

**Hormonális mechanizmusok humán uterus
myoma pathogenezisében**

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Kovács Kálmán András

**Program- és témavezető:
Prof. Dr. Sümegei Balázs**

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika
Pécs 2002**

Gyakrabban használt rövidítések jegyzéke

AP-1 : Aktivációs Protein-1

Cdk : ciklin függo (dependens) kináz

EGF : Epidermalis Growth Factor

ER : ösztradiol receptor

ERE : ösztrogén válasz-adó gén szakasz, estrogen responsive element

IGF : insulin-szeru növekedési factor (Insulin like Growth Factor)

OE : ösztrogén (ösztradiol)

P : progeszteron

PR : progeszteron receptor

SRC-1 : Steroid Receptor Coaktivátor -1

Tartalom

1. Bevezetés	5
2. Célkitűzések	13
3. Módszerek	15
3.1. Human uterus szövetek előkészítése. Betegek.....	15
3.2. Kémiai anyagok.....	17
3.3. Sejttenyésztési módszerek.....	18
3.4. Humán uterus szövetek vizsgálata.....	19
3.4.1. Western blot meghatározások.....	20
3.4.2. [H ³] ösztadiol kötődés meghatározása.....	21
3.5. Statisztika.....	17
4. Eredmények	
4.1. Humán myometrium és myoma simaizomsejtek szaporodásának jellegzetességei sejttenyésztésében.....	22
4.1.1. Kevertsejtes myometrium és myoma sejtek szaporodása hormonmentes környezetben.....	22
4.1.2. Ösztrogén hatása kevertsejtes myometrium és myoma sejtek szaporodásában.....	23
4.2. Ovarialis steroid receptorok expressziója human myometrium és myoma szövetekben.	
4.2.1. Ösztadiol receptor proteinek expressziója.....	26
4.2.2.[H ³] ösztadiol kötődése.....	28.
4.2.2.1. Nagy affinitású kötohelyek.....	29
4.2.2.2. Kis affinitású kötohelyek.....	29

4.2.3. Progeszteron receptorok.....	32
4.3. Sejtciklus szabályozásának jellegzetességei	
myometrium és myoma szövetekben.....	33
4.2.1. Ciklin D1 expresszió jellegzetességek.....	33
4.3. Apoptózis szabályozásának jellegzetességei	
myometrium és myoma szövetekben.....	35
4.4.1. Bcl-2 protein expresszió jellegzetességei.....	37
4.4.2. Bax protein jellegzetességei.....	38
5. Eredmények megbeszélése, következtetések	40
6. Eredmények rövid összefoglalója	50
7. Befejezés.....	52
8. Idézett irodalom.....	53
9. Tudományos munkák jegyzéke.....	67
10. Köszönetnyilvánítás.....	72

1.Bevezetés

Humán uterus myoma a női genitális tractus leggyakoribb daganata. A reprodukív években fordul elő (Crum 1999). Ez a megbetegedés a nők mintegy 25 % -át érinti, érdemes megemlíteni azt, hogy patológiai vizsgálatok tanúsága szerint az előfordulás jóval magasabb, mintegy 77%-os (Cramer és Patel 1990). A myoma benignus daganat, és igen ritkán malignizálódik (Crum 1999), mégis igen sok reprodukív és nőgyógyászati probléma okozója lehet, mint pl. infertilitás, abortus, kis medencei fájdalom, vérzési rendellenesség (Buttram és Reiter 1981). Az USA-ban évente megközelítőleg 200.000 hysterectomia oka myoma (Gambone , Reiter 1997). A myoma gyógyítása, a tünetek kezelése a pathomechanizmusra vonatkozó pontos adatok hiánya miatt, többnyire nem oki megfontolásokon nyugszik, a hysterectomia indikációi között vezető helyen áll. Sterilitásban, abortusokban felismert szerepük miatt, további terhességek reményében a szervmegtartó műtétek egyre inkább előtérbe kerültek. A myoma daganatok igen erőteljes újraképződési hajlama miatt azonban sem az endoszkópos úton történő myomectomia, sem a különböző hormonális kezelések (GnRH analógok, anti-progeszteron) nem képesek a betegség végleges megoldására és igen gyakran nem kívánatos mellékhatások forrásai lehetnek (Olive 2000). Egyre sürgetőbb az igény, orvosok és betegek oldaláról egyaránt, a megfelelő terápiás lehetőségek kidolgozására.

A daganat gyakoriságának ellenére kevés információ áll rendelkezésünkre a myoma etiológiájáról. A tumor egy myometriális sejt klonális expansiója révén alakul ki. A tumor kollagén gazdag, megfelelő vérellátással rendelkezik (Scully

1992), myometriumba jellemző specifikus gének, mint simaizom specifikus a aktin, myosin, desmin expresszió kimutatható (Eyden és mtsai 1992, Cavallé és mtsai 1995).

Cytogenetikai vizsgálatok szerint a myoma nemcsak egy gén működésének meghibásodása miatt alakul ki. A vizsgált myomák több mint felében transzlokációs, duplikációs és deléziós változások egyaránt kimutathatóak voltak (Nilbert és Heim 1990, Pandis és mtsai 1991, Meloni és mtsai 1992). A megfigyelt cytogenetikai változások három csoportba oszthatók:

- ? a 7-es kromoszómán transzlokáció vagy deléció
- ? transzlokációk a 12-es és 14-es kromoszómákon
- ? zavarok a 6-os kromoszómán

Ugyancsak zavarokról számoltak be az 1, 3, 4, 9 és 10-es kromoszómák vonatkozásában is, de ezek a változások még kevésbé ismertek (Andersen 1998). Feltételezések szerint a myomákban kimutatható cytogenetikai zavarok csak másodlagos események a tumor kialakulásában, mivel az eltérések nem mindig és egy ugyanazon méhen belül nem mindegyik tumorban alakulnak ki (Mashal és mtsai 1994). Nem ismeretes az sem, hogy a megfigyelhető cytogenetikai zavarok melyik gén működését befolyásolják és hogyan korrelálnak a myoma tulajdonságaival, az egy uteruson belüli számával, nagyságával, progressziójával, stb. (Nilbert és Heim 1990, Meloni 1992, Rein és mtsai 1995).

Epidemiológiai vizsgálatok szerint a myoma 3-9-szer gyakoribb fekete nőkben, mint fehérekben (Kjerulff és mtsai 1993, Marshall és mtsai 1997). A fekete nőkben a myoma megjelenése átlagosan 4 évvel korábban figyelhető meg. Ezek a különbségek nem magyarázhatóak életmód és kockázati faktorok

különbségeivel (Marshall és mtsai 1998). Orosz kutatók vizsgálatai szerint a myomák elofordulásában családi halmozódás is megfigyelhető, 97 családban 215 myomában szenvedő betegről számoltak be, az elofordulási gyakoriság az elsőfokú rokonság körében 2,2-szeres volt (Vikhlyeva és mtsai 1995).

Myoma menarche előtt nem fejlődik ki és menopausa után visszafejlődik. Az esetek mintegy 20-30 % -ában 30 éves kor körül, több mint 40%-ában 40 év után, valamint terhesség alatt megnagyobbodik (Andersen és Barbieri 1995). Funkcionális életkorfüggése kétségtelenné teszi az ovariális szteroidok szerepét a tumor növekedésében.

Az elmúlt évtizedben számos vizsgálat tárgyát képezte és képezi jelenleg is. az ösztrogén és progeszteron receptorok analízise a myomában a myometriumhoz viszonyítva (Brandon és mtsai 1993, 1995, Englund és mtsai 1998, Rein és mtsai 1995, Shimomura és mtsai 1998 Kovács és mtsai 2001a), de ezek a vizsgálatok elsősorban a klasszikus ösztrogén receptorok, a jelenlegi nomenklatúra szerint az ösztradiol receptor (ER) alfa változásokat analizálják.

1996-ban kimutatták, hogy a korábban felfedezett klasszikus ER mellett egy új ösztrogén receptor, az ER béta is szerepet játszik az ösztradiol (OE) hatásának mediálásában (Kuyper és mtsai 1996). Az ER béta protein kisebb, mint az ER alfa. Struktúrájukat összehasonlítva megállapítható, hogy a DNS kötő doménjeikben nagyfokú a hasonlóság, így mindkét receptor kötődése ugyanazon "estrogen responsive elemekhez (ERE)" biztosítottnak látszik. A receptor aminosav végén elhelyezkedő A/B, a transzaktiváló alegységen jelentősek a különbségek, a ligandkötő alegységen pedig megközelítőleg 50 % a homológia. Ezek a különbségek a két receptor között eltérő hatásokat okozhatnak és okoznak is

(Nilsson és mtsai 2001). Mindkét receptor a hormonkötődés után dimért képez, ezek a dimérek lehetnek homodimérek, de egymással is kapcsolódhatnak és heterodiméreket alakítanak ki és így kapcsolódnak az adott DNS szakaszhoz a transzkripció szabályozása céljából (1. összefoglaló: Nilsson és mtsai 2001).

Az ösztadiol-receptor komplexek az ERE-n keresztül megvalósuló transzkripciós hatásuk mellett még befolyásolhatják a transzkripciót egyes általános transzkripciós faktorokon keresztül is. A legismertebb az ER Aktivációs Protein-1 (AP-1) család, a Fos és Jun proteinek közvetítésével vezérelt transzkripciós hatása.

A kilencvenes években végzett vizsgálatok eredményei szerint (1. Összefoglaló Nilsson és mtsai 2001) a szteroid hormonok, köztük az ösztadiol is, transzkripciós hatásait különböző regulátor fehérjék szabályozzák. Az első szteroid receptor koaktivátort 1995-ben identifikálták, ami SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1) elnevezéssel került az irodalomba. A koaktivátorok szerepének mechanizmusára több adat látott napvilágot (Nilsson és mtsai 2001, Hermanson és mtsai 2002).

Az eredeti hipotézis szerint a koaktivátorok az ER komplexet rögzítik a gén ERE régióihoz, biztosítva az effektív transzkripciós hatást, de enzimként is működhetnek, szabaddá téve a gén promóter régióját a receptor-ERE kötődéshez. A koaktivátorok mellett korepresszorok is ismertek, amelyek, ahogy a nevük is mutatja, gátolják a receptorok transzkripciós hatását, feltételezhetően hisztonok deacetilálása révén (Klinge 2000).

Az ER alfa és béta receptor típusok ERE-n keresztüli transzkripciós hatásai egyformák, de jelentős különbségek figyelhetők meg az AP-1 helyeken keresztül

történo hatásban. Az ER alfa ösztradiollal aktiváló hatást fejt ki, míg az ER béta gátolja az AP-1 vezérelt transzkripciós változásokat (Peach és mtsai 1997, Petterson és Gustafsson 2001).

A két típusú ER felfedezése óta több vizsgálat irányult az ER béta szerepére, a két ER kölcsönhatására. Több klinikai és kísérleti megfigyelés szerint az ER béta különböző sejtekben, így különböző szervek simaizomzatában, az érfalban, a vastagbélben antiproliferációs hatású (Gustafsson 1999). Ami a két receptor kölcsönhatását illeti, a vonatkozó adatok szerint az sejtspecifikus, és a kölcsönhatás függ a lokális ösztrogén (OE) szinttől (Hall és McDonell 1999, Weihua és mtsai 2000).

A myoma szövetben az ER alfa jelenléte, [H^3]ösztradiol kötése, ciklus alatti változását illetően számos adat áll az érdeklődő rendelkezésére. Az ER receptorok fokozott expressziója a myomában a kontroll myometriumhoz viszonyítva általánosan elfogadottnak tunik, de megoszlik a vélemény az ER receptorok változásairól a menstruációs ciklus különböző fázisaiban (Andersen és mtsai 1995, összefoglaló Andersen 1998, Kovács és mtsai 2001a). Mások beszámoltak arról, hogy az ösztrogén szint a tumorban messze magasabb, mint a környező myometriumban (Burroghs és mtsai 1997). Egyre több adat számol be arról, hogy a myoma növekedésében lokálisan képződő növekedési faktorok (EGF, IGF, opioid peptidek) is szerepet játszanak, bár hatásmechanizmusuk még nem tisztázott (Shimomura és mtsai 1998, Környei és mtsai 1999, Englund és mtsai 2000, Dixon és mtsai 2000). Tetszetosnek tunnek Andersen és Barbieri (1995) vizsgálatai, akik szerint a myoma sejtek jobban hasonlítanak a terhességi myometriális sejtekhez, mint a ciklus alatti myometriális sejtekhez. A

hasonlóság megnyilvánul, többek között, az OE és P (progeszteron) receptorok, IGF, EGF, egyes extracelluláris proteinek, connexin 43 fokozott expressziójában. A terhességi myometrium sejtek azonban visszarendeződnek a terhesség végén, míg a myoma sejtek “remodeling” képességgel nem rendelkeznek és változatlanul megtartják fokozott receptor és növekedési faktor szintézisüket, valamint fokozott hormonérzékenységüket (Cesen-Cummings és mtsai 2000).

A myoma pathogenezisének vizsgálatakor egyre fokozottabb figyelem fordul a progeszteron és progeszteron receptorok szerepére. Antiprogeszteron RU 486 kezelés után a myoma regrediál (Murphy és mtsai 1993, Rein 2000), a menstruációs ciklus alatt a myoma mitotikus aktivitása a legmagasabb a szekréciós fázisban (Kawaguchi és mtsai 1985, Tiltman 1985, Matsuo és mtsai 1998). A progeszteron receptorok (PR) mindkét formája, az A és B, fokozottan expresszálódik a tumorban (Kastner és mtsai, 1990, Viville és mtsai 1997). Progeszteron hatására fokozódik az antiapoptotikus Bcl-2 expresszió myoma sejtek kultúrájában (Matsuo és mtsai 1997).

Biológiai értelemben a daganatok leglényegesebb vonása a sejtek folyamatos, regulálatlan felhalmozódása. Ennek oka, igen leegyszerűsítve, a sejtketkezés és a sejthalál közti fiziológiai egyensúly felbomlása. Feltételezhető, hogy a myoma keletkezésében a sejtek képződésének ill. pusztulásának zavarai is szerepet játszanak.

A sejtosztódás egy szigorúan szabályozott eseménysor, több fázisra, G1-S-G2-M, osztható. Az egyes fázisok közötti átmenet szabályozott. A szabályozásban ciklindependens kinázok (cdk) és ciklinek játszanak elsődleges szerepet. A ciklin

függő kinázok aktivitását a ciklinek szabályozzák, egy holoenzimet alkotnak, ahol a katalitikus alegység a cdk, és a regulatorikus alegység a ciklin. A ciklin D típusok regulálják a G0-G1 fázis átmenetet, azaz a sejtek osztódási fázisba történő belépését, hatásukat az ösztrogének több szinten szabályozzák.

Emlo tumor és uterus sejtvonalakban kimutatták, hogy az ösztradiol fokozza a ciklin D1 expressziót és a cdk4 és cdk2 aktivitást (Foster és Wimalasena 1996, Altucci és mtsai 1997, Prall és mtsai 1997). Ugyancsak bizonyított, hogy a ciklin D1 kötődik az ER-hez, aktiválja a receptor indukált transzkripciót ösztrogén hiányában is (Zwijssen és mtsai 1997). A ciklin D1-ER komplex transzkripciós hatásában az egyik koaktivátor az SRC1 (Steroid Receptor Coaktivátor 1) is résztvesz. Az SRC egy LLXXL (L leucin, X bármilyen aminosav) motívumhoz tud kapcsolódni. Hasonló motívum a ciklin D1 molekulán is megtalálható, s ennek eredményeként a ciklin D1 is képes rekrutálni a koaktivátorokat. Ha a ciklin D1 kötődik az ER-hez, hidat, alakít ki az ER és SRC között és létre hozza a transzkripciót. Abban az esetben, ha egy sejtben ösztrogén és ciklin D1 is jelen van, akkor a transzkripciós hatás felerősödik, mert egyrészt a hormonnal aktivált ösztrogén-receptor, másrészt a ciklinnel aktivált ösztrogén-receptor is résztvesz annak megvalósításában (Barnards 1999).

A sejtciklus szabályozás zavarairól, a ciklin-cdk rendszer esetleges szerepéről myoma vonatkozásában igen keveset tudunk. A mi adataink voltak az elsők, amelyek felvetették a ciklinek szerepét a myoma pathogenezisében (Kovács és mtsai 2001a).

Ahogy a fentiekben említettem, a daganat képződésében az aktív sejtpusztulás, az apoptózis mértéke is igen fontos elem. Az apoptózis szabályozásában igen

fontos szerepet játszanak a Bcl-2 gén család tagjai, amelyek között találhatunk apoptózist serkento (pl. Bax, Bad,) és gátló (pl. Bcl-2, Bcl-x_s) fehérjéket is. A szabályozás jellegét egyrészt meghatározzák azok a fehérje-fehérje kapcsolatok, amelyek a család tagjai között alakulnak ki. A család tagjai képezhetnek homodiméereket, de egymással is kapcsolódhatnak heterodiméerekként. Az antiapoptotikus proteinek túlsúlya gátolja a citokróm C release-t a mitokondriumokból, a proapoptotikus fehérjék pedig fokozzák, aminek eredményeként egy Apaf-1 enzim aktiválja az apoptózist elindító proteáz család, a kaszpáz-9 kaszkádot (Chau és Korsmayer 1998).

Néhány adat arra utal, hogy a myomában folyó apoptózis szabályozásában az ovariális steroid hormonok szerepet játszanak. Myoma sejtenyészetben progeszteron fokozza az antiapoptotikus Bcl2 expressziót (Matsuo és mtsai 1997), a Bax protein expressziója fokozódik a menstruációs ciklus szekréción fázisában (Wu és mtsai 2002) és menopauzában (Kovács és mtsai 2001b).

2. Célkituzések

Vizsgálataink elsodleges célja az volt, hogy megismerjünk olyan sejtszintu eseményeket, amelyeken keresztül az ovariális szteroidok kiválthatják a daganat növekedését, illetve azokat az eseményeket, amelyek szerepet játszanak a tumor regressziójában.

Ennek megfeleloen 49 humán uterusból származó myomában és az ugyanazon uterusból származó myometrium mintákban párhuzamosan elemeztük a menstruációs ciklus különböző stádiumaiban, valamint a menopausa első évében

1. a myoma sejtek szaporodásának ütemét a myometrium sejtekhez hasonlítva
2. a myoma és myometrium sejtek OE érzékenységet, proliferációs képességüket
3. a kéttípusú ösztrogén receptor és progeszteron receptor expresszióját
4. az ösztrogén receptorok [H^3]ösztradiol kötődésének paramétereit
5. a sejtciklus G0/G1 fázisában szerepet játszó ciklin D1 szinteket, valamint
6. az apoptózist szabályzó antiapoptotikus Bcl-2 és a proapoptotikus Bax proteinek expresszióját.

Másodlagos célunk az eredmények hatékonyabb, értékelhetőbb összehasonlításának javítása. Ahogy a „Bevezetés”-ben említettem, annak ellenére, hogy sok klinikai megfigyelés mellett számos laboratóriumi vizsgálat veti fel az ovariális szteroid hormonok szerepét, mechanizmusát a myoma növekedésében, a vonatkozó adatok nem egységesek. Ennek okát elsősorban abban látom, hogy az alkalmazott módszerek igen változatosak, találunk adatokat, amelyek különböző típusú sejttenyészetekből, míg mások

immunhisztológiai vizsgálatokból származnak, s így az eltéro, esetlegesen egymásnak ellentmondó eredmények nehezen értékelhetőek.

Jelen vizsgálatainkban ezeket a faktorokat kívántuk kizárni, kidolgoztunk egy egységes szövetnyerési és feldolgozási rendszert, aminek alapján nagyobb számú mintából nyert vizsgálati eredmények összehasonlíthatóvá váltak. A vizsgálatokban kontrollként minden alkalommal a myomás uterusból, a lehetőségekhez képest a myomától mindig egyenlo távolságban elhelyezkedo egészséges myometriumot használtunk.

3. Módszerek

A vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Humán Etikai Bizottsága engedélyezte. A betegeket a vizsgálatokról tájékoztattuk és beleegyezésüket kértük és kaptuk azokhoz.

3.1. Human uterus szövetek elokészítése. A vizsgálatba bevont betegek hormonális hátterének jellemzése.

A vizsgálatokat hysterectomiás mutétekből származó 49 humán uterusból nyert myoma és myometrium szöveteken végeztük. A betegek életkora 38 és 56 év között volt, a műtétet megelőzően 3 hónapig hormonális kezelésben nem részesültek. A hysterectomiás műtétek indikációjában rosszindulatú elváltozások nem szerepeltek. A vizsgált uterusok közül 34 menstruációs ciklussal rendelkező (átlag életkor \pm SD: 46 ± 5.1 év), míg 15 a menopausa korai szakaszában lévő (átlag életkor: 54 ± 2.7 év) olyan betegekből származott, akiknek az utolsó vérzése legalább 3, de kevesebb mint 12 hónapnál korábban történt. A menopausa meglétét Se FSH szint meghatározásával igazoltuk, amit a műtét reggelén levett vérből határoztunk meg immunoluminometriás módszerrel (RIA-MAT, Byk-Sagtec Diagnostica, Germany).

Az uterusokból a műtét után azonnal, steril körülmények biztosítása mellett, uterus onként egy-egy myomát disszekáltunk. A myomák száma uterusonként egy és öt között változott, átmérojük 10-50 mm volt. A vizsgálatokhoz olyan

myomát választottunk, amelynek átméroeje 35-40 mm volt és az uterus falában helyezkedett el. A myomákat a myometriumból kihámoztuk, majd a daganat felszíne alatt közvetlenül elhelyezkedő szövetrészt használtuk fel a vizsgálatokhoz. Kontrollként ugyanazon uterusból származó ép myometrium szövetet alkalmaztunk, ami 10 mm-nél távolabbra helyezkedett el a tumoros szövevttől.

Csak azokat a tumorokat vontuk be a vizsgálatokba, amelyek nem mutattak degenerációra utaló jeleket és a szövettani diagnózis is megerosította a “myoma” klinikai diagnózisát. Ugyancsak pathológiai diagnózis alapján soroltuk be a vizsgálati mintákat a menstruációs ciklus stádiumaiba. A vizsgálatok során a mutét reggelén levett vérből az ösztrogén és progeszteron szintek is meghatározásra kerültek ugyancsak immunoluminometriás módszerrel (RIA-MAT, Byk-Sagtec Diagnostica, Germany), amelynek eredményeivel pontosítottuk a ciklus stádiumok beosztását. Ennek eredményeként a betegeket 4 csoportba osztottuk: proliferációs fázisban 14, szekréciós fázisban 15 beteg volt, a mutét napján 5 beteg menstruált és 15 olyan betegünk volt, akik a menopausa első évében voltak.

A betegektől a mutét reggelén vért vettünk a vér ösztradiol, progeszteron és FSH szintek meghatározásához. Az eredményeket az I. Táblázat mutatja. A hormon értékek és a rendelkezésünkre álló egyéb adatok (szövettan, anamnézis) igen jó összhangban vannak. Ennek megfelelően a csoportosítást alkalmazhatónak tartottuk az uterus szövevteken kapott eredményeink elemzésére és értékelésére.

I. Táblázat. A vizsgálatba bevont betegek hormonális státusza a műtét reggelén.

	Proliferációs fázis, (n: 14)	Szekréciós fázis (n:15)	Menstruáció (n:5)	Menopausa (n: 15)
Oestradiol (pmol/l)	285 ± 37	349 ± 115	116 ± 45	45 ± 12
Progeszteron (nmol/l)	1,32 ± 0,7	22,7 ± 6,9	4,6 ± 2,2	1,3 ± 0,9
FSH (IU/l)	8,9 ± 2,1	4,4 ± 1,6	2,9 ± 0,9	38 ± 7,9

A betegek csoportjait az uterusok szövettani vizsgálatának eredményei alapján alakítottuk ki, s ezekhez rendeltük a kapott hormon értékeket. Az egyes értékek a csoporthoz tartozó betegek hormonszintjének átlagát ± SD mutatja.

A fentiek szerint nyert szövetmintákat kísérleti céloknak megfelelően vagy azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, majd -80°C -on tároltuk a feldolgozásig, vagy a sejtlaboratóriumba szállítottuk sejttenyésztés elindításához (l. részletesen a Sejttenyésztési módszereknél).

3.2. Kémiai anyagok

(2, 4, 6, 7 $-H^3$)ösztradiolt (spec. aktivitás 3,4 TBq/mmol; MTA Budapest, Hungary) használtunk a vizsgált szövetek ösztadiol kötődésének meghatározására. A vizsgálatokban a következő antitesteket alkalmaztuk:

monoklonális anti ER α (ER1D5), anti PR (PR10A9) az Immunotech-tól, nyúl poliklonális IgG anti ER α és anti ciklin D1 protein, valamint antihuman Bcl2 és antihuman Bax polyclonalis antitest (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). A többi kémiai anyagot, ha nem jelöljük külön, a Sigmától (St. Louis, MO, USA) szereztük be.

3.3. Sejtenyésztési módszerek

A hysterectomia műtétekből származó humán myometrium és myoma kevertsejtes sejtvonalak készítése Környei korábban közölt módszere szerint (Környei és mtsai 1999) történt. A szövetmintákat közvetlenül a műtét után, steril körülmények között a hysterectomia során eltávolított uterusból kivágtuk, majd azonnal jéghideg HBSS 2 tápoldatba (Hanks Balanced Salt Solution: Sigma, pH 7.4, 2% N-2- hydroxietilpiperazin-N-2-etánszulfonsav (HEPES) puffer, Sigma 2%-os antibiotikus-antimikotikus oldat (Gibco)) helyeztük és olvadó jégen a sejtenyésztési laboratóriumba szállítottuk. A szövetmintákat 1-2 mm³ darabokra vágtuk, majd 15 percig 4°C-n Ca²⁺ és Mg²⁺ mentes Hank oldatban, 0.1 mg Tripsin EDTA/ml, 5 μ g DNase (typeI)/ml, 2% HEPES, pH 7.4 jelenlétében emésztettük. Az emésztést friss oldatokkal még négyszer megismételtük, az utolsó két emésztés esetében az alkalmazott hőmérsékletet 20°C-ra emeltük. Az utolsó tripszines emésztés után a szövetet kétszer kollagenáz enzimmel kezeltük (2 mg/ml HBSS 2+, 37°C, 1 óra). A végeredményként kapott sejtszuszpenziót lecentrifugáltuk, háromszor mostuk és a sejteket 1000 élosejt/cm² denzitásnak megfelelően elültettük. A sejteket 10%

foetális szarvasmarha szérumot (BSA) tartalmazó gazdagított Waymouth's oldatban tenyésztettük inkubátorban (5% CO₂ , 37°C) 2.2 nM ösztadiol jelenlétében ill. anélkül. A tápoldatot kétnaponta frissre cseréltük. A hormon kezelést a tenyészet második napján kezdtük el, amikor az életképes sejtek letapadása már teljessé vált. Az ösztadiol az egész tenyésztési idő alatt folyamatosan jelen volt. A tenyészeteket az összeérés fázis előtt állítottuk le, hogy a kontakt fázis torzító és szórást okozó hatását elkerüljük.

A sejtsűrűséget tripszines leválasztás és tripánkék vítfestést követő sejtszámlálással határoztuk meg. Egyes esetekben a sejtek milyenségét anti a aktin (simaiomsejtek) és anti type I. kollagén (fibroblastok) antitestek alkalmazásával immunhisztokémiai reakciók segítségével, avidin-biotin-peroxidáz módszerrel (Környei és mtsai 1999) ellenőriztük.

3.4. HUMAN UTERUS SZÖVETEK VIZSGÁLATA

3.4.1. Western blot meghatározások

A meghatározásokhoz a szöveteket homogenizáltuk TRIS –SDS pufferban, ami proteáz gátlóként 2.5 µg/ml aprotinin plusz 0.3 mM phenylmethylsulphonyl-fluorid keveréket tartalmazott, majd 5 percig forraltuk és centrifugáltuk. A fehérje koncentráció meghatározása (BioRad Protein Assay) után az extraktumot SDS storage pufferral kombináltuk, újra forraltuk és –20°C-on tároltuk a meghatározásig.

A vizsgált fehérjék szintjét Western blot technikával analizáltuk. A mintákból 100 µg fehérjét elektroforetizáltunk 10% SDS-t tartalmazó gélen, majd blottoltuk

a rutin technikák szabályait figyelembe véve. A membránokat blokkolást követően az adott első antitesttel 1: 1000 hígításban inkubáltuk.

Az antigén specificitás ellenőrzésére az első antitestet a megfelelő blokkoló peptidekkel (Santa Cruz) előinkubáltuk, majd ezzel is elvégeztük a meghatározást.

Az antigén-antitest reakciót tórmaperoxidázzal konjugált antitestekkel hívtuk elő kemilumineszcenciás módszer (ECL, Amersham) segítségével. A kapott csíkok erősségét denzitometriával határoztuk meg. Az eredményeket az összehasonlítás biztosítása érdekében relatív egységekben adtuk meg. Fél éve bizonyítottan menopausában lévő beteg uterusának myometriumból a fehérjét extraháltuk a fentiekben leírt módszer szerint. Ebből az u.n. "standard" extraktumból 100 µg mennyiséget minden kísérletben a vizsgált fehérjékkel együtt analizáltunk. A blotok denzitásának lemérése után, a "standardunk"-ban kapott denzitást 10-es értéknek tekintettük és ehhez viszonyítottuk a többi mintából nyert értékeket.

3.4.2. [H^3]ösztradiol kötődés meghatározása

A mintákat 0.1 mg/ml bacitracint tartalmazó TRIS-EDTA pufferben (pH 7.4) homogenizáltuk (10mg/ml), majd 800 g-vel centrifugáltuk 20 percen keresztül. A felülúszó leöntése után visszamaradó üledéket puffer oldatunkkal háromszor mostuk és az így kapott durva magfrakciót a homogenizálási térfogatra hígítva használtuk a kötődés meghatározására. DNS koncentrációt Burton (1956) módszerével határoztuk meg.

[H³] OE kötődés vizsgálatát az in vitro "OE-exchange" analízissel végeztük. 3-3 mintát (0.2 ml) 0.5-30 nM [H³]OE és 1000-szeres DES jelenlétében ill. anélkül 30° C-n 60 percig inkubáltuk.

A kötőhelyek szolubilizációja (0.5 M/l NaSCN, 0° C, 16 óra) után a nem kötött hormont dextranszal fedett szénhez adszorbeáltuk. A rádióaktivitást Packard Tricarb 2100 TR folyadékcintillációs mérőműszerben mértük meg. A ligand-receptor kötődés paramétereit szaturációs, Scatchard (1949) és Hill (1910) analízisek szerint elemeztük.

3.5. Statisztika

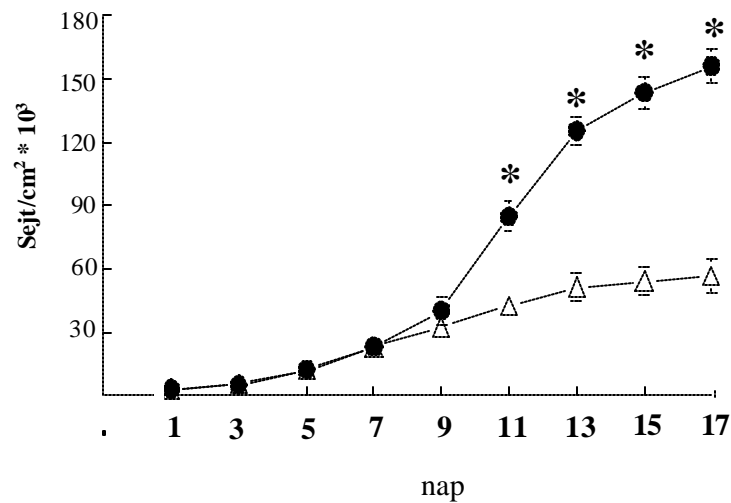
A kísérleteket legalább háromszor megismételtük. Az eredményeinket variancia analízissel (ANOVA) és az azt követő Student-Newman-Keul's „multiple range test” segítségével elemeztük. A myoma és kontroll myometriumból kapott értékeket „unpaired t test”-tel analizáltuk. Szignifikánsnak azokat a különbségeket fogadtuk el, ahol legalább $p < 0.05$.

4. Eredmények

4/1. HUMÁN MYOMETRIUM ÉS MYOMA SIMAIZOMSEJTEK SZAPORODÁSÁNAK JELLEGZETESSÉGEI SEJT TENYÉSZETBEN

4/1.1. Kevertsejtes myometrium és myoma sejtek szaporodása hormonmentes környezetben

Vizsgálatainkban első lépésként összehasonlítottuk az egészséges myometriumból illetve a myoma szövetekből izolált sejtek szaporodását (1. Ábra).



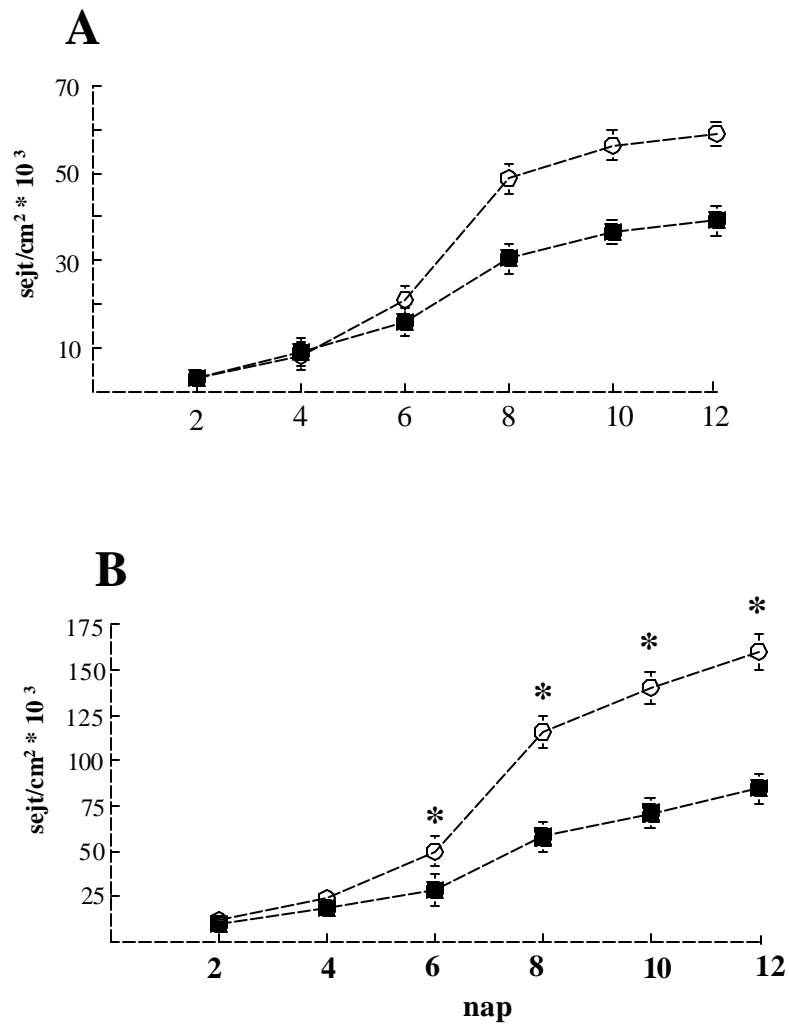
1.Ábra. Myoma (fekete kör, folytonos vonal) és myometrium sejtek (üres háromszög, szaggatott vonal) szaporodása a tenyésztési idő függvényében. Egy-egy érték 33 meghatározás átlagát ± S.E. mutatja. * $p < 0.05$ a kontroll értékekhez viszonyítva.

Eredményeink szerint a myomatosus izomsejtek tulajdonságai eltérést mutattak a kontroll myometrium sejtekhez viszonyítva. A myomasejtek szaporodása sokkal gyorsabb volt, mint az ugyanazon uterusból származó myometrium sejtéké. A különbség már a kezelés 9. napján megfigyelhető, a 17. napon a myoma sejtek száma mintegy háromszorosa a myometrium sejtek számának.

4.1.2. Ösztrogén hatása kevertsejtes myometrium és myoma sejtek szaporodására

OE hatására a két vizsgált szövet sejt kultúrája másképpen viselkedik. Myometrium primér sejtenyészetben (~50% simaizom sejt, ~ 50% fibroblast) 2.2 nM OE mintegy 40%-kal fokozta a sejtek szaporodását. OE indukált szignifikánsan gyors sejtszaporodást a tenyészet 6-12 napos korában észleltünk (2A. Ábra), az átlagos populáció megkettőződési ideje 2.1-2.5 nap volt.

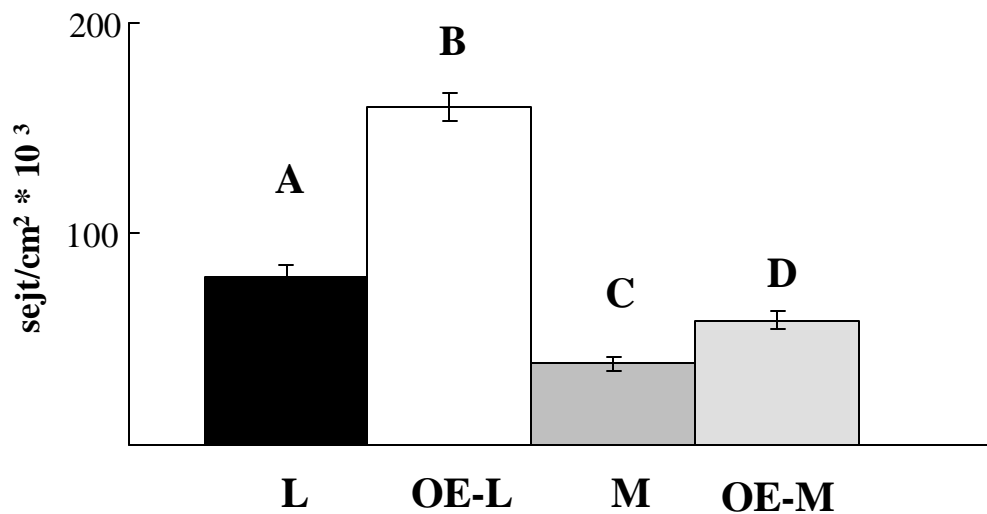
Myoma primér sejtenyészetben, ahol ugyancsak megközelítőleg 50-50% -ban található a simaizom és fibroblast sejteket, OE hatására a sejtek szaporodása ugyancsak jelentősen fokozódott. A növekedés üteme gyorsabb volt és a tenyésztési idő végére OE hatására a sejtek száma megkétszereződött (2B. Ábra), az átlagos populáció megkettőződési ideje sokkal rövidebb, 1.5-1.6 nap volt.



2. Ábra. OE hatása (2.2 nM) human uterus myometrium (A) és myoma (B) sejtek szaporodására primér sejttenyészetben. Fekete négyzetek a kontroll, az üres körök az OE kezelések hatását mutatják Egy-egy érték 33 meghatározás átlagát ? SE mutatja. * $p < 0.05$ a kontroll értékekhez viszonyítva.

Eredményeinket összefoglalva megállapítható, hogy a tumoros sejtek szaporodásának üteme hormonmentes környezetben is messze meghaladta az

egészséges myometriumból nyert sejtek szaporodási ütemét. OE hatására mindkét típusú simaizomsejt tenyésztésben a sejtek proliferációja fokozódik, de a myoma sejtek OE érzékenysége, s ennek következtében a sejtek szaporodásának üteme szignifikánsan magasabb, mint a myometriumban (3. Ábra).



3. Ábra. Ösztadiol kezelés hatása myoma és myometrium sejtek primér tenyésztésében a tenyésztés 12. napján. (L: myoma sejtek, OE- L: OE kezelt myoma sejtek, M: myometrium sejtek, OE-M: OE kezelt myometrium sejtek) Egy-egy oszlop 3-3 kísérletből számolt sejtek átlagát ? S.E: mutatja. A különböző betűkkel jelölt oszlopok értékei között a különbség szignifikáns $p < 0.05$

4.2. OVARIÁLIS SZTEROID RECEPTOROK EXPRESSZIÓJA HUMÁN MYOMETRIUM ÉS MYOMA SZÖVETEK BEN

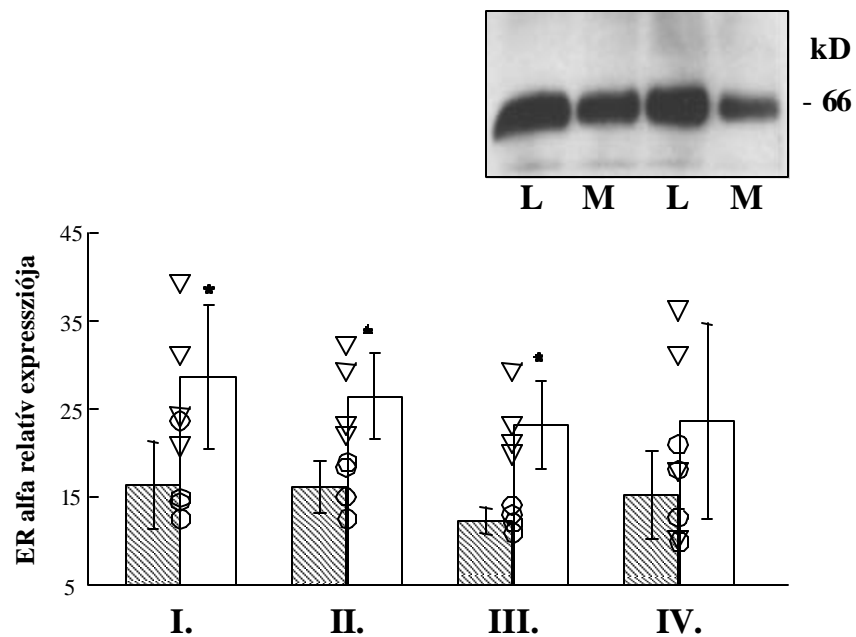
4.2.1 Ösztradiol receptor proteinek expressziója

Az OE hatása intracelluláris receptorokon keresztül valósul meg. Jelenlegi ismereteink szerint két típusú OE receptor, a klasszikus alfa, valamint az 1996-ban felfedezett ER béta felelős a hormon hatásokért. Mindkét ER ligand aktivált transzkripció faktor, de a molekulájukban meglévő eltérés a transzkripció hatásokat is érinti, amelyek esetlegesen szerepet játszhatnak az OE érzékeny jó és rosszindulatú daganatok pathomechanizmusában.

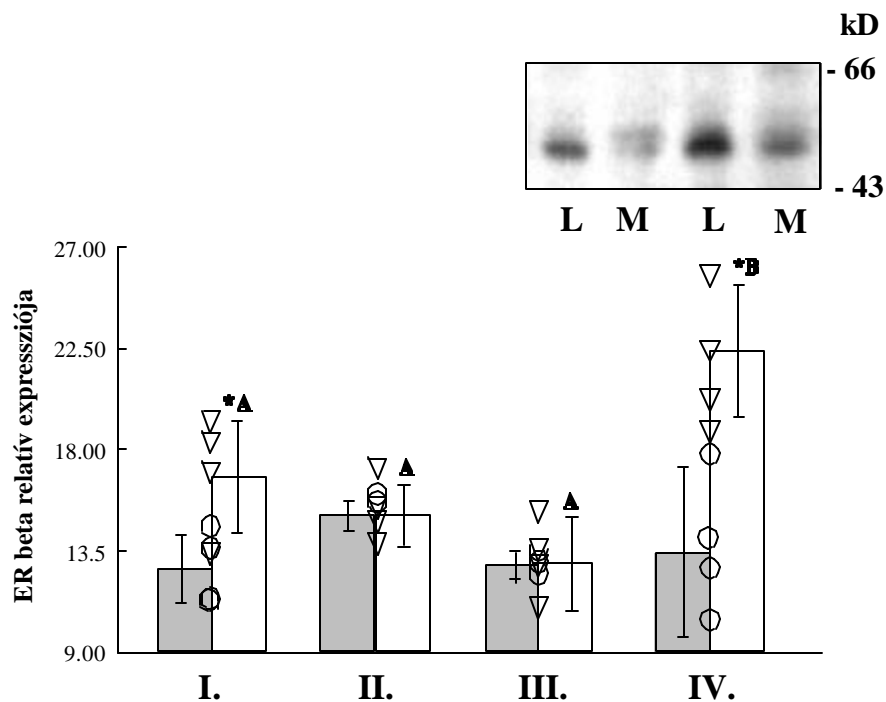
A klasszikus ER alfa Western blot technikával mindkét szövetben, a myomában és az ugyanazon uterusból nyert, kontrollként alkalmazott egészséges myometrium szövetben is kimutatható. Az ER alfa szintje szövet specificitást mutatott, a myomában minden vizsgált ciklus stádiumban, valamint menopausában magasabb volt. A különbség a reprodukív ciklusban lévő betegek uterusából származó myomák esetében szignifikáns volt. Ciklustól függő változások egyik szövetben sem voltak kimutathatóak (4. Ábra).

Az ösztradiol béta receptor expressziója szintén megfigyelhető a vizsgált szövetekben, bár a Western bloton detektálható jele jelentősen gyengébb volt mint az ER alfa esetében. A receptor fehérje szintek jelentősen különböztek az ER alfánál megfigyeltéktől. A legszembetűnőbb különbség, hogy a

menopausában lévo betegek uterusából származó myomákban az ER béta expressziója igen magas, az összes vizsgált esetet figyelembevéve a legmagasabb. A menstruációs ciklus proliferációs fázisában ugyancsak magasabb ER béta szint volt detektálható a myomákban, a többi esetben nem volt különbség sem a myoma-myometrium között, sem a különböző ciklus stádiumok között (5. Ábra.).



4. Ábra. Ösztradiol receptor alfa expressziója humán uterus myomában (üres oszlopok) és kontroll myometriumban (csíkozott oszlopok) a menstruációs ciklus alatt (I. proliferáció, II. szekréció, III. menstruáció) és menopausában (IV.). Az oszlopok 4-4 betegből származó adatok átlagát? SD értékeket mutatják. Az üres háromszögek az egyes myomákból, az üres körök pedig a kontroll myometriumból nyert egyedi értékeket mutatják. Insert: reprezentatív Western blot myoma (L) és myometrium (M) szövetekből. * $p < 0.05$ szignifikáns különbség myometrium és myoma szövetek között.



5. ábra. Ösztradiol receptor béta expressziója human uterus myomában (üres oszlopok) és kontroll myometriumban (csíkozott oszlopok) a menstruációs ciklus alatt (I. proliferáció, II. szekréció, III. menstruáció) és menopausában (IV.). Az oszlopok 4-4 betegből származó adatok átlagát ± SD értékeket mutatják. A háromszögek az egyes myomákból, az üres körök pedig a kontroll myometriumból nyert egyedi értékeket mutatják. Insert: reprezentatív Western blot myoma (L) és myometrium (M) szövetekből. Szignifikáns különbség ($p < 0.05$): *: myometrium és myoma, a különböző nagyságú betűk: a myoma minták között.

4.2.2. [H^3]ösztadiol kötődése

Két típusú nukleáris [H^3]ösztadiol kötohely detektálható a myoma és myometrium szövetekben. Szaturációs analízis eredmények alapján az egyik kötohely, az ún. type I., nagy affinitással (K_d 1.44-0.17 nmol/l) és kis kapacitással köti az OE-t, a szaturációs adatok Scatchard szerinti transzformációja lineáris görbét ad, a Hill koefficiens értéke ~1, kompetitív

kötődésre utal. A másik kötohely, az un. type II. pedig alacsonyabb affinitással (K_d 21? 4.1 nmol/l) és nagy kapacitással köti a hormont, Scatchard analízis egy felfelé konvex görbét ad, a Hill koefficiens pedig >1 , pozitív kooperációra jellegzetes értéku (6. Ábra).

4.2.2.1. Nagy affinitású kötohelyek

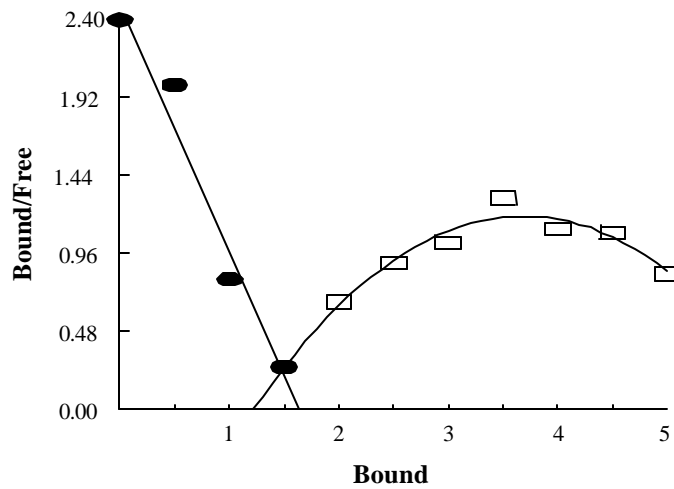
A nagy affinitású kötohelyek száma a menstruációs ciklus fázisaiban nagyobb volt a myoma-szövetekben, menopausában pedig megegyezett a myometrium mintákban kapott értékkel (7. Ábra). Változások figyelhetok meg a ciklus alatt. Myometriumban legmagasabb a kötohelyek száma a proliferációs fázisban, ez az érték 72-39 %-kal csökkent a többi fázisban. Myomában szintén a proliferációs fázisban legmagasabb a kötohelyek száma, de magasabb volt azokban az uterusokból származó daganatos szövetekben is, amelyek a mutét napján a menstruációs fázisban voltak. A legalacsonyabb a kötohelyek száma a menopausás uterusban.

4.2.2.2. Kis affinitású kötohelyek

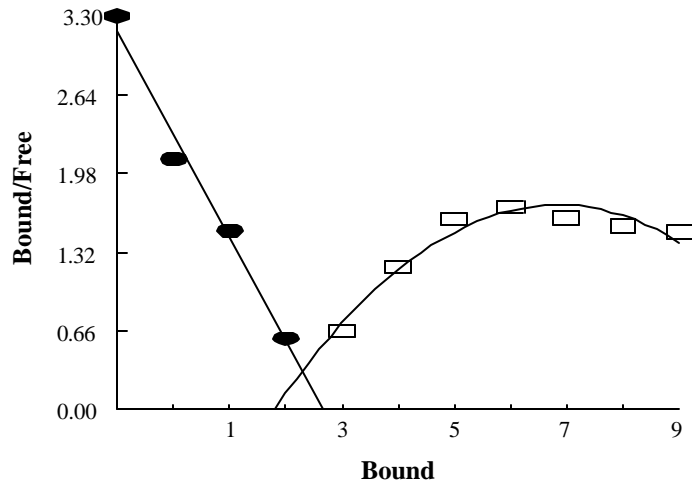
A kis affinitású, type II. kötohelyek száma (8. Ábra) mindkét szövetben a legmagasabb volt a proliferációs fázisban, myomában ekkor a kötohelyek száma több mint háromszorosára fokozódott a többi vizsgált fázishoz viszonyítva. További változások a myometriális szövetben nem mutathatók ki. A menopausában lévo uterusból származó myoma mintákban a kötohelyek száma

kétszer több, mint a kontroll myometrium szövetekben. Érdekes megjegyezni, hogy az alacsony affinitású kötohelyek száma és az ER béta receptor fehérjék (1. 5. Ábra) hasonló változásokat mutattak a vizsgált reprodukciós ciklusokban.

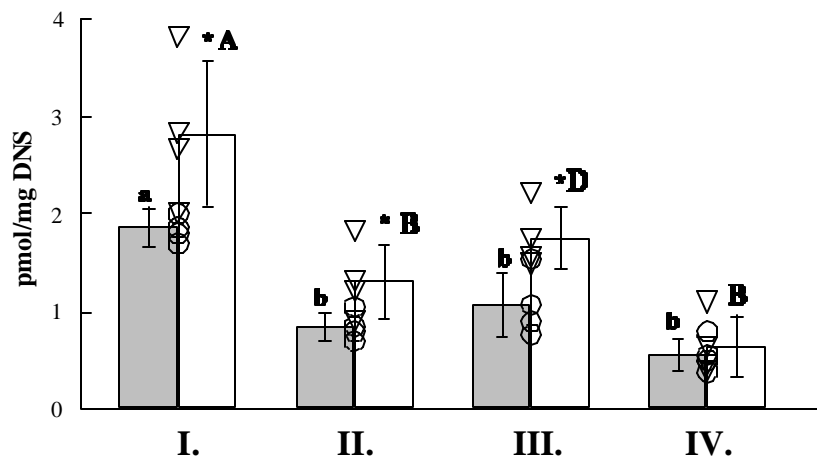
A



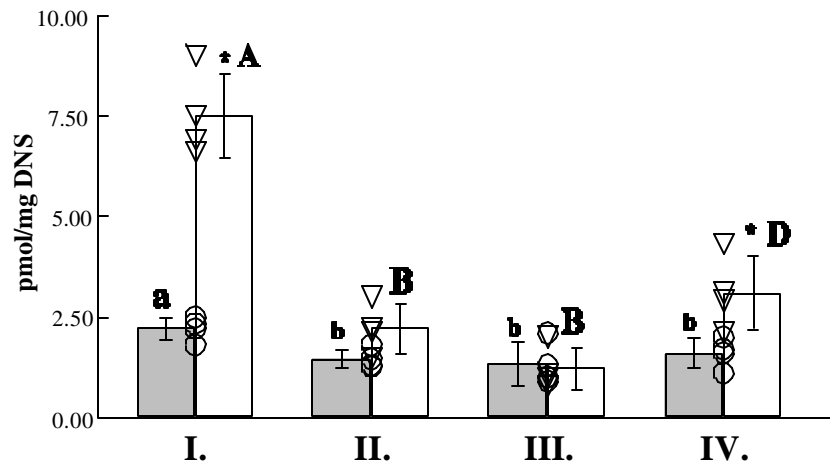
B



6. Ábra. Nukleáris $[H^3]$ ösztadiol kötohelyek reprezentatív Scatchard analízise human uterus myometriumban (A) és myomában (B) a menstruációs ciklus proliferációs fázisában. A nagy affinitású kötohelyeket a fekete elipszisek, a kis affinitású kötohelyeket pedig az üres téglalapok mutatják (Bound: kötött hormon, B/F: kötött/szabad hormon).



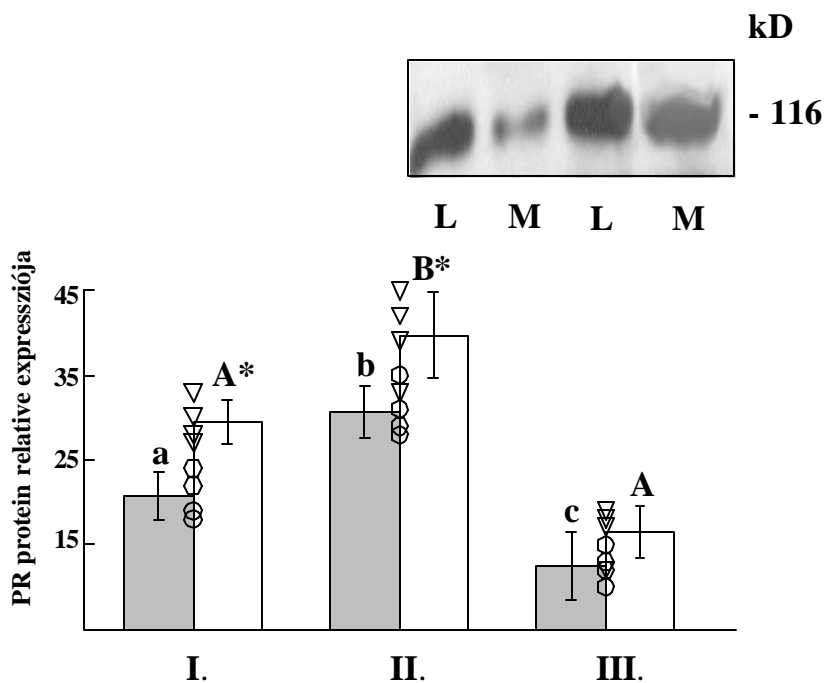
7. Ábra. Nukleáris nagy affinitású $[H^3]$ ösztadiol kötohelyek változásai a menstruációs ciklus alatt és menopausában humán uterus myometriumban (csíkozott oszlopok, körök) és myomában (üres oszlopok és háromszögek). Statisztikailag szignifikáns különbség ($p < 0.05$) *: myoma és myometrium között, különböző kis betű: a myometrium minták között, különböző nagy betű: a myoma minták között. További ábramagyarázat l. 4. Ábra.



8. Ábra. Nukleáris kis affinitású $[H^3]$ ösztadiol kötohelyek változásai a menstruációs ciklus alatt és menopausában humán uterus myometriumban (csíkozott oszlopok, körök) és myomában (üres oszlopok és háromszögek). Statisztikailag szignifikáns különbség ($p < 0.05$) *: myoma és myometrium között, különböző kis betű: a myometrium minták között, különböző nagy betű: a myoma minták között. További ábramagyarázat l. 4. Ábra.

4.2.3. Progeszteron receptorok

A progeszteron receptor (PR) fehérjék az általunk alkalmazott antitesttel egy reakciós csíkot adtak ~ 116 kD nagyságrendben. Ahogy a 9. Ábra mutatja, PR fehérje szint a menstruációs ciklusban lévő uterusból származó myomákban szignifikánsan magasabb, mint a megfelelő myometrium mintákban. Mindkét szövetben a PR fehérje expressziója legmagasabb volt a szekréciós fázisban és legalacsonyabb volt a menopausás mintákban, ahol nem volt különbség a myometrium és myoma között.



9. Ábra. Progeszteron receptor fehérjék expressziójának változásai myoma (üres oszlop, háromszögek) és kontroll myometrium (csíkozott oszlop, körök) mintákban a menstruációs ciklus (I. proliferációs, II. szekréciós) fázisaiban valamint menopauzában (III.). További ábra magyarázatok l. 4. Ábra.

Összehasonlítva az ER alfa és béta receptorok változásait a progeszteron receptoréval, eredményeink arra mutatnak, hogy a myomákban kimutatható PR fehérjék változásai követik a myometriumban megfigyelhető ciklustól függő változásokat, míg az ER fehérjék myoma szövetekben megfigyelhető változásai ciklus stádiumoktól függetlennek látszanak.

4.3. SEJTCIKLUS SZABÁLYOZÁSÁNAK JELLEGZETESSÉGEI MYOMETRIUM ÉS MYOMA SZÖVETEKBEN

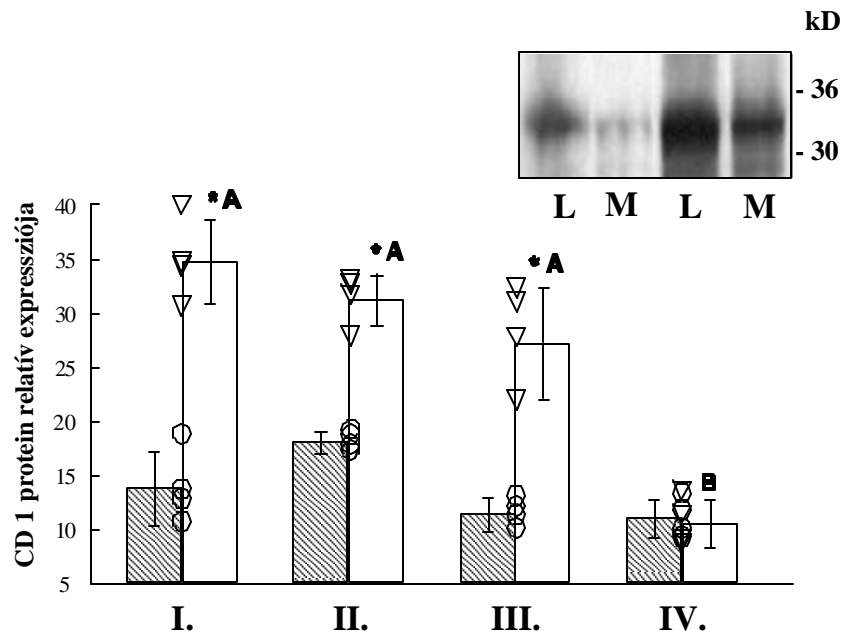
Általánosan ismert, hogy a sejtek proliferációja szigorúan szabályozott folyamat, aktivitásában igen jelentős szerepet játszanak a különböző ciklinek és ciklin függő kinázok komplexei. Az ösztadiol sejtproliferációs hatását a sejtciklus korai G1 fázisában fejt ki, szorosan együttműködve a ciklin D1 fehérjével. ERE köthelyek mutathatók ki a ciklin D1 gén promóter régiójában, amin keresztül az OE erőteljesen fokozza a ciklin D1 expresszióját, s ennek következtében a sejtciklusba kerülő sejtek számát (Lamb és Mtsai 2001).

4.3.1. Ciklin D1 expresszió jellegzetességei

Ciklin D1 expresszió mindkét vizsgált szövetben megfigyelhető volt, a molekula 30-35 kD nagyságrendben volt kimutatható.

Vizsgálatainkban, ahogy a 10. Ábra mutatja, a menstruációs ciklus vizsgált stádiumainak mindegyikében a ciklin D1 expresszió erősen fokozódott a myoma szövetekben. A fokozódás mértéke a menstruációs ciklus stádiumától függött, a legnagyobb különbség, mintegy 2.5-szeres a myometriumhoz viszonyítva a

proliferációs fázisban és a legkisebb, mintegy 1.7-szeres, a szekréciós fázisban volt. Menopauzás betegek uterusából származó myomákban a ciklin D1 expresszió jelentős mértékben csökkent, alacsonyabb lett, mint bármelyik vizsgált szövetben, és eltűnt a különbség a menopauzás betegek uterusából származó myometriumban és myomák között. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy feltehetően a keringő vér OE szintjének csökkenése következtében a ciklin D1 expresszió is lecsökkent, esetleg megszűnt, ami a tumor involúciójában jelentős szerepet játszhat.



10. Ábra. Ciklin D1 expressziója humán uterus myomában (üres oszlopok, háromszögek) és közeli myometriumban (csíkozott oszlopok, körök) a menstruációs ciklus alatt (I. proliferáció, II. szekréció, III. menstruáció) és menopauzában (IV.). Az oszlopok 44 betegből származó adatok átlagát ± SD értékeket mutatják. Insert: reprezentatív Western blot myoma (L) és myometrium (M) szövetekből. Statisztikailag szignifikáns különbség ($p < 0.05$): * : myoma és myometrium között, különböző nagyságot: a myoma minták között.

Ciklin D1 expresszió a myometrium szövetekben is kimutatható volt. A kapott értékek, ahogy említettem, messze alacsonyabbak voltak, mint a myoma szövetekben. A menstruációs ciklus alatt a szekréción fázisban enyhe emelkedés figyelhető meg, legalacsonyabb érték menopausában illetőleg a menstruáció alatt volt, de ezek a különbségek nem voltak matematikailag szignifikánsak.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy az egészséges myometriumban a sejtszaporodás helyett inkább sejtmeújulás a jellemző. Ezek az eredmények megerősítik azt a feltételezést, hogy a myometrium sejtek elsősorban hipertrófiával válaszolnak fiziológiai hormonális eseményekre, mint amilyenek például a terhesség alatt alakulnak ki, míg sejtszám fokozódás patológiai történések részeként figyelhető meg (Cesen-Cummings és mtsai 2000).

4.4. APOPTÓZIS SZABÁLYOZÁSÁNAK JELLEGZETESSÉGEI MYOMETRIUM ÉS MYOMA SZÖVETEKBE

A programozott sejtihal, az apoptózis is meghatározó a fejlődés alatt, a szöveti homeosztázis elengedhetetlen feltétele. Akár a sejtépződés, akár az apoptózis zavara a két folyamat közti egyensúly felborulásához vezet, aminek eredményeként daganat képződés illetőleg fokozott sejtpusztulás jöhet létre.

Számos tényező befolyásolja az apoptózist. Növekedési faktorok hiánya, kemoterápiás gyógyszerek, egyes immunológiai megbetegedések, stressz fokozza a sejtpusztulásnak ezt a formáját. Amikor az apoptózishoz vezető eseményláncolat aktiválódik, jellegzetes változások figyelhetők meg, így a sejt

zsugorodása, kromatin kondenzációja, DNS fragmentáció stb. (Kerr és mtsai 1972).

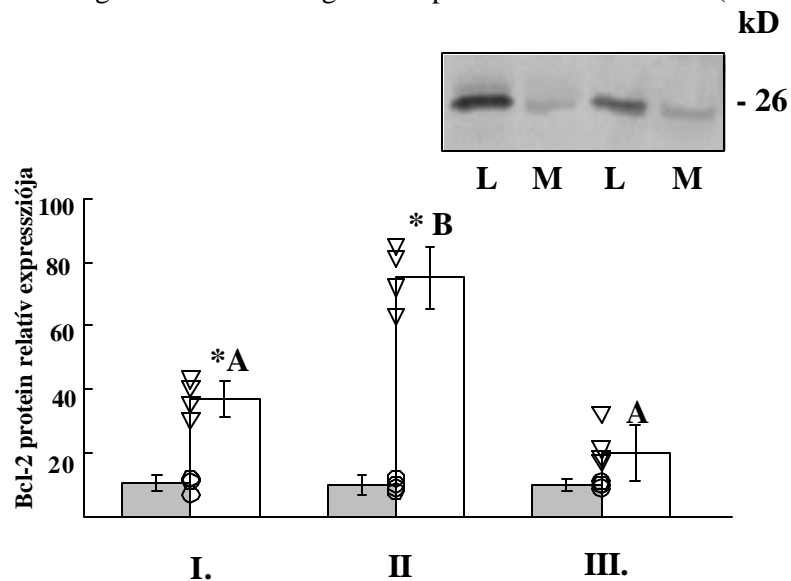
A programozott sejthalál szabályozásában kitüntetett szerepet játszik a Cisztain függő Aspartat specifikus protease (Caspase) kaszkád. A kaszpáz családnak több tagja van, közülük a kaszpáz-9 szerepe meghatározó a folyamat működésében (Cohen 1997).

Az apoptózis szabályozásában a Bcl2 fehérje család meghatározó. A családnak proapoptotikus és antiapoptotikus hatású tagjai egyaránt vannak. Bax és Bcl-2 proteinek meghatározó tagjai a pro- ill. antiapoptotikus molekuláknak, a két fehérje aránya szabja meg az adott sejt sorsát. Amennyiben a Bax molekulák dominálnak, akkor azok a mitokondriumok membránját átjárhatóvá teszik a Ca^{2+} ionok számára, amelyek egy komplexet hoznak létre Apaf-1, citokróm C és dATP részvételével. Ez a komplex lesz a felelős a már említett kaszpáz kaszkád aktivációjáért és az apoptózisért. Ha az antiapoptotikus Bcl-2 van túlsúlyban, akkor a Bax proteinek mitokondriális Ca csatornákra gyakorolt hatása nem valósul meg, a sejt tovább él (Murphy és mtsai 2000).

Vizsgálatainkban az antiapoptotikus Bcl-2 és a proapoptotikus Bax proteinek expresszióját elemeztük a myomákban a kontroll myometriummokkal összehasonlítva (11. és 12. Ábra). Ezeket a vizsgálatokat, a korábbiaktól eltérően, a megfelelő beteg anyag hiánya miatt csak proliferációs, szekréciós fázisban, illetve menopauzában lévő betegek uterusában tudtuk ezideig vizsgálni.

4.4.1. Bcl-2 protein expresszió jellegzetességei

Az antiapoptotikus Bcl-2 protein expressziója (26 kD) mindkét vizsgált szövetben kimutatható volt. Az expresszió mértéke a myometriumban a kimutathatóság szintjén volt és változásnak a különböző stádiumok között még csak a tendenciája sem volt megfigyelhető. Ezekkel ellentétben a myoma szövetekben a menstruációs ciklus mindkét fázisában fokozódott, a legnagyobb mértékben a szekréciós fázisban, ahol az emelkedés mértéke közel 8-szorosan meghaladta a myometriumban kimutatható igen alacsony szintet. Ez a különbség a kéttípusú szövetben a proliferációs fázisban 4-szeres volt. Nem volt kimutatható szignifikáns különbség a menopauzás szövetek között (11. Ábra).

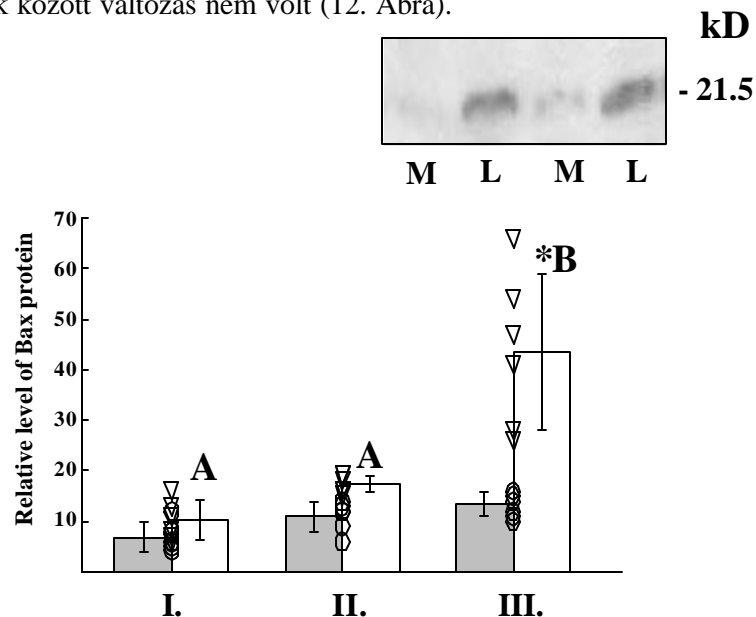


11. Ábra. Bcl-2 protein expressziója humán uterus myomában (üres oszlopok, háromszögek) és közeli myometriumban (csíkozott oszlopok, körök) a menstruációs ciklus alatt (I. proliferáció, II. szekréció) és menopausában (III.). Az oszlopok 4-4 betegből származó adatok átlagát \pm SD értékeket mutatják. Insert: reprezentatív Western blot myoma (L) és myometrium (M) szövetekből. Statisztikailag szignifikáns különbség ($p < 0.05$): *: myoma és myometrium között, különböző nagybetű: a myoma minták között.

4.4.2. Bax protein expresszió jellegzetességei

A proapoptotikus Bax protein expressziójának változásai ellentétesek voltak a Bcl-2 proteineknel megfigyelt változásokkal. A Bax protein expresszió a menopausa alatti myomában volt domináns, ahol az expresszió mértéke mintegy 3-szorosa volt a myometriumban kapott értékeknek. A menstruációs ciklus stádiumai alatt a myomás szövetekben kimutatható kisebb, nem szignifikáns emelkedéstől eltekintve, változás nem volt detektálható.

A myometriumban a kép ismételt változásokban szegény volt. Az expresszió szintje igen alacsony volt, a három vizsgált reprodukív fázisban megfigyelhető expressziós jelek között változás nem volt (12. Ábra).



12. Ábra Bax protein expressziója humán uterus myomában (üres oszlopok, háromszögek) és közeli myometriumban (csíkozott oszlopok, körök) a menstruációs ciklus alatt (I. proliferáció, II. szekréció) és menopausában (III.). Az oszlopok 4-4 betegből származó adatok átlagát \pm SD értékeket mutatják. Insert: reprezentatív Western blot myoma (L) és myometrium (M) szövetekből. Statisztikailag szignifikáns különbség ($p < 0.05$) *: myoma és myometrium között, különböző nagyságú: a myoma minták között.

Az apoptózis szabályozó fehérjék szerepét elemző vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy a programozott sejthalál szabályozásában szerepet játszó Bcl2 protein család expressziója az egészséges myometriumban igen szegényes. Ezzel ellentétben a myoma szövetekben igen aktív. Feltételezhetjük, hogy a tapasztalt változások szerepet játszhatnak a myoma pathogenezisében. A jelenlegi vizsgálatok arra nem tudnak választ adni, hogy a Bcl gének aktivációjáért közvetlenül milyen változások a felelősek.

Napjainkban egyre több adat veti fel, hogy a sejtproliferáció és az apoptózis szabályozása szorosan kapcsolódik egymáshoz (Meikrantz és Schlegel 1995, Huang és mtsai 1997), így pl. az általunk vizsgált fehérjék közül a Bcl2 fehérje gátolja az apoptózist és fokozza a ciklin D1 expresszióját (Lin és mtsai 2001). A ciklin D1 és a Bcl2 expressziója pedig igen szorosan együttműködik az ER rendszerrel (Perillo és mtsai 2000). Ez a kapcsolat szintén az OE kulcsszerepét húzza alá a myoma pathogenezisében.

5. Eredmények megbeszélése, következtetések

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a vizsgált szteroid receptorok, a ciklin D1, és az apoptózist szabályozó Bcl-2 és Bax proteinek expressziója különbözik a myoma szövetekben a myometriális szövetekhez viszonyítva, továbbá a myoma mintákban kapott vizsgálati eredmények jelentősen különböznek a myoma növekedési és regressziós szakában.

A növekedés alatt a myoma szövetben az ösztadiol receptor alfa, a progeszteron receptor valamint a ciklin D1 és Bcl-2 proteinek, míg menopausában, a tumor regressziós fázisában az ösztadiol receptor béta és a Bax protein expressziója haladja meg jelentősen a kontroll myometriumokban kapott értékeket.

Az irodalmi adatokkal összhangban a mi vizsgálataink is azt az elképzelést látszanak megerősíteni, hogy az ösztadiol és az ösztadiol receptorok meghatározó szerepet játszanak a myoma növekedési fázisának pathomechanizmusában. Az ösztrogén receptorok ligand aktivált transzkripciós faktorok, amelyek egy specifikus gén szakaszhoz, az ún. ösztrogén válaszadó gén szakaszhoz (ERE) kötődve gének expresszióját szabályozzák (Nilsson és mtsai 2001). Az ER béta felfedezése (Kuiper és mtsai 1996) az ösztadiol hatásmechanizmusának új aspektusait nyitotta meg. A két fajta ösztadiol receptor molekula DNS kötı doménjében nagyfokú homológia figyelhető meg, ami biztosítja a hasonlóságot a két ösztrogén receptor transzkripciós hatásában az ösztrogén válaszadó elemeken keresztül (Pettersson és Gustafsson 2001).

Az ER alfa jelenléte humán uterus myomában általánosan elfogadott, bár a myometriumhoz viszonyított változásokat illetően a vonatkozó irodalmi adatok

egymásnak ellentmondóak. Egyes vizsgálatokban az ER mRNS szintekben nincs változás a myoma és myometrium között (Vollenhoven és mtsai 1994, Lessl és mtsai 1997). Mások ezekkel az adatokkal ellentétben, a myoma szövetekben fokozódott ER mRNS és protein szinteket találtak (Brandon és mtsai 1993, 1995, Andersen és mtsai 1995, Englund és mtsai 1998). ER béta vonatkozásában lényegesen kevesebb adat áll rendelkezésünkre. Fokozott ER béta expresszióról számoltak be terhes myometriumban és myomában (Benessayag és mtsai 1999). Ugyanakkor csökkent ER béta és magasabb ER alfa szintet talált myomában a myometriumhoz viszonyítva Wu (Wu és mtsai 2000).

A jelen vizsgálatainkban mind a myometriumokban, mind a myomákban az ER alfa és ER béta expressziója kimutatható volt. A menstruációs ciklus alatt az ER alfa szint a myoma mintákban mindig magasabb volt, mint a myometriumban, és az ER alfa nem változott egyik vizsgált szövetben sem a menstruációs ciklus különböző fázisai alatt. Ezen adataink ellentétesek Andersen és mtsai (1995) adataival, akik myometriumban menstruációs ciklus fázisfüggő változásokat figyeltek meg az ER alfa expressziójában. A különbség oka az alkalmazott módszerek különbözősége mellett az is lehet, hogy a myometriális ER koncentráció változik attól függően, hogy a vizsgált szövetminta az uterus melyik részéből származik (Richards és Tiltman 1995, 1996). Az ER béta expressziója vizsgálatainkban csak kisebb változásokat mutatott a myometriumban a menstruációs ciklus során, a myomában a proliferációs fázisban jelentősen fokozódott.

Nagy affinitású, kis kapacitású OE receptorok és kisebb affinitású és nagyobb kapacitású ösztadiol kötohelyek jelenléte volt igazolható a vizsgált szövetekben.

A nagy affinitású kötohelyek a receptorok ligand köto doménjén találhatóak. OE kötoedés hatására az ER-on egy olyan változás következik be, amely kedvez a koaktivátor molekulák kötoedésének és létrejöhet a hatékony transzkripció (Nilsson és mtsai 2001).

A kisebb affinitású ösztradiol kötohelyek jelenlétét már számos szövetben bizonyították (Eriksson és mtsai 1978, Markaverich és mtsai 2001), azonban élettani szerepük még ma sem tisztázott. Számuk párhuzamosan változik patkány uterusban az ösztrogén indukált DNS szintézis fokozódásával és ennek alapján felvetődött, hogy szerepet játszanak az ösztrogének sejtproliferációs hatásaiban (Markaverich és mtsai 2001). Az általunk vizsgált szövetekben a nagy affinitású és kis kapacitású OE receptorok, valamint az alacsony affinitású és nagy kapacitású kötohelyek a menstruációs ciklus során a proliferációs fázisban fokozódtak, ekkor volt a legnagyobb különbség koncentrációjukban a myoma és myometrium között is. A ciklus többi stádiumában a nagy affinitású kötohelyek száma a myomában magasabb volt, ami a menstruációban lévo uterusok esetében matematikailag is szignifikánsnak bizonyult. Az alacsonyabb affinitású ösztradiol kötohelyek változásai a jelen vizsgálatokban, valamint Benessayag és mtsai (1999) vizsgálataiban is párhuzamot mutattak az ösztradiol receptor béta változásaival, aminek alapján feltételezhetőnek tunik, hogy e kötohely és ER béta között funkcionális kapcsolat van. Ennek a bizonyítása azonban további vizsgálatokat igényel.

Az ER protein és OE kötohelyek vizsgálata során nyert eredményeink jól összhangban állnak a myoma és myometrium szaporodásának vizsgálatokor kapott adatainkkal. A myomában megmutatkozó folyamatosan magasabb ER

expresszió más faktorokkal esetlegesen együtt magyarázata lehet a myoma sejtek myometriumhoz viszonyított fokozott szaporodásának hormonmentes környezetben, és a fokozott OE kötohely szám szerepet játszhat a tumoros sejtek fokozott OE érzékenységében, amely megmutatkozott az OE hatására megfigyelhető magasabb szaporodási ütemben (1. és 2. Ábra).

A progeszteron receptorok expressziójának elemzésekor más képet kaptunk, mint az ER-ok esetében. Adataink arra utalnak, hogy a progeszteron receptorok expressziójának regulációs zavara, ha van, nem annyira nyilvánvaló, mint az ösztrogén receptoroknál.

A menstruációs ciklus során a myomában a progeszteron receptor szint mindig magasabb volt, és úgy, mint a myometriumban, a legmagasabb érték a szekréciós fázisban figyelhető meg.

A progeszteron receptorok szerepe a myoma pathogenezisében meghatározó. Sok adat mutatja, klinikai és kísérleti egyaránt, hogy a szekréciós fázisban, vagy progeszteron adásának hatására a myoma proliferatív aktivitása és több mitogén hatású lokális növekedési faktor szintézise fokozódik, amelyeknek a szerepe a tumor növekedésében kétségtelennek látszik (Lösszefoglaló Rein 2000).

Menopausában a tumor regresszív fázisában sokkal egyhangúbb változásokat kaptunk, mint a menstruációs ciklus alatt. Az ER alfa, PR, valamint a $[H^3]OE$ kötődése nem mutatott változást a myometriumhoz viszonyítva, az értékek a legalacsonyabb ciklus alatti értékek nagyságrendjében voltak. Ezzel ellentétben az ER béta expressziója a myomában jelentősen fokozódott. Eredményeink felvetik az ER béta esetleges szerepét a myoma visszafejlődésének megindításban. Ahogy már említettem, nem ismert sok szerv és sejt

vonatkozásában az ER béta fiziológiai szerepe. Tudjuk, hogy az ERE-n keresztül az ER alfához hasonló transzkripció hatást tud kifejteni, de az is ismert, hogy az ER béta transzkripció hatása az általános transzkripció faktorok egyikén, az AP-1 proteineken keresztül más hatással rendelkezik. Ösztradiol az ER alfával fokozza, míg ER bétával gátolja a transzkripciót az AP-1 fehérjéken keresztül (Peach és mtsai 1997). Egyre több adat bizonyítja, hogy az ER béta alacsony OE szint esetén gátolja az ER alfa transzkripció hatását (Hall és McDonnell 1999). Az említett adatok és vizsgálataink eredménye alapján feltételezhetőnek tűnik, hogy a menopausa általunk vizsgált szakaszában megfigyelhető magas ER béta receptor expresszió és az ahhoz társuló alacsony vér OE szint gátolhatja mind az ER alfa által, mind az AP-1 proteineken keresztül megvalósuló OE indukált transzkripció hatásokat, ami jelentősen megváltoztathatja az ER-től függő gének funkcióit.

Az érintett gének között talán elsoként a ciklin D1 expressziójában várható változás, közismert ugyanis, hogy a ciklin D1 és az ER között igen szoros a kölcsönhatás (Lamb és mtsai 2000).

A ciklinek esetleges szerepével a myoma pathogenezisében igen kevés tanulmány foglalkozik. Fokozott ciklin E és cdk 2 aktivitást mutattak ki terhes myometriumban lévő myomában (Horiuchi és mtsai 2000). Jelen vizsgálatainkban ciklin D1 expressziója myometriumban a menstruációs ciklus alatt igen gyenge volt, myomában azonban 2-3-szorosára növekedett, menopausában nem volt különbség a myoma és myometrium között. Ezek a változások jellegükben hasonlítanak azokhoz, amit az ER alfa (4. Ábra) és a nagy affinitású kötohelyek számában (6. Ábra) figyelhattunk meg.

Ösztadiol fokozza a ciklin D1 expresszióját (Prall és mtsai 1997, Sabbah és mtsai 1999). Nincs adat arról, hogy melyik ER típus tud kötödni a ciklin D1 génhez. A ciklin D1 gén promoter régiójában található ERE-hez a már említett ER molekulák közti homológia következtében (Nilsson és mtsai 2001), mindkét ER tud kötödni és résztvehet a gén stimulációjában. Azonban a ciklin D1 promoteren AP-1 kötohelyet is kimutattak (Albanese és mtsai 1995) és elképzelhető, hogy ezen keresztül az OE ER bétával gátló hatást gyakorol a ciklin D1 expresszióra (Paech és mtsai 1997).

E kölcsönhatások mellett még említésre érdemesek azok az adatok, amelyek azt bizonyították, hogy a ciklin D1 molekulák kapcsolódhatnak az ER hormonkötő doménjához, aktiválhatják a DNS köto domén ERE-hez történő kapcsolódását és így annak transzkripció hatását (Zwijssen és mtsai 1997, Bernards 1999).

Adatok arra is utalnak, hogy ER és ciklin D1 molekulák között egyes sejtekben egy önmagát gerjesztő kölcsönhatás (autostimuláció) alakulhat ki. Az ösztrogén hatására az ER komplex aktiválódik, fokozza a ciklin D1 expressziót, ami kötődik az ER-hez, cdk-tól, ösztrogéntől függetlenül, aktiválja az ER indukált transzkripciót, aminek következtében tovább fokozódik a ciklin D1 képződés..... és így tovább (Bernards 1999), szinte megállíthatatlan sejtszaporodást eredményezve az OE érzékeny sejtekben.

A sejtszaporodás mellett a sejthalál mértéke is meghatározó egy adott szerv vagy szövet növekedésében illetőleg involúciójában. A megváltozott mértéku apoptózis lehetősége a myoma pathogenesisében már korábban felvetődött (Andersen 1998). In vitro sejt kultúrában kimutatták, hogy az apoptózist szabályozó Bcl2 protoonkogének egyik fehérje terméke, az antiapoptotikus Bcl-

2 expressziója fokozódott a myomából származó sejtekben a myometrium sejtek kultúrájában megfigyeltekhez viszonyítva, és progeszteron hatására az expresszió mértéke fokozódott (Matsuo és mtsai 1997).

A Bcl-2 protein család tagjai között apoptózist gátló fehérjék mellett apoptózist serkentők is megtalálhatók. A fehérjék struktúrájában a homológia nagyfokú. A proapoptotikus fehérjék, mint a Bax, Bak, Bok fehérjék BH1, -2, -3 doménnal rendelkeznek, az antiapoptotikus tagok struktúrájában a BH1-3 domén mellett egy BH4 is megtalálható. Mindkét típusú molekulának a COOH végén egy transzmembrán domén van, amely a molekulákat a mitokondriumok membránjához kapcsolják. A pro- és antiapoptotikus molekulák egymással homo- és heterodiméereket képeznek. A hatásuk több molekuláris szinten valósulhat meg, egyesek szerint sejtspecifikus. A proapoptotikus Bcl-2 proteinek, mint pl a Bax, mitokondriális csatornát alakítanak ki, szabályozzák a cytochrom C kivándorlását a mitokondriumokból, ez szabályozza a kaszpáz enzimek aktivációját és így az apoptózis mértékét (Sheau Yu Hsu és Hsueh 2000).

Proapoptotikus fehérjék változásairól humán myometriumban és myomában igen kevés irodalmi adat található, és ami van, annak a módszere kifogásolható (Wu és mtsai 2002), az antiapoptotikus Bcl2 változásokat illetően pedig csak sejtenyészetből származó adatok vannak, érdemesnek tűnt elemezni párhuzamosan a Bcl-2 és Bax proteinek expresszióját myomában és kontroll myometrium szövetben. Bcl-2 protein expresszió, a sejtenyészetből nyert adatokkal összehangban (Matsuo és mtsai 1997) myoma szövetben fokozott volt, a legmagasabb értéket a progeszteron és ösztrogén gazdag szekréciós fázisban

találtuk. Menopauzás uterusból származó myomában az emelkedés igen csekély volt. A myometriumokban a Bcl-2 protein expressziója a kimutathatóság szintjén volt, különbség az egyes mintacsoportok között nem volt. A Bax protein expressziója az elobb leírt változásokkal ellentétben a menopauzás uterusból származó mintában volt messze a legmagasabb, a menstruációs ciklusban lévő uterusokból származó myometrialis és myoma mintákban kisebb változásokon túlmenően különbség nem volt.

Ösztrogén gátolja az apoptózist különböző szövetekben Bcl-2 expresszióin keresztül, a molekulán elhelyezkedő két ösztrogén válaszadó génszakasz stimulációjával (Perillo és mtsai 2000). Progeszteron szerepe a Bcl-2 indukciójában nem ismert. Más szövetekben, emlőben, humán endometriumban, a Bcl-2 szint a proliferációs fázisban magasabb, mint a szekréciósban (Tao és mtsai 1997, Prall és mtsai 1998). Véleményem szerint a myomákban a szekréciós fázisban megfigyelhető fokozódás az ösztrogének és a progeszteron közti kölcsönhatás eredménye, ezt az elképzelést alátámasztja Migliaccio és mtsai (1998) adatai, amelyek szerint Src/Ras/ MAP kináz jelátviteli úton keresztül az ösztrogén-progeszteron kölcsönhatás szerepet játszik az ösztrogén indukált sejtproliferáció szabályozásában. Hasonló mechanizmus szerepet játszhat a Bcl-2 gén expressziójában is. Több adat beszámol arról, hogy humán uterusban, myomában is, progeszteron fokozza egyes növekedési faktorok és receptoraik szintézisét (Andersen 1998, Dixon és mtsai 2000), amelyek szintén felelősek lehetnek a fokozott Bcl-2 expresszióért.

Az ovariális szteroidok szerepe a Bax protein expressziójában nem ismert, ugyancsak igen keveset tudunk a Bcl-2 proteinek anti- és proapoptotikus tagjai

expressziójának egymás közötti kapcsolatáról, kölcsönhatásáról és szabályozásáról. Humán endometriumban a Bax/Bcl2 proteinek aránya a menstruációs ciklus különböző fázisaiban összerendezetten változik, biztosítva mindig a pro- és antiapoptotikus hatások optimális arányát az adott celluláris eseményekhez (Tao és mtsai 1997). Ilyen összerendezett mechanizmus a myomában nem figyelhető meg. A Bcl-2 expresszió a myomában a menstruációs ciklus alatt folyamatosan magas, aminek következtében a Bax proteinek citoplazmából a mitokondriumba történő transzlokációja és következményként az apoptózis gátlódik (Murphy és mtsai 2000).

A disszertációban leírt eredmények és a vonatkozó irodalmi adatok alapján az alábbiakban szeretném összefoglalni azt a hormonális esemény-láncolatot, amely feltételezhetően résztvesz azokban a sejtszintű mechanizmusokban, amelyek szerepet játszhatnak, legalábbis részben, a myoma növekedésében és regressziójában.

A **menstruációs ciklus alatt**, a myoma növekedésének periódusában, a sejtszaporodás fokozódása és az apoptózis gátlása domináns.

Az ösztrogén aktiválja az ösztrogén receptor alfát, fokozza az érzékeny sejtek proliferációját, aktiválja a ciklin D1 szintézisét, ami a sejtciklus fokozása mellett aktiválja az ösztrogén receptor alfa transzkripció hatását, a sejtek szaporodását, még a ciklus azon fázisaiban is, amikor a keringő vér ösztrogén szintje csökken.

Az aktivált ösztrogén receptor alfa fokozza a progeszteron receptorok számát, aminek eredményeként azok az ösztrogén receptorokkal együtt, kiemelten a

szekréciós fázisban, fokozzák az antiapoptotikus Bcl-2 expressziót, és gátolják a proapoptotikus molekulák szintjét és hatását, és az apoptózis gátlás alá kerül.

Mindkét hormon, az ösztrogén és a progeszteron is, fokozza egyes mitogén hatású növekedési faktorok és receptorainak szintézisét, amelyek jelentősen hozzájárulnak a sejtszaporodás fokozódásához.

Menopauzában, a tumor regressziós stádiumában, a sejtproliferáció mértéke visszaesik, és az apoptózis fokozódik.

A vér ösztrogén szintje csökken, az ösztrogén receptor béta expresszió fokozódik és hatására az ER alfa transzkripciós hatása mind a klasszikus ösztrogén választ adó génszakaszokon, mind az AP-1 proteineken keresztül csökkenti a ciklin D1 és a progeszteron receptor expresszióját, aminek eredményeként az antiapoptotikus Bcl-2 protein szint is csökken. A proapoptotikus Bax protein expressziója felszabadul a gátlás alól és ezeknek a változásoknak eredményeként a sejtproliferáció leáll, az apoptózis fokozódik és a tumor visszafejlődik.

6. Eredmények rövid összefoglalója

1. Myoma sejtek sejt szaporodásának üteme hormonmentes sejttenyészetben meghaladta az egészséges myometriumból nyert sejtek szaporodási ütemét.
2. OE hatására mindkét típusú simaizomsejtek tenyészetében a sejtek proliferációja fokozódik, de a myoma sejtek OE érzékenysége, s ennek következtében a sejtek szaporodásának üteme szignifikánsan magasabb, mint a myometriumban.
3. Ösztradiol receptor alfa expressziója és a $[H^3]$ ösztradiol kötődése a nagy affinitású és kis kapacitású receptorokhoz a myoma szövetben fokozódott a menstruációs ciklus alatt, a menopauzában nem változott a kontroll myometriumhoz viszonyítva.
4. Kimutattuk, hogy az ösztradiol receptor béta, valamint a $[H^3]$ ösztradiol kötődése az alacsonyabb affinitású és nagy kapacitású kötohelyekhez fokozódott a myomában a kontroll myometriumokhoz viszonyítva a menstruációs ciklus proliferációs fázisában, valamint a menopauzában lévő beteg uterusából származó myoma mintákban.

5. Ciklin D1 expresszió, hasonlóan az ER alfa változásaihoz, erőteljesen fokozódott a myomában a menstruációs ciklus vizsgált fázisaiban és a menopauzában a myometriumban kimutatható alacsony értékre esett vissza.

6. Az antiapoptotikus Bcl-2 proteinek szintje a progeszteron receptorok expressziójával párhuzamosan fokozódott a myoma mintákban a menstruációs ciklus alatt, a legmagasabb értéket és a legnagyobb myometrium - myoma közti különbséget a ciklus szekréciós fázisában mutattuk ki. Menopauzában a PR és Bcl-2 fehérjék szintje a myomában a myometriumhoz hasonló, különbség a két vizsgált szövet között nem volt kimutatható.

7. A proapoptotikus Bax protein expressziója a menopauzás uterusból származó myomákban igen magas. A menstruációs ciklus alatt szignifikánsan nem különbözött a myometriumban mérhető értékektől.

7. Befejezés

Klinikusként, még ha fiatal is vagyok a szakmában, szerettem volna, ha az első tudományos összefoglalómat gyakorlatban is hasznosítható következtetésekkel tudom befejezni.

Ennek a célkitűzésnek nem tudok eleget tenni és megtanultam, hogy ez a törekvés nem is olyan egyszerűen kivitelezhető feladat.

Eredményeink, valamint a vonatkozó irodalmi adatok arra utalnak, hogy a daganatok, így a myoma kialakulásában, növekedésében nagyon sok tényező játszik szerepet, amelyeknek az összerendezettsége, vagy helyesebben az összerendezettségnek a felbomlása a felelős az elváltozásokért, a kiindulási pont megtalálása pedig nagyon összetett feladat.

Az kétségtelennek tűnik, hogy az ovarialis szteroidok hatásának, mechanizmusának változásai a myoma pathogenezisében igen meghatározónak tűnnek, de mellettük, vagy hatásukra a sejtszaporodás és sejthalál mechanizmusai is zavart szenvednek.

A gyógyításban a fentieknek megfelelően az ovarialis hormonok hatásainak változtatása, megfelelő SERM-ek alkalmazása, ígéretesnek tűnhet, ha a nem kívánatos mellékhatások kiküszöbölhetővé válnak.

Ahogy a természetes involúció alatti változások elemzésére irányuló vizsgálataink eredményei mutatják, talán hasznosak lehetnének olyan molekulák is, amelyek ER béta, vagy a proapoptotikus hormonok szintjét tudják fokozni. Ilyen molekulák (pl. opioid peptidok, genistein) hatásainak kísérletes elemzése már folyik, de még igen sok munka, meggyőző eredmény szükséges ahhoz, hogy ezek a molekulák betegekben is kipróbálásra kerülhessenek.

8. Idézett irodalom

Albanese C, Johnson J, Watanabe G, Eklund N, Vu D, Arnold A, Pestell RG. (1995). Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J. Biol. Chem.* 270: 23589-23597.

Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, Germano D, Pacilio C, Battista T, Cancemi M, Petrizzi VB, Bresciani F, Weisz A. (1997). Estrogen induces early and timed activation of cyclin-dependent kinases 4, 5, and 6 and increases cyclin messenger ribonucleic acid expression in rat uterus. *Endocrinology* 138:978-984.

Andersen J (1998). Factors in fibroid growth. *Bailliere`s Clinical Obstet. Gynecol.* 12: 225-243.

Andersen J, Barbieri RL (1995) .Abnormal gene expression in uterine leiomyomas *J. Soc.Gynecol. Invest.* 2: 663-672.

Andersen J, DyReyes V, and Barbieri RL. (1995). Leiomyoma primary cultures have elevated transcriptional response to estrogen compared to autologous myometrial cultures. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 2: 542-551.

Bennassayag C, Leroy MJ, Rigourd V, Robert B, Honore CJ, Mignot TM, Vacher-Lavenu MC, Chapron C, Ferre F. (1999). Estrogen receptors (Er? /Er?)

in normal and pathological growth of the human myometrium: pregnancy and leiomyoma. *Am.J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 276: E1112-E1118.

Bernards R. (1999). CDK independent activities of D type cyclins *Biochem.Biophys. Acta* 1424: M17-M22.

Brandon D, Bethea CL, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Harrington MS, Erickson TE, Warner C, Keenan EJ, Clinton GM. (1993). Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are overexpressed in human leiomyoma. *Am.J. Obstet. Gynecol.*, 169. 78-85.

Brandon DD., Erickson, TE., Keenan, EJ. Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Warner C, Clinton GM. (1995) Estrogen receptor gene expression in human uterine leiomyomata. *J. Clin. Endocrinol.Metab*, 80:1876-1881.

Burroughs KD, Kiguchi K, Howe SR, Fuchs-Young R, Trono D, Barrett JC, Walker C. (1997). Regulation of apoptosis in uterine leiomyomata. *Endocrinology* 138:3056-3064.

Burton K. (1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem.J.* 62: 315-323.

Buttram VC Jr, Reiter R. (1981). Uterine leiomyomata, etiology, symptomatology, and manegement. *Fertil.Steril* 36: 433-455.

Cavaillé F, Fournier E, Dallot C, (1995). Myosin heavy chain isoform expression in human myometrium: presence of an embryonic nonmuscle isoform in leiomyomas and in cultured cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 30: 183-193.

Cesen-Cummings K, Copland JA, Barrett JC, Walker CL, Davis BJ (2000). Pregnancy, parturition, and prostaglandins: defining uterine leiomyomas. *Environmental Health Persp.* 108: suppl. 5 817-820.

Chao DT, Korsmeyer SJ. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Ann. Rev. Immunol.* 16: 395-419.

Cohen GM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem.J.* 326: 1-16.

Cramer SF, Patel A. (1990). The frequency of uterine leiomyomas. *Am.J. Clin. Pathol.* 94: 435-438.

Crum CP. (1999). The female genital tract. In: *Pathologic Basis of Disease* (Cotran,RS, Kumar, V, Collins V, eds) Philadelphia: WB Saunders, 1035-1091.

Dixon D, He H, Haseman K. (2000). Immunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. *Environmental Health Persp.* 108: suppl. 5, 705-802.

Englund K., Blanck, A., Gustavsson, I. Lundkvist U, Sjoblom P, Norgren A, Lindblom B. (1998). Sex steroid receptors in human myometrium and fibroids: changes during the menstrual cycle and gonadotropin-releasing hormone treatment. *J. Clin.Endocrinol. Metab.* 80: 4092-4096.

Eriksson H, Upchurch S, Hardin JW, Peck EJ Jr, Clark JH. (1978). Heterogeneity of estrogen receptors in the cytosol and nuclear fractions of the rat uterus *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 81: 1-7.

Eyden BP, Hale RJ, Richmond I., Buckley CH. (1992). Cytoskeletal filaments in the smooth muscle cells of uterine leiomyomata and myometrium: an ultrastructural and immunohistochemical analysis. *Virchows Archives A. Pathology and Anatomy* 420: 51-58.

Foster JS, Wimalasena J. (1996). Estrogen regulates activity of cyclin-dependent kinases and retinoblastoma protein phosphorylation in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol* 10: 488-498.

Gambone JC, Reiter RC. (1997). Hysterectomy: improving the patients' decision-making process. *Clin. Obstet. Gynecol.* 40: 868-877.

Gustafsson J-A. (1998). Estrogen receptor β – a new dimension in estrogen mechanism of action. *J. Endocrinol* 163: 379-383.

Hall JM, and McDonnell DP. (1999). The estrogen receptor β -isoform (ER β) of the human estrogen receptor modulates ER α transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 144: 5566-5578.

Hermanson O, Glass CK, Rosenfeld MG. (2002). Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocr. Metab.* 13: 55-60.

Hill AV. (1910). The possible effect of the aggregation of the molecule of hemoglobin on the dissociation curve. *Proc. Physiol. Soc. Lond.* 4-7.

Horiuchi A, Nikaido T, Yoshizawa T, Itoh K, Kobayashi Y, Toki T, Konishi I, Fujii S. (2000). HCG promotes proliferation of uterine leiomyomal cells more strongly than that of myometrial smooth muscle cells in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* 6: 523-528.

Hsu SY, Hsueh AJ. (2000). Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm *Physiol. Rew.* 80: 593-614.

Huang DC, O`Reilly LA, Strasser A, Cory S. (1997). The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J.* 16: 4628-4638.

Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9:1603-1614.

Kawaguchi K, Fuji S, Konishi I, Okamura H, Mori T. (1985). Ultrastructural study of cultured smooth muscle cells from uterine leiomyoma and myometrium under the influence of sex steroids. *Gynecol. Oncol.* 21: 111-114.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 26: 239-257.

Kjerulff KH, Guzinski GM, Langenberg PW, Stolley PD, Adler Moye NE, Kazandjian VA. (1993). Hysterectomy and race. *Obstet.Gynecol.* 82: 757-764.

Klinge C. (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65: 227-251.

Kovács KA, Oszter A, Gocze PM, Környei JL, Szabó I. (2001a). Comparative analysis of cyclin D1 and ösztrogén receptor (? and ?) levels in human leiomyoma and adjacent myometrium. *Mol. Hum. Repr.* 7:1085-1091.

Kovács KA, Oszter A, Gocze PM, Környei JL, Kovács S, Szabó I. (2001b). Sex steroid receptors, regulation of cell cycle and apoptosis in human leiomyoma and myometrium. 5th European Congress of Endocrinology, Abstract book P649 Turin, Italy.

Környei J, Vertes Z, Oszter A, Kovacs KA, Rao CV, Vertes M(1999.) Opioid peptides inhibit the action of oestradiol on human myometrial cells in culture. Mol. Hum. Repr. 5: 565-572.

Kroemer G. (1997). The protooncogene Bcl2 and its role in regulating apoptosis. Nat. Med. 3: 614-620.

Kuiper GG, Enmark M, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5925-5930.

Lamb J, Ladha MH, McMahon C, Sutherland RL, Ewen ME. (2000). Regulation of the functional interaction between cyclin D1 and the estrogen receptor. Mol. Cell Biol. 20:8667-75.

Lessl ., Klotzbuecher M, Schoen S. Reles A, Stockemann K, Fuhrmann U. (1997). Comparative messenger ribonucleic acid analysis of immediate early genes and sex steroid receptors in human leiomyoma and healthy myometrium. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 2596-2600.

Lin HM, Lee YJ, Li G, Pestell RG, Kim HR. (2001). Bcl2 induces cyclin D1 promoter activity in human breast epithelial cells independent of cell anchorage. *Cell Death Differ.* 8: 44-50.

Markaverich BM, Shoulars K, Alejandro M, Brown T.(2001). Purification and characterization of nuclear type II [³H] estradiol binding sites from the rat uterus: covalent labeling with [³H]luteolin. *Steroids* 66: 707-719.

Marshall IM, Spiegelman D, Barbieri RL, Goldman MB, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ. (1997). Variation in the incidence of uterine leiomyomata among premenopausal women by age and race. *Obstet.Gynecol* 90: 967-973.

Marshall IM, Spiegelman D, Manson JE, Goldman MB, Barbieri RL, Stampfer MJ, Willett WC, Hunter DJ. (1998). Risk of uterine leiomyomata among premenopausal women in relation to body size and cigarette smoking. *Epidemiology* 9: 511-517.

Mashal RD, Fejzo MI, Friedman AJ, Mitchner ., Nowak RE, Rein MS, Morton CC., Sklar J. (1994). Analysis of androgen receptor DNA reveals the independent clonal origins of uterine leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer* 11: 1-6.

Matsuo H, Maruo T, Samoto T. (1997). Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:293-299.

Meinkrantz W, Schlegel R. (1995). Apoptosis and the cell cycle. *J. Cell. Biochem.* 58: 160-174.

Meloni AM, Surti U, Contento AM, Davare J, Sandberg AA. (1992). Uterine leiomyomas: cytogenetic and histologic profile. *Obstetr. Gynecol.* 80: 209-217.

Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M, Auricchio F. (1998). Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J.* 17:2008-2018.

Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB. (2000). Bcl-2 inhibits Bax trans-location from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ.* 7:102-111.

Nilbert M, Heim S. (1990). Uterine leiomyoma and cytogenetics. *Genes Chromosomes and Cancer* 2: 3-13.

Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. (2001). Mechanism of estrogen action. *Physiol. Rev.* 81:1535-65.

Olive DL. (2000). Review of the evidence for treatment of leiomyomata. *Environmental Health Persp.* 108: suppl. 5: 841-843.

Paech K., Webb P., Kuiper GGJM, Nilsson S, Gustafsson J-A, Kushner PJ, Scanlan TS. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP-1 sites. *Science* 277, 1508-1510.

Pandis N, Heim S, Bardi G, Floderus UM, Willen H, Mandahl N, Mitelman F. (1991). Chromosome analysis of 96 uterine leiomyomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 55: 11-18.

Perillo B, Sasso A, Abbondanza C, Palumbo G (2000). 17 β -estradiol inhibits apoptosis in MCF-7 cells, inducing bcl-2 expression via two estrogen-responsive elements present in the coding sequence. *Mol. Cell. Biol.* 20:2890-2901.

Pettersson K, Gustafsson J-A. (2001). Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 165-192.

Prall OW, Rogan EM, Sutherland RL. (1998). Estrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65: 169-74.

Prall OWJ, Sarcevic B, Musgrove EA, Watts CK, Sutherland RL. (1997). Estrogen-induced activation of cdk4 and cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-cdk2. *J. Biol. Chem.* 272: 10882-10894.

Rein MS, Powell WE, Walters F, Weremowicz S, Cantor RM., Barbieri RL ,
Morton CC. (1998). Cytogenetic abnormalities in uterine myomas are associated
with myoma size. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 83-6.

Rein S. (2000). Advances in uterine leiomyoma research: The Progesterone
hypothesis . *Environmental Health Persp.* 108: suppl. 5: 791-793.

Rein MS, Barbieri RL, Friedman AJ. (1995). Progesterone: A critical role in the
pathogenesis of uterine myomas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172: 14-18.

Richards PA, Tiltman AJ. (1995). Anatomical variation of the oestrogen receptor
in normal myometrium. *Virchows Arch.* 427: 303-307.

Richards PA, Tiltman AJ. (1996). Anatomical variation of the oestrogen receptor
in the non-neoplastic myometrium of fibromyomatous uteri. *Virchows Arch.*
428: 347-351.

Sabbah M, Courilleau D, Mester J, Redeuilh G. (1999). Estrogen induction of the
cyclin D1 promoter: Involvement of a cAMP response-like element.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96: 11217-11222.

Scatchard G. (1949). The attraction of proteins for small molecules and ions.
Ann.N.Y.Acad. Sci. 51: 660-673.

Scully RE. (1972). Pathology of leiomyomas. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 10: 325-331.

Sheau Yu Hsu, Aaron JW Hsueh. (2000). Tissue specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: an ovarian paradigm. *Physiol. Rev.* 80: 593-614.

Shimomura Y, Matsuo H, Samato T, Maruo T. (1998). Up-regulation by progesterone of proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor expression in human uterine leiomyoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 2192-2198.

Tao XJ, Tilly KI, Maravei DV, Shifren JL, Krajewski S, Reed JC, Tilly JL, Isaacson KB. (1997). Differential expression of members of the bcl-2 gene family in proliferative and secretory human endometrium: glandular epithelial cell apoptosis is associated with increased expression of Bax. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 2738-2746.

Tiltman A. (1985). The effect of progestins on the mitotic activity of uterine fibromyomas. *Internat. J. Gynecol. Pathol.* 4: 89-96.

Vikhlyaeva EM, Khodzhaeva ZS, Fantschenko ND. (1995). Familial predisposition to uterine leiomyomas. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 51: 127-131.

Viville B, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Wetzka B, Smith SK. (1997).
Distribution of the A and B forms of the progesterone receptor messenger
ribonucleic acid and protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium.
Hum. Reprod. 12: 815-22.

Vollenhoven BJ, Pearce P, Herington AC, Healy DL. (1994). Steroid receptor
binding and messenger RNA expression in fibroids from untreated and
gonadotrophin-releasing hormone agonist pretreated women. Clin. Endocrinol.
(Oxf). 40: 537-544.

Weihua Z, Saji S, Makinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M, Gustafsson JA.
(2000). Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ER alpha in the uterus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 5936-5941.

Wu X, Blanck, A, Olovsson M, Henriksen R, Lindblom B. (2002).
Expression of Bcl2, Bcl-x, Mcl-1, Bax and Bak in human uterine leiomyomas
and myometrium during the menstrual cycle and after menopause. J. Steroid
Biochem. Molec. Biol. 80: 77-83.

Wu JJ, Geimonen E, Andersen J (2000). Increased expression of estrogen
receptor ? in human uterine smooth muscle at term. Eur. J. Endocrinol. 142: 92-
99.

Zwijsen RM, Wientjens E, Klompmaker R, van der Sman J, Bernards R, Michalides RJ. (1997). CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 88: 405-415.

Tudományos munkák jegyzéke

Dolgozatok:

Kovács KA, Figler M, Nemes J, Mózsik Gy

Effects of TRH on gastric acid secretion: A model for human study.

J.Physiol. (Paris) 91: 265-269 1997 **IF: 1.339**

Környei JL, Vértes Zs, Oszter A, Kovács K, Rao CV, Vértes M

Opioid peptides inhibit the action of estradiol on human myometrial cells in culture.

Mol. Hum. Reprod. 5: 565-572 1999 **IF: 3.643**

Krommer K, Gocze PM, Garamvölgyi Z, Kovács K, Szabó I

Roszcindulatú granulosa-sejt daganatos betegek és gyógyulási eredményeik a Pécsi Noi Klinikán.

Orvosi Hetilap 140: 1583-1586 1999

Gocze P, Krommer K, Csermely T, Cziráky K, Garamvölgyi Z, Kovács K, Szabó I

Az ovuláció indukciós kezelés és a petefészek roszcindulatú daganatos megbetegedése.

Orvosi Hetilap 141: 71-75 2000

Oszter A, Törocsik B, Vértes Zs, Környei JL, Kovács KA, Vértes M

Regulation of activator protein-1-DNA binding activity by opioid peptides in estrogen sensitive cells of rat hypothalamus and uterus.

Eur.J.Pharmacol. 395: 103-106 2000 **IF: 2.236**

Vértes Zs, Sándor A, Kovács KA, Oszter A, Környei JL, Kovács S, Vértes M

Epidermal growth factor influenced by opioid peptides in immature rat uterus.

J. Endocrinol. Invest. 23: 502- 508 2000 **IF: 1.398**

Oszter A, Vértes Zs, Törocsik B, Környei JL, Kovács KA, Vértes M
Antioestrogenic effect of opioid peptides in rat uterus.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 74: 25-32 2000 **IF: 2.245**

Környei JL, Oszter A, Kovács KA, Vértes Zs, Komlósi KM, Gocze MP, Vértes M
Anti-mitogenic action of opioid peptides on epidermal growth factor -stimulated
uterine cells.

Eur. J. Pharmacol. 414: 159-164 2001 **IF: 2.236**

Kovács KA, Oszter A, Gocze P, Környei JL, Szabó I
Comparative analysis of cyclin D1 and oestrogen receptors (alpha and beta)
levels in human leiomyoma and adjacent myometrium.

Mol. Hum. Repr 7:1085-1091 2001 **IF: 3.643**

Kovács KA, Oszter A, Környei JL, Szabó I, Sümegi B
Differential expression of Bcl-2 and Bax proteins in human leiomyoma and
myometrium.

Submitted 2002

Folyóiratban megjelent idézhető abstractok

Környei JL, Vértes Zs, Oszter A, Kovács KA, Vértes M
Progesterone receptor is involved in the inhibitory action of endogenous opioid
peptides on epidermal growth factor stimulated proliferation of cultured rat
uterine cells. 32nd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction,
1999 Aug, Pullman, Washington, USA

Biol. Reprod. 60: Suppl. 1. p. 202 1999 **IF: 3.414**

Környei JL, Kovács KA, Oszter A, Vértes Zs, Komlósi KM, Vértes M
Altered regulation of cell proliferation by opioid peptides in human uterine
leiomyoma cells. Joint Meeting of the British and Hungarian Physiological
Society, 2000, Budapest, Hungary

J. Physiol. 526: p:20-21 2000 **IF:4.455**

Eloadások:

Kovács KA, Figler M, Nemes J, Mózsik Gy

Effects of TRH on gastric acid secretion: A model for human study.

IInd Internat. Congress of the Worldwide Hungarian Medical Academy (WHMA), Budapest 1994.

Kovács K, Gocze P, Schunk E, Bay Cs

Oesrogen kötohelyek változása humán uterusban az élet folyamán

Fiatal Szülész-Nőgyógyász Orvosok IV. Tudományos ülése, Győr 1997

Kovács KA, Környei J, Oszter A, Szabó I.

Az opioid peptidok gátolják az oestradiol indukált sejtproliferációt humán myometrium sejtvonalakban.

Magyar Nőorvos Társaság XXVI. Nagygyűlése, Pécs 1998

Gocze P, Vereckei G, Drozgyik I, Bay Cs, Kovács KA, Zámbo K, Hegedus K, Szabó I

A perzisztáló gestációs trophoblaszt tumorok rádióizotópos képi ábrázolása, MA-CO és szelektív intraarteriális citosztatikus kezelése.

Magyar Nőorvos Társaság XXVI. Nagygyűlése, Pécs 1998

Környei JL, Vértes Zs, Oszter A, Kovács KA, Rao CV, Vértes M.

Inhibition of estradiol-induced cell proliferation by opioid peptides in human myometrial cell lines.

IV. European Congress of Endocrinology, Sevilla, Abstr. P2-263 1998

Oszter A, Törcsik B, Kovács KA, Környei JL, Vértes Zs, Vértes M

Opioid peptidok antioestrogén hatása patkány uterusban.

Magyar Élettani Társaság LXIV. Vándorgyűlése, Budapest Eloadáskivonatok és poszterösszefoglalók 113.o. 1999

Környei JL, Vértes Zs, Oszter A, Kovács KA, Vértes M
Az endogén opioid peptidek a progeszteron receptor bevonásával gátolják az epidermális növekedési faktor által kiváltott sejtszaporodást patkány uterus sejtkultúrákban.

Magyar Élettani Társaság LXIV. Vándorgyűlése Budapest, Eloatáskivonatok és poszterösszefoglalók 81.o. 1999

Kovács KA, Környei JL, Oszter A, Vértes Zs, Kovács S, Vértes M
Hormonal factors in the regulation of myoma growth.
6th International Congress on Hormones and Cancer, Jerusalem, Israel, Abstract book p.108. 1999

Kovács KA, Oszter A, Gocze P, Vértes M
Oestradiol receptorok (alpha és béta) human myometriumban és myomában a menstruációs ciklus alatt és menopausában.
Magyar Noorvos Társaság Déldunántuli Szekciójának Konferenciája, Siófok 2000

Környei JL, Kovács KA, Oszter A, Vértes Zs, Vértes M
Altered regulation of cell proliferation by opioid peptides in human uterine leiomyoma cells.
J. Physiol.(Lond) 526: P19-20 2000

Kovács KA, Oszter A, Vértes Zs, Gocze P, Környei JL, Vértes M
Cyclin D1 and estradiol-receptors (alpha and beta) in human myometrium and leiomyoma.
11th International Congress of Endocrinology, Sydney, Australia, Abstract book P91 2000

Vértes Zs, Oszter A, Kovács KA, Környei JL, Kovács S, Vértes M
Involvement of EGF and EGF-R in the inhibitory action of opioid peptides on rat uterine DNA synthesis.
11th International Congress of Endocrinology, Sydney, Australia, Abstract book P92 2000

Kovács KA, Oszter A, Gocze PM, Környei JL, Kovács S, Szabó I
Sex steroid receptors, regulation of cell cycle and apoptosis in human leiomyoma
and myometrium.

5th European Congress of Endocrinology, Turin, Olaszország, Abstract book P649
2001

Környei JL, Oszter A, Vértes Zs, Kovács KA, Komlósi KM, Gocze PM, Vértes M
Developmental changes of the inhibition of cell proliferation by opioid peptides
in cultured rat uterine cells.

5th European Congress of Endocrinology, Turin, Olaszország, Abstract book P641
2001

Kovács KA, Krommer K

Elorehaladott petefészekrákos beteg eredményes kezelése.

Magyar Onkológus Társaság Nőgyógyászati Szekciója Továbbképző ülése,
Budapest 2001

10. Köszönetnyilvánítás

Ez alkalommal is szeretnék köszönetet mondani azoknak, akik munkámat támogatták és lehetővé tették PhD értekezésem elkészítését.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Sümegi Balázsnak, Program- és témavezetomnek, aki befogadott klinikusként, bízott bennem, és segített disszertációm elkészítésében.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Szabó Istvánnak, a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika igazgatójának, aki támogatott PhD munkámban, lehetővé tette számomra külföldi és belföldi kongresszusokon való részvételemet, amelyek jelentősen elősegítették szakmai fejlődésemet.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet Izotóp laboratóriumában dolgozó munkatársaknak, elsősorban Dr. Vértes Zsuzsannának, Dr. Környei Józsefnek és Dr. Oszter Angélának, akik tanácsaikkal, módszertani ismereteikkel pótolhatatlan segítséget nyújtottak.

Végezetül szeretném megköszönni feleségemnek és szüleimnek a segítségüket.

