

Stanisław Chrapusta, Witold Sieński, Bożena Konopka,
Zygmunt Paszko, Józef Szamborski

STĘŻENIA RECEPTORÓW ESTROGENÓW I PROGESTAGENÓW W MIĘŚNIAKACH MACIC KBIET PODCZAS CYKLU MIESIĄCZKOWEGO

Z Samodzielnej Pracowni Endokrynologii Onkologicznej
Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. Z. Paszko
Dyrektor: prof. dr hab. J. Steffen
Z Zakładu Patomorfologii Rozrodu Instytutu Położnictwa
i Ginekologii Akademii Medycznej w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. J. Szamborski
Dyrektor: prof. dr hab. J. Kuczyńska-Sicińska

Oznaczono i porównano zawartość „cytozolowych” receptorów estrogenów (ERc) i progestagenów (PRc) oraz „jądrowego” receptora estrogenów (ERn) w prawidłowej błonie mięśniowej i mięśniakach macic 16 miesięczkujących kobiet. Wykazano, że średnie stężenia ERc i PRc (w przeliczeniu na jednostkę białka cytozolu) w mięśniakach były większe niż w błonach mięśniowych tych samych macic zarówno w fazie sekrecji, jak i w fazie proliferacji. Tak w błonach mięśniowych, jak i w mięśniakach średnie stężenia ERc i PRc (w przeliczeniu na mg białka cytozolu) w fazie proliferacji były większe niż w fazie sekrecji, ale różnica ta osiągała znamienność statystyczną tylko dla PRc, a przeliczona na jednostkę DNA tkanki zachowywała znamienność tylko w przypadku prawidłowej błony mięśniowej. Różnice średniej zawartości ERn w błonie mięśniowej i mięśniakach nie były statystycznie istotne i nie wykazywały istotnych różnic związanych z fazą cyklu, ale liczba tkanek analizowanych pod tym względem była mała, co nie pozwala na wysnucie jednoznacznych wniosków. Na podstawie otrzymanych wyników oraz analizy danych z piśmiennictwa wysunięto przypuszczenie, że reaktywność mięśniaków na progesteron jest słabsza niż prawidłowej błony mięśniowej.

Mięśniaki są najczęściej spotykanymi nowotworami macicy. Ich wzrost jest zazwyczaj ograniczony w czasie do okresu rozrodczego, co wskazuje na jego związek z czynnością jajników (11, 16). U zwierząt można wywołać mięśniaki różnych narządów przez stosowanie estradiolu (9). W związku z tymi obserwacjami postulowano, że pojawianie się mięśniaków macicy u kobiet jest związane z hiperestrogenizmem (18, 21), jednak inni badacze nie potwierdzili tego przypuszczenia (15).

Hormony steroidowe wpływają na czynność komórek docelowych za pośrednictwem wewnątrzkomórkowych białek receptorowych, swoiście oddziaływających z chromatyną (6, 12). Ilość białka receptorowego w komórce może być jednym z czynników warunkujących wrażliwość na dany hormon (7, 19). W prawidłowych tkankach macicy — błonach mięśniowej i śluzowej — zawartość receptorów estrogenów i progestagenów wzrasta pod wpływem estradiolu, a maleje pod wpływem progesteronu, i w proliferacyjnej fazie cyklu miesięczkowego jest większa niż w fazie sekrecyjnej (3, 8, 20).

Celem obecnej pracy było określenie zawartości receptorów estrogenów i progestagenów w mięśniakach macic miesięczkujących kobiet i ustalenie, czy wykazuje ona w czasie cyklu miesięczkowego takie same wahania, jaki zachodzą w prawidłowej błonie mięśniowej macicy.

MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowiły mięśniaki i prawidłowa błona mięśniowa macic 16 miesięczkujących kobiet poddanych histerektomii. W 9 przypadkach analizowano po 2 mięśniaki pochodzące z tej samej macicy. Fazę cyklu miesięczkowego ustalano na podstawie histomorfologicznych cech endometrium.

Tkanki sproszkowywano w temperaturze ciekłego azotu przy użyciu młynka wibracyjnego *Dismembrator II (Braun, RFN)* przy amplitudzie drgań 15 mm w ciągu 1 min. Dalsze etapy preparatyki i oznaczenia białek receptorowych prowadzono — o ile nie zaznaczono inaczej — w temp. 0—2°C. Proszek zawieszano w 4 objętościach buforu TEDG (Tris-HCl 10 mM, EDTA — 1,5 mM, ditiotreitol — 0,5 mM, glicerol — 10% obj., pH 7,4 w 20°C) i poddawano dalszej homogenizacji przy użyciu aparatu Polytron PTA 10-35 (*Kinematica GmbH, Szwajcaria*) stosując trzy 10-sekundowe cykle pracy przy ustawieniu regulatora prędkości w położeniu 5 z 1-min przerwami na chłodzenie. Z zawiesiny pobierano próbkę w celu oznaczenia DNA, a resztę wirowano przy 860 g przez 20 min. Nadsącz wirowano ponownie przy 220 000 g przez 30 min w celu otrzymania cytozolu, osad z tego wirowania cdrzucano. Osad po wirowaniu zawiesiny przy 860 g (zawierający jądra komórkowe) przemywano 3-krotnie przez zawieszenie w 4 obj. buforu TEDG i wirowanie przy 860 g przez 10 min, nadsącze cdrzucano. Przemyty osad ekstrahowano 4 obj. buforu TEDG z dodatkiem 0,6 M KCl przez 1 godz., mieszając co 10 min, a następnie odwirowywano przy 150 000 g przez 30 min; w ekstrakcie oznaczano „jądrowy” receptor estrogenów, a w osadzie poekstrakcyjnym — DNA.

Cytozole (100 μ l) inkubowano przez noc z 10 nM 3 H-estradiolem (3 H-E₂) w obecności i w nieobecności 1 μ M dietylostilbestrolu (DES) w celu oznaczenia receptora estrogenów (ERc) lub z 20 nM 3 H-promegestonem (3 H-R5020) w obecności 1 μ M kortyzolu i w obecności oraz w nieobecności 2 μ M nieradioaktywnego promegestonu w celu oznaczenia receptora progestagenów (PRc). Łączna objętość mieszaniny inkubacyjnej wynosiła w każdym przypadku 200 μ l. W celu oznaczenia receptora estrogenów w ekstrakcie jądrowym (ERn) próbki ekstraktu (200 μ l) inkubowano przez 3 godz. w temp. 30°C z 5 nM 3 H-E₂ w obecności i w nieobecności 1 μ M DES w łącznej objętości 203 μ l, a następnie schładzano w lodzie. Do wszystkich próbek dodawano następnie po 20 μ l 5% zawiesiny węgla aktywowanego (Norit A, Sigma) w 0,5% roztworze dekstranu (grade C, BDH) w buforze TEDG, inkubowano przy stałym mieszaniu przez 15 min., odwirowywano węgiel przy 4600 g przez 10 min. i mierzono radioaktywność nadsącza. Ilość miejsc receptorowych obliczano z różnicy radioaktywności nadsączów z próbek zawierających i nie zawierających nieradioaktywny R5020 lub DES i przeliczano na mg białka cytozolu lub mg DNA homogenatu tkankowego (ERc, PRc) lub na mg DNA w osadzie poekstrakcyjnym (ERn).

Białko oznaczano metodą Lowry'ego (10), a DNA — zmodyfikowaną metodą *Burtona* (4). Do statystycznej oceny wyników zastosowano test „t” Studenta.

WYNIKI

Stwierdzono, że średnia zawartość „cytozolowych” receptorów estrogenów i progestagenów w mięśniakach jest większa niż w prawidłowej błonie mięśniowej, zarówno w proliferacyjnej, jak i w sekrecyjnej fazie cyklu miesiączkowego. Różnice te były jednak znamienne statystycznie jedynie w przeliczeniu na jednostkę białka cytozolu, a zniknęły lub malały poniżej progu znamienności ($p = 0,05$) po przeliczeniu na jednostkę DNA. Mięśniaki zawierały także więcej ER_n niż prawidłowa błona mięśniowa, ale te różnice nie były statystycznie istotne dla żadnej z faz cyklu (tabela I).

Zawartość ER_c, PR_c i ER_n w tkankach pochodzących z różnych macic wykazywała znaczną indywidualną zmienność (dane nie prezentowane), ale w większości przypadków (odpowiednio w 76% i 80%) zawartość ER_c i PR_c w mięśniaku była większa niż w prawidłowej błonie mięśniowej tej samej macicy.

Mięśniaki z macic usuniętych w proliferacyjnej fazie cyklu zawierały średnio znamienne więcej PR_c niż mięśniaki macic usuniętych w fazie sekrecji, a różnica średniej zawartości ER_c w tych tkankach wykazywała podobną tendencję (w przeliczeniu na jednostkę białka), ale nie osiągała znamienności. W przeliczeniu na jednostkę DNA średnia zawartość ER_c w mięśniakach była w fazie proliferacji nieznamienne mniejsza, a średnia zawartość PR_c — nieznamienne większa niż w fazie sekrecji. Natomiast średnia zawartość PR_c w prawidłowej błonie mięśniowej była w fazie proliferacji istotnie większa niż w fazie sekrecji, niezależnie od sposobu przeliczenia wyników. Średnia zawartość ER_n w mięśniakach i błonach mięśniowych nie wykazywała zmian związanych z fazą cyklu, ale pod tym względem analizowano bardzo małą liczbę próbek (tab. I).

DYSKUSJA

Badania nad regulacją zawartości receptorów dla hormonów steroidowych w mięśniakach prowadzone są m.in. w poszukiwaniu przyczyn zmienionej (w porównaniu z prawidłową błoną mięśniową) reaktywności tych nowotworów na estrogeny i progestageny. Większość badaczy stwierdza, że średnie stężenia receptorów estrogenów i progesteronów w mięśniakach są większe niż w prawidłowej błonie mięśniowej (1, 3, 13, 14), co potwierdzone zostało również w obecnej pracy. Inni nie znajdują istotnych różnic (20) między zawartością PR_c w tych tkankach lub nawet wykazują, że w nowotworze jest ona zmniejszona (3, 17). Należy jednak zwrócić uwagę na to, że podawane przez nich wartości stężeń PR_c są zwykle o rząd wielkości mniejsze niż większość danych w piśmiennictwie, a zatem różnice te mogą wynikać z zastosowanej metodyki.

Zawartość receptorów estrogenów i progestagenów w mięśniakach macicy wykazuje znaczną indywidualną zmienność (1, 17, 20). W naszym materiale, w większości przypadków, zawartość PR_c i ER_c w mięśniaku była większa, niż w sąsiadującej tkance prawidłowej, ale zdarzały się także takie przypadki, w których było odwrotnie. Ponadto stwierdziliśmy istnienie znacznych różnic zawartości ER_c i PR_c w różnych mięśniakach pochodzących z tej samej macicy (dane nie prezentowane). Jedną z przyczyn wymienionych powyżej różnic może być zmniejszenie ilości rozpuszczalnych białek w mięśniakach w porównaniu z ich zawartością w tkance prawidłowej (1). Przypuszczenie to potwierdza fakt,

Tabela 1. Zawartość „cytologicznych” receptorów estrogenów (ERe) i progestagenów (PRc) oraz „jądrowego” receptora estrogenów (ERn) w prawidłowej błonie mięśniowej i mięśniakach macicy miesiączkujących kobiet. W nawiasach podano liczbę oznaczeń; w 9 przypadkach analizowano oddzielnie po 2 mięśniaki z tej samej macicy

Table 1. Contents of „cytosol” estrogen (ERe) and progestagen (PRc) receptors and of „nuclear” estrogen (ERn) receptor in the normal myometrium and in the uterine myomas of menstruating women. In brackets number of estimations; in 9 cases pairs of myomas from the same uterus have been analysed separately

	Faza proliferacji		Faza sekrecji	
	Wiek pacjentek (średnia \pm SD): 44 \pm 6 mięśniak	Liczba przypadków: 7 mięśniówka	Wiek pacjentek (średnia \pm SD): 44 \pm 6 mięśniak	Liczba przypadków: 9 mięśniówka
ERe				
fmol/mg białka \pm SE	81 \pm 16 (10)	31 \pm 7 (7)	53 \pm 8 (15)	25 \pm 7 (9)
				p < 0,05
pmol/mg DNA \pm SE	0,72 \pm 0,15 (6)	0,78 \pm 0,14 (4)	0,88 \pm 0,15 (7)	0,45 \pm 0,08 (4)
ERn				
pmol/mg DNA \pm SE	0,97 \pm 0,25 (6)	0,53 \pm 0,10 (4)	0,95 \pm 0,27 (5)	0,65 \pm 0,05 (3)
PRc				
pmol/mg białka \pm SE	1,92 \pm 0,30 (10)	0,85 \pm 0,21 (7)	0,97 \pm 0,13 (15)	0,48 \pm 0,07 (9)
				p < 0,02
				p < 0,001
				p < 0,005
pmol/mg DNA \pm SE	28,8 \pm 6,9 (6)	22,8 \pm 3,6 (4)	19,2 \pm 3,2 (7)	11,9 \pm 0,5 (4)
				p < 0,05

że, jak wykazaliśmy w badaniach przeprowadzonych na większej liczbie mięśniaków i błon mięśniowych (bez uwzględniania fazy cyklu), zmienność wyników oznaczeń ERc i PRc w przeliczeniu na mg DNA tkanki była z reguły znacznie mniejsza niż w przeliczeniu na mg białka cytozolu, a różnice między zawartością ERc i PRc w mięśniakach w porównaniu z prawidłową błoną mięśniową malały poniżej progu znamienności statystycznej (2).

Różnice zawartości ERc i PRc w mięśniakach macic usuniętych w różnych fazach cyklu miesięczkowego wskazują, że nowotwory te reagują na zmiany stężeń estrogenów i progesteronu podobnie jak prawidłowa błona mięśniowa (3, 14). Należy jednak zwrócić uwagę na to, że względna różnica średniej zawartości PRc w mięśniakach w fazach proliferacji i sekrecji (w przeliczeniu na mg DNA) jest mniejsza niż w błonie mięśniowej (odpowiednio 33% i 48%) i nie osiąga statystycznej zmienności. Fakt ten przemawia za zmniejszeniem reaktywności tych nowotworów na progesteron. Przypuszczenie to znajduje potwierdzenie w pewnych danych klinicznych: wykazano, że do wywołania degeneracyjnych zmian w mięśniakach konieczne jest zastosowanie bardzo dużych dawek progestagenów, a spontaniczne zmiany tego typu w czasie ciąży występują przede wszystkim w trzecim jej trymestrze, tj. po znacznie dłuższym okresie działania progesteronu, niż ma to miejsce w czasie cyklu miesięczkowego (5).

С. Храпуста, В. Сивьски, В. Конопка, З. Пашко,
Ю. Шамборски

КОНЦЕНТРАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРОГЕНОВ И ПРОГЕСТОГЕНОВ В МИОМАХ МАТКИ ЖЕНЩИН В ТЕЧЕНИЕ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА

Резюме

Обозначено и сравнено содержание „цитозольных” рецепторов эстрогенов (ERc) и прогестогенов (PRc) а также „ядерного” рецептора эстрогенов (ERn) в правильной миометрии и миомах маток 16 женщин с менструальным циклом. Доказано, что средние концентрации ERc и PRc (пересчитаны на единицу белка цитозоля) в миомах были больше чем в миометриях тех же маток, так в секреторной как и в пролиферативной фазе. Так в миометрии, как и в миомах средние концентрации ERc и PRc (пересчитаны на мг белка цитозоля) в пролиферативной фазе были больше чем в секреторной, но эта разница достигла статистической значимости только для PRc, а пересчитана на единицу ДНК ткани оставалась значимой только в случае правильного миометрия. Разницы среднего содержания ERn в эндометрии и миомах не были статистически значимыми и не проявляли значительных различий в связи с фазисом цикла, но количество тканей анализированных с той точки зрения было малое, что не дает возможности делать однозначные выводы. На основании полученных результатов а также анализа литературных данных сделано предложение, что реактивность миом на прогестерон меньше чем правильного миометрия.

S. Chrapusta, W. Sieiński, B. Konopka, Z. Paszko,
J. Szamborski

CONCENTRATIONS OF ESTROGEN AND PROGESTAGEN RECEPTORS IN THE UTERINE MYOMAS OF WOMEN IN THE COURSE OF MENSTRUAL CYCLE

Summary

Contents of „cytosol” estrogen (ERc) and progestagen (PRc) receptors and of „nuclear” estrogen receptor (ERn) in the normal uterine muscularis and in uterine myomas in 16 menorrhagic women has been estimated and compared. It has

been shown that mean concentrations of ERc and PRc (calculated for a unit of cytosol protein), in myomas have been greater than in the uterine myometrium of the same women, both in the secretion and proliferation phase. Both in the myometrium and in myomas mean concentrations of ERc and PRc (calculated for a unit of cytosol protein) in the proliferation phase has been greater as compared with secretory phase, but the difference reached the statistical significance only for PRc and calculated for a unit of DNA of the tissue preserved. The significance only in case of normal muscularis. The differences of mean contents of ERn in the myometrium and myomas did not present significant differences, connected with the phase of the cycle, but the number of analysed in this respect tissues has been small, not allowing the unequivocal conclusions. In connection with obtained results and the analysis of published data the hypothesis is advanced that the reactivity of myomas to progesterone is lower as compared with normal myometrium.

PISMIENNICTWO

1. Buehli K. A., Keller P. J.: Cytoplasmic progesterone receptors in myomal and myometrial tissue. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 1983; 62: 487. — 2. Chrapusta S., Konopka B., Galuda M., Padzik H., Ujee M., Paszko Z.: Zawartość receptorów estrogenowych i progestagenowych w endometrium i myometriu u kobiet podczas cyklu miesięczkowego. *Nowotwory* 1987; w druku. — 3. Eiletz J., Genz T., Pollow K., Schmidt-Gollwitzer M.: Sex steroid levels in serum myometrium and fibromyomata in correlation with cytoplasmic receptors and 17 β -HSD activity in different age-groups and phases of menstrual cycle. *Arch. Gynecol.* 1980; 239: 13. — 4. Giles K. W., Myers A.: An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 1965; 206: 93. — 5. Godsteker J. W., Maqueo M., Ricaud L., Aguilar J. A., Canales E.: Induction of degenerative changes in uterine myomas by high-dosage progestin therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1966; 96: 1078. — 6. Gorski J., Gannon F.: Current models of steroid hormone action: a critique. *Ann. Rev. Physiol.* 1976; 38: 425. — 7. Hsueh A. J. W., Peck E. J. Jr., Clark J. H.: Progesterone antagonism of the oestrogen receptor and oestrogen-induced uterine growth. *Nature* 1975; 254: 337. — 8. Körneji J., Csermely T., Szekely J. A., Vertes M.: Two types of nuclear estradiol binding sites in human myometrium and leiomyoma during the menstrual cycle. *Exp. Clin. Endocrinol.* 1986; 87: 256. — 9. Lipschütz A., Iglesias R.: Multiple tumeurs uterines et extra-génitales provoquées par le benzoate d'oestradiol. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 1938; 129: 519. — 10. Loury O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurements with Folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1965; 193: 265. — 11. Müller N. F., Lubovici P. P.: On the origin and development of uterine fibroids. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1955; 70: 720. — 12. Scheidereit C., Krauter P., van der Ahe D., Janich S., Rabenau O., Cato A. C. B., Suske G., Westphal H. M., Beato M.: Mechanism of gene regulation by steroid hormones. *J. Steroid Biochem.* 1936; 24: 19. — 13. Steiński W., Chrapusta S., Konopka B., Paszko Z., Chmielewski M., Szamborski J.: Struktura morfologiczna mięśniaków macicy a zawartość receptorów estrogenów i progestagenów. *Nowotwory* 1987; w druku. — 14. Soules M. R., McCarthy K. S. Jr.: Leiomyomas: steroid receptor content. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1982; 143: 6. — 15. Spellacy W. N., LeMaire W. J., Buhí W. C., Birk S. A., Bradley B. A.: Plasma growth hormone and estradiol levels in women with uterine myomas. *Obstet. Gynecol.* 1972; 40: 829. — 16. Stearn H. C.: Uterine myomas: clinical and pathological aspect. *Postgrad. Med.* 1965; 51: 165. — 17. Tamaya T., Fujimoto J., Okada H.: Comparison of cellular levels of steroid receptors in uterine leiomyoma and myometrium. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 1985; 64: 307. — 18. Timonen S., Purola E.: Hormonal and neurovegetative factors in myoma genesis. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 1960; 39: 154. — 19. Walters M. R., Clark J. H.: Relationship between the quantity of progesterone receptor and the antagonism of estrogen-induced uterotrophic response. *Endocrinology* 1979; 105: 382. — 20. Wilson E. A., Yang F., Rees E. D.: Estradiol and progesterone binding in uterine leiomyomata and in normal uterine tissues. *Obstet. Gynecol.* 1980; 55: 20. — 21. Winterspoon J. T.: The hormonal origin of uterine fibroids and hypothesis. *Amer. J. Cancer* 1935; 24: 402.

Adres autora: Samodzielna Pracownia Endokrynologii Onkologicznej Centrum Onkologii — Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, ul. Wawelska 15, 00-973 Warszawa

Praca wpłynęła do redakcji: 1987.09.17