

Ocena ekspresji telomerazy w błonie śluzowej jamy macicy podczas cyklu miesięczkowego

Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in endometrium during menstrual cycle

Edyta Właźlak¹, Adam Bitner¹, Grzegorz Surkont¹, Nina Juszczyzyn-Różycka¹,
Tomasz Stetkiewicz², Katarzyna Hendzel³, Józef Kobos⁴, Jacek Suzin¹

¹Klinika Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej, I Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi; kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Jacek Suzin

²Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński

³Zakład Patomorfologii Wojewódzkiego Specjalistycznego Szpitala im. M. Madurowicza w Łodzi; kierownik Zakładu: dr med. Katarzyna Hendzel

⁴Zakład Patomorfologii Wieku Rozwojowego, Katedra Biomedycznych Podstaw Pielęgniarstwa, Uniwersytecki Szpital Kliniczny Nr 4 im. M. Konopnickiej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi; kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. med. Józef Kobos

Przeгляд Menopauzalny 2007; 2: 102–105

Streszczenie

Telomeraza jest białkową polimerazą mającą zdolność wydłużania telomerów. Uważa się, że pełni ona kluczową rolę w utrzymaniu proliferacyjnej aktywności komórek.

Cel pracy: Celem pracy była ocena ekspresji telomerazy w błonie śluzowej jamy macicy miesięczkujących kobiet w fazie proliferacyjnej oraz sekrecyjnej.

Materiał i metody: Ekspresję telomerazy mierzono przy pomocy monoklonalnych przeciwciał przeciwko podjednostce białkowej ludzkiej telomerazy – hTERT. W danym polu widzenia obliczano procentowy udział komórek wykazujących ekspresję telomerazy w stosunku do wszystkich komórek (indeks komórkowy).

Wyniki: Wykazano istotną ekspresję telomerazy we wszystkich badanych preparatach, przy czym poziom ekspresji w fazie proliferacyjnej był statystycznie istotnie wyższy niż w fazie sekrecyjnej.

Wnioski: W błonie śluzowej macicy miesięczkujących kobiet stwierdzono wysoką ekspresję telomerazy, której wartość zależała od fazy cyklu. W fazie proliferacyjnej była ona wyższa niż w fazie sekrecyjnej.

Słowa kluczowe: hTERT, endometrium, cykl miesięczkowy

Summary

Telomerase is a protein polymerase which has the ability to elongate telomers. There is a common opinion that it plays a crucial role in holding proliferative activity of cells.

Aim of the study: The aim of the study was to evaluate telomerase expression in women's endometrium in proliferative and secretory phase.

Material and methods: Telomerase expression was evaluated using monoclonal antibodies against protein subunit of human telomerase (hTERT). In a given range we counted cell index (percentage of cells showing telomerase activity out of all cells).

Results: We found significant telomerase expression in every examined tissue. The level of telomerase expression in proliferative endometrium was statistically significantly higher than in the secretory phase.

Conclusions: In endometrium of menstruated women there was found high telomerase expression, whose value depended on the phase of the cycle. In the proliferative phase expression was statistically higher than in the secretory phase.

Key words: hTERT, endometrium, menstrual cycle

Adres do korespondencji:

dr med. **Edyta Właźlak**, Klinika Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej, I Katedra Ginekologii i Położnictwa, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. M. Madurowicza, ul. Wileńska 37, 94-029 Łódź, tel. + 48 42 686 04 71, e-mail: edytawlazlak@wp.pl, edytawlazlak@gmail.com

Telomery są specyficznymi strukturami zlokalizowanymi na końcach chromosomów. Są one zbudowane z wielokrotnie powtarzających się heksanukleotydów TTAGGG [1]. Ludzkie telomery mają długość do 25000 bp [2]. Telomery nie zawierają sekwencji kodujących. Ich rola polega przede wszystkim na ochronie chromosomów przed degradacją, zmianą struktury i fuzją z innymi chromosomami [1, 3]. Podczas każdego podziału komórkowego dochodzi do utraty od 50 do 200 nukleotydów z telomerowego DNA każdego z chromosomów [4]. Osiągnięcie przez telomery krytycznej długości prowadzi do apoptozy, tj. do programowanej śmierci komórki [4–6]. Wynika z tego, że prawidłowe komórki mogą dzielić się skończoną ilość razy (tzw. limit Hayflicka), a telomery pełnią w komórce rolę zegara biologicznego. Niektóre intensywnie regenerujące się komórki (np. komórki rozrodcze, komórki hematopoetyczne, keratynocyty) oraz większość komórek nowotworowych wykształciły specyficzne mechanizmy chroniące je przed śmiercią, wynikającą ze skrócenia telomerów [7–10]. Przede wszystkim wynikają one z aktywacji telomerazy – enzymu mającego zdolność wydłużania telomerów. Jest on zbudowany z podjednostki białkowej (hTERT), z matrycy RNA (hTR) oraz z białek towarzyszących – hTEP. Telomeraza, będąc odwrotną transkryptazą, dobudowuje nukleotydy do końcowego odcinka chromosomu wykorzystując własną matrycę RNA [11].

Cel pracy

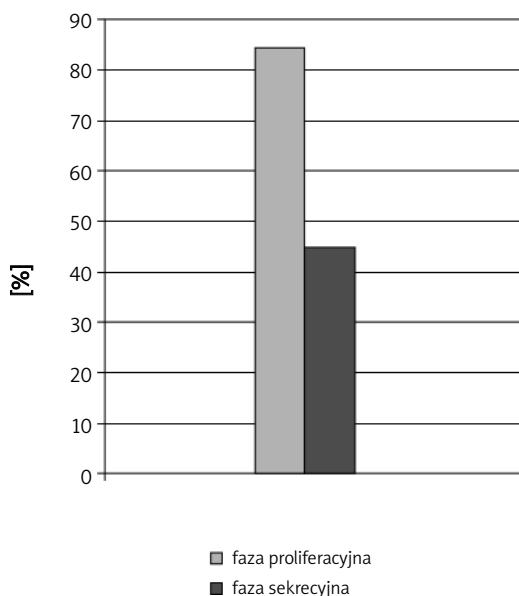
Celem pracy była ocena ekspresji telomerazy w błonie śluzowej jamy macicy miesięczkujących kobiet w fazie proliferacyjnej oraz sekrecyjnej.

Materiał i metodyka

W skład grupy badanej weszło 25 miesięczkujących kobiet w wieku 22–53 lat (średnio 46 lat), u których wykonano diagnostyczne wyłyżeczkowanie jamy macicy ze względu na nieprawidłowy wynik badania cytologicznego, polipa szyjki macicy lub mięśniaków macicy bez nieprawidłowych krwawień i zaburzeń miesięczkowania. Na podstawie badania histopatologicznego pacjentki zostały podzielone na 2 grupy. W skład I grupy weszło 12 kobiet, u których w badaniu histopatologicznym stwierdzono endometrium w fazie proliferacyjnej. Do II grupy (n=13) zakwalifikowano pacjentki z endometrium w fazie sekrecyjnej. Z materiału pobranego od kobiet z badanych grup wykonano ponownie preparaty histologiczne. Przy wykorzystaniu metody immunohistochemicznej oznaczono ekspresję telomerazy w materiale z endometrium. Do badań immunohistochemicznych ekspresji odwrotnej transkryptazy użyto mysiego przeciwciała monoklonalnego przeciwko podjednostce białkowej telomerazy NCL – hTERT firmy Novocastra Laboratories Ltd. Do oceny mor-

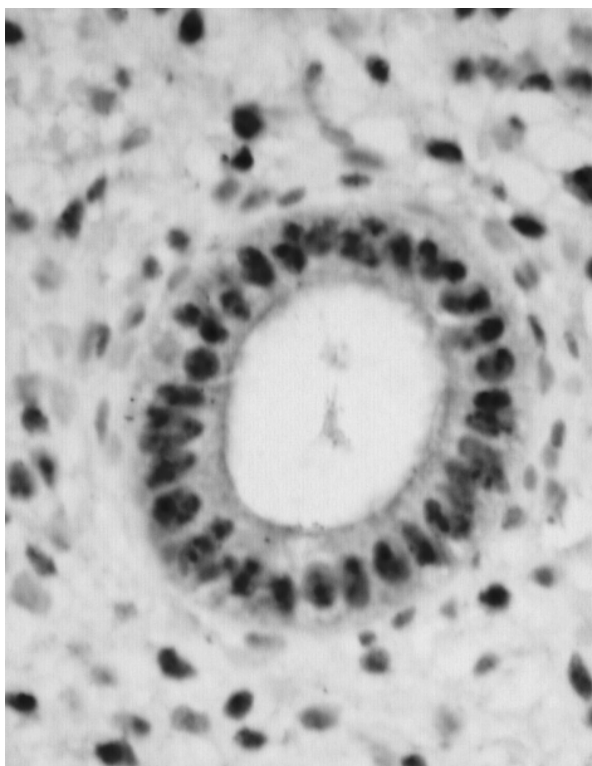
Tab. I. Indeks komórkowy ekspresji telomerazy w 5 losowo wybranych polach widzenia – w fazie proliferacyjnej i w fazie sekrecyjnej

Faza proliferacyjna							Faza sekrecyjna						
indeks komórkowy w kolejnych polach widzenia							indeks komórkowy w kolejnych polach widzenia						
pacjentka	I	II	III	IV	V	średnia	pacjentka	I	II	III	IV	V	średnia
1	0,59	0,78	0,74	0,83	0,7	0,73	1	0,40	0,51	0,56	0,37	0,38	0,44
2	0,83	0,82	0,80	0,85	0,82	0,82	2	0,49	0,53	0,35	0,54	0,42	0,47
3	0,95	0,97	0,73	0,94	0,93	0,90	3	0,36	0,40	0,43	0,36	0,44	0,40
4	0,88	0,70	0,86	0,87	0,93	0,85	4	0,60	0,23	0,48	0,36	0,45	0,42
5	0,65	0,82	0,92	0,85	0,74	0,80	5	0,45	0,64	0,41	0,42	0,28	0,44
6	0,95	0,95	0,85	0,92	0,85	0,90	6	0,49	0,39	0,39	0,54	0,54	0,47
7	0,84	0,85	0,62	0,80	0,81	0,78	7	0,38	0,39	0,54	0,54	0,49	0,47
8	0,88	0,97	0,91	0,81	0,86	0,89	8	0,46	0,70	0,50	0,46	0,58	0,54
9	0,80	0,89	0,93	0,93	0,96	0,90	9	0,29	0,29	0,39	0,58	0,40	0,39
10	0,79	0,94	0,87	0,79	0,88	0,85	10	0,30	0,50	0,29	0,33	0,37	0,36
11	0,79	0,92	0,88	0,98	0,80	0,87	11	0,39	0,50	0,48	0,43	0,40	0,44
12	0,89	0,84	0,82	0,87	0,88	0,86	12	0,60	0,69	0,49	0,43	0,44	0,52
							13	0,51	0,65	0,43	0,42	0,46	0,49
średnia						0,85	średnia						0,45



Ryc. 1. Wyniki – porównanie ekspresji telomerazy w błonie śluzowej macicy w fazie proliferacyjnej i sekrecyjnej

fometrycznej wykorzystano mikroskop optyczny Nixon, Microphot – FXA. Ilościową ocenę wykonano przy użyciu systemu pomiarowego MultiScanBase V.8.08, wyprodukowanego przez Computer Scanning Systems Ltd. Liczono 5 losowo wybranych pól widzenia z powiększeniem 400 razy. W danym polu widzenia obliczano procent



Ryc. 2. Obraz ekspresji telomerazy w fazie proliferacyjnej endometrium

towy udział komórek wykazujących ekspresję telomerazy w stosunku do wszystkich komórek (indeks komórkowy).

Wyniki

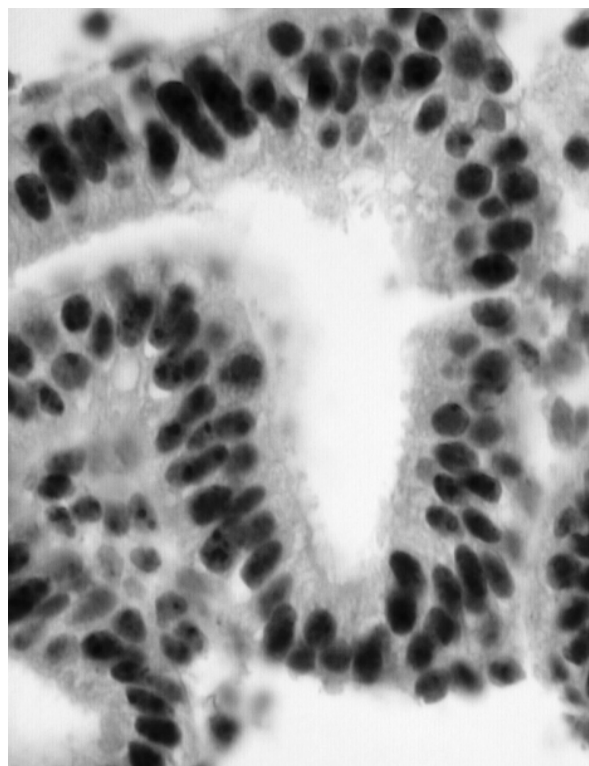
W przeprowadzonym badaniu wykazano ekspresję telomerazy we wszystkich ocenianych przez autorów preparatach. Stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy ekspresją telomerazy w fazie proliferacyjnej i sekrecyjnej. W fazie folikularnej wartość indeksu komórkowego wahała się 73–90% (średnia wartość 85%), w fazie lutealnej – 36–54% (średnio 45%). Uzyskane przez autorów wyniki zebrano w tab. 1 i na ryc. 1. Przykładowe obrazy ekspresji telomerazy w fazie proliferacyjnej oraz sekrecyjnej przedstawiono na ryc. 2. i 3.

Wnioski

W błonie śluzowej macicy miesiączkujących kobiet stwierdzono wysoką ekspresję telomerazy, której wartość zależała od fazy cyklu. W fazie proliferacyjnej była ona wyższa niż w fazie sekrecyjnej.

Dyskusja

W przeciwieństwie do komórek somatycznych, większość komórek nowotworowych [10, 12, 13] wykazuje wysoką aktywność telomerazy. Fakt ten sugeruje, że ak-



Ryc. 3. Obraz ekspresji telomerazy w fazie sekrecyjnej endometrium

tywacja telomerazy może być kluczowym momentem w unieśmiertelnieniu komórek i w procesie onkogenezy. W odróżnieniu od większości komórek somatycznych, w prawidłowym endometrium miesiączkujących kobiet stwierdza się aktywność telomerazy [14, 15], przy czym jej ekspresja zależy od fazy cyklu miesiączkowego, osiągając najwyższe wartości pod koniec fazy proliferacyjnej. Dotychczas przeprowadzone badania oceniające aktywność telomerazy w tkankach endometrium przeprowadzone były przy użyciu metody TRAP (*telomeric repeat amplification protocol*), wykorzystującej reakcję PCR (*polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy). Biorąc pod uwagę bardzo silną korelację pomiędzy aktywnością telomerazy a ekspresją podjednostki hTERT [16], autorzy w badaniach posłużyli się metodami immunohistochemicznymi z użyciem mysich monoklonalnych przeciwciał przeciwko podjednostce hTERT. Dzięki wykorzystaniu tej metody można było w sposób ilościowy pokazać różnice w ekspresji telomerazy pomiędzy endometrium proliferacyjnym i sekrecyjnym u miesiączkujących kobiet. Wykazano także istotne statystycznie różnice pomiędzy ekspresją tego enzymu w endometrium w poszczególnych fazach cyklu miesiączkowego. Najwyższą ekspresję stwierdzono w fazie proliferacyjnej. W fazie sekrecyjnej ekspresja hTERT była znacznie niższa. Uzyskane przez autorów wyniki są zgodne z danymi z piśmiennictwa [17–21].

Wiedza na temat ekspresji telomerazy w błonie śluzowej macicy w trakcie cyklu miesiączkowego może stanowić punkt wyjścia do dalszych badań dotyczących ekspresji telomerazy w stanach patologicznych błony śluzowej jamy macicy, takich jak rozrosty i raki endometrium.

Praca wykonana w ramach grantu KBN nr 507-11-266 oraz pracy własnej nr 502-11-202.

Piśmiennictwo

1. Rhyu MS. Telomeres, telomerase and immortality. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 884-894.
2. Greider CW. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 337-365.
3. Urquidí V, Tarín D, Goodison S. Role of telomerase in cell senescence and oncogenesis. *Annu Rev Med* 2000; 51: 65-79.
4. Allsopp R, Chang E, Kashefi-Azham M, et al. Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 1995; 220: 194-200.
5. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991; 256: 271-282.
6. Harley CB, Vaziri H, Counter C, et al. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 1992; 27: 375-382.
7. de Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2882-2885.
8. Broccoli D, Young J, de Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9082-6.
9. Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K, et al. Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* 1996; 13: 433-9.
10. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-5.
11. Feng J, Funk WO, Wang SS, et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269: 1236-41.
12. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, et al. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 116-22.
13. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, et al. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 895-902.
14. Yokoyama Y, Takahashi Y, Morishita S, et al. Telomerase activity in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 173-7.
15. Kyo S, Takakura M, Kohama T, et al. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* 1997; 57: 610-4.
16. Kyo S, Kanaya T, Takakura M, et al. Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *Int J Cancer* 1999; 80: 60-3.
17. Shroyer KR, Stephens JK, Silverberg SG, et al. Telomerase expression in normal endometrium, endometrial hyperplasia, and endometrial adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16: 225-32.
18. Kyo S, Takakura M, Kohama T, et al. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* 1997; 57: 610-4.
19. Williams CD, Boggess JF, LaMarque LR, et al. A prospective, randomized study of endometrial telomerase during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3912-7.
20. Menon MM, Simha MR. Telomerase and telomere length in normal and malignant human endometrium as prognostic markers. *Indian J Pathol Microbiol* 2003; 46: 394-8.
21. Vidal JD, Register TC, Gupta M, et al. Estrogen replacement therapy induces telomerase RNA expression in the macaque endometrium. *Fertil Steril* 2002; 77: 601-8.