

Ocena ekspresji telomerazy w endometrium atroficznym u kobiet po menopauzie

Expression of telomerase in atrophic endometrium in postmenopausal women

Edyta Wlazlak¹, Józef Kobos⁴, Adam Bitner¹, Grzegorz Surkont¹, Katarzyna Hendzel³, Barbara Kocięba-Gała¹, Aldona Dunicz-Sokolowska¹, Tomasz Stetkiewicz², Jacek Suzin¹

¹Klinika Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej, I Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi;

kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Jacek Suzin

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

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

⁴Katedra i Zakład Patomorfologii, Instytut Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi; SP ZOZ Państwowy Szpital Kliniczny Nr 4 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi; kierownik Pracowni Patomorfologii: prof. dr hab. med. Józef Kobos

Przeгляд Menopauzalny 2007; 3: 162–165

Streszczenie

Telomeraza jest polimerazą, mającą zdolność wydłużania telomerów.

Cel pracy: Celem pracy była ocena aktywności telomerazy poprzez oznaczenie ekspresji hTERT w endometrium atroficznym u kobiet po menopauzie.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 20 kobiet w wieku 49–85 lat (średnio 66 lat), u których usunięto macicę w związku z zaburzeniami statyki lub z powodu łagodnego, nieczynnego hormonalnie guza jajnika. Były to pacjentki po menopauzie, u których w badaniu histopatologicznym stwierdzono obecność endometrium atroficznego. Ekspresję telomerazy mierzono przy pomocy monoklonalnych przeciwciał przeciwko podjednostce białkowej ludzkiej telomerazy – hTERT. Liczono indeks komórkowy (odsetek komórek wykazujących ekspresję telomerazy).

Wyniki: W przeprowadzonym przez nas badaniu stwierdzono ekspresję telomerazy we wszystkich badanych próbkach endometrium. Najmniejsza średnia wartość ekspresji wyniosła 10%, a największa 34%. W pojedynczych polach stwierdzono ekspresję hTERT o wartości 40–57%.

Wnioski: Endometrium atroficzne kobiet po menopauzie wykazuje w większości przypadków małą aktywność telomerazy. W pojedynczych przypadkach aktywność jest większa.

Słowa kluczowe: telomeraza, hTERT, endometrium atroficzne

Summary

Telomerase is a polymerase which has the ability to elongate telomeres.

Aim of the study: The aim of this study was to evaluate telomerase activity through an examination of hTERT expression in atrophic endometrium of postmenopausal women.

Material and methods: 20 postmenopausal women aged 49-85 years (mean 66 yrs), who were hysterectomized because of pelvic organ prolapse or benign ovarian tumours without hormonal activity were evaluated in the study. There was found atrophic endometrium in histological examination. Telomerase expression was measured using monoclonal antibodies against protein subunit of human telomerase – hTERT. We counted cell index (percentage of cells showing telomerase activity).

Results: We found telomerase expression in all examined endometrial specimens. The lower mean expression was 10%, the higher 34%. In some individual ranges we found expression between 40 and 57%.

Conclusions: Atrophic endometrium in postmenopausal women shows little telomerase activity. In some cases activity is greater.

Key words: telomerase, hTERT, atrophic endometrium

Adres do korespondencji:

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

Telomeraza jest polimerazą mającą zdolność wydłużania telomerów. Zbudowana jest z białkowej podjednostki hTERT, z matrycy RNA (hTR) oraz z białek towarzyszących. Jej rola polega na dobudowywaniu nukleotydów do końcowego odcinka chromosomu przy wykorzystaniu własnej matrycy DNA [1]. W trakcie każdego podziału komórkowego dochodzi do utraty ok. 50–200 nukleotydów z telomeru – końcowego odcinka chromosomu, zbudowanego z wielokrotnie powtarzających się heksanukleotydów TTAGGG długości do 25000 bp, niezawierających sekwencji kodujących [2–4]. Rola telomerów polega przede wszystkim na ochronie chromosomów przed degradacją, zmianą struktury i fuzją z innymi chromosomami [3, 5]. Osiągnięcie przez telomery krytycznej długości prowadzi do apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki [6–8].

Większość komórek somatycznych nie wykazuje ekspresji telomerazy. Stwierdza się ją w intensywnie regenerujących się komórkach, np. w komórkach rozrodczych, hematopoetycznych oraz komórkach błony śluzowej macicy miesiączkujących kobiet [9–11]. Ekspresja telomerazy w wyżej wymienionych tkankach umożliwia im wieloletnie utrzymanie potencjału proliferacyjnego. W świetle powyższych danych zrozumiałą staje się fakt, że w większości komórek nowotworowych stwierdza się ekspresję telomerazy [12]. W ostatnich latach pojawiają się doniesienia o wykazaniu aktywności telomerazy w pozornie nieaktywnej tkance, jaką jest endometrium atroficzne [13, 14]. Podstawowym obrazem endometrium u kobiet po menopauzie jest atrofia, spowodowana fizjologiczną niewydolnością jajników w okresie klimakterium i w wieku starszym. W obrazie mikroskopowym cechuje się ono włóknieniem podścieliska oraz obecnością pojedynczych gruczołów układających się równolegle do powierzchni błony śluzowej. Cewy gruczołowe występują w nabłonkiem cylindrycznym o skąpej cytoplazmie. Powyższy obraz morfologiczny sugeruje involucję omawianej tkanki [16, 17].

Cel pracy

Celem pracy była ocena ekspresji telomerazy poprzez oznaczenie ekspresji hTERT w endometrium atroficznym u kobiet po menopauzie.

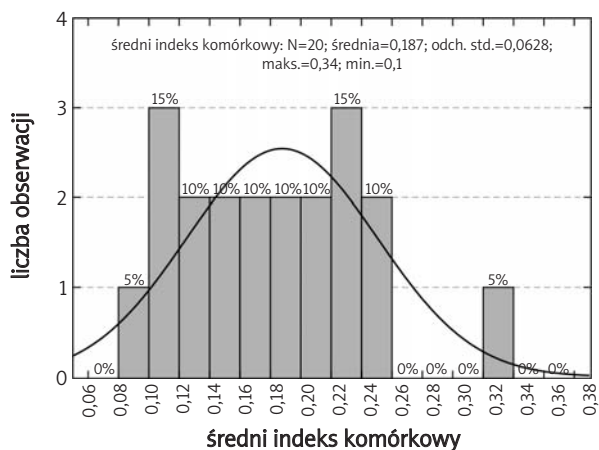
Materiał i metodyka

Do badania zakwalifikowano 20 kobiet w wieku 49–85 lat (średnio 66 lat), u których usunięto macicę w związku z zaburzeniami statyki lub z powodu łagodnego, nieczynnego hormonalnie guza jajnika. Były to pacjentki po menopauzie (1–34 lat, średnio 14 lat), u których w badaniu histopatologicznym stwierdzono obecność endometrium atroficznego. Z analizy wykluczono kobiety, które podawały nieprawidłowe krwawienia

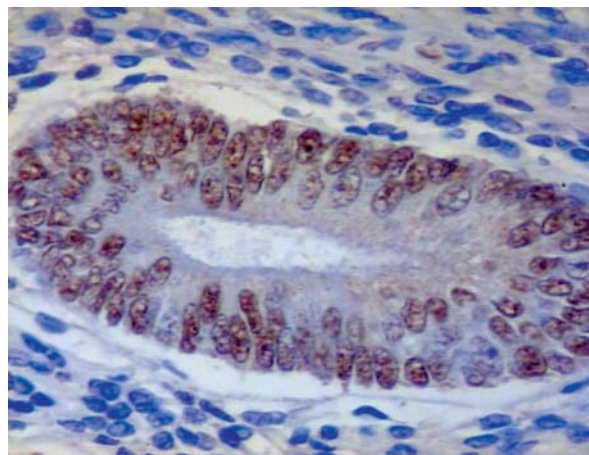
w wywiadzie. Z materiału pobranego od badanych pacjentek wykonano ponownie preparaty histologiczne. Do badań immunohistochemicznych ekspresji odwrotnej transkryptazy użyto mysiego przeciwciała monoklonalnego przeciwko podjednostce białkowej telomerazy NCL – hTERT firmy Novocastra Laboratories Ltd. Do oceny morfometrycznej wykorzystano mikroskop optyczny Nikon, Microphot – FXA. Ocenę ilościową wykonano przy użyciu 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 procentowy udział komórek wykazujących ekspresję telomerazy w stosunku do wszystkich komórek (indeks komórkowy).

Tab. I. Indeks komórkowy (odsetek komórek wykazujących ekspresję telomerazy w stosunku do wszystkich komórek w kolejnych polach widzenia)

Lp. pacjentki	Endometrium atroficzne					średnia
	indeks komórkowy w kolejnych polach widzenia					
	I	II	III	IV	V	
1	0,25	0,14	0,29	0,18	0,13	0,20
2	0,26	0,33	0,18	0,22	0,19	0,24
3	0,29	0,23	0,16	0,40	0,24	0,26
4	0,18	0,13	0,10	0,07	0,09	0,11
5	0,44	0,08	0,20	0,10	0,10	0,18
6	0,18	0,33	0,28	0,24	0,24	0,26
7	0,26	0,57	0,41	0,22	0,23	0,34
8	0,10	0,18	0,06	0,13	0,20	0,13
9	0,13	0,13	0,17	0,09	0,20	0,14
10	0,07	0,25	0,21	0,10	0,13	0,15
11	0,12	0,08	0,10	0,08	0,13	0,10
12	0,24	0,15	0,22	0,15	0,29	0,21
13	0,18	0,30	0,22	0,23	0,21	0,23
14	0,16	0,18	0,19	0,19	0,13	0,17
15	0,20	0,33	0,07	0,29	0,23	0,22
16	0,19	0,26	0,27	0,14	0,29	0,23
17	0,18	0,11	0,13	0,15	0,17	0,15
18	0,13	0,14	0,12	0,05	0,15	0,12
19	0,25	0,09	0,22	0,17	0,20	0,19
20	0,10	0,08	0,04	0,22	0,13	0,11
średnia						0,19



Ryc. 1. Rozkład średniego indeksu komórkowego w grupie badanych pacjentek



Ryc. 2. Obraz ekspresji telomerazy w endometrium atroficznym

Analizy statystycznej dokonano przy pomocy programu STATISTICA 7.1 StatSoft PL.

Wyniki

W przeprowadzonym przez autorów badaniu stwierdzono ekspresję telomerazy we wszystkich badanych próbkach endometrium. Najmniejsza średnia wartość ekspresji wyniosła 10%, a największa 34%. W pojedynczych polach stwierdzono wyższą ekspresję hTERT o wartościach 40–57%. Uzyskane wyniki umieszczone zostały w tab. I. Rozkład wartości średniego indeksu komórkowego (ryc. 1.) jest symetryczny wokół średniej arytmetycznej indeksu (0,187), oprócz ewidentnie wyższej jednej wartości (34%). U 50% pacjentek wartości indeksu przyjmują wartości z przedziału 12–22%, przy czym rozkład ten jest równomierny. Przykład obrazu ekspresji telomerazy w endometrium atroficznym przedstawiono na ryc. 2.

Dyskusja

W większości przypadków badacze ograniczyli się do stwierdzenia lub wykluczenia aktywności telomerazy w ocenianej próbce endometrium atroficznego. W prezentowanym badaniu, wykorzystując znaną silną korelację pomiędzy aktywnością telomerazy a ekspresją podjednostki hTERT [15], oznaczono ekspresję podjednostki białkowej hTERT w analizowanych preparatach endometrium atroficznego metodami immunohistochemicznymi w sposób ilościowy. Poziom ekspresji był niższy niż w endometrium proliferacyjnym i sekrecyjnym [18]. Podobne wyniki opublikowali Lehner [13] i Kyo [14]. Noci i wsp. [19], na podstawie przeprowadzonych badań sugerują, że istnieje rozbieżność pomiędzy morfologicznym obrazem zanikowego endometrium a jego aspektem funkcjonalnym. Przy użyciu przeciwciał monoklonalnych przeciw ludzkiemu PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) zbadali oni, że błona ślu-

zowa endometrium pomenopauzalnego wykazuje umiarkowaną proliferację komórkową. Ponadto stwierdzili we wszystkich badanych próbkach zanikowego endometrium obecność receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PR). Po menopauzie w surowicy pacjentek stwierdza się estrogeny, pochodzące z obwodowej konwersji androstendionu produkowanego przez nadnercza. Konwersja ta odbywa się głównie w tkance tłuszczowej przy użyciu enzymu aromatazy. Równocześnie obserwuje się postępującą niewydolność ciątka żółtego i niedobór progesteronu. Występuje więc względny hiperestrogenizm, nie zrównoważony przez progesteron. Wydaje się, że są to główne czynniki powodujące występowanie słabej aktywności proliferacyjnej w atroficznym endometrium. Hipotezę tę wydaje się potwierdzać obecność ER i PR w komórkach endometrium [19]. Noci i wsp. [19] sugerują, że właściwsze byłoby określenie *endometrium uspione*, a nie zanikowe. Dowodem na to może być badanie przeprowadzone przez Cicinelli i wsp [20]. Badacze ci 8 kobietom po menopauzie, zakwalifikowanym do histerektomii przezpochwowej z powodu wypadania narządu płciowego przez 4 tyg. przed operacją, podawali doustnie skoniugowane estrogeny. 10 dni przed operacją pobrali materiał z jamy macicy i dołączyli gestageny. W I badaniu histopatologicznym wykazali oni endometrium w fazie proliferacyjnej, w drugim natomiast, przeprowadzonym po operacji, endometrium w fazie sekrecyjnej.

Wskazane byłoby prowadzenie dalszych analiz, mających na celu porównanie losów pacjentek po menopauzie, u których po łyżeczkowaniu jamy macicy stwierdzono endometrium atroficzne w zależności od aktywności telomerazy.

Wnioski

Endometrium atroficzne kobiet po menopauzie wykazuje w większości przypadków małą aktywność

telomerazy. W pojedynczych przypadkach aktywność jest większa.

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

Piśmiennictwo

1. Feng J, Funk W, Wang S, et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 1: 1236-41.
2. 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.
3. Rhyu M. Telomeres, telomerase and immortality. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 884-94.
4. Greider C. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 337-65.
5. Urquidi V, Tarin D, Goodison S. Role of telomerase in cell senescence and oncogenesis. *Anu Rev Med* 2000; 51: 65-79.
6. 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.
7. Harley C. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991; 256: 271-82.
8. Harley C, Vaziri H, Counter C, et al. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 1992; 27: 375-82.
9. De Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2882-5.
10. Broccoli D, Young JW, de Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9082-6.
11. Williams C, Boggess J, LaMarque L, et al. A prospective, randomized study of endometrial telomerase during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3912-7.
12. Kim N, Piatyszek M, Prowse K, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1995; 268: 1115-7.
13. Lehner R, Enomoto T, McGregor J, et al. Quantitative analysis of telomerase hTERT mRNA and telomerase activity in endometrioid adenocarcinoma and in normal endometrium. *Gynecol Oncol* 2002; 84: 120-5.
14. Kyo S, Takakura M, Kohama T, et al. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* 1997; 57: 610-4.
15. 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.
16. Archer D, McIntyre-Seltman K, Wilborn W, et al. Endometrial morphology in asymptomatic postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 317-22.
17. Crow J, Amso N, Shaw R. Morphology and ultrastructure of Fallopian tube epithelium at different stages of menstrual cycle and menopause. *Hum Reprod* 1994; 9: 2224-33.
18. Wlazlak E, Bitner A, Surkont G, et al. Ocena ekspresji telomerazy w błonie śluzowej macicy podczas cyklu miesięczkowego. *Prz Menopauz* 2007; 2: 102-5.
19. Noci I, Borri P, Scarselli G, et al. Morphological and functional aspect of the endometrium of asymptomatic post-menopausal women: does the endometrium really age? *Hum Reprod* 1996; 10: 2246-50.
20. Cicinelli E, Cignarelli M, Resta L, et al. Effects of the repetitive administration of progesterone by nasal spray in postmenopausal women. *Fertil Steril* 1993; 60: 1020-4.