genów wielu białek odpowiedzialnych za proliferację komórek czy też zmiany ich metabolizmu [19]. Ras-zależne MAP-kinazy: ERK₁ i ERK₂ są wspólną drogą przekazywania sygnałów badanych przez nas czynników. Ekspresja tych białek sygnałowych wyraźnie zwiększa się w mięśniakach dużych, co wykazaliśmy w naszych wcześniejszych pracach [11]. W niniejszej pracy stwierdziliśmy wzrost ekspresji receptora TNF-RI w *myometrium* i w mięśniakach dużych.

Podsumowując peptydowe czynniki wzrostowe odgrywają ważną rolę zarówno w transformacji nowotworowej, jak również w biologii komórek nowotworowych. Pewne onkogeny kodują białka ściśle spokrewnione lub identyczne z niektórymi czynnikami wzrostowymi. W komórce nowotworowej ulegają one nadekspresji lub amplifikacji, co w efekcie końcowym zdecydowanie zwiększa ilość czynników wzrostowych. Ponieważ komórki nowotworowe posiadają jednocześnie receptory dla wielu czynników wzrostowych, ulegają wielostronnemu, autokrynnemu lub parakrynnemu pobudzeniu [20, 21].

Konsekwencją działania peptydowych czynników wzrostowych jest hiperplazja i hipertrofia tych komórek. Pozwala to sądzić, iż w tej sytuacji istnieją warunki do szybkiego wzrostu wspomnianych guzów.

Reasumując można założyć, iż pierwotną przyczyną rozwoju mięśniaków jest hiperstymulacja komórek *myometrium* przez estrogeny [22, 23, 24].

Przyпускаjąc, że hiperplazja zwiększa liczbę komórek syntetyzujących składniki macierzy i czynniki wzrostowe. Zwiększona zawartość proteoglikanów heparanosiarczanowych sprzyja wiązaniu peptydowych czynników wzrostowych w macierzy pozakomórkowej, a wzmożona aktywność metaloproteinaz, trawiących rdzenie białkowe proteoglikanów, ułatwia ich uwalnianie [12, 25, 26]. Powstaje cykl wzajemnie pobudzających się reakcji, którego efektem jest postępujący wzrost guza i przebudowa jego macierzy pozakomórkowej.

Wnioski

Czynniki martwicy nowotworów i ich receptory obok innych cząsteczek regulacyjnych, odpowiadają za wzrost mięśniaków.

Piśmiennictwo

- Lethaby A, Vollenhoven B. Fibroids Uterine Myomatosis, Leiomyomas. *Am Fam Physician*. 2005, 71, 1753-1756.
- Corda S, Samuel J, Rappaport L. Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev*. 2000, 5, 119-130.
- Flake G, Anderson J, Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ Health Perspect*. 2003, 111, 1037-1054.
- Wolańska M, Sobolewski K, Drożdżewicz M, [et al.]. Extracellular matrix components in uterine leiomyoma and their alteration during the tumour growth. *Mol Cell Biochem*. 1998, 189, 145-152.
- Wolańska M, Bańkowski E. An accumulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) in human myometrium and uterine leiomyomas in various stages of tumour growth. *Eur Cytokine Netw*. 2004, 15, 359-363.
- Wolańska M, Bańkowski E. Fibroblast growth factor (FGF) in human myometrium and uterine leiomyomas in various stages of tumour growth. *Biochimie*. 2006, 88, 141-146.
- Wolańska M, Bańkowski E. Transforming growth factor beta and platelet-derived growth factor in human myometrium and in uterine leiomyomas at various stages of tumour growth. *Eur J Obst Gyn Reprod Biol*. 2007, 130, 238-244.
- Schuppan D, Ruhl M. Matrix in signal transduction and growth factor modulation. *Braz J Med Biol Res*. 1994, 27, 2125-2141.
- Bosman F, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. 2003, 200, 423-428.
- Wolańska M, Jaworski S. Czynniki wzrostu naskórka (EGF) w przebiegu wzrostu mięśniaków macicy. *Ginekol Pol*. 2005, 76, 643-647.
- Wolańska M. Macierz pozakomórkowa mięśniaków macicy - jako rezerwuar peptydowych czynników wzrostowych. Rozprawa habilitacyjna. Białystok: AMB, 2007, 1-129.
- Inagaki N, Ung L, Otani T, [et al.]. Uterine cavity matrix metalloproteinases and cytokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. *Eur J Obst Gyn Reprod Biol*. 2003, 111, 197-203.
- Wcisło G, Korniluk J, Szarlej-Wcisło K, [et al.]. Leczenie chorób nowotworowych czynnikiem martwicy nowotworów-alfa (TNF-alfa). *Współczesna Onkologia*. 2002, 4, 222-227.
- Korobowicz A. Biologia czynnika martwicy nowotworów typu alfa. *Pol Merk Lek*. 2006, 124, 358-361.
- Balkwill F. Tumour necrosis factor or tumour promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002, 13, 135-141.
- Schultz D, Bazel S, Wright L, [et al.]. Western blotting and enzymatic activity analysis of cathepsin D in breast tissue and sera of patients with breast and benign breast disease. *Cancer Res*. 1994, 54, 48-54.
- Schuppan D, Ruhl M. Matrix in signal transduction and growth factor modulation. *Braz J Med Biol Res*. 1994, 27, 2125-2141.
- Lee J, Juliano R. Mitogenic signal transduction by integrin and growthfactor receptor-mediated pathways. *Mol Cells*. 2004, 17, 188-202.
- Kurachi O, Matsuo H, Samoto T, [et al.]. Tumor necrosis Factor- α Expression in Human Uterine Leiomyoma and Its Down-Regulation by Progesterone. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2001, 86, 2275-2280.
- Petruzelka L. Diagnosis and treatment of tumor metastases. *Vnitř Lek*. 2001, 47, 555-560. Czech.
- Jarząb B. Nowotwory. W: Patofizjologia kliniczna dla studentów medycyny. Red. Zahorska-Markiewicz B, Malecka-Tendera E. Wrocław: Volumed, 2001, 31-75.
- Sozen I, Arici A. Interaction of cytokines, growth factor and the extracellular matrix in cellular biology of uterine leiomyoma. *Fertil Steril*. 2002, 78, 1-12.
- Fayed Y, Tsibris J, Langenberg P, [et al.]. Human uterine leiomyoma cells: binding and growth responses to epidermal growth factor, platelet-derived growth factors and insulin. *Lab Invest*. 1989, 60, 30-37.
- Maruo T, Ohara N, Wang J, [et al.]. Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update*. 2004, 10, 207-220.
- Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J*. 1997, 11, 51-59.
- Ruostelahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. 1991, 64, 867-896.