# Streszczenie

**Wstęp**

Mięśniaki macicy są najczęściej występującymi mezenchymalnymi nowotworami macicy, a częstość ich występowania szacuje się na 40-60% kobiet przed 35 rokiem życia oraz 70-80% kobiet powyżej 50 roku życia. Do najczęstszych objawów klinicznych mięśniaków macicy należą: nieprawidłowe krwawienia maciczne, niecharakterystyczne dolegliwości bólowe, objawy uciskowe głównie dróg moczowych i jelita grubego, niedokrwistość oraz niepłodność. Mimo, iż mięśniaki gładkokomórkowe są zmianami niezłośliwymi to w literaturze opisywane są pojedyncze przypadki ich transformacji w zmiany złośliwe (np. mięsaki gładkokomórkowe). Ze względu na wysoką częstość występowania, mięśniaki macicy są najczęstszym powodem operacji usunięcia macicy. Dodatkowo trudności diagnostyczne może nieść ze sobą różnicowanie pomiędzy mięśniakami gładkokomórkowymi a mięśniakami atypowymi. Dotychczas nie opracowano skutecznej profilaktyki oraz metod leczenia zachowawczego, co związane jest z nadal mało poznaną biologią opisywanych zmian. Prowadzone obecnie badania mają na celu pogłębienie wiedzy na temat mechanizmów leżących u podstaw tworzenia się mięśniaków, czynników wpływających na ich wzrost oraz markerów posiadających walory diagnostyczne oraz prognostyczno-predykcyjne.

Białka regulujące proliferację komórkową wykorzystywane jako markery, pozwalają określić stopień aktywności podziałowej guza. W komórkach nowotworowych, aktywnie dzielących się, obserwowany jest wzrost poziomu ekspresji genów oraz ilości białek proliferacyjnych. Stanowi to ważny czynnik diagnostyczny oraz prognostyczny i predykcyjny dla pacjentów, niejednokrotnie związany z gorszym rokowaniem. Białka z rodziny MCM (białka licencjonujące replikację, ang. *minichromosome maintenance proteins*), są nowymi markerami proliferacji komórkowej intensywnie badanymi przez ostatnie lata. Podstawową funkcją białek MCM jest współudział w molekularnym mechanizmie tworzenia widełek replikacyjnych i jednocześnie regulacja syntezy DNA. Białka MCM w fazie spoczynku komórki G0 nie ulegają ekspresji, podczas gdy wykrywane są podczas wszystkich pozostałych faz (G1, S, G2 i M). Z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko białkom MCM można odróżnić komórki w fazie spoczynku i różnicowania od tych aktywnie dzielących się, co jest typowe dla komórek nowotworowych, zwłaszcza zmian o charakterze złośliwym. Wykorzystanie tych białek może pomóc w postawieniu diagnozy oraz prognozowaniu i ocenie odpowiedzi na zastosowane leczenie w wielu powszechnie występujących zmianach nowotworowych, w tym mięśniakach macicy.

**Materiał i metody**

Do badania wykorzystano 44 przypadki mięśniaków macicy oraz 5 przypadków makroskopowo niezmienionej tkanki mięśniowej z otoczenia guzów zabezpieczone w formie bloczków parafinowych. Następnie przygotowano skrawki parafinowe, które podbarwiono przy użyciu hematoksyliny i eozyny oraz zdigitalizowano przy użyciu skanera histologicznego Pannoramic MIDI II (3DHistech) celem weryfikacji rozpoznania wstępnego oraz określenia obszarów referencyjnych do przygotowania mikromacierzy tkankowych (TMA). Następnie dla każdego przypadku wybrano 3 lokalizacje o reprezentatywnej mikroarchitekturze i przy użyciu TMA Grand Master (3DHistech) wykonano mikromacierze tkankowe. Na skrawkach TMA przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne (IHC) z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko: antygenowi proliferacyjnemu Ki-67, receptorowi estrogenowemu (ER) i progesteronowemu (PgR) oraz badanym białkom rodziny MCM, tj. MCM-3, MCM-5 i MCM-7 z wykorzystaniem automatycznej platformy Autostainer Link48 (Dako).

Reakcje immunohistochemicznych oceniano z zastosowaniem oprogramowania Quant Center z modułem Nuclear Quant (3DHistech), przeznaczonym do analizy reakcji jądrowych. Dla każdego ze 3 histiospotów reprezentujących jeden przypadek w TMA określono procentowy udział komórek wykazujących ekspresję badanego markera w odniesieniu do wszystkich komórek zmienionych. Finalny wynik dla każdego przypadku stanowiła wartość średnia z 3 histiospotów. Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu Statistica v.12 (Statsoft) oraz arkusza kalkulacyjnego MS Excel (Microsoft) stosując testy Shapiro-Wilka, Manna-Whitneya oraz Spearmana przyjmując istotność statystyczną na poziomie p<0,05.

**Cele**

Celem pracy było określenie potencjału proliferacyjnego komórek wchodzących w skład mięśniaków macicy w oparciu o ekspresję powszechnie oznaczanego antygenu proliferacyjnego Ki-67 oraz badanych białek rodziny MCM, tj. MCM-3, MCM-5 i MCM-7. Ponadto oceniano ekspresję receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz korelowano uzyskane wyniki z ekspresją wyżej wymienionych markerów. Ostatecznie analizowano ekspresję wszystkich badanych markerów w aspekcie posiadanych danych kliniczno-patologicznych.

**Wyniki**

W grupie badanej (mięśniaki macicy) zaobserwowano istotną statystycznie silniejszą ekspresję wszystkich badanych białek MCM, w porównaniu do grupy kontrolnej (tkanka niezmieniona nowotworowo). Ponadto, wykazano obecność umiarkowanych i silnych pozytywnych korelacji pomiędzy wszystkimi badanymi markerami proliferacyjnymi. Dodatkowo ekspresja białka MCM-7 korelowała pozytywnie z ER oraz PgR. W odniesieniu do posiadanych danych kliniczno-patologicznych stwierdzono ujemną korelację pomiędzy ekspresją białek MCM a liczba przebytych ciąż jak również porodów. W grupie kobiet stosujących doustną antykoncepcję hormonalną stwierdzono istotne statystycznie obniżenie ekspresji MCM-5 i MCM-7, podczas gdy u kobiet palących zaobserwowano wzrost ekspresji MCM-7 jak również ER i PgR. Pozostałe przeanalizowane zależności nie uzyskały poziomu istotności statystycznej.

**Wnioski**

1. Komórki wchodzące w skład mięśniaków macicy cechują się większym potencjałem proliferacyjnym ocenianym ekspresją antygenu proliferacyjnego Ki-67 oraz badanych białek rodziny MCM w porównaniu do niezmienionych komórek warstwy mięśniowej trzonu macicy.
2. W związku ze stwierdzoną korelacją ekspresji obu receptorów steroidowych, ER i PgR, z ekspresją MCM-7, wydaje się że jest to białko rodziny MCM, które zasługuje na największą uwagę.
3. Ekspresja badanych markerów w odniesieniu do danych klinicznych wskazywała na istotne statystycznie zależności wyłącznie w aspekcie wywiadu położniczego, stosowanej antykoncepcji doustnej oraz nikotynizmu, co sugeruje możliwość wykorzystania ekspresji ww. markerów w tych grupach pacjentek .
4. Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę dalszych badań z wykorzystaniem białek rodziny MCM celem weryfikacji możliwości ich wykorzystania klinicznego jako markera proliferacyjnego, alternatywnego dla rutynowo oznaczanego antygenu Ki-67.

**Abstract**

**Introduction**

Uterine fibroids are the most common mesenchymal uterine neoplasms; their prevalence is estimated at 40%–60% of women under 35 and 70%–80% of women over 50 years of age. The most common clinical symptoms of uterine fibroids include: abnormal uterine bleeding, nonspecific pain, pressure symptoms mainly associated with the urinary tract and colon, anemia, and infertility. Although leiomyomas are benign lesions, the literature describes a small number of cases of them transforming into malignant lesions (e.g., leiomyosarcomas). Because of their high prevalence, uterine fibroids are the most common cause of uterine surgery. In addition, diagnostic difficulties may be associated with differentiating between leiomyomas and atypical fibroids. So far, no effective method of prevention or conservative treatment has been developed, on account of the little-known biology of these lesions. The current research aims to deepen our knowledge of the mechanisms lying behind the creation of leiomyomas, the factors that affect their growth, and markers with diagnostic and prognostic properties.

The proteins that regulate cell proliferation are used as markers, allowing the degree of tumor involvement to be determined. In active tumor cells, an increase in the level of gene expression and in the amount of proliferative proteins is observed. This constitutes an important diagnostic, prognostic, and predictive factor, and is often associated with worse prognosis. Proteins from the MCM (minichromosome maintenance) family are new markers of cell proliferation that have been intensively studied in recent years. The primary function of MCM proteins is to participate in the molecular mechanism of creating a replication forks while regulating DNA synthesis. MCM proteins in the G0 resting phase of cells are not expressed, but are detected during all other phases (G1, S, G2, and M). Using antibodies directed against MCM proteins, it is possible to distinguish cells from the resting and differentiation stages from those that are actively dividing - which is typical of tumor cells, and especially of malignant lesions. The use of these proteins can help to diagnose, predict, and evaluate the response to the treatment used in many common tumor changes, including uterine fibroids.

**Materials and methods**

Forty-four cases of uterine fibroids and five cases of macroscopically unaltered muscle tissue from the area surrounding such tumors were fixed using paraffin blocks. Paraffin sections were then stained with hematoxylin and eosin and digitized using a Pannoramic MIDI II histological scanner (3DHistech) to verify the prediagnosis and to determine the reference areas for tissue microarrays (TMA). Then three locations with representative microarchitecture were then selected for each case and a TMA Grand Master (3DHistech) was used for the tissue microarrays. On the TMA sections, immunohistochemistry (IHC) was performed using anti-Ki-67 proliferative antigen, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), and test proteins of the MCM family - such as MCM-3, MCM-5, and MCM-8 - using the automatic Autostainer Link48 platform (Dako).

Immunohistochemical reactions were evaluated using Quant Center software with the Nuclear Quant module (3DHistech) for nuclear reaction analysis. For each of the three histiospots, each representing one case in TMA, the percentage of cells expressing the marker under investigation was determined for all affected cells. The final result for each case was taken as the average of the three histiospots. Statistical analysis was performed using Statistica v.12 (Statsoft) software and MS Excel spreadsheet (Microsoft) using the Shapiro–Wilk, Mann–Whitney, and Spearman tests, taking p < 0.05 as statistically significant.

**Aims**

The aim of this work was to determine the proliferative potential of uterine leiomyoma cells based on the expression of the Ki-67 proliferative antigen and the MCM family of proteins - i.e., MCM-3, MCM-5, and MCM-7. In addition, the expression of estrogen and progesterone receptors was evaluated and correlated with the expression results of these markers. Ultimately, the expression of all the examined markers was analyzed in terms of clinical and pathological data.

**Results**

In the study group (uterine fibroids), statistically significantly stronger expression of all the investigated MCM proteins was observed, as compared to the control group (neoplastically unchanged tissue). In addition, moderate and strong positive correlations were found between all tested proliferative markers. The expression of the MCM-7 protein also correlated positively with ER and PgR. With regard to clinical and pathological data, there was a negative correlation between the expression of MCM proteins and the number of both pregnancies and births. Significant reductions in MCM-5 and MCM-7 expression were observed in the group of women receiving oral hormonal contraceptives, while smoking women showed an increase in MCM-7 expression, as well as in that of ER and PgR. The other examined relationships failed to reach the level of statistical significance.

**Conclusions**

1. Uterine fibroid cells have greater proliferative potential, as evaluated by expression of the Ki-67 proliferative antigen and MCM family proteins, compared to neoplastically unaltered cells of the uterine body.
2. With reference to the correlation observed between the expression of both steroid receptors, ER and PgR, and the expression of MCM-7, it appears that it is the MCM family protein that deserves the greatest attention.
3. Referring the expression of the investigated markers back to the clinical data, a statistically significant relationship is found only in the context of obstetric history, oral contraceptives, and nicotine use - which suggests the possibility of using the expression of these markers in these groups of patients.
4. These results indicate the need for further studies using MCM family proteins in order to verify their potential for clinical use as proliferative markers, and as an alternative to the routine marking of Ki-67 antigen.