

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Postgraduální doktorské studium Biomedicíny

Studijní obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.



MUDr. Ondřej Sosna

Genový polymorfismus Th1/Th2 cytokinů u pacientek s děložní myomatózou

Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with uterine fibroid

Doktorská dizertační práce

Školitel: Doc. MUDr. David Kužel, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 26. 05. 2011

MUDr. Ondřej Sosna

Identifikační záznam:

SOSNA, Ondřej. Genový polymorfismus Th1/Th2 cytokinů u pacientek s děložní myomatózou, [*Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with uterine fibroid*]. Praha, 2011. 62 s., 3 příl. Doktorská dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Gynekologicko-porodnická klinika. Školitel Kužel, David

PODĚKOVÁNÍ:

Tato dizertační práce vznikala pod vedením mého školitele Doc. MUDr. Davida Kužela, CSc. Proto je mou milou povinností mu v první řadě poděkovat za trpělivost a předávání cenných zkušeností při vzniku této práce a přípravě publikací.

Spolupracovníkům z Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze MUDr. Antoniji Slavčevovi, CSc. a Mgr. Jeleně Skibové za pomoc při sestavení designu studie a jejímu statistickému zpracování. Speciálně pak mému příteli Mgr. Liboru Kolesárovi za zvládnutí laboratorních technik a neúnavnou ochotu pomoci.

Přednostovi Gynekologicko-porodnické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze prof. MUDr. Aloisu Martanovi, DrSc. a předsedovi PDSB studia prof. MUDr. Jaroslavu Živnému, DrSc. za podporu a vytvoření podmínek pro tvůrčí práci.

Mé poděkování patří též Grantové agentuře University Karlovy (GAUK), která pomohla financovat velkou část nákladů spojených s provedeným laboratorním výzkumem.

V neposlední řadě děkuji své manželce, synům, sestře a rodičům za zázemí a realizaci této dizertační práce.

ABSTRAKT

Úvod: Děložní myom (leiomyom) je nejčastěji se vyskytujícím nezhoubným nádorem v oblasti ženského genitálního traktu a představuje nejčastější indikaci k provedení hysterektomie. Jeho etiologie však stále zůstává neznámá. V posledních letech jsou podrobněji zkoumány genetické faktory podílející se na vzniku děložních myomů. Cílem naší práce bylo najít možné genetické faktory použitelné jako prognostický marker k evaluaci zvýšeného rizika vzniku tohoto onemocnění.

Metodika: Do studie jsme zařadili 102 pacientek s děložními myomy, jako kontrolní skupina sloužil soubor 145 zdravých žen. Všem těmto ženám bylo provedeno ultrazvukové vyšetření malé pánve a odebrán vzorek nesrážlivé krve. Ve skupině pacientek s děložním myomem následovala vždy po zvolené operační intervenci histologická verifikace nálezu. Princip detekce polymorfismů cytokinových genů byl založen na jednoduché PCR reakci s využitím sekvenčně specifických primerů.

Výsledky: Porovnali jsme široké spektrum SNP (z angl. single nucleotide polymorphisms) TH2/Th2 cytokinových genů celého souboru pacientek s kontrolním souborem. Frekvence většiny testovaných SNP nedosáhla u pacientek statisticky významného rozdílu. Našli jsme však zajímavý rozdíl v distribuci genotypů promotoru genu pro IL-4. Genotyp CC v pozici -590 a -33 byl zastoupen u pacientek s menší frekvencí než u kontrol ($p=0,03$). Dále jsme porovnávali pacientky s kontrolami po rozdělení souboru pacientek do dvou skupin dle jejich věku ≤ 35 a >35 . Pozorovali jsme stejný trend v nižší frekvenci genotypu CC v pozicích -590 a -33 u pacientek starších 35 let ($p=0,09$), nikoliv však u mladších pacientek. Kromě IL-4 jsme zaznamenali rozdíl v distribuci genotypů i u v rámci promotoru genu TNF α (SNP -308 A/G).

Frekvence genotypu AA byla vyšší u pacientek pod 35 let ($p=0,02$). Tento rozdíl nebyl u starších pacientek potvrzen (>35).

Souhrn: Naše práce jako první analyzuje pomocí molekulárně-genetických metodik (PCR-SSP) takto rozsáhlé spektrum cytokinů a jejich polymorfismů. Výsledky naší práce naznačují možnou souvislost mezi přítomností některých genových polymorfismů cytokinů (IL-4, TNF- α) a zvýšeným rizikem vzniku děložní myomatózy. Pochopitelně budou za potřebí další výzkumné projekty k objasnění mechanismu působení výše uvedených souvislostí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Děložní myom, leiomyom, cytokiny, interleukin 4 (IL-4), tumor nekrotizující faktor alfa (TNF α), genový polymorfismus

ABSTRACT

Background: Uterine fibroid (UF) or leiomyoma is the most frequent benign tumour upon lower genital tract and represents the most frequent indication for hysterectomy. The aetiology remains still unknown. The genetic factors contributing for the development of UF are being intensively investigated. The aim of our study was to look for possible genetic markers which could be used as prognostic tools for evaluation of an increased risk for development of UF.

Methods: The study group enrolled 102 patients diagnosed with UF and 145 healthy controls. Ultrasonographic examination of the pelvis was performed and a single blood sample was taken in all women. Histological verification followed the surgery in the patient group. The principal of the cytokine gene polymorphisms detection is based on PCR reaction with sequence-specific primers.

Results: A large spectrum of Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with uterine fibroid was compared with control group. The frequencies of the majority of tested cytokine gene SNP in the patient cohort were not statistically different from the cytokine SNP in the control group. However, an intriguing association between polymorphisms of the IL-4 gene promotor at positions -590 C/T and -33 C/T, and the risk of leiomyoma was observed. The CC genotype of IL-4 at position -590 and -33 was less frequent in the patient group than in the control group ($p=0.03$). Besides IL-4, we observed different genotype distribution of the gene for TNF- α -308A/G. The frequency of genotype AA was higher in the younger (<35 years) patient group ($p=0.02$).

Conclusion: This study as a first has analysed such a large spectrum of cytokines and their polymorphism using molecular and genetic techniques (PCR-SSP). Our results suggest that certain cytokine gene polymorphisms, especially of the IL-4 and TNF- α genes may be associated with increased risk for development of uterine fibroid. Further investigation will be needed for elucidation of the mechanisms responsible for these associations.

KEY WORDS

Uterine fibroid, leiomyoma, cytokines, interleukine 4 (IL-4), tumour necrosis factor alpha (TNF- α), gene polymorfism

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	11
1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY	13
1.1 Děložní myomy	14
1.1.1 Etiopatogeneze, symptomatologie, histopatologie	14
1.1.2 Incidence	15
1.1.3 Rizikové faktory	15
1.1.4 Iniciátory tumorogeneze a genetické predispozice	16
1.1.5 Cytokiny jako promotóri růstu myomů	18
1.2 Cytokiny	20
1.2.1 Obecná charakteristika	20
1.2.2 Klasifikace cytokinů	21
1.2.2.1 Klasifikace dle názvu	21
1.2.2.2 Klasifikace dle struktury	22
1.2.2.3 Klasifikace dle funkce	22
1.2.3 Účinek cytokinů	23
1.2.4 Terapeutické využití cytokinů	23
1.2.4.1 Substituční léčba	24
1.2.4.2 Inhibiční léčba	24

1.3	Genové polymorfismy	25
2	HYPOTÉZA A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	27
3	MATERIÁL A METODIKA	30
3.1	Soubor pacientek	31
3.2	DNA analýza	32
3.3	Statistická analýza	36
4	VÝSLEDKY	37
4.1	Demografická data	38
4.2	Operační data	38
4.3	Polymorfismy	39
5	DISKUZE	43
6	ZÁVĚR	49
7	LITERATURA	52
8	VLASTNÍ PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU	61

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	adenin
AH	abdominální hysterektomie
bFGF	fibroblastový růstový faktor (basis fibroblast growth factor)
BMI	body-mass index
bp	pár bazí (base pair)
C	cytosin
CD	zkratka CD následovaná číselným kódem určuje buněčné membránové receptory v rámci jednotné mezinárodní klasifikace (clusters of differentiation)
CSF	kolonie stimulující faktor (colony stimulating factor)
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
FasL	membránový protein (ligand) přítomný na NK buňkách a aktivovaných cytotoxických T lymfocytech
G	guanin
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou (high densiti lipoprotein)
HWR	Hardy-Weinbergova rovnováha
IGF	inzulin připomínající růstový faktor (insuline-like growth factor)
IL	interleukin
INF	interferon
LAVH	laparoskopicky asistovaná vaginální hysterektomie
LM	laparoskopická myomektomie
LT	leukotrieny
MCP	monocyte chemotactic protein

MIP	macrophage inflammatory protein
NFκB	významný transkripční faktor (nuclear factor kappa)
N	počet jedinců ve skupině
NK	přirození zabíječi (natural killer cells)
NSA	nesteroidní antirevmatika
OC	perorální kontraceptivum (oral contraception)
OM	otevřená myomektomie
p	statistická významnost
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGF	růstový faktor z destiček (platelet derived growth factor)
SCF	stem cell factor
SD	směrodatná odchylka
SHBG	globulin vázající sexuální hormony (sex hormone binding globulin)
SNPs	jednonukleotidové polymorfismy (single nukleotide polymorphisms)
SSP	sekvenčně specifický primer
T	thymin
TCRM	transcervikální resekce myomu
TGF-β	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
Th	pomocné T tymfocyty
TLH	totální laparoskopická hysterektomie
TNF	tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)
UF	děložní myom (uterine fibroid)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VIP	vazoaktivní intestinální peptid

Kapitola 1:
ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1 Děložní myomy

1.1.1 Etiopatogeneze, symptomatika, histopatologie

Děložní myomy představují poměrně důležitý zdravotní problém současnosti a pro mnoho žen znamenají ohrožení jejich reprodukčního zdraví. Až do nedávné doby byla vzniku leiomyomů navzdory jejich prevalenci věnována jen malá pozornost. Důvodem byl možná jejich nízký potenciál k maligní transformaci. Ačkoli jsou příčiny vzniku děložních myomů stále neznámé, současná vědecká literatura obsahuje řadu informací týkajících se epidemiologie, genetiky, hormonálních aspektů a molekulární biologie těchto tumorů. Myomatózní děloha je navíc nejčastější indikací k provedení hysterektomie (Flake, 2003). Podle lokalizace myomů ve vztahu k vrstvám stěny děložní rozlišujeme submukózní, intramurální, subserózní, případně pendulující či intrakavitální myomy (obr. 1).

Nejčastějším symptomem tohoto onemocnění je hypermenorrhoea, nepravidelné krvácení, bolesti a tlak v podbřišku, problémy s močením, defekací nebo při pohlavním styku, dále pak sterilita nebo opakované těhotenské ztráty včetně řady různých těhotenských komplikací jako je předčasný porod, abrupce placenty, patologické polohy plodu, atd.

Myomy jsou benigní, monoklonální nádory složené z hladkých svalových buněk myometria, extracelulární matrix obsahující kolagen (zvl. typu I a III), fibronektinu a proteoglykanu. Kolagenní vlákna jsou uspořádána podobně jako v keloidních jizvách (Parker, 2007).

Podle WHO klasifikace se leiomyocelulární nádory dělohy dělí na leiomyom obvyklé struktury, hladkosvalový nádor nejistého maligního potenciálu a leiomyosarkom (Hendrickson, 2003). Naprostou převahu těchto tumorů tvoří benigní leiomyomy, které jsou zároveň nejčastějšími nádory těla děložního (obr. 2).

1.1.2 Incidence

Děložní myom (leiomyoma uteri, uterine fibroid) je nejčastěji se vyskytujícím nezhoubným nádorem v oblasti ženského genitálního traktu. Nejvyšší frekvence výskytu myomu, 30-40% se udává u žen ve věku 40 let (Stewart, 2001; Wallach, 2004).

Četnost výskytu se v literatuře značně liší, protože výskyt, velikost, četnost a lokalizace nekorelují vždy s klinickou symptomatologií. Při cílené histologické diagnostice se děložní myom vyskytuje v 69% (Kjerulff, 1996) až 77% (Cramer, 1990) všech benigních pánevních onemocnění. Na základě literatury lze odhadnout 40-90% pokles výskytu myomů po menopauze (Kjerulff, 1996; Romieu, 1991).

Incidence myomů je u žen černé rasy signifikantně vyšší než u bělošek (Marshall, 1997). U žen černé pleti kromě vyšší incidence děložních myomů dochází také k časnější manifestaci klinických obtíží pod obrazem mnohočetné myomatózy. Byly doloženy signifikantní rozdíly v metabolismu estrogenů u různých etnik, nelze však říci, zda jde o faktory genetické nebo enviromentální (Al Hendy, 2006).

1.1.3 Rizikové faktory

Rizikové faktory vzniku nebo diagnózy myomu se zvyšují s věkem (určení diagnózy myomu je nejpravděpodobnější u žen, které překročily věkovou hranici 40 let), časnějším nástupem menarche, roli hrají genetické faktory, etnický původ (myomy u afroamerických žen jsou častější, objevují se v mladším věku, jsou četnější a více symptomatické), obezita (zvyšuje konverzi nadledvinových androgenů na estron a snižuje hladinu SHBG s výsledkem vzestupu biologicky disponibilního estrogenu, svou roli hraje také zvýšená konverze estrogenů v tukové tkáni), hypertenze a zvýšení HDL a cholesterolu (Mára, 2009; Sato, 1998).

Naopak kouření je považováno za protektivní faktor ve smyslu vývoje myomu snížením biologické přítomnosti estrogenů v cílových tkáních pomocí redukce konverze androgenů na estron následkem nikotinem indukované inhibice aromatázy a zvýšené hydroxylace estradiolu nebo stimulace vyšších hladin SHBG (Parker, 2007). S počtem vykouřených cigaret za den relativní riziko ještě více klesá. Tento ochranný efekt však u exkuřáček mizí.

Parita je nepřímo úměrná prevalenci myomů (Arici, 2003; Lumbiganon, 1995; Ligon, 2001; Toro JR, 2003). Těhotenství v průběhu středního reprodukčního věku (25-29 let) poskytuje největší ochranu proti vývoji myomů.

Na vliv kontraceptiv, exogenních hormonů a hormonální substituční terapie jsou rozporuplné názory. Příznivý vliv OC na vývoj děložních myomů lze očekávat pouze u žen právě užívajících kontraceptiva nebo krátce po skončení jejich aplikace (Mára, 2009). Pozitivní efekt vedoucí ve svém důsledku ke snížení rizika vzniku myomu má pravděpodobně depotní medroxyprogesteronacetát (Schwartz, 2000). Hormonální substituční terapie (HRT) v postmenopauze může mírně stimulovat růst leiomyomů nebo alespoň blokovat jejich zmenšování po menopauze. Rozhodující není ani tak dávka nebo způsob aplikace HRT, jako typ použitého gestagenu. Zmenšení myomů naopak obvykle nastává účinkem GnRH agonistů.

1.1.4 Iniciátory tumorogeneze a genetické predispozice

Přesná příčina vzniku myomů je neznámá. Získané genetické předpoklady (vlohy) ke vzniku myomu indukují prostřednictvím hormonů a růstových faktorů zvýšenou expresi estrogenních receptorů. (Arici, 2003; Stewart, 2006).

Bylo prokázáno, že děložní myomy se vyskytují častěji u žen s pozitivní rodinnou zátěží (Lumbiganon, 1995). Je referován vyšší výskyt děložních myomů u monozygotických dvojčat oproti dizygotickým, což nahrává některým genetickým teoriím (Gross & Morton, 2001).

Karyotyp leiomyomů je asi v 40% abnormální. Nejčastějším typem aberací jsou translokace chromozomů 12 a 14, delecce chromozomu 7 a trizomie chromozomu 12 (Ligon, 2001). Histologicky pak nacházíme častěji zvýšeně buněčné myomy nebo myomy s atypii. S velikostí myomů roste i počet atypií.

Dvě skupiny genových proteinů (High Mobility Group Proteins Genes) HMGIC a HMGIY jsou konzistentně spojeny s uvedenými chromozomálními aberacemi. Podílejí se na architektonické transkripci a jsou pravděpodobně odpovědné za odchýlný růst myomů (Van de Ven WJ, 1998).

Buněčné, atypické a velké myomy jsou s vysokou pravděpodobností spojeny s přítomností chromozomálních abnormit. U zbývajících 60% tzv. normálních karyotypů nelze vyloučit přítomnost nedetekovaných mutací. U více než 100 genů v nádorových buňkách byly nalezeny poruchy regulace, včetně genů spojených s produkcí sexuálních steroidů (estrogenové receptory α a β , progesteronové receptory A a B, receptor růstového hormonu a prolaktinu, matrixové a kolagenní geny). Řada z těchto genů se podílí na řízení buněčného růstu, diferenciaci, proliferaci a mitogenezi. Další poznatky z cytogenetiky by mohly poskytnout vysvětlení pro familiárně a rasově podmíněný zvýšený výskyt myomů (Mára, 2009).

Mnohočetný výskyt leiomyomů (v kůži a děloze) provází tzv. hereditární leiomyomatózu neboli Reedův syndrom (Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma). Onemocnění postihuje muže i ženy. Mutací genu pro fumarát hydratázu dochází ke ztrátě tumorsupresorových mechanismů. Jde o autozomálně dominantní typ dědičnosti s neúplnou penetrancí s rizikem maligní transformace leiomyomu na leiomyosarkóm nebo vznikem renálního papilárního karcinomu (Alam, 2005).

Genetické rozdíly mezi leiomyomy a leiomyosarkomy ukazují, že jejich původ je vysoce pravděpodobně rozdílný a že leiomyosarkomy nevznikají na podkladě maligní

degenerace myomů. Porovnání pomocí hybridizace genomů nenašlo společné specifické anomálie pro děložní myomy a sarkomy (Parker, 2007).

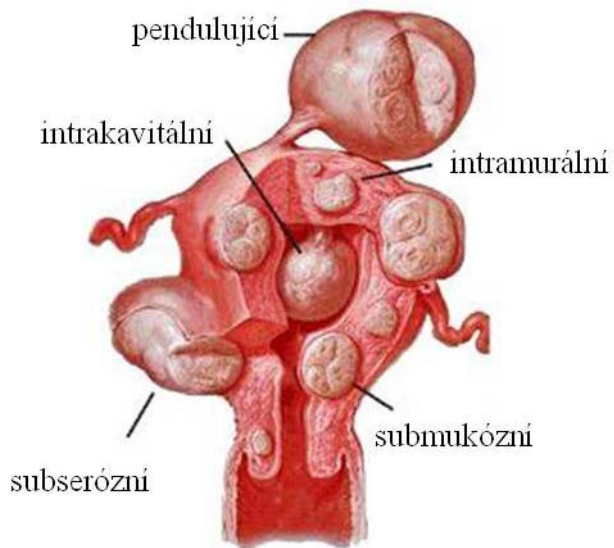
Růst myomů je pod vlivem steroidních hormonů a četnost výskytu myomů stoupá v průběhu reprodukčního období a klesá po menopauze (Parker, 2007; Lumbiganon, 1995; Faerstein, 2001; Rein M, 1995).

1.1.5 Cytokiny jako promotori růstu myomů

Růstové faktory (TGF- β , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, IGF, prolaktin), proteiny nebo polypeptidy, produkované lokálně buňkami hladkého svalu a fibroblasty kontrolují proliferaci těchto buněk a mohou také stimulovat růst myomu. TGF- β je jediným prokázaným růstovým faktorem se zvýšenou expresí ve tkáni leiomyomu oproti zdravému myometriu (Arici, 2000; Sozen, 2006). Basis fibroblast growth factor (bFGF) působí na proliferaci buněk hladké svaloviny včetně myometria a leiomyomů a je hojně uložen v extracelulárním matrix myomů. Je pravděpodobné, že řada významných růstových faktorů bude teprve objevena. Zatím se zdá, že růstové faktory, cytokiny a případně další látky působí při vzniku a růstu myomů jako mediátory působení ovariálních steroidů, jež hrají roli regulátorů genové exprese v buňkách (Sozen, 2006).

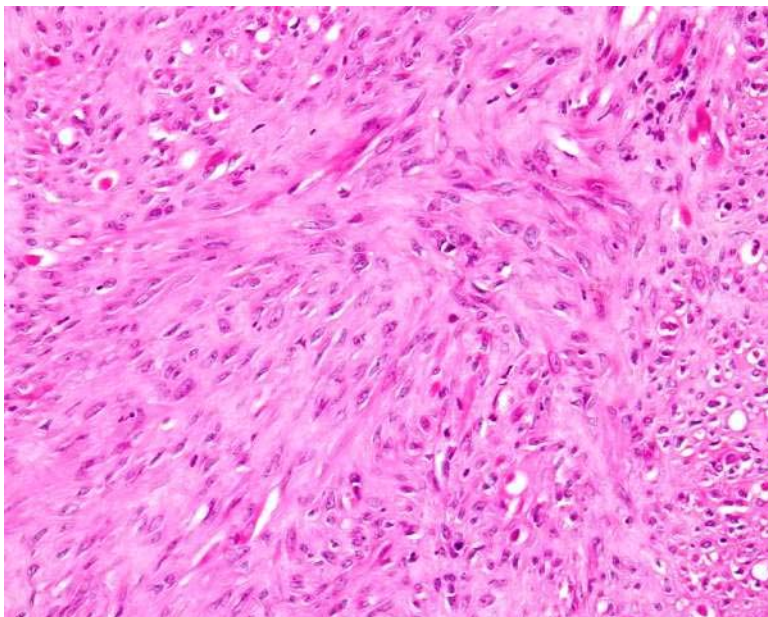
V současné době, kdy stále vyšší počet žen časuje zahájení reprodukce do období nad třicátý rok věku a skutečnost, že výskyt děložního myomu nepříznivě ovlivňuje kvalitu života ženy, zvl. nepravidelným děložním krvácením a bolestí a může nepříznivě ovlivnit průběh a výsledek těhotenství, je výzkum rizikových faktorů pro vznik a vývoj děložního myomu podstatný.

Obrázek 1: Schematická klasifikace děložních myomů dle lokalizace



Podle uložení myomů ve vztahu k vrstvám děložní stěny rozlišujeme submukózní, intramurální, subserózní, případně pendulující (stopkaté) či intrakavitální myomy. Převzato a upraveno (zdroj: myomy.cz)

Obrázek 2: Leiomyom obvyklé histologické struktury



Leiomyom – barveno hematoxilin-eosin. Buňky leiomyomu jsou na rozdíl od buněk myometria dlouhé, vřetenovité s protáhlými jádry se zakulacenými konci (tzv. doutníkovitá jádra). Na rozdíl od leiomyosarkomu nevykazují buňky leiomyomu mitotickou aktivitu. Tyto tumory mají výraznou tendenci k fibrotizaci, kalcifikaci a regresním změnám.

1.2 Cytokiny

1.2.1 Obecná charakteristika

Cytokiny jsou základní regulátory imunitního systému, tkáňové hormony - proteiny (glykoproteiny, peptidy) produkované buňkami imunitního systému, které působí prostřednictvím specifických receptorů na různé buňky imunitního systému i mimo něj (Hořejší, 2002). Na jejich produkci se podílí jak buňky přirozené, tak adaptivní imunity. Cytokiny jsou schopné navodit například rychlé dělení a diferenciaci určitých typů buněk v boji proti patogenům, případně další procesy imunitní obrany (Lennarz, 2001). Cytokiny hrají důležitou roli v zánětu a při vzniku autoimunity.

Většina cytokinů je ve svém účinku pleiotropní (působí na několik různých typů buněk), často působí v kaskádě (jeden cytokin indukuje tvorbu druhého) a celý imunitní systém je do jisté míry redundantní (jednotlivé druhy cytokinů mohou být často nahrazeny jinými). Cytokiny mají z hlediska působení účinky buď na samotnou buňku, která je produkuje (apokrinní funkce), nebo působí na okolní buňky (parakrinní funkce), případně na delší vzdálenost (endokrinní funkce). Pro některé účely je zřejmě nezbytné koordinovat spolupůsobení několika různých cytokinů. Tyto složité synergistické a antagonistické interakce v cytokinovém systému se označují jako cytokinová síť (Hořejší, 2002).

Původní nomenklatura cytokinů je založena na jejich buněčném zdroji. Cytokiny, které jsou produkovány monocyty a makrofágy byly označovány za monokiny, cytokiny

produkované lymfocyty za lymfokiny. Postupem času však bylo zřejmé, že některé z těchto proteinů jsou produkovány různými typy buněk imunitního systému a též některými tkáňovými buňkami, buňkami endoteliálními či výjimečně i buňkami epitelu. Ve snaze o zavedení jednotné nomenklatury byly tyto proteiny označovány jako interleukiny a číslovány podle pořadí, ve kterém byla jejich struktura poznána. V některých případech však nebyla nomenklatura interleukinů zavedena a byl ponechán tradiční název (např. tumor nekrotizující faktor, interferony, transformující růstové faktory apod.) Z těchto důvodů se začal používat obecnější termín cytokin. V posledních letech bylo též zjištěno, že některé hormony (VIP, prolaktin) mohou v určitých situacích fungovat jako cytokiny. V současnosti je známo něco okolo 120 různých cytokinů a lze předpokládat, že jejich počet bude narůstat.

1.2.2 Klasifikace cytokinů

1.2.2.1 Klasifikace dle názvu:

Interleukiny: IL-1 až IL-23. Regulují vývoj a aktivaci leukocytů

Chemokiny: IL-8 a řada příbuzných molekul regulující chemotaxi

Interferony: INF- α , IFN- β , INF- γ , významné pro neadaptivní protivirovou imunitu, regulátory imunity

Transformující růstové faktory: TGF- α , TGF- β

Faktory simulující kolonie: CSF, jedná se o cytokiny stimulující v kostní dřeni diferenciaci buněk – granulocytů (G-CSF), monocytů (M-CSF) nebo obou typů (GM-CSF)

Faktory nekrotizující nádory: TNF – zvaný též kachektin a lymfotoxin. Tyto faktory působí cytotoxicky – indukci apoptózy a regulačně.

Jiné růstové faktory: růstový faktor kmenových buněk, erythropoetin, růstový faktor fibroblastů, růstový nervový faktor apod.

(Ferenčík, 2005; Vokurka 2007; Hořejší, 2002)

1.2.2.2 Klasifikace dle struktury:

Primární struktura (pořadí aminokyselin) všech popsaných cytokinů je známa. U většiny je též známo prostorové uspořádání molekul cytokinů i jejich receptorů. Cytokiny lze rozdělit do skupin s podobnou prostorovou strukturou a podobnou sekvencí aminokyselin. Základní strukturální skupiny cytokinů jsou:

Hemopoetiny: (IL-2, IL-3, IL-4, IL- 5, IL- 6, IL-7, IL- 9, IL- 11, IL- 12, IL- 15, IL- 23, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, onkostatin M)

Interferony: (INF- α , INF- β , INF- γ , IL-10, IL-19, IL-20, IL-21)

Skupina TNF: (TNF, LT, CD30L, CD40L, FasL, CD70 a další)

Skupina TGF- β

Chemokiny: IL-8, MIP 1, MCP 1, 2

Ostatní: struktury nepodobné jiných cytokinům – IL-12, IL-16, IL-17, IL-18, SCF (Hořejší, 2002; Abbas, 2000).

1.2.2.3 Klasifikace podle funkce

Prozánětlivé cytokiny: jedná se o cytokiny podporující zánět včetně chemotaktických faktorů – IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF

Protizánětlivé cytokiny: jedná se o cytokiny s převážně inhibičním účinkem na zánětlivé reakce – IL-1Ra, IL-4, IL-10, TGF-beta

Růstové faktory: jedná se o cytokiny s aktivitou růstových faktorů hemopoetických buněk – IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-14, IL-15, C-CSF, M-CSF, GM-CSF, TGF-beta

Cytokiny uplatňující se v humorální (protilátkové) imunitě - TH2: IL-4, IL-5, IL-9, IL-

Cytokiny uplatňující se v buněčně zprostředkované imunitě – TH1: IL-2, IL-12, IFN- γ , GM-CSF

Cytokiny s antivirovým účinkem: INF- α , INF- β , INF- γ

(Hořejší, 2002; Abbas, 2000)

1.2.3 Účinek cytokinů

Účinek cytokinů je zprostředkován přes specifické receptory o dvou (výjimečně o třech) podjednotkách. Jedna z nich je zodpovědná za specifickou vazbu cytokinu, zatímco druhá či třetí zajišťuje spojení se signalizačními intracelulárními molekulami. Vazba cytokinu na specifický povrchový receptor způsobí v receptorové molekule konformační změnu, která se projeví v intracelulární části receptoru a zahájí přenos signálu do buňky. Většina cytokinových receptorů je v intracelulární části nekovalentně spojena s cytoplazmatickými proteinkinázami. Proteinkinázy jsou enzymy fosforylující jiné proteiny. Tímto je spuštěna signalizační kaskáda. Výsledek signalizace přes cytokinové receptory závisí na typu buňky, povaze receptoru a na spolupůsobení jiných signálů. V konečném důsledku může dojít od stimulace buněčného dělení a diferenciaci, přes spuštění efektorových mechanismů (degranulace, aktivace membránových enzymů, chemotaxe apod.) až po zablokování buněčného cyklu a k apoptóze (Hořejší, 2002; Abbas, 2000).

1.2.4 Terapeutické využití cytokinů:

Na účast cytokinů v terapii onemocnění je nutné pohlížet ze dvou zcela opačných pohledů. Na jednu stranu lze některé cytokiny podávat a tímto využívat jejich působení na jednotlivé systémy a na stranu druhou je v některých případech žádoucí působení cytokinů blokovat, jak přímou blokádu jejich tvorby, tak blokádu receptorů, kterými je jejich účinek zprostředkován.

1.2.4.1 Substituční léčba

Podávání rekombinantního erythropoetinu pacientům s chronickým renálním selháním řeší s tímto onemocněním spojenou anémií. Pro klinické i laboratorní účely se používá rekombinantní růstový faktor granulocytových kolonií (G-CSF) u vrozené agranulocytózy (Kostrmanův syndrom), u pacientů po chemoterapii a po transplantaci kostní dřeně. Interferon- α je v dnešní době již běžně používán k léčbě virových hepatitid, některých leukemií, předních i zadních uveitid. Interferon- β se používá obdobně jako interferon- α a navíc ještě k léčbě roztroušené sklerózy. IL-2 je používán v léčbě renálního adenokarcinomu.

1.2.4.2 Inhibiční léčba

Nespecifická imunosupresivní léčba: Nespecifická imunosupresivní léčba je taková, která postihuje nejen autoreaktivní, ale i normální populace lymfocytů. S tímto souvisejí rizika snížené protiinfekční a protinádorové imunity. Do této skupiny řadíme kortikosteroidy, které blokují aktivitu T lymfocytů. Je potlačena exprese některých genů pro produkci cytokinů. Dále do této skupiny patří imunosupresiva selektivně inhibující T lymfocyty (Cyklosporin A, takrolimus, rapamycin) a imunosupresiva zasahující do metabolismu DNA (cyklofosfamid, metotrexát, azathioprim, mykofenolát mofetil).

Specifická inhibice zánětlivých cytokinů: Hlavními prozánětlivými cytokiny byly identifikovány IL-1 a TNF. Cílem je specifická inhibice jejich účinku. Antagonista receptoru pro IL-1 IL-1Ra je v dnešní době používán k léčbě revmatoidní artritidy. Uvažuje se i o využití těchto antagonistů v léčbě schizofrenie. Selektivní protilátka proti TNF je již běžně používána k léčbě revmatických chorob, zánětlivých střevních onemocnění (Crohnova choroba) či v léčbě předních i zadních uveitid (Dinarello, 1994; Kim, 2004).

1.3 Genové polymorfismy

Genetický polymorfismus je dle definice existence dvou nebo více alel (variant genů) v jednom lokusu, převyšující svým výskytem 1% výskyt v populaci. Jednonukleotidové polymorfismy (z angl. single nucleotide polymorphisms neboli SNP) jsou nejčastěji nacházenou genetickou změnou v lidské populaci (0,1% lidského genomu). Každý SNP reprezentuje rozdíl (odchylku) právě v jednom nukleotidu v sekvenci DNA (Shastry, 2002). SNP mohou být součástí kódujících úseků – exonů, častěji se ale vyskytují v nekódujících oblastech – intronech. SNP jsou vhodné pro genetické či evoluční studie člověka, neboť jsou stabilní a jsou roztroušeny po celém lidském genomu s frekvencí asi 1 SNP na 1000bp (Bruchova, 2005). Většina SNP pravděpodobně nemá přímý vliv na lidské zdraví, ale mohou pozměnit účinek léků nebo odpověď organismu na různé (stresové) situace. SNP se oproti náhodné mutaci předávají z generace na generaci a jde tedy o vrozenou záležitost. Mutace vzniká naopak u jedince náhodně a není zaručeno, že se předá do další generace. Somatické mutace se do potomstva nepřenášejí, gametické ano. V oblasti genomiky dnes probíhá velmi intenzivní výzkum pomocí tzv. asociačních genomických studií (z angl. genome-wide association studies). Tyto studie mapují výskyt SNP v lidském genomu a snaží se najít souvislost s konkrétním onemocněním.

Cytokiny, signální proteiny produkované různými typy buněk, jsou nezbytné pro rozvoj a fungování vrozené a adaptivní imunitní odpovědi. Genová exprese cytokinů je přísně regulována a změny v této regulaci (genový polymorfismus, vnější vlivy) mohou ovlivnit i jejich funkci. Mohou také souviset s řadou onemocnění, s náchylností k infekcím či s reakcí na léčbu. Cytokiny a jejich receptory jsou vysoce polymorfní (Bidwell, 1999). SNP mohou ovlivnit funkci genu několika způsoby – např.: záměnou aminokyseliny (IL-13), přeskočením exonu (IL-7R α), vznikem proximálních promotorových variant (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10,

TNF, TGF- β), distálních promotorových variant (IL-6, IL-18) a intronové varianty (IL-8) (Smith & Humphries, 2009). Promotorové polymorfismy mohou narušit nebo úplně zrušit působení některých regulačních transkripčních faktorů (NF κ B) a tak přímo ovlivnit celou signální transdukcii. Změna v intronech může ovlivnit enhancer/silencer sekvence a modifikovat tak expresi genů (Wilson, 1997). SNP u cytokinů se využívají především v asociačních studiích některých onemocnění nebo u transplantačních studií. Nicméně řada onemocnění je komplexní polygenní porucha a význam jednotlivých cytokinů a jejich polymorfismů na vývoj nebo vznik choroby je nejasný. U transplantací mohou některé cytokinové polymorfismy představovat určité rizikové faktory pro vývoj akutní rejekce.

Drtivá většina provedených studií zahrnuje analýzu jednotlivých SNP, nicméně nejnovější metody sledují tisíce SNP najednou a umožňují tak komplexnější pohled na danou problematiku.

Kapitola 2:
HYPOTÉZA A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

2 HYPOTÉZA A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Přestože děložní myom (leiomyom, uterine fibroid) představuje nejčastější nezhoubný nádor u žen ve fertlním věku a postmenopauze, jeho etiopatogeneze není stále dostatečně objasněna. Až do nedávné doby byla vzniku leiomyomů, navzdory jejich prevalenci, věnována jen malá pozornost. Důvodem byl možná jejich nízký potenciál k maligní transformaci. Pro značnou část žen však představují ohrožení jejich reprodukčních plánů a socioekonomický dopad tohoto onemocnění je značný.

Cílem naší práce bylo najít možné genetické faktory použitelné jako prognostický marker k evaluaci zvýšeného rizika vzniku děložních myomů. I když je známá celá řada rizikových faktorů a predisponujících stavů, které hrají více či méně významnou úlohu v etiologii děložní myomatózy, jsou v poslední době podrobněji zkoumány přednostně genetické faktory. Souvislost genových polymorfismů cytokinů s patogenezí děložních myomů podporují některé konkrétní studie (Hsieh, 2007; Hsieh, 2004; Litovkin., 2007; Pietrowski, 2009).

Naše hypotéza možné asociace genových polymorfismů cytokinů a zvýšené incidence děložní myomatózy byla založena na skutečnosti, že cytokiny mohou zvyšovat produkci matrix metaloproteináz, které mohou následně stimulovat děložní růst. (Inagaki, 2002). Tyto polymorfismy nemusí být přímo spojeny se vznikem tohoto onemocnění, ale mohou být užitečným vodítkem při studiu této multifaktoriální choroby (Andersen, 1994). Některé cytokiny navíc působí jako tzv. růstové faktory, které svým promitotickým účinkem (proliferace a diferenciacie buněk) nebo indukci syntézy extracelulární matrix nebo její remodelací vedou k fibrotizaci a růstu tumorů. Např. transformující růstový faktor beta (TGF β) patří mezi multifunkční cytokiny s promitotickým účinkem nebo vlivem na syntézu extracelulárního matrix (Arici, 2000). Fibroblastový růstový faktor (bFGF) působí na

proliferaci buněk hladké svaloviny včetně myometria a leiomyomů a je hojně uložen v extracelulárním matrix myomů (Wolanska & Bankowski, 2005). Epidermal growth factor (EGF) kromě promitotické aktivity podléhá účinku progesteronu během luteální fáze menstruačního cyklu se zvýšením jeho aktivity. Platelet-derived growth factor (PDGF) jako potentní mitogen působí v synergii s ostatními růstovými faktory. Úloha vascular endothelial growth faktoru (VEGF), který není mitogenem pro buňky hladké svaloviny, je stimulace angiogeneze a vzestup cévní permeability, která je esenciální pro růst tumorů. Mnoho rozporuplných údajů poskytuje literatura v souvislosti s insulin-like growth faktorem (IGF), který se asi také podílí na růstu děložních myomů přes své receptory typu I (Dixon, 2000).

Smyslem této práce byla tedy analýza genových polymorfismů širokého spektra Th1/Th2 (prozánětlivých a protizánětlivých) cytokinů u pacientek s děložními myomy a porovnání výsledků se zdravými kontrolami. Takto široké spektrum vyšetřovaných genových polymorfismů konkrétních cytokinů nebylo dosud v souvislosti s tímto onemocněním vyšetřováno.

Kapitola 3:
MATERIÁL A METODIKA

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Soubor pacientek

Do prospektivní studie bylo zařazeno 102 pacientek s děložními myomy proti souboru 145 zdravých kontrol. Výběr pacientek a zdravých kontrol vhodných k zařazení do studie probíhal od začátku roku 2007 až do konce roku 2008 na Gynekologicko-porodnické klinice VFN a 1. LF UK v Praze. Všechny ženy zařazené do studie podepsaly informovaný souhlas a provedení studie bylo schváleno etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice a 1. LF UK v Praze. Vhodné kandidátky byly získány na základě odběru anamnestických dat, výsledku transvaginální sonografie (ultrazvukový přístroj SIEMENS Sonoline Sienna) na přítomnost, velikost a charakter či absenci děložních myomů s vhodným BMI ve stanoveném věkovém rozmezí. Vzhledem k rasovým rozdílům genových polymorfismů cytokinů v různých populacích byly primárně vyloučeny ženy jiné než české národnosti. Všem ženám zařazeným do studie byl pracovníky Gynekologicko-porodnické kliniky odebrán vzorek nesrážlivé krve (2 ml), který byl transportován do Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze 4 na oddělení imunogenetiky.

Ve skupině pacientek s děložním myomem následovala vždy po zvolené operační intervenci histologická verifikace nálezu na Ústavu patologie 1. LF UK a VFN. Kvůli zachování důvěryhodnosti studie a homogenity došlých histologických nálezů byly ze studie vyloučeny některé ojedinělé nálezy jako leiomyom se zvýšenou buněčnou aktivitou, adenomyom nebo stromální sarkom. Proto byl jediným vstupním histologickým kritériem studie tzv. leiomyom obvyklé histologické struktury.

Soubor pacientek s děložními myomy tvořily jednak ženy (skupina A; n=40) do věku 35 let včetně, průměrný věk $30.8 \pm 3.3(\text{SD})$, s $\text{BMI} < 25$, s negativní farmakologickou a onkologickou anamnézou a abnormální ultrasonografií malé pánve (tj. s přítomností

děložního myomu/ů), jednak ženy (skupina B; n=62) starší 35 let, průměrný věk 47.9 ± 4.2 (SD) s BMI<25, s negativní farmakologickou a onkologickou anamnézou a abnormální ultrasonografií malé pánve (tj. s přítomností děložního myomu/ů). Jako minimální velikost myomu byla v naší studii stanovena velikost 3 cm v případě solitárního myomu, nebo výskyt alespoň 4 drobných myomů větších než 1 cm u mnohočetných děložních myomatóz. Průměrná velikost myomu činila $5.7 \text{ cm} \pm 1.8$ (SD). Nejčastějším symptomem těchto pacientek byly bolesti v podbřišku, silná menstruace a nepravidelné krvácení. Způsob operačního odstranění myomu byl různý. Ve skupině A se jednalo o tzv. dělohu šetřící výkony (vzhledem k přání zachovat fertilitu), tj. laparoskopická myomektomie (LM) 85%, laparotomická neboli otevřená myomektomie (OM) 10%, event. transcervikální resekce myomu (TCRM) 5%. Ve skupině B byla naopak provedena laparoskopicky asistovaná vaginální hysterektomie (LAVH) 93%, totální laparoskopická hysterektomie (TLH) 5% nebo abdominální hysterektomie (AH) 2%. Zdravou kontrolní skupinu tvořily ženy (n=145) ve věku 20-55 let, průměrný věk v tomto rozmezí zde činil 45.0 ± 8.5 (SD) let, s BMI < 25, s negativní rodinnou, farmakologickou a onkologickou anamnézou a normální ultrasonografií malé pánve (tj. bez přítomnosti děložního myomu).

3.2 DNA analýza

DNA byla izolovaná z plné krve soupravou QIAamp (Qiagen, Německo). Princip této soupravy spočívá v zachycení DNA na speciální DNA-vázající kolonku. Tato kolonka je umístěna v mikrozkušavce a pomocí centrifugační síly dochází k protlačování roztoků, včetně DNA, přes kolonku, čímž dochází jednak k jejímu zachycení a jednak k jejímu promývání. Nukleová kyselina se na konci rozpustí do elučního pufru a centrifugací se přenesou z kolonky do sběrné zkumavky. Průměrný výtěžek této metody je 10 µg z 200 µl krve. Následně jsme provedli kontrolu kvality izolace DNA za pomoci spektrofotometrického

měření. Měřili jsme absorbanci roztoku DNA při vlnové délce 260 a 280 nm. Absorbční maximum je pro DNA 260 nm, pro proteiny 280 nm. Pro kontrolu čistoty DNA jsme pak použili poměr absorbancí při 260 a 280 nm. Poměr čisté DNA se pohyboval v rozmezí 1.7 – 1.9. DNA jsme uchovávali při teplotě -20°C.

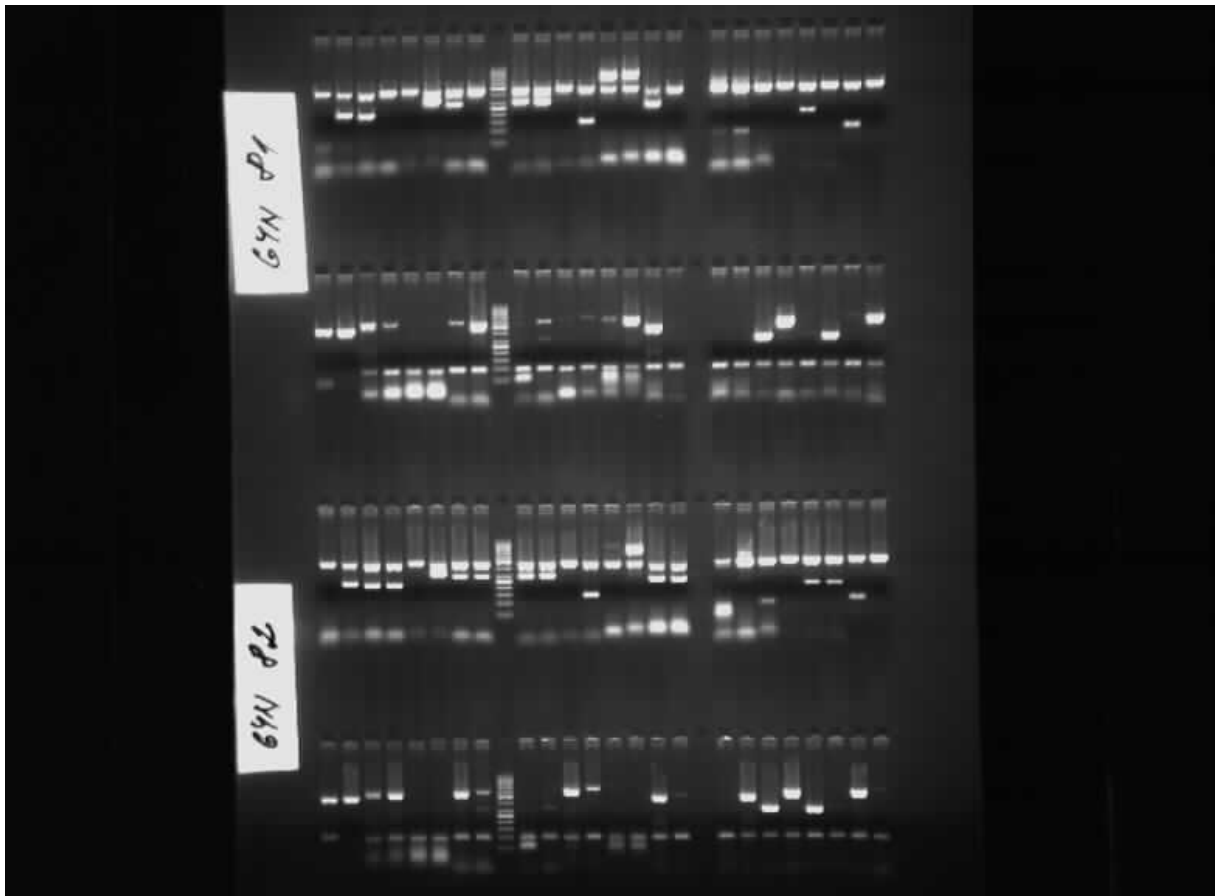
Pro typizaci polymorfismů cytokinových genů jsme zvolili soupravu Cytokine Genotyping Kit (Invitrogen, Německo), s kterou je na pracovišti (IKEM) dlouholetá zkušenost. Princip detekce polymorfismů je založen na jednoduché PCR reakci s využitím sekvenčně specifických primerů (SSP-PCR). Tyto primery mají své specifické 3'-koncové nukleotidy, které překrývají konkrétní SNP (single nucleotide polymorphism) pozice. V případě úplné kompatibility primeru (zvláště na 3'-konci) s cílovou sekvencí genomické DNA dojde k nasednutí termostabilní polymerázy a proběhne syntéza nového řetězce. V opačném případě nikoliv. Výsledné produkty PCR reakce se následně rozdělí v agarosové elektroforéze dle své velikosti a vizualizují se pod UV světlem. S pomocí dokumentačního zařízení se pořídí fotografie gelu. Na výsledné fotografii se hodnotí přítomnost/nepřítomnost produktu, jinými slovy přítomnost/nepřítomnost SNP v genomické DNA. Test v sobě zahrnuje interní kontrolu, která je představována párem primerů obvykle pro gen lidského růstového hormonu. Přítomnost produktu interní kontroly validuje, zda byly splněny všechny podmínky pro správné provedení PCR reakce. Reakce bez pozitivní interní kontroly je 1) v případě nepřítomnosti specifického produktu považována za chybnou a musí se opakovat, 2) v případě přítomnosti specifického produktu je i bez interní kontroly validní. Pozitivní specifická reakce se hodnotí porovnáním velikosti PCR produktu se standardním hmotnostním markerem.

Souprava Cytokine Genotyping Kit obsahuje předkapanou PCR destičku specifickými páry primerů pro detekci následujících cytokinů a jejich polymorfismů: interleukin IL-1 α (-889 T/C), IL-1 β (-511 T/C a +3962 T/C), IL-1R (pst11970 C/T), IL-1RA (mspa111100

T/C), IL-4R α (+1902 G/A), IL-12 (-1188 C/A), interferon (IFN)- γ (+874 A/T), TGF- β 1 (kodón 10 C/T a kodón 25 G/C), tumor nekrotizující faktor (TNF)- α (-308 G/A a -238 G/A), IL-2 (-330 T/G a +166 G/T), IL-4 (-1098 T/G, -590 T/G a -33 T/C), IL-6 (-174 G/C a nt565 G/A) a IL-10 (-1082 G/A, -819 C/T a -592 C/A).

PCR reakční směs byla připravena dle pokynů výrobce následujícím způsobem. K 140 μ l reakčního pufru bylo přidáno 5.6-9.3 μ g DNA, 20U Taq polymerázy (koncentrace 5U/ μ l, TopBio, AVČR, Česká republika) a celá směs byla doplněna PCR vodou do konečného objemu 501 μ l. Deset mikrolitrů tohoto mastermixu bylo rozplněno do jamek PCR destičky s předpřipravenými primery. PCR reakce pak proběhla v termocyklerech typu Biometra T1 (Schöeller, Německo) s upravenou rychlostí změny teploty na 1 $^{\circ}$ C/s. Protokol pro PCR reakci byl následující: úvodní denaturace při 94 $^{\circ}$ C 2 minuty byla následována 10 cykly při 94 $^{\circ}$ C 15 s a při 65 $^{\circ}$ C 60 s. Poté reakce pokračovala 20 cykly při 94 $^{\circ}$ C 15 s, 61 $^{\circ}$ C 50 s a 72 $^{\circ}$ C 30 s. Po skončení PCR reakce byly produkty elektroforeticky rozděleny v 2% agarosovém gelu (obr. 2) barveném UV-citlivou látkou GelRed (Biotium, USA). Gel byl zdokumentován v zařízení typu GeneGenius Bio-Imaging system (Syngene, Velká Británie).

Obrázek 2: Agarozová elektroforéza produktů PCR



Fotografie agarozového gelu dvou testovaných vzorků. Vyšetření jednoho pacienta obsáhlo 48 jamek. Jamky 1-26 obsahují kontrolní proužek o velikosti 440 bp a jamky 27-48 o velikosti 89 bp. Každá devátá jamka v řádku představuje standardní velikostní marker. Směr elektroforézy byl shora dolů.

3.3 Statistická analýza

Genotypové a alelické frekvence byly určeny přímým spočítáním a statisticky porovnány s kontrolní skupinou chí-kvadrát testem nebo Fischerovým testem v případech, kde nešlo použít chí-kvadrát test. K počítání statistiky byl použit programový balíček MedCalc. Hladina významnosti p byla považována za statisticky významnou při hodnotách menších nebo rovných 0,05. Pro detekci významných velkých rozdílů byly pomocí algoritmu Z-score přizpůsobeny standardní odchylky mezi pozorovanými a očekávanými hodnotami v každé buňce. V případech mnohočetného porovnávání, kde v rámci jednoho genu byly sledovány 2 a více SNP, byla použita Bonferroniho metoda korekce.

Kapitola 4:
VÝSLEDKY

4 VÝSLEDKY

4.1 Demografická data

Demografická data, kterými jsou soubory charakterizovány, jsou shrnuty v tabulce 1. Pacientky souboru byly podle věku rozděleny do dvou skupin. Skupinu A tvořilo 40 žen ≤ 35 let, průměrný věk v této skupině byl $30.8 \pm 3.3(\text{SD})$. Skupinu B tvořilo 62 žen >35 let, průměrný věk v této skupině byl $47.9 \pm 4.2(\text{SD})$. Kontrolní skupinu tvořilo 145 žen, průměrný věk byl $45.0 \pm 8.5(\text{SD})$.

Tabulka 1: demografická data

	Věk (průměr)	(SD)	BMI (průměr) [kg/m ²]
Skupina A	30.8	3.3	22.8
Skupiny B	47.9	4.2	23.9
Kontroly	45.0	8.5	23.6

4.2. Operační data

Všechny pacientky zahrnuté do studie podstoupily operační výkon na Gynekologicko-porodnické klinice VFN a 1. LF UK v letech 2007-2008. Pro skupinu A byly typické dělohu šetřící výkony (LM, OM, TCRM), pro skupinu B naopak výkony definitivní (LAVH, TLH, AH). Procentuelní zastoupení jednotlivých výkonů shrnuje tabulka 2. Průměrná velikost solitárních myomů byla $5.7 \text{ cm} \pm 1.8(\text{SD})$.

Tabulka 2: operační data

	LM N (%)	OM N (%)	TCRM N (%)	LAVH N (%)	TLH N (%)	AH N (%)
Skupina A ≤ 35 let	34 (85)	4 (10)	2 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Skupina B >35 let	0 (0)	0 (0)	0 (0)	58 (93)	3(5)	1 (2)

4.3 Polymorfismy

Pro každý sledovaný polymorfismus byla spočítána Hardy-Weinbergova rovnováha (HWR) a žádný z nich nedosáhl statisticky významného rozdílu, tedy jak soubor pacientek, tak kontrolní soubor dosahoval rovnoměrného rozložení alel mezi homozygotními a heterozygotními jedinci. Nejprve jsme porovnali SNP cytokinových genů celého souboru pacientek s kontrolním souborem. Frekvence většiny testovaných SNP nedosáhla u pacientek statisticky významného rozdílu. Našli jsme však zajímavý rozdíl v distribuci genotypů interleukinu 4. Genotyp CC v promotorové pozici -590 a -33 byl zastoupen u pacientek s menší frekvencí než u kontrol. Tento rozdíl byl statisticky významný ($p=0,03$) (Tab. 3). Frekvence genotypů CC obou těchto polymorfismů byla stejná a činila jen 63% proti 78% v kontrolním souboru. Mezi těmito SNP je dokonce silná vazebná nerovnováha ($D \neq 0$).

Dále jsme porovnávali pacientky s kontrolami po rozdělení souboru pacientek do dvou skupin dle jejich věku ≤ 35 a >35 . Pozorovali jsme stejný trend v nižší frekvenci genotypu CC v pozicích -590 a -33 u pacientek starších 35 let ($p=0,09$). Frekvence genotypů CC obou těchto polymorfismů byla 61% oproti 78% v kontrolní skupině. Tento trend však nebyl u mladších pacientek potvrzen (Tab. 4). Kromě IL-4 jsme zaznamenali rozdíl v distribuci genotypů i u genu TNF α (promotorový SNP -308 A/G). Frekvence genotypu AA byla vyšší u pacientek pod 35 let. Tento výsledek byl statisticky významný ($p=0,02$). Frekvence genotypu AA ve skupině mladších pacientek činila 8% oproti 1% výskytu v kontrolním souboru. Síla testu činila v tomto případě 42%. Tento rozdíl nebyl u starších pacientek potvrzen (>35).

Tabulka 3: srovnání genotypových frekvencí pacientek a kontrolní skupiny

Cytokin	SNP	Genotyp	Kontroly N (%)	Pacienti N (%)	P hodnota
IL-1 α	-889	CC	69 (48)	51 (50)	0.70
		CT	59 (41)	42 (42)	
		TT	16 (11)	8 (8)	
IL-1 β	-511	CC	79 (54)	46 (45)	0.35
		CT	54 (37)	46 (45)	
		TT	12 (8)	10 (10)	
IL-1 β	+3962	CC	74 (51)	55 (54)	0.78
		CT	55 (38)	39 (38)	
		TT	15 (10)	8 (8)	
IL-1R	Pst 1970	CC	55 (38)	40 (39)	0.66
		CT	67 (46)	50 (49)	
		TT	23 (16)	12 (12)	
IL-1RA	Mspa1 11100	CC	13 (9)	13 (13)	0.62
		CT	63 (43)	41 (40)	
		TT	69 (48)	48 (47)	
IL-4R α	+1902	AA	84 (58)	60 (59)	0.62
		AG	56 (39)	36 (35)	
		GG	5 (3)	6 (6)	
IL-12	-1188	AA	85 (59)	54 (53)	0.24
		AC	55 (38)	42 (42)	
		CC	3 (2)	6 (6)	
IFN- γ	+874	AA	40 (28)	32 (31)	0.85
		AT	70 (49)	47 (46)	
		TT	32 (23)	23 (23)	
TGF- β 1	codon 10	CC	25 (17)	13 (13)	0.17
		CT	66 (46)	61 (60)	
		TT	54 (37)	28 (27)	
TGF- β 1	codon 25	CC	1 (1)	1 (1)	0.76
		CG	20 (14)	11 (11)	
		GG	124 (86)	90 (88)	
TNF- α	-308	AA	1 (1)	4 (4)	0.14
		AG	29 (20)	25 (25)	
		GG	113 (79)	73 (72)	

TNF- α	-238	AA	0 (0)	0 (0)	0.16
		AG	14 (10)	5 (5)	
		GG	129 (90)	97 (95)	
IL-2	-330	GG	15 (10)	12 (12)	0.95
		GT	63 (44)	44 (43)	
		TT	65 (45)	46 (45)	
IL-2	+166	GG	61 (43)	48 (47)	0.76
		GT	62 (43)	42 (41)	
		TT	20 (14)	12 (12)	
IL-4	-1098	GG	0 (0)	0 (0)	0.21
		GT	22 (15)	10 (10)	
		TT	122 (85)	92 (90)	
IL-4	-590	CC	112 (78)	64 (63)	0.03
		CT	27 (19)	34 (33)	
		TT	5 (3)	4 (4)	
IL-4	-33	CC	112 (78)	64 (63)	0.03
		CT	27 (19)	34 (33)	
		TT	5 (3)	4 (4)	
IL-6	-174	CC	27 (19)	19 (19)	0.23
		CG	72 (50)	41 (40)	
		GG	45 (31)	42 (41)	
IL-6	nt565	AA	25 (17)	18 (18)	0.21
		AG	73 (51)	41 (40)	
		GG	46 (32)	43 (42)	
IL-10	-1082	AA	42 (29)	32 (31)	0.45
		AG	83 (57)	51 (50)	
		GG	20 (14)	19 (19)	
IL-10	-819	CC	74 (51)	56 (55)	0.82
		CT	64 (44)	41 (40)	
		TT	7 (5)	5 (5)	
IL-10	-592	AA	7 (5)	5 (5)	0.82
		AC	64 (44)	41 (40)	
		CC	74 (51)	56 (55)	

Tabulka 4: distribuce IL-4 -590 a -33 genotypů u skupiny pacientek ≤35 let a >35 let; srovnáno s kontrolní skupinou ($p = 0.09$)

IL-4 -590	CC N (%)	CT N (%)	TT N (%)
Kontroly	112 (78)	27 (19)	5 (3)
Pacienti ≤35 let	25 (63)	13 (32)	2 (5)
Pacienti >35 let	38 (61)	22 (36)	2 (3)
IL-4 -33	CC	CT	TT
Kontroly	112 (78)	27 (19)	5 (3)
Pacienti ≤35 let	25 (63)	13 (32)	2 (5)
Pacienti >35 let	38 (61)	22 (36)	2 (3)

Tab. 5: distribuce TNF- α -308 genotypů u skupiny pacientek ≤35 let a >35 let; srovnáno s kontrolní skupinou ($p = 0.02$)

TNF-α -308	AA N (%)	AG N (%)	GG N (%)
Kontroly	1 (1)	29 (20)	113 (79)
Pacienti ≤35 let	3 (8)	6 (15)	31 (77)
Pacienti >35 let	1 (2)	20 (32)	41 (66)

Kapitola 5:

DISKUZE

5 DISKUZE

Děložní myomy představují bez nadsázky poměrně velký socioekonomický problém současnosti a pro stále větší počet žen znamená i ohrožení jejich reprodukčních plánů. Řada z nich přichází konzultovat možnosti konzervativní, radiologické nebo chirurgické terapie. Zatímco na poli etiopatogeneze myomů nebylo přes nesporné úspěchy bazálního výzkumu, zejména v oblasti genetiky, dosaženo výraznějších, klinicky aplikovatelných výsledků, diagnostické a především terapeutické možnosti se v posledních letech rozšířily nevídanou měrou. Rozšíření spektra účinné léčby se dotýká zejména konzervativní terapie myomů neboli léčby zachovávající dělohu a fertilitu (Mára; Holub, 2009).

Současná odborná literatura se opakovaně věnuje rozdílům v produkci nebo aktivitě cytokinů ve vztahu k zvýšené vnímavosti nebo rezistenci k nejrůznějším infekčním procesům, autoimunitním chorobám, nádorovým onemocněním či vztahu k rejekci transplantovaných orgánů. Cytokiny a jejich receptory jsou navíc vysoce polymorfní. Jednonukleotidové polymorfismy mohou různými způsoby ovlivnit funkci cytokinových genů a polymorfismy v promotorech těchto genů mohou tak přímo ovlivnit celou signální transdukcii.

Hypotéza možné asociace genových polymorfismů cytokinů s predispozicí k vzniku děložní myomatózy vychází ze skutečnosti, že cytokiny (glykoproteiny, polypeptidy) jako růstové faktory produkované lokálně fibroblasty a myocyty, regulují proliferaci a diferenciaci těchto buněk a indukci syntézy extracelulární matrix mohou dále stimulovat růst myomů.

Cílem studie bylo najít možné genetické markery, které by sloužily jako vhodný prognostický faktor zvýšeného rizika rozvoje děložní myomatózy a přispět tak k optimalizaci rizikových faktorů a prognózy tohoto velmi častého onemocnění. Dosud je ale málo studií analyzujících jednonukleotidové genetické polymorfismy v těchto souvislostech. Navíc

recentně publikované studie podobného designu zdaleka neanalyzují genové polymorfismy tak širokého spektra (Th1/Th2) cytokinů jako poskytuje naše práce.

Podobě designovaná studie autorů z IKEM vyšetřila 30 pacientů s idiopatickou plicní fibrózou (intersticiální plicní proces s nekontrolovanou fibroprodukcí) proti souboru 103 zdravých dobrovolníků na genový polymorfismus podobného spektra cytokinů (Vasakova, 2006). Zmíněná studie prokázala signifikantně vyšší frekvenci genotypů CT v pozicích -590 a -33 promotoru genu pro IL-4 ve skupině pacientů s idiopatickou plicní fibrózou a podpořila tak názor na možnou roli genových polymorfismů některých cytokinů v etiopatogenezi této vážné choroby. V této studii byly sledovány také polymorfismy TNF- α v pozicích -308 a -238, statisticky významné rozdíly se ale mezi frekvencemi jednotlivých genotypů nepotvrdily.

Literatura přináší omezená data týkající se významu jednotlivých cytokinů v souvislosti se vznikem děložní myomatózy jako je např. role epidermal growth faktoru (EGF) (Shimomura, 1998), transforming growth faktoru β (TGF- β) (Arici and Sozen, 2000) a dalších chemokinů a jejich receptorů (Syssoev, 2008). Arici 2000 kvantifikuje množství TGF- β mRNA u 18 pacientek s děložními myomy, které bylo signifikantně vyšší než TGF- β mRNA v normálním myometriu 16 zdravých žen. Stejný trend zvýšené exprese mRNA vykazovalo i měření mRNA fibronektinu v obou těchto skupinách. Sozen (2002) prokázal ve své studii zvýšenou expresi pouze v případě TGF a dále potvrdil možný regulační vliv estrogenů a progesteronu v expresi tohoto multifunkčního cytokinu mezenchymálního původu. Za klíčovou roli v patogenezi leiomyomů pak pokládá kromě cytokinů komponenty extracelulární matrix jako jsou kolagen, fibronektin, proteoglykany, matrix metaloproteinázy a jejich tkáňové inhibitory. Fujita již v roce 1985 publikoval, že myomy obsahují dvakrát více extracelulární matrix, než okolní myometrium. Jiné publikované práce hodnotí význam estrogenů a progesteronu jako iniciátorů zvýšené exprese cytokinů a cytokinových receptorů v tkáni myometria (Maruo, 2003). Naproti tomu literatura poskytuje mnoho dat podporujících

skutečnost, že jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) mohou mít vliv na genovou expresi konkrétních cytokinů (Fishman, 1998; Smith & Humphries 2009; Turner, 1997; Wilson, 1997).

V prezentovaném souboru jsme prokázali možnou souvislost mezi polymorfismem promotoru genu pro IL-4, konkrétně v pozicích -590 C/T a -33 C/T, a rizikem vzniku myomu. Přítomnost alely T na pozici -590 totiž zvyšuje expresi genu pro IL-4 a je spojená s rostoucí koncentrací IL-4 v séru (Rosenwasser & Borish, 1997). Naproti tomu přítomnost alely C v této pozici vede ke snížené expresi genu. Naše výsledky prezentují nižší frekvenci genotypu CC ve skupině pacientek s děložním myomem. Můžeme nyní pouze teoretizovat o tom, co je důsledkem sledované souvislosti. IL-4 byl popsán jako potentní protizánětlivý cytokin modulující aktivaci fibroblastů v nádorové tkáni a inhibující tumorem aktivovanou angiogenezi (Blankenstein, 2005). V našem souboru zdravých kontrol jsme prokázali signifikantně častější výskyt právě alely C, což by potvrzovalo představu, že zdraví jedinci bez nádoru by vyšší koncentraci IL-4 v séru nepotřebovali. Rovněž byla zkoumána jeho role v procesu inhibice a regrese nádorového procesu (Golumbek, 1991; Hock, 1993; Hock, 1994; Tepper, 1989).

Naproti tomu Hsieh, 2007 také testoval mj. polymorfismus promotoru genu pro IL-4 ve stejné pozici a kromě IL-12R β (vyšší frekvence genotypu GG u pacientek s myomy) neprokázal ve skupině svých pacientek asociaci se zvýšeným výskytem děložních myomů. Možným vysvětlením rozporu mezi tímto závěrem a námi prezentovanými výsledky je skutečnost, že autor vyšetřoval populaci premenopauzálních taiwanských žen, nikoli tedy naši kavkazskou populaci jako my. Škorpil a kol., 2007 ve své práci dobře demonstruje rasové rozdíly v genových polymorfismech cytokinů ve třech evropských populacích. V této studii bylo sledováno 22 SNP ve 13 genech pro různé cytokiny a následně byly porovnány genotypy v jednotlivých populacích (nizozemská, italská, česká). Rozdíly byly nalezeny hned

v několika genech (IL-1, IL-2, IL-10, TNF- α), kdy některé genotypy byly častější u jedné populace (-380 GG TNF- α u italské populace), některé byly naopak minoritní. Dobře doložené jsou též signifikantní rozdíly v incidenci děložní myomatózy u různých etnik na podkladě nejenom genetických, ale též enviromentálních faktorů (Al Hendy, 2006).

Naše výsledky ukazují i na možnou roli genového polymorfismu TNF- α na vzniku myomů. TNF- α spolupůsobí v úvodu protizánětlivé odpovědi a v rámci reakce akutní fáze při různých infekčních a autoimunitních chorobách. Kromě výše zmíněných účinků se uplatňuje při regulaci exprese povrchových receptorů vaskulárních endotelových buněk např. pro VEGF. Možná role VEGF v patogenezi myomů byla již výše zmíněna. Popsána je také úloha genu pro TNF- α v patogenezi tumorogeneze. Literární data prokazují vliv TNF- α polymorfismu v promotorové pozici -308A/G na vznik různých druhů nádorů se signifikantně vyšší frekvencí alely A mezi pacienty s malignitami (Chouchane, 1997). Bylo prokázáno, že záměna alely A místo G v pozici - 308 je částí haplotypu vedoucího ve svém důsledku ke zvýšené expresi genu pro TNF- α . Alela A v této pozici takto zvyšuje produkci tohoto cytokinu až sedminásobně (Wilson, 1997). Naše studie prokázala v souladu se zmíněnou skutečností rovněž vyšší frekvenci distribuce genotypu AA polymorfismu TNF- α v pozici -308 ve skupině mladších pacientek. Je třeba konstatovat, že budou potřeba další studie, které objasní, jakou roli hraje TNF- α v etiologii a patogenezi děložních myomů. Skupina autorů v čele s Hsiehem v roce 2004 referuje ve své práci o signifikantně vyšší frekvenci přítomnosti alely G v pozici -308 u TNF- α genu ve skupině taiwanských premenopauzálních žen s leiomyomem (Hsieh, 2004). Tento výsledek jsme v naší práci nepotvrdili, ale ani nevyvrátili. V úvahu nutno vzít hlavně skutečnost již výše zmíněné etnické heterogenity vyšetřovaných polymorfismů, kde u taiwanské populace převládá v pozici -308 alela G proti predominantní alele A u evropské populace.

Litovkin a kol., 2007 ve své studii genového polymorfismu -174 G/C genu pro IL-6 uvádí, že tento SNP není rizikovým faktorem velkého významu pro rakovinu prsu (ukrajinská populace), nicméně popisuje jistý trend asociace mezi mutantní alelou C a náchylností k děložnímu leiomyomu. V naší studii jsme tento trend nepotvrdili, přestože patříme do stejné kavkazské populace.

Kapitola 6:

ZÁVĚR

6 ZÁVĚR

Ačkoli jsou příčiny vzniku děložních myomů stále neznámé, současná vědecká literatura obsahu řadu informací týkajících se epidemiologie, genetiky, hormonálních aspektů a molekulární biologie těchto tumorů. V posledních letech je věnována zvýšená pozornost genetickým změnám v souvislosti s predispozicí k výskytu myomů a jejich dědičnosti. Zkoumán je vliv etnicity, zvýšený familiární výskyt nebo incidence leiomyomů u dvojčat. V tomto smyslu byla navržena i tato studie s cílem nalézt nové poznatky v oblasti predikce výskytu a diagnostiky tohoto onemocnění a výsledky aplikovat v prevenci. Naše práce jako první analyzuje pomocí molekulárně-genetických metodik (PCR-SSP, sekvenování) takto rozsáhlé spektrum následujících cytokinů a jejich polymorfismů: interleukin IL-1 α (-889 T/C), IL-1 β (-511 T/C a +3962 T/C), IL-1R (pst11970 C/T), IL-1RA (mspa111100 T/C), IL-4R α (+1902 G/A), IL-12 (-1188 C/A), interferon (IFN)- γ (+874 A/T), TGF- β 1 (kodón 10 C/T a kodón 25 G/C), tumor nekrotizující faktor (TNF)- α (-308 G/A a -238 G/A), IL-2 (-330 T/G a +166 G/T), IL-4 (-1098 T/G, -590 T/G a -33 T/C), IL-6 (-174 G/C a nt565 G/A) a IL-10 (-1082 G/A, -819 C/T a -592 C/A). Frekvence většiny testovaných SNP nedosáhla u pacientů statisticky významného rozdílu. Zaznamenali jsme ale zajímavý rozdíl v distribuci genotypů interleukinu 4. Genotyp CC v promotorové pozici -590 a -33 byl zastoupen u pacientek s menší frekvencí než u kontrol ($p=0,03$). Mezi těmito SNP je dokonce silná vazebná nerovnováha ($D\neq 0$). Práce dále srovnává pacientky s kontrolami po rozdělení souboru pacientek do dvou skupin dle jejich věku ≤ 35 a >35 . Byl pozorován stejný trend v nižší frekvenci genotypu CC v pozicích -590 a -33 u pacientek starších 35 let ($p=0,09$), nikoliv však u mladších pacientek. Kromě IL-4 jsme zaznamenali rozdíl v distribuci genotypů i u genu TNF α (promotorový SNP -308 A/G). Frekvence genotypu AA byla vyšší u pacientek pod 35 let ($p=0,02$). Tento rozdíl nebyl u starších pacientek potvrzen (>35). Závěrem můžeme

tedy konstatovat, že výsledky naší práce naznačují možnou souvislost mezi přítomností některých genových polymorfismů cytokinů (IL-4, TNF- α) a zvýšeným rizikem vzniku děložní myomatózy. Pochopitelně budou za potřebí další výzkumné projekty k objasnění mechanismu působení výše uvedených souvislostí.

Kapitola 7:
LITERATURA

7 LITERATURA

1. Abbas A, Lichtman A, Pober J: Cellular and Molecular Immunology, 4th edn. Philadelphia: W. B. Saunders; 2000
2. Al Hendy, A., Salama, SA.: Catechol -O- methyltransferase polymorphism is associated with increased uterine leiomyoma risk in different ethnic groups. *J. Soc Gynecol Incest*, 2006, 13, p. 136-144
3. Alam NA, Olpin S, Leigh, IM. Fumarate hydratase mutations and predisposition to cutaneous leiomyomas, uterine leiomyomas and renal cancer. *Br J Dermatol* 2005; 153:11-17.
4. Andersen,T.I., Heimdal,K.R., Skrede,M., Tveit,K., Berg,K. & Borresen,A.L. (1994) Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Hum. Genet.*, 94, 665.
5. Arici A, Sozen I. Expression, menstrual cycle-dependent activation, and bimodal mitogenic effect of transforming growth factor-beta1 in human myometrium and leiomyoma. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:76-83.
6. Arici A, Sozen I. Transforming growth factor-beta3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertil Steril* 2000;73:1006-11.
7. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun.* 1999, 1, p. 1 –17.
8. Blankenstein, T. (2005) The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. *Curr. Opin. Immunol.*, 17, 180.

9. Bruchova H, Kracmarova A, Cerny V, Brdicka R. Využití technologie LabMAP Luminex pro detekci SNP polymorfismů. *Klin. Biochem. Metab.*, 2005, 13, p. 87-91.
10. Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol* 1990;94:435-8.
11. Dinarello CA (December 1994). "The interleukin-1 family: 10 years of discovery". *FASEB J.* 8 (15): 1314–25.
12. Dixon, D., He, H., Hasseman, J., et al.: Imunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. *Environ Health Perspect*, 2000, 108, p. 795-802.
13. Faerstein E, Szklo M, Rosenheim N. Risk factors for uterine leiomyoma: a practice-based case-control study. I. African-American heritage, reproductive history, body size, and smoking. *Am J Epidemiol* 2001;153:1-10.
14. Ferenčík, M; Rovenský, J; Shoenfeld, Y. Imunitní systém; informace pro každého. 1. české. vyd. Praha : Grada Publishing, 2005
15. Flake, GP., Andersen, J., Dixon D.: Etiology and pathogenesis of sterine leiomyomas: a review. *Environ Health Prospect.* 2003, 111(8), p. 1037-54
16. Fishman,D., Faulds,G., Jeffery,R., Mohamed-Ali,V., Yudkin,J.S., Humphries,S. & Woo,P. (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J. Clin. Invest*, 102, 1369.
17. Fujita M. Histological and biochemici studies on collagen in human leiomyomas. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1985;60:602-15

18. Golumbek,P.T., Lazenby,A.J., Levitsky,H.I., Jaffee,L.M., Karasuyama,H., Baker,M. & Pardoll,D.M. (1991) Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4. *Science*, 254, 713.
19. Gross, K., Morton, C.: Genetics and the development of fibroids. *Clin Obstet gynecol*, 2001, 44, p. 335-349
20. Hendrickson, MR., Tavassoli, FA., Kempson, RL., et al. Mesenchymal tumor and related lesions. In Tavassoli, FA., Devilee, P. WHO Classification of tumors. Tumors of the breast and female genital organs. Lyon: IARC Press, 2003, p. 233-44.
21. Horeksi V, Bartunkova J: Základy imunologie, 2. vydání: Triton; 2002
22. Hsieh,Y.Y., Chang,C.C., Tsai,C.H., Lin,C.C. & Tsai,F.J. (2007) Interleukin (IL)-12 receptor beta1 codon 378 G homozygote and allele, but not IL-1 (beta-511 promoter, 3953 exon 5, receptor antagonist), IL-2 114, IL-4-590 intron 3, IL-8 3'-UTR 2767, and IL-18 105, are associated with higher susceptibility to leiomyoma. *Fertil. Steril.*, 87, 886.
23. Hsieh,Y.Y., Chang,C.C., Tsai,F.J., Lin,C.C., Yeh,L.S. & Tsai,C.H. (2004) Tumor necrosis factor-alpha-308 promoter and p53 codon 72 gene polymorphisms in women with leiomyomas. *Fertil. Steril.*, 82 Suppl 3, 1177.
24. Hock,H., Dorsch,M., Kunzendorf,U., Qin,Z., Diamantstein,T. & Blankenstein,T. (1993) Mechanisms of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin 2, interleukin 4, interleukin 7, tumor necrosis factor, or interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 2774.

25. Hock,H., Dorsch,M., Richter,G., Kunzendorf,U., Kruger-Krasagakes,S., Blankenstein,T., Qin,Z. & Diamantstein,T. (1994) Tumor-cell-targeted cytokine gene transfer in experimental models for cancer therapy. *Nat. Immun.*, 13, 85.
26. Chouchane,L., Ahmed,S.B., Baccouche,S. & Remadi,S. (1997) Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha promotor region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer*, 80, 1489
27. Inagaki,N., Ung,L., Otani,T., Wilkinson,D. & Lopata,A. (2003) Uterine cavity matrix metalloproteinases and cytokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 111, 197.
28. Kjerulff KH, Langenberg B, Seidman JI, et al. Uterine leiomyomas: racial differences in severity, symptoms and age at diagnosis. *J Reprod Med* 1996;47:483-90.
29. Kim SJ, Lee HJ, Koo HG, Kim JW, Song JY, Kim MK, Shin DH, Jin SY, Hong MS, Park HJ, Yoon SH, Park HK, Chung JH (September 2004). "Impact of IL-1 receptor antagonist gene polymorphism on schizophrenia and bipolar disorder". *Psychiatr. Genet.* 14 (3): 165–7.
30. Lennarz,W.J., Lane, M.D.. *Encyclopedia of biological chemistry, four-volume set, 1-4.* Oxford: Elsevier, 2004. ISBN 0124437109.
31. Ligon AH, Morton CC. Leiomyomata: heritability and cytogenetic studies. *Hum Reprod Update* 2001;7:8-14.
32. Litovkin,K.V., Domenyuk,V.P., Bubnov,V.V. & Zaporozhan,V.N. (2007) Interleukin-6 -174G/C polymorphism in breast cancer and uterine leiomyoma patients: a population-based case control study. *Exp. Oncol.*, 29, 295

33. Lumbiganon P, Ruggao S, Phandhu-Fung S, et al. Protective effect of depot-medroxyprogesterone acetate on surgically treated uterine leiomyomas: a multicentre case-control study. *Br J Obstet Gynaecol* 1995;103:909-14.
34. Mára M, Holub Z a kol. Děložní myomy. Moderní diagnostika a léčba. Grada Publishing, a.s., 2009
35. Marshall LM, Spiegelman D, Barbieri RI, et al. Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstet Gynecol* 1997;90:963-73.
36. Maruo,T., Matsuo,H., Shimomura,Y., Kurachi,O., Gao,Z., Nakago,S., Yamada,T., Chen,W. & Wang,J. (2003) Effects of progesterone on growth factor expression in human uterine leiomyoma. *Steroids*, 68, 817.
37. Parker W. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril* 2007;87:725-36.
38. Pietrowski,D., Thewes,R., Sator,M., Denschlag,D., Keck,C. & Tempfer,C. (2009) Uterine leiomyoma is associated with a polymorphism in the interleukin 1-beta gene. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 62, 112.
39. Rein M, Barbieri R, Friedman A. Progesteron: a critical role in the pathogenesis of uterine myomas. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:14-8.
40. Romieu J, Walker AH, Jick S. Determination of uterine fibroids. *Post Market Surveil* 1991;5:119-33.

41. Rosenwasser,L.J. & Borish,L. (1997) Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10). *Am. J. Respir. Crit Care Med.*, 156, S152.
42. Sato, F., Kudo, R., Miyake H.: Body fat distribution and uterine leiomyomas. *J Epidemiol*, 1998, 8, p. 176-180
43. Shastry BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J. Hum. Genet.*, 2002, 47, p. 561–566.
44. Shimomura,Y., Matsuo,H., Samoto,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.
45. Schwartz, SM., Marshall, LM., Baird, DD.: Epidemiologic contributions to understanding the etiology of uterine leiomyomata. *Environ Health Perspect*, 2000, 108(5), p. 821-827.
46. Skorpil,N., Kolesar,L., Striz,I., Lardy,N.M. & Slavcev,A. (2007) Cytokine gene polymorphisms in the Dutch population. *Int. J. Immunogenet.*, 34, 87.
47. Smith AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009, 20, p.43-59.
48. Sozen I, Arici A. Cellular biology of myomas: interaction of sex steroids with cytokines and growth factors. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2006;33:41-58.
49. Sozen I, Arici. Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. *Fertil Steril.* 2002;78:1-12.

50. Stewart EA, Morton CC. The genetics of uterine leiomyomata: what clinicians need to know. *Obstet Gynecol* 2006;107:917-21.
51. Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet* 2001;357:293-8.
52. Syssoev, K.A., Kulagina, N.V., Chukhlovin, A.B., Morozova, E.B. & Totolian, A.A. (2008) Expression of mRNA for chemokines and chemokine receptors in tissues of the myometrium and uterine leiomyoma. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 145, 84.
53. Tepper, R.I., Pattengale, P.K. & Leder, P. (1989) Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell*, 57, 503.
54. Toro JR, Nickerson ML, Wei MH, et al. Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America. *Am J Hum Genet* 2003;73:95-106.
55. Turner, D., Grant, S.C., Yonan, N., Sheldon, S., Dyer, P.A., Sinnott, P.J. & Hutchinson, I.V. (1997) Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation*, 64, 776.
56. Van de Ven WJ. Genetic basis of uterine leiomyoma: involvement of high mobility group proteins genes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;81:289-93.
57. Vasakova M, Striz I, Slavcev A, Jandova S, Kolesar L, Sulc J. Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patient with idiopathic pulmonary fibrosis. *Tissue Antigens* 2006, 67 (3):229-32
58. Vokurka, Martin. *Velký lékařský slovník*. 7. vydání. Praha: Maxdorf, 2007. ISBN 978-80-7345-130-1.

59. Wallach EE, Vlahos NF. Uterine myomas: an overview of development, clinical features, and management. *Obstet Gynecol* 2004;104:393-406.
60. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Surf GW. Effects of a polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94, p. 3195-3199
61. Wolanska M, Bankowski E. Fibroblast growth factors (FGB) in human myometrium and uterine leiomyomas in variol stages of tumour growth. *Biochimie* 2006;88:141-146

Kapitola 8:

VLASTNÍ PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU

8 VLASTNÍ PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU

1. **Sosna O**, Kolesar L, Slavcev A, Skibová J, Fait T., Mara M., Striz I, Kuzel D.:
Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with uterine fibroid. Fol. Biol.
2010; 56, 206-210. **IF: 1,14**
2. Mara M, Maskova J, Fucikova Z, Kuzel D, Belsan T, **Sosna O.**: Midterm clinical and
first reproductive results of a randomized controlled trial comparing uterine fibroid
embolization and myomectomy. Cardiovasc Intervent Radiol. 2008 Jan-Feb;31(1):73-
85. Epub 2007 Oct 18. **IF: 1,25**
3. **Sosna O**, Kuzel D, Mára M.: Etiopathogenesis of uterine fibroid: current knowledge.
Ceska Gynekol. 2008 Jun;73(3):184-7. Review.

Original Article

Th1/Th2 Cytokine Gene Polymorphisms in Patients With Uterine Fibroid

(uterine fibroid / myoma / cytokine / gene polymorphism)

O. SOSNA¹, L. KOLESÁR², A. SLAVČEV², J. SKIBOVÁ³, T. FAIT¹, M. MARA¹, I. STRÍŽ⁴, D. KUŽEL¹

¹Charles University in Prague, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Department of Gynaecology and Obstetrics, Prague, Czech Republic

Institute for Clinical and Experimental Medicine: ²Department of Immunogenetics, ³Department of Medical Statistics, ⁴Department of Clinical and Transplant Immunology, Prague, Czech Republic

Abstract. Uterine fibroid or leiomyoma is a frequent non-malignant tumour with unknown aetiology and pathogenesis. The aim of our study was to look for possible genetic markers which could be used as prognostic tools for evaluation of an increased risk for development of uterine fibroid. A large spectrum of Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in 102 patients with uterine leiomyoma was compared with 145 healthy controls. An association between polymorphisms of the *IL4* gene promotor at positions -590 C/T and -33 C/T, and the risk of leiomyoma was observed. The CC genotype of *IL4* -590 and at position -33 was less frequent in the patient group than in the control group ($P = 0.03$). Besides *IL-4*, we observed different genotype distribution of the *TNFA* gene -308 A/G. The frequency of genotype AA was higher in the younger (≤ 35 years) patient group ($P = 0.02$). Our study thus suggests that certain cytokine gene polymorphisms, especially of the *IL4* and *TNFA* genes, may be associated with increased risk for development of uterine fibroid. Further investigation would be needed to elucidate the mechanisms responsible for these associations.

Introduction

Uterine fibroid (UF) or leiomyoma is diagnosed in 30–40 % of women in reproductive age. UF becomes symptomatic in one-third of diagnosed patients and is the most frequent indication for hysterectomy (Falcone and Walters, 2008). UF is a benign monoclonal tumour of smooth muscle cells of the uterus and also contains large amounts of extracellular matrix components such as collagen, fibronectin and proteoglycans (Parker, 2007). The clinical symptoms are related to the local mass effect, resulting in pressure upon adjacent organs, excessive uterine bleeding or problems related to infertility and pregnancy. Leiomyomas can be usually diagnosed by gynecologic palpatory examination, transvaginal ultrasonography or hysteroscopy and MRI. Although the tumour represents the most common benign female tumour, its aetiology remains unknown. The influence of several genetic, hormonal, anthropometrical and reproductive factors is supposed (Flake et al., 2003; Stewart and Morton, 2006; Evans and Brunsell, 2007).

The genetic factors contributing to the development of UF are being intensively investigated. The possibility for a role of certain cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of UF has been suggested in several previous works (Hsieh et al., 2004, 2007; Litovkin et al., 2007; Pietrowski et al., 2009). The aim of our study was therefore to examine a large spectrum of Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with uterine leiomyoma and to compare them with healthy controls. Our hypothesis of a possible association between cytokine single nucleotide polymorphisms (SNP) and the incidence of UF was based on the fact that cytokines may enhance elevated production of matrix metalloproteinases, which may further stimulate leiomyoma growth (Inagaki et al., 2003). These polymorphisms may not be directly linked to the disease, but may be useful tools in the study of this multifactorial disorder (Andersen et al., 1994). To our best knowledge, our study is the first to analyse such a wide range of cytokine gene polymorphisms in UF patients.

Received April 19, 2010. Accepted May 10, 2010.

This study was financially supported by the following grants: GA UK No. 38108 and IGA No. NS 9798-4.

Corresponding author: Libor Kolesár, Department of Immunogenetics, IKEM, Vídeňská 1958/9, 140 21 Prague, Czech Republic; e-mail: libor.kolesar@ikem.cz

Abbreviations: BMI – body mass index, EGF – epidermal growth factor, HWE – Hardy-Weinberg equilibrium, IFN- γ – interferon γ , IL – interleukin, PCR – polymerase chain reaction, SNP – single nucleotide polymorphisms, TGF- β – transforming growth factor β , TNF- α – tumour necrosis factor α , *TNFA* – gene for TNF- α , UF – uterine fibroid.

Material and Methods

Patients

The study group enrolled 102 patients diagnosed with UF between 2007 and 2008 at Charles University in Prague, First Faculty of Medicine and General Faculty Hospital in Prague. The study design and Informed Consent form was approved by the Ethics Committee of the General University Hospital, Prague. Informed consent was obtained from all patients. Ultrasonography targeted on the size and character of the leiomyoma was performed in all patients. Patients also underwent elective surgery such as laparoscopic myomectomy, open myomectomy, transcervical resection of myoma or hysterectomy. Histological verification was performed after surgery. Several undefined cases were excluded, such as leiomyomas with increased cell activity, adenomyosis and one case of stromal sarcoma. Only UF with typical histology were enrolled into the study.

Patients with UF for the statistical analysis were divided into two groups: A) ≤ 35 years of age, BMI < 25 , B) > 35 years of age, BMI < 25 . None of the patients took any long-term medication and all also had negative oncology history. The diameter of UF was verified by abdominal and transvaginal ultrasonography. The minimal size of UF was set to 30 mm in diameter in case of single leiomyoma or the occurrence of at least four small-sized leiomyomas more than 10 mm in diameter (in case of multiple leiomyomas). The most common symptoms and complaints were pelvic pain and abnormal bleeding.

As a control group we used 145 control samples from female volunteers without leiomyoma and mean age of 45 (20–55 years). No women from the control group took any long-term medication and all had negative oncology history. The absence of UF was verified by abdominal and transvaginal ultrasonography.

DNA analysis

DNA was isolated from whole blood using the QIAamp kits (provided by Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The quality of DNA was measured both with gel electrophoresis and by a spectrophotometer. DNA with the ratio of absorbancies A260/A280 between 1.7 and 1.9 was considered for further analysis. A Cytokine Genotyping Kit (Invitrogen, Darmstadt, Germany) was applied to cytokine genotyping. The following cytokine SNPs were detected (Table 1): interleukin (IL)-1 α (-889 T/C), IL-1 β (-511 T/C and +3962 T/C), IL-1R (pst11970 C/T), IL-1RA (mspa111100 T/C), IL-4R α (+1902 G/A), IL-12 (-1188 C/A), interferon (IFN)- γ (+874 A/T), TGF- β 1 (codon 10 C/T and codon 25 G/C), tumour necrosis factor (TNF)- α (-308 G/A and -238 G/A), IL-2 (-330 T/G and +166 G/T), IL-4 (-1098 T/G, -590 T/C and -33 T/C), IL-6 (-174 G/C and nt565 G/A) and IL-10 (-1082 G/A, -819 C/T and -592 C/A). The principle of SNP detection is based on PCR reaction with sequence-specific primers. Briefly, a master mix was prepared according to manufacturer's instructions – 140 μ l reaction buffer,

5.6–9.3 μ g DNA, 20 U Taq polymerase (TopBio, Prague, Czech Republic) and PCR water added up to a final volume of 501 μ l. Ten microlitres of the master mix were aliquoted to lyophilized primer mixes. The following PCR protocol was run in a Biometra Thermocycler (Schöeller, Göttingen, Germany) with an optimized ramp speed to 1 $^{\circ}$ C/s. The PCR started with an initial denaturation at 94 $^{\circ}$ C for 2 min followed by 10 cycles at 94 $^{\circ}$ C for 15 s and 65 $^{\circ}$ C for 60 s. The final step involved 20 cycles of 94 $^{\circ}$ C for 15 s, 61 $^{\circ}$ C for 50 s and 72 $^{\circ}$ C for 30 s. PCR products were detected after electrophoresis in 2% agarose gel by staining with GelRed (Biotium, Hayward, CA). The gel was documented with a GeneGenius Bio-Imaging system (Syngene, Cambridge, UK).

Statistical analysis

Genotype and allele frequencies were determined by direct counting and were compared with the control population by Fisher's exact test or χ^2 test. Statistical analysis was performed using MedCalc statistical software (Mariakerke, Belgium). P values lower than 0.05 were considered significant. Adjusted standardized deviates between observed and expected values for each cell were approximated by Z scores to identify large differences. Bonferroni correction was used for multiple comparisons if more than one SNP at the same locus were assessed.

Results

Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was counted for each locus and none of them reached a statistically significant difference. First, we compared the cytokine gene SNP of the entire patient cohort with the SNP of the control group. The frequencies of the majority of tested cytokine gene SNP in the patient cohort were not statistically different from the cytokine SNP in the control group. However, we found an intriguing difference in the distribution of *IL4* genotypes. The CC genotype of *IL4* -590 and at position -33 was less frequent in the patient group than in the control group ($P = 0.03$) (Table 1). The power of the test reached 73 % for both polymorphic positions. Furthermore, there is a strong linkage disequilibrium between these two positions (-590 and -33 ($D \neq 0$)).

In addition, we compared the cytokine gene polymorphisms of patients with the control group after separation of patients into two cohorts according to age – ≤ 35 , and > 35 . The same trend of lower frequency of the CC genotype *IL4* -590 and *IL4* -33 in patients compared with controls was preserved in older individuals (> 35 years) ($P = 0.09$) but not in patients younger than 35 (Table 2). Besides *IL4*, we observed a different genotype distribution of the *TNFA* gene -308 A/G. The frequency of the AA genotype was higher in the younger patient group ($P = 0.02$) (Table 3), but this result was not conclusive due to the small power of the test (42 %). This difference was not found in the patient group with > 35 years of age.

Table 1. Comparison of genotype frequencies between the patient group and the control group

Cytokine	SNP	Genotype	Controls N (%)	Patients N (%)	P value
IL-1 α	-889	CC	69 (48)	51 (50)	0.70
		CT	59 (41)	42 (42)	
		TT	16 (11)	8 (8)	
IL-1 β	-511	CC	79 (54)	46 (45)	0.35
		CT	54 (37)	46 (45)	
		TT	12 (8)	10 (10)	
IL-1 β	+3962	CC	74 (51)	55 (54)	0.78
		CT	55 (38)	39 (38)	
		TT	15 (10)	8 (8)	
IL-1R	Pst1 1970	CC	55 (38)	40 (39)	0.66
		CT	67 (46)	50 (49)	
		TT	23 (16)	12 (12)	
IL-1RA	Mspal 11100	CC	13 (9)	13 (13)	0.62
		CT	63 (43)	41 (40)	
		TT	69 (48)	48 (47)	
IL-4R α	+1902	AA	84 (58)	60 (59)	0.62
		AG	56 (39)	36 (35)	
		GG	5 (3)	6 (6)	
IL-12	-1188	AA	85 (59)	54 (53)	0.24
		AC	55 (38)	42 (42)	
		CC	3 (2)	6 (6)	
IFN- γ	+874	AA	40 (28)	32 (31)	0.85
		AT	70 (49)	47 (46)	
		TT	32 (23)	23 (23)	
TGF- β 1	codon 10	CC	25 (17)	13 (13)	0.17
		CT	66 (46)	61 (60)	
		TT	54 (37)	28 (27)	
TGF- β 1	codon 25	CC	1 (1)	1 (1)	0.76
		CG	20 (14)	11 (11)	
		GG	124 (86)	90 (88)	
TNF- α	-308	AA	1 (1)	4 (4)	0.14
		AG	29 (20)	25 (25)	
		GG	113 (79)	73 (72)	
TNF- α	-238	AA	0 (0)	0 (0)	0.16
		AG	14 (10)	5 (5)	
		GG	129 (90)	97 (95)	
IL-2	-330	GG	15 (10)	12 (12)	0.95
		GT	63 (44)	44 (43)	
		TT	65 (45)	46 (45)	
IL-2	+166	GG	61 (43)	48 (47)	0.76
		GT	62 (43)	42 (41)	
		TT	20 (14)	12 (12)	
IL-4	-1098	GG	0 (0)	0 (0)	0.21
		GT	22 (15)	10 (10)	
		TT	122 (85)	92 (90)	
IL-4	-590	CC	112 (78)	64 (63)	0.03
		CT	27 (19)	34 (33)	
		TT	5 (3)	4 (4)	
IL-4	-33	CC	112 (78)	64 (63)	0.03
		CT	27 (19)	34 (33)	
		TT	5 (3)	4 (4)	
IL-6	-174	CC	27 (19)	19 (19)	0.23
		CG	72 (50)	41 (40)	
		GG	45 (31)	42 (41)	
IL-6	nt565	AA	25 (17)	18 (18)	0.21
		AG	73 (51)	41 (40)	
		GG	46 (32)	43 (42)	
IL-10	-1082	AA	42 (29)	32 (31)	0.45
		AG	83 (57)	51 (50)	
		GG	20 (14)	19 (19)	
IL-10	-819	CC	74 (51)	56 (55)	0.82
		CT	64 (44)	41 (40)	
		TT	7 (5)	5 (5)	
IL-10	-592	AA	7 (5)	5 (5)	0.82
		AC	64 (44)	41 (40)	
		CC	74 (51)	56 (55)	

Table 2. Genotype distribution of *IL-4* -590 and -33 in the two patient groups (≤ 35 years and > 35 years of age); compared with the control group ($P = 0.09$)

IL-4 -590	CC	CT	TT
	N (%)	N (%)	N (%)
Controls	112 (78)	27 (19)	5 (3)
Patient age ≤ 35	24 (63)	12 (32)	2 (5)
Patient age > 35	38 (61)	22 (36)	2 (3)

IL-4 -33	CC	CT	TT
	N (%)	N (%)	N (%)
Controls	112 (78)	27 (19)	5 (3)
Patient age ≤ 35	24 (63)	12 (32)	2 (5)
Patient age > 35	38 (61)	22 (36)	2 (3)

Table 3. Genotype distribution of *TNF- α* -308 in the two patient groups ≤ 35 years and > 35 years of age); compared with the control group ($P = 0.02$).

TNF-α -308	AA	AG	GG
	N (%)	N (%)	N (%)
Controls	1 (1)	29 (20)	113 (79)
Patient age ≤ 35	3 (8)	5 (13)	30 (79)
Patient age > 35	1 (2)	20 (32)	41 (66)

Discussion

Our study was designed to search for possible genetic markers which could be used as prognostic tools for evaluation of increased risk for development of UF. The role of various cytokines in leiomyoma development has been investigated, like that of epidermal growth factor (EGF) (Shimomura et al., 1998), transforming growth factor β (TGF- β) (Arici and Sozen, 2000), chemokines and chemokine receptors (Syssoev et al., 2008). Besides, it is known that leiomyoma growth is dependent on oestrogen and progesterone production (Maruo et al., 2003), which on their part may influence the gene expression of several cytokines and growth factors.

In our study we selected several "candidate" SNPs of pro- and anti-inflammatory cytokine genes which could be associated with UF development. Besides, there is extensive literary data that the studied SNPs may influence the level of gene expression of the corresponding cytokines (Turner et al., 1997; Wilson et al., 1997; Fishman et al., 1998; Smith and Humphries, 2009).

Our study suggests a possible association between the polymorphisms of the *IL4* gene promotor, namely SNP -590 C/T and -33 C/T, and the risk of leiomyoma development. T allele substitution at position -590 increases *IL4* gene expression and is associated with elevation of serum IL-4 concentrations (Rosenwasser and Borish, 1997). On the contrary, the C allele at this position leads to decreased gene expression. It is a matter of speculation what might be the reason for the observed association. As a strong anti-inflammatory cytokine, IL-4 has been shown to modulate the activation of tumour-associated fibroblasts (Blankenstein, 2005). Its role in tumour clearance and reduction of tumour load has also been investigated (Tepper et al., 1989; Golumbek et al.,

1991; Hock et al., 1993, 1994). The study of Hsieh et al. (2007) tested the same *IL4* -590 polymorphisms and other SNPs; however, no association with the incidence of UF was found with the exception of IL-12R β 1. This contradiction may be caused by differences between the patient groups studied (premenopausal Taiwanese women) or by a race difference as it was previously shown in the study of Skorpil et al. comparing CGP among three European populations (Skorpil et al., 2007).

Our results indicated a possible role of *TNFA* polymorphism on the risk of leiomyoma development. Tumour necrosis factor participates in the induction of inflammatory responses and acute phase reactions, which in turn cause many of the clinical problems associated with various infectious and autoimmune diseases. The effect of the *TNFA* gene on tumour pathogenesis has also been described. There are reports in the literature about the influence of *TNFA* -308 A/G polymorphism on various tumours with a significantly increased frequency of the A allele among patients with malignancies (Chouchane et al., 1997). It has been shown that the substitution of the -308 A to G is a part of haplotype which influences *TNFA* gene expression. The A allele at this position increases cytokine production up to 7-fold (Wilson et al., 1997). However, further studies would be needed to clarify to what extent TNF- α may play a role in the aetiology and pathogenesis of UF. The group of Hsieh et al. (2004) found association of *TNFA* -308 G allele with leiomyoma in premenopausal Taiwan Chinese women. This result, however, cannot be confirmed or rebutted based on our results, but one should take into account the oriental ethnic background, where the G allele is the most frequent at position -308 in Taiwanese women, whilst the A allele is predominant in the European nations.

In conclusion, our study suggests that certain cytokine gene polymorphisms, especially those of *IL4* and *TNFA*, may be associated with increased risk for development of uterine fibroid. Further investigation would be needed to elucidate the mechanisms responsible for these associations.

Acknowledgement

The authors thank Gabriela Vondraskova for her skilful technical assistance.

References

- Andersen, T. I., Heimdal, K. R., Skrede, M., Tveit, K., Berg, K., Borresen, A. L. (1994) Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Hum. Genet.* **94**, 665-670.
- Arici, A., Sozen, I. (2000) Transforming growth factor- β 3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertil. Steril.* **73**, 1006-1011.
- Blankenstein, T. (2005) The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 180-186.

- Chouchane, L., Ahmed, S. B., Baccouche, S., Remadi, S. (1997) Polymorphism in the tumor necrosis factor- α promoter region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer* **80**, 1489-1496.
- Evans, P., Brunzell, S. (2007) Uterine fibroid tumors: diagnosis and treatment. *Am. Fam. Physician* **75**, 1503-1508.
- Falcone, T., Walters, M. D. (2008) Hysterectomy for benign disease. *Obstet. Gynecol.* **111**, 753-767.
- Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J. S., Humphries, S., Woo, P. (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J. Clin. Invest.* **102**, 1369-1376.
- Flake, G. P., Andersen, J., Dixon, D. (2003) Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ. Health Perspect.* **111**, 1037-1054.
- Golumbek, P. T., Lazenby, A. J., Levitsky, H. I., Jaffee, L. M., Karasuyama, H., Baker, M., Pardoll, D. M. (1991) Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4. *Science* **254**, 713-716.
- Hock, H., Dorsch, M., Kunzendorf, U., Qin, Z., Diamantstein, T., Blankenstein, T. (1993) Mechanisms of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin 2, interleukin 4, interleukin 7, tumor necrosis factor, or interferon γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2774-2778.
- Hock, H., Dorsch, M., Richter, G., Kunzendorf, U., Kruger-Krasagakes, S., Blankenstein, T., Qin, Z., Diamantstein, T. (1994) Tumor-cell-targeted cytokine gene transfer in experimental models for cancer therapy. *Nat. Immun.* **13**, 85-92.
- Hsieh, Y. Y., Chang, C. C., Tsai, F. J., Lin, C. C., Yeh, L. S., Tsai, C. H. (2004) Tumor necrosis factor- α -308 promoter and p53 codon 72 gene polymorphisms in women with leiomyomas. *Fertil. Steril.* **82 Suppl 3**, 1177-1181.
- Hsieh, Y. Y., Chang, C. C., Tsai, C. H., Lin, C. C., Tsai, F. J. (2007) Interleukin (IL)-12 receptor β 1 codon 378 G homozygote and allele, but not IL-1 (β -511 promoter, 3953 exon 5, receptor antagonist), IL-2 114, IL-4-590 intron 3, IL-8 3'-UTR 2767, and IL-18 105, are associated with higher susceptibility to leiomyoma. *Fertil. Steril.* **87**, 886-895.
- Inagaki, N., Ung, L., Otani, T., Wilkinson, D., Lopata, A. (2003) Uterine cavity matrix metalloproteinases and cytokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **111**, 197-203.
- Litovkin, K. V., Domenyuk, V. P., Bubnov, V. V., Zaporozhan, V. N. (2007) Interleukin-6 -174G/C polymorphism in breast cancer and uterine leiomyoma patients: a population-based case control study. *Exp. Oncol.* **29**, 295-298.
- Maruo, T., Matsuo, H., Shimomura, Y., Kurachi, O., Gao, Z., Nakago, S., Yamada, T., Chen, W., Wang, J. (2003) Effects of progesterone on growth factor expression in human uterine leiomyoma. *Steroids* **68**, 817-824.
- Parker, W. H. (2007) Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil. Steril.* **87**, 725-736.
- Pietrowski, D., Thewes, R., Sator, M., Denschlag, D., Keck, C., Tempfer, C. (2009) Uterine leiomyoma is associated with a polymorphism in the interleukin 1- β gene. *Am. J. Reprod. Immunol.* **62**, 112-117.
- Rosenwasser, L. J., Borish, L. (1997) Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, S152-S155.
- Shimomura, Y., Matsuo, H., Samoto, 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.
- Skorpil, N., Kolesár, L., Striz, I., Lardy, N. M., Slavcev, A. (2007) Cytokine gene polymorphisms in the Dutch population. *Int. J. Immunogenet.* **34**, 87-90.
- Smith, A. J., Humphries, S. E. (2009) Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**, 43-59.
- Stewart, E. A., Morton, C. C. (2006) The genetics of uterine leiomyomata: what clinicians need to know. *Obstet. Gynecol.* **107**, 917-921.
- Sysoev, K. A., Kulagina, N. V., Chukhlovina, A. B., Morozova, E. B., Totolian, A. A. (2008) Expression of mRNA for chemokines and chemokine receptors in tissues of the myometrium and uterine leiomyoma. *Bull. Exp. Biol. Med.* **145**, 84-89.
- Tepper, R. I., Pattengale, P. K., Leder, P. (1989) Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* **57**, 503-512.
- Turner, D., Grant, S. C., Yonan, N., Sheldon, S., Dyer, P. A., Sinnott, P. J., Hutchinson, I. V. (1997) Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation* **64**, 776-779.
- Wilson, A. G., Symons, J. A., McDowell, T. L., McDevitt, H. O., Duff, G. W. (1997) Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3195-3199.

Midterm Clinical and First Reproductive Results of a Randomized Controlled Trial Comparing Uterine Fibroid Embolization and Myomectomy

Michal Mara · Jana Maskova · Zuzana Fucikova · David Kuzel · Tomas Belsan · Ondrej Sosna

Received: 8 March 2007 / Accepted: 13 September 2007 / Published online: 18 October 2007
© Springer Science+Business Media, LLC 2007

Abstract The purpose of this study was to compare the midterm results of a radiological and surgical approach to uterine fibroids. One hundred twenty-one women with reproductive plans who presented with an intramural fibroid(s) larger than 4 cm were randomly selected for either uterine artery embolization (UAE) or myomectomy. We compared the efficacy and safety of the two procedures and their impact on patient fertility. Fifty-eight embolizations and 63 myomectomies (42 laparoscopic, 21 open) were performed. One hundred eighteen patients have finished at least a 12-month follow-up; the mean follow-up in the entire study population was 24.9 months. Embolized patients underwent a significantly shorter procedure and required a shorter hospital stay and recovery period. They also presented with a lower CRP concentration on the second day after the procedure ($p < 0.0001$ for all parameters). There were no significant differences between the two groups in the rate of technical success, symptomatic effectiveness, postprocedural follicle stimulating hormone levels, number of reinterventions for fibroid recurrence or regrowth, or complication rates. Forty

women after myomectomy and 26 after UAE have tried to conceive, and of these we registered 50 gestations in 45 women. There were more pregnancies (33) and labors (19) and fewer abortions (6) after surgery than after embolization (17 pregnancies, 5 labors, 9 abortions) ($p < 0.05$). Obstetrical and perinatal results were similar in both groups, possibly due to the low number of labors after UAE to date. We conclude that UAE is less invasive and as symptomatically effective and safe as myomectomy, but myomectomy appears to have superior reproductive outcomes in the first 2 years after treatment.

Keywords Comparison · Myomectomy · Reproduction · Uterine fibroid embolization

Embolization of uterine fibroids, which was first introduced by Ravina et al. [1] in 1995, is now a well-established therapeutic procedure. Uterine artery embolization (UAE) is mostly performed in women with symptomatic fibroids who do not plan further pregnancy. Its use in women with reproductive plans is still controversial. Evidence exists that there is a possible risk of infection, which may lead to sepsis and hysterectomy and premature ovarian failure in these patients [2–4].

Myomectomy is considered to be a standard treatment procedure for the removal of myomas in patients of fertile age [5]. This procedure can also be associated with dramatic complications such as perioperative bleeding and uterine rupture during subsequent gravidity, which may require hysterectomy. We thus decided to compare the efficacy and safety of these two approaches in women with reproductive plans who presented with intramural uterine fibroids. The first results of this trial have already been

M. Mara · Z. Fucikova · D. Kuzel · O. Sosna
Department of Obstetrics and Gynecology, General Faculty Hospital and First Medical Faculty of Charles University, Apolinarska 18, 128 00 Prague 2, Czech Republic

J. Maskova · T. Belsan
Department of Radiology, Central Military Hospital, U Vojenske nemocnice 1200, 169 02 Prague 6, Czech Republic

M. Mara (✉)
Department of Obstetrics & Gynecology, 1st Medical Faculty of Charles University, Apolinarska 18, 128 00 Prague 2, Czech Republic
e-mail: michal.mara@quick.cz

published [6]. The aim of this paper is to present midterm clinical and first reproductive results obtained in a larger group of patients.

Materials and Methods

Trial Design

The trial was approved by the Ethics Committee of the First Medical Faculty of Charles University. It was designed as prospective and randomized. Every newly recruited patient was randomly assigned a computer-generated integral number from 1 to 100 (using a random number generating program available at <http://www.random.org>, by Mads Haahr, Distributed Systems Group, Department of Computer Science, University of Dublin, and Trinity College, Ireland). This was always done at the point of randomization, so that no researcher could know or predict any subsequent number. Patients who were assigned an odd number were included in group E (embolization), and patients who were assigned an even number in group M (myomectomy). The researcher in charge of patient recruitment and detailed instruction has always been different from the researcher accomplishing randomization. This second doctor did not know any patient details at the time of randomization and was only notified that the patient met the criteria for trial entry.

Study Population

One hundred forty-nine women with uterine fibroid or fibroids and unfinished reproductive plans were examined from November 2001 to December 2005. All patients entering the trial underwent gynecological examination and abdominal and transvaginal ultrasonography (US) examination of the small pelvis, including Doppler examination of uterus and fibroids. Serum levels of follicle stimulating hormone (FSH) luteinizing hormone (LH), and estradiol were measured on the third day of the cycle in all patients. Additionally, pelvic magnetic resonance imaging (MRI) was performed (i) when clinical examination or US was suspicious for adenomyosis or uterine sarcoma, (ii) in virgins where vaginal US was impossible, and (iii) starting in April 2004, in all patients before UAE. Other possible causes of infertility were systematically investigated in couples with primary or secondary sterility or a history of consecutive abortions.

All patients completed a questionnaire relating to myoma-related symptoms before the start of the therapeutic procedure. Each patient had to define the intensity of symptoms on a scale from 1 to 10, where 1 = absence of

symptoms and 10 = maximal intensity of symptoms. The following symptoms were evaluated: (i) menorrhagia and/or hypermenorrhea, (ii) dysmenorrhea, (iii) dyspareunia, (iv) pelvic pain, (v) dysuria and/or urinary frequency, and (vi) pressure symptoms.

The following inclusion criteria were set: (i) US-verified intramural fibroid at least 4 cm at its largest diameter (in the case of multiple fibroids, at least one with a size of 4 cm), (ii) age <40 years, (iii) serum FSH concentration <30 IU/L (on the third day of menstrual cycle), and (iv) planned pregnancy. Intramural fibroids were defined using US as a uterine wall expansion of typical echo structure with the prevalent part of its volume inside the myometrium.

Exclusion criteria included (i) nonintramural localization of the main fibroid (submucosal and subserous); (ii) size of the dominant myoma >12 cm in its largest diameter (according to US) or uterus enlarged to the size corresponding to >4 months of pregnancy (according to bimanual pelvic examination); (iii) previous myomectomy, embolization, or hormonal therapy of fibroids with GnRH agonists or Danazol; (iv) suspected uterine sarcoma or diffuse adenomyosis (according to US or MRI); and (v) serious disease contraindicating gravidity.

Embolization Procedure

Patients included in group E underwent bilateral UAE. The access for the procedure was from the right groin via the right common femoral artery. The aim was to bilaterally embolize the ascending branches of the uterine artery supplying the fibroid in order to achieve a complete loss of fibroid perfusion and, at the same time, leave free flow in the main stems and in cervico-vaginal branches of both uterine arteries. We refrained from embolization of sites displaying significant utero-ovarian anastomoses of type III (main ovarian blood supply arises from the uterine artery) [7], which could not be overcome by microcatheter.

The technique of “free flow embolization” was employed to perform all procedures, using a 5-Fr catheter (RUC, COOK; William Cook Europe, Bjeverskov, Denmark) and always with the aid of a coaxially introduced microcatheter (Embocath; BioSphere Medical Inc., Rockland, MA, USA). Trisacryl gelatin microspheres (Embospheres; BioSphere Medical, S.A., Roissy, France) were used for embolization in all cases. At the start of the study (first five patients), we chose particles 300 to 900 μm in diameter. Later, in accordance with data published in the literature, particles larger than 500 μm were used exclusively, to prevent possible nontargeted ovarian embolization via utero-ovarian anastomoses [8].

A single dose of antibiotics (sultamicillin; 1.5 g intravenously) was administered to every patient 30 min before

the embolization. For pain management during the first 24 h after the procedure patients were given either epidural analgesia (10 ml of 0.5% bupivacain plus 5 µg of sufentanyl in 50 ml of normal saline, administered continually at 5 to 10 ml per hour) or intravenous analgesia (5 µg of sufentanyl plus 0.15 mg of clonidin in 50 ml of normal saline as a continual infusion at 5 to 10 ml per hour). Nausea and postembolization discomfort during subsequent days were treated by thiethylperazin, diclofenac, and paracetamol. The minimal length of hospitalization after the procedure was 48 h.

Embolization leading to bilateral occlusion of ascending branches of urinary arteries and a complete loss of fibroid perfusion, as detected by angiography, was considered technically successful. Dissection or spasm of uterine arteries, adverse reaction to administered drugs, hematoma in the groin, and other complications of angiography were considered periprocedural complications. All procedures were performed by the same interventional radiologist.

Myomectomy

The myomectomy procedure was always initiated with hysteroscopy: a finding of a submucous fibroid of type 0 or type I (according to the classification of European Society for Hysteroscopy) would eliminate the relevant patient from the study. Hysteroscopy was followed by laparoscopy and the access for myomectomy was chosen according to predefined criteria. Open myomectomy (OM) was preferred when a fibroid was larger than 8 cm, in the case of a finding of multiple intramural fibroids, and in the case of a very unfavorable localization of a fibroid (e.g., in uterine edges reaching the pelvic wall or deep in the posterior uterine wall reaching the insertions of sacro-uterine ligaments). In all other cases myomectomy was performed by laparoscopy. The suture of the uterine wall defect required after myoma enucleation was performed using atraumatic stitches in two layers (vicryl 2/0, polyglactin 910; Ethicon, Brussels, Belgium). Myomectomy was also covered by a single dose of antibiotics (sultamicillin, 1.5 g i.v. 30 min before the procedure), by the corresponding protocol of continuous intravenous analgesia (sufentanyl plus clonidin for the first 24 h after the procedure), and by the same symptomatic therapy (antiemetics, antipyretics, analgesics) such as UAE. The minimal length of hospital stay was 48 h after LM and 120 h (5 days) after OM.

Myomectomy was evaluated as successful when all detectable fibroids larger than 4 cm were completely removed. The following were considered to be perioperative complications: (i) injury of organs in the abdominal cavity (fallopian tube, ovaries, urinary bladder, intestines) or major pelvic vessels, (ii) blood loss exceeding 1000 ml,

(iii) unexpected penetration of the uterine cavity (in women in whom fibroid prominence in the cavity was not previously detected by hysteroscopy), (iv) unplanned conversion from LM to laparotomy (during myoma enucleation), and (v) early reoperation because of uterine bleeding, hemo-peritoneum, or hematoma. The same two surgeons performed all myomectomies.

Follow-up

The occurrence of the following early postoperative complications were monitored during the first 30 days: fever, signs of pelvic infection, severe vaginal bleeding, severe pain not responsive to analgesics, prolonged hospital stay (>48 h after UAE, 72 h after LM, and >144 h after OM), the necessity for antibiotics or blood transfusion, rehospitalization, allergic reactions, wound complications after myomectomy, ischemic phenomena after UAE, surgical intervention due to hematoma (pelvic, subfascial, retro-peritoneal, or inguinal) or infection, thromboembolic complications, and hysterectomy.

Patients were examined (clinically and using ultrasonography) 1 month and 6 months postprocedurally and subsequently every 6 months. The levels of FSH, LH, and estradiol (on the third day of the cycle or at another time in the case of amenorrhea) were measured and myoma-related symptoms were again evaluated (the same questionnaire) 6 months after the procedure. The FSH level was monitored in the subsequent course of follow-up in women with signs of ovarian failure. Patients were examined immediately in the case of difficulties, complications, or signs of pregnancy.

The following late complications were assessed more than 30 days after the procedure: (i) signs of uterine infection or sepsis; (ii) permanent or transient signs of ovarian failure (clinical, i.e., amenorrhea not related to pregnancy, with or without vasomotor symptoms of menopause, requiring hormone replacement therapy [HRT]; or laboratory, in the case of FSH increase by >5 IU/L, compared to pretreatment values); (iii) ischemic phenomena after UAE; (iv) chronic pelvic pain or dyspareunia; (v) sudden severe uterine bleeding; (vi) chronic malodorous vaginal discharge; (vii) loss of libido; (viii) emergency myomectomy or hysterectomy; (ix) vaginal fibroid expulsion; and (x) uterine rupture.

Great emphasis was placed on ultrasonographical scan of the uterus 6 months after the procedure. The following outcomes were evaluated as favorable, with regard to planned gravity: (i) absence of a fibroid larger than 5 cm or a fibroid deforming the uterine cavity and (ii) absence of a hematoma or thinning of the myometrium in place of previous myomectomy. MRI was performed 6 months after

embolization in patients who underwent MRI before UAE (all patients starting from April 2004) and also in patients who showed no sign of a fibroid decrease by US. The main benefit of MRI in these patients was confirmative determination of fibroid reperfusion or its insufficient infarction.

Reproductive Follow-up and Reinterventions

All patients with reproductive plans were recommended to wait for at least 6 months after the therapy. Women with a history of infertility who had a favorable outcome of a US uterus scan 6 months after the procedure were referred to a center of assisted reproduction to undergo causal infertility treatment (according to associated factors), including in vitro fertilization (IVF). History of reproductive attempts and results of all patients were systematically recorded during regular checkups (every 6 months). In the case of pregnancy, prenatal monitoring and delivery at our hospital were offered to all patients. The type of delivery and possible indications for operative delivery were subjected to standard rules: cesarean section was not primarily indicated (only if other indications were also present) except for cases where persisting fibroid formed an obstetric obstruction and in patients who underwent intrauterine penetration during myomectomy.

Secondary myomectomy was recommended in the case of undetectable fibroid shrinkage at 6 months after UAE and/or in the case of a persisting fibroid >5 cm. Similar reintervention was recommended anytime later (except during pregnancy) when fibroid regrowth after UAE (over 5 cm) or recurrent fibroid >5 cm after myomectomy was detected. The intervals between checkups after surgical reintervention were also 6 months, and patients were recommended to delay their pregnancy plans for at least another 6 months.

Analysis of the Results

The results were analyzed on an intent-to-treat basis. For statistical comparison of qualitative parameters from both groups (e.g., rehospitalization: yes or no), chi-square test and Fischer's test were used. For comparison of quantitative parameters (e.g., FSH level), Student's t-test and Mann-Whitney test were used. $p < 0.05$ was determined to be statistically significant.

Results

Twenty-one patients (15.4%) of 149 refused to participate in the trial and 7 patients were excluded from the study

based on the elimination criteria; the remaining 121 women were randomized into one of the two groups (58 for UAE and 63 for myomectomy) and they underwent appropriate therapy (Table 1). Of this count, 120 patients have finished a 6-month follow-up and 3 patients have dropped out of the trial: 1 patient did not turn up for the checkup at 6 months after myomectomy and 2 patients did not turn up at 12 months after UAE.

Of the total number of 121 patients, 110 patients were symptomatic (90.9%). The mean age of women was 32.4 and 32.0 years in groups E and M, respectively. Sixty-six patients were nulligravidae (54.5%), 35 were sterile (28.9%; 11 in group E and 24 in group M; $p < 0.05$), 18 had miscarried in the past (14.9%), and 51 had another subfertility factor other than myoma (42.1%). Mean FSH levels before the procedure were 6.98 ± 2.9 IU/L in group E and 6.73 ± 1.9 IU/L in group M. Six patients had a FSH value >10 IU/L before embolization, and four women before myomectomy. Except for the rate of sterility, there were no statistically significant differences in any aforementioned factors or in other entry parameters (size of dominant fibroid, number of fibroids) between the two groups. A detailed summary of US scan findings prior to both procedures is given in Table 2.

Periprocedural results are shown in Table 3. The rate of technical failures was about 10% in both groups. Six patients were embolized unilaterally (four due to atypical branching or spasms of uterine arteries not responding to vasodilators and two because of large utero-ovarian anastomoses). In five women myomectomy was incomplete due to unfavorable localization, resulting in the retention of a fibroid larger than 4 cm. Forty-two (67%) myomectomies of 63 were performed by LM. The frequency of laparoconversions, i.e., myomectomies started by LM which had to be completed as an open surgery because of complications (i.e., bleeding and/or difficult tumor enucleation from the uterus), was 4.5%. The following complications have occurred: in group E, one case of artery dissection and three cases of uterine artery spasms; and in group M, three myomectomies with unexpected intrauterine penetration and two nonelective laparoconversions.

There were no significant differences in most monitored parameters of early postprocedural results between the two groups (Table 4). The average length of hospitalization and postoperative recovery were significantly longer and the mean serum C-reactive protein concentration was significantly higher in the group of women treated by surgery. There were no significant differences in the frequency of early complications between the two groups. All these complications can be considered as mild or moderately serious. It was the febrile status in most cases which required therapy with antibiotics (eight patients in group E, five patients in group M). After UAE 1 patient required a

Table 1 Flowchart of 142 patients (pt) eligible (according to inclusion criteria) to enter the trial

Pt no.	Pt initials	Year of birth	Date of randomization	Randomized into group	Date of procedure	Type of procedure
1	Z.I.	1969	2.11.2001	E	20.11.2001	UAE
2	M.H.	1967	2.11.2001	E	22.11.2001	UAE
—	K.S.	1965	—	Refused	—	—
3	L.N.	1973	7.12.2001	M	9.1.2002	OM
4	D.D.	1965	14.12.2001	E	24.1.2002	UAE
5	D.K.	1964	11.1.2002	M	21.2.2002	OM
—	J.B.	1973	—	Refused	—	—
6	M.M.	1976	8.2.2002	E	28.3.2002	UAE
—	B.C.	1970	—	Refused	—	—
7	M.L.	1974	15.3.2002	M	11.4.2002	OM
8	D.L.	1973	22.3.2002	M	15.4.2002	OM
9	V.H.	1976	22.3.2002	E	3.5.2002	UAE
10	K.S.	1968	12.4.2002	M	22.5.2002	LM
—	P.K.	1964	—	Refused	—	—
—	M.P.	1976	—	Refused	—	—
11	M.M.	1972	31.5.2002	M	4.7.2002	OM
—	L.H.	1977	—	Refused	—	—
12	L.B.	1971	21.6.2002	M	7.8.2002	OM
13	D.M.	1975	6.9.2002	E	11.10.2002	UAE
14	E.M.	1976	13.9.2002	E	15.10.2002	UAE
15	M.K.	1973	27.9.2002	M	27.11.2002	OM
16	J.C.	1974	4.10.2002	E	14.11.2002	UAE
17	L.S.	1975	18.10.2002	M	27.11.2002	LM
18	A.H.	1970	25.10.2002	M	16.12.2002	OM
19	I.K.	1970	25.10.2002	E	21.11.2002	UAE
—	H.S.	1966	—	Refused	—	—
20	M.K.	1975	13.12.2002	M	22.1.2003	OM
21	M.C.	1966	20.12.2002	E	9.1.2003	UAE
22	D.H.	1976	20.12.2002	M	28.1.2003	LM
23	D.V.	1967	10.1.2003	E	30.1.2003	UAE
24	J.B.	1971	24.1.2003	E	6.3.2003	UAE
—	S.B.	1968	—	Refused	—	—
25	V.H.	1970	7.2.2003	E	20.3.2003	UAE
26	M.O.	1967	21.2.2003	M	2.4.2003	OM
27	I.T.	1968	28.2.2003	M	14.5.2003	OM
28	H.A.	1964	28.3.2003	E	30.4.2003	UAE
29	L.V.	1969	4.4.2003	E	7.5.2003	UAE
30	J.M.	1963	25.4.2003	M	3.6.2003	OM
31	M.K.	1974	25.4.2003	E	19.5.2003	UAE
32	L.T.	1968	2.5.2003	M	17.6.2003	OM
33	S.B.	1971	2.5.2003	E	29.5.2003	UAE
34	E.T.	1968	23.5.2003	E	3.7.2003	UAE
35	B.P.	1973	13.6.2003	M	9.9.2003	OM
36	L.K.	1974	13.6.2003	E	3.7.2003	UAE
—	I.S.	1964	—	Refused	—	—
37	M.S.	1966	10.10.2003	M	26.11.2003	LM
38	M.H.	1964	24.10.2003	E	4.12.2003	UAE
—	A.H.	1965	—	Refused	—	—

Table 1 continued

Pt no.	Pt initials	Year of birth	Date of randomization	Randomized into group	Date of procedure	Type of procedure
39	K.K.	1975	19.12.2003	M	10.2.2004	LM
40	L.J.	1967	19.12.2003	E	9.1.2004	UAE
41	I.F.	1971	9.1.2004	E	23.1.2004	UAE
42	D.L.	1977	16.1.2004	M	17.2.2004	LM
43	J.V.	1977	16.1.2004	E	17.2.2004	UAE
44	E.S.	1972	30.1.2004	M	2.3.2004	LM
45	R.K.	1966	6.2.2004	E	5.3.2004	UAE
46	J.H.	1972	13.2.2004	E	12.3.2004	UAE
47	M.M.	1967	13.2.2004	M	23.3.2004	LM
48	M.Z.	1970	20.2.2004	E	12.3.2004	UAE
49	E.S.	1970	5.3.2004	M	20.4.2004	LM
50	M.M.	1965	12.3.2004	M	20.4.2004	OM
51	K.K.	1968	12.3.2004	E	2.4.2004	UAE
52	D.M.	1968	19.3.2004	M	21.4.2004	OM
53	N.V.	1969	19.3.2004	M	21.4.2004	LM
54	M.T.	1970	26.3.2004	M	8.6.2004	LM
55	I.S.	1966	26.3.2004	E	29.4.2004	UAE
—	E.Z.	1971	—	Refused	—	—
56	M.P.	1974	23.4.2004	M	7.7.2004	LM
57	E.K.	1972	23.4.2004	E	14.5.2004	UAE
58	P.S.	1967	7.5.2004	M	19.7.2004	OM
59	L.D.	1974	14.5.2004	M	21.7.2004	LM
60	J.S.	1968	14.5.2004	E	11.6.2004	UAE
61	H.K.	1965	21.5.2004	M	7.9.2004	OM
62	M.M.	1972	28.5.2004	M	12.10.2004	LM
63	A.M.	1970	28.5.2004	M	9.11.2004	LM
64	V.H.	1978	31.5.2004	E	11.6.2004	UAE
65	K.W.	1970	4.6.2004	E	9.7.2004	UAE
—	L.S.	1975	—	Refused	—	—
66	K.H.	1973	18.6.2004	E	20.8.2004	UAE
67	E.B.	1983	25.6.2004	E	20.8.2004	UAE
68	K.F.	1968	2.7.2004	E	9.9.2004	UAE
69	M.R.	1973	9.9.2004	M	16.11.2004	LM
70	M.H.	1967	9.9.2004	E	1.10.2004	UAE
—	J.P.	1976	—	Refused	—	—
—	D.R.	1965	—	Refused	—	—
71	K.F.	1976	23.9.2004	M	29.11.2004	LM
72	P.C.	1975	23.9.2004	E	22.10.2004	UAE
73	P.P.	1972	30.9.2004	E	22.10.2004	UAE
74	B.S.	1972	7.10.2004	M	19.1.2005	LM
75	P.H.	1969	14.10.2004	E	3.11.2004	UAE
76	J.L.	1979	14.10.2004	M	26.1.2005	LM
77	J.E.	1968	21.10.2004	M	27.1.2005	LM
78	L.A.	1969	21.10.2004	E	19.11.2004	UAE
79	M.D.	1975	4.11.2004	M	2.2.2005	LM
80	M.R.	1972	11.11.2004	E	10.12.2004	UAE
81	M.Z.	1966	18.11.2004	M	17.2.2005	LM
82	S.Z.	1971	9.12.2004	M	17.2.2005	LM

Table 1 continued

Pt no.	Pt initials	Year of birth	Date of randomization	Randomized into group	Date of procedure	Type of procedure
83	H.S.	1968	16.12.2004	E	21.1.2005	UAE
84	M.S.	1974	6.1.2005	E	18.2.2005	UAE
—	E.K.	1965	—	Refused	—	—
—	S.D.	1970	—	Refused	—	—
85	L.L.	1972	27.1.2005	E	18.3.2005	UAE
86	L.M.	1972	3.2.2005	M	21.3.2005	LM
87	I.C.	1970	17.2.2005	M	23.3.2005	LM
88	P.Z.	1971	24.2.2005	E	8.4.2005	UAE
89	M.K.	1969	24.2.2005	M	11.4.2005	LM
—	M.T.	1975	—	Refused	—	—
90	H.K.	1967	3.3.2005	M	26.4.2005	OM
91	B.Z.	1974	10.3.2005	E	6.5.2005	UAE
92	M.K.	1965	24.3.2005	M	4.5.2005	LM
93	A.G.	1977	31.3.2005	M	16.5.2005	LM
94	L.P.	1972	7.4.2005	M	17.5.2005	LM
95	L.H.	1977	7.4.2005	M	18.5.2005	OM
96	J.K.	1976	14.4.2005	E	13.5.2005	UAE
97	M.L.	1976	21.4.2005	M	23.5.2005	LM
—	H.V.	1965	—	Refused	—	—
98	M.K.	1974	12.5.2005	M	6.6.2005	LM
99	P.L.	1978	26.5.2005	E	1.8.2005	UAE
100	E.P.	1971	23.6.2005	E	1.8.2005	UAE
101	K.K.	1977	30.6.2005	M	7.9.2005	LM
102	L.F.	1969	14.7.2005	E	21.9.2005	UAE
—	E.S.	1966	—	Refused	—	—
103	J.R.	1980	8.9.2005	M	26.9.2005	LM
104	E.H.	1972	8.9.2005	E	23.9.2005	UAE
105	O.S.	1967	15.9.2005	M	5.10.2005	LM
106	I.K.	1970	15.9.2005	M	12.10.2005	LM
—	H.A.	1966	—	Refused	—	—
107	P.P.	1966	22.9.2005	E	14.10.2005	UAE
108	M.A.	1977	29.9.2005	M	26.10.2005	LM
109	E.Z.	1973	29.9.2005	M	2.11.2005	LM
110	I.S.	1979	29.9.2005	M	2.11.2005	LM
111	D.M.	1967	6.10.2005	E	21.10.2005	UAE
112	J.B.	1967	6.10.2005	M	2.11.2005	LM
113	A.G.	1983	13.10.2005	M	9.11.2005	OM
114	J.P.	1973	13.10.2005	E	15.11.2005	UAE
115	S.S.	1969	20.10.2005	M	16.11.2005	LM
116	H.D.	1974	27.10.2005	M	1.12.2005	LM
117	L.B.	1973	27.10.2005	E	2.12.2005	UAE
—	D.V.	1976	—	Refused	—	—
118	K.K.	1970	10.11.2005	E	2.12.2005	UAE
119	M.J.	1972	10.11.2005	M	1.12.2005	LM
120	R.L.	1977	10.11.2005	E	9.12.2005	UAE
121	D.R.	1975	24.11.2005	E	9.12.2005	UAE

Note. LM, laparoscopic myomectomy; OM, open myomectomy; UAE, uterine artery embolization. Dates given as day.month.year

Table 2 Ultrasound findings for 121 patients prior to uterine artery embolization (UAE) or myomectomy

	UAE (<i>n</i> = 58)	Myomectomy (<i>n</i> = 63)	<i>p</i>
Average size of dominant fibroid, mm ± SD (range)	62.3 ± 19.1 (42–107)	59.8 ± 16.5 (41–110)	NS ^a
No. women with myoma >80 mm	8 (13.8%)	7 (11.1%)	NS ^b
No. myomas >2 cm ± SD (range)	1.95 ± 1.8 (1–8)	1.84 ± 2.1 (1–16)	NS ^a
No. women with Solitary myomas	39 (67.2%)	40 (63.5%)	NS ^b
2–5 fibroids	15 (25.9%)	21 (33.3%)	NS ^b
>5 fibroids	4 (6.9%)	2 (3.2%)	NS ^c
Uterine cavity deviated by fibroid(s)	30 (51.7%)	22 (34.9%)	NS ^b

Note. NS, nonspecific difference; SD, standard deviation. Tested by: ^a Mann-Whitney test; ^b chi-square test; ^c Fisher's test

Table 3 Periprocedural evaluation

	UAE (<i>n</i> = 58)	Myomectomy (<i>n</i> = 63)	<i>P</i>
Technical success	52 (89.7%)	58 (92.1%)	NS ^b
Average time of procedure, min ± SD (range)	59.2 ± 23.1 (30–140)	108.9 ± 27.7 (54–173)	<0.0001 ^a
Fluoroscopy time, min ± SD (range)	16.8 ± 6.3 (5–33)	—	
No. women with utero-ovarian anastomoses	25 (43.1%)	—	
Average perioperative blood loss, ml ± SD (range)	—	296.0 ± 122.6 (100–700)	
Type of analgesia	38 EDA/20 IVA	63 IVA	
Complications	4 (6.9%)	5 (7.9%)	NS ^c

Note. UAE, uterine artery embolization; NS, nonspecific difference; SD, standard deviation; EDA, epidural analgesia; IVA, intravenous analgesia. Tested by: ^a Mann-Whitney test; ^b chi-square test; ^c Fisher's test

Table 4 Early postprocedural results (from day 1 to day 30 after procedure)

	UAE (<i>n</i> = 58)	Myomectomy (<i>n</i> = 63)	<i>P</i>
Average hospital stay, h ± SD (range)	60.2 ± 32.3 (36–216)	86.1 ± 40.4 (48–192)	<0.0001 ^a
Prolonged hospital stay*	9 (15.5%)	6 (9.5%)	NS ^b
Hospital stay >7 days	1 (1.7%)	3 (4.8%)	NS ^c
Readmissions to hospital	2 (3.4%)	1 (1.6%)	NS ^c
Febrile morbidity	7 (12.1%)	7 (11.1%)	NS ^b
Day 2 serum CRP, mg/L ± SD (range)	23.8 ± 27.3 (3–168)	36.9 ± 28.1 (6–137)	<0.0001 ^a
Need for antibiotics	8 (13.8%)	6 (9.5%)	NS ^b
Necessity for transfusion	0	2 (3.2%)	NS ^c
Recovery period, days ± SD (range)	11.9 ± 5.9 (3–30)	22.1 ± 12.3 (7–65)	<0.0001 ^a
Disability >2 wk	13 (22.4%)	36 (57.1%)	<0.0001 ^b
Complications	12 (20.7%)	10 (15.9%)	NS ^b

Note. UAE, uterine artery embolization; NS, nonspecific difference; SD, standard deviation; CRP, C-reactive protein. Tested by: ^a Mann-Whitney test; ^b chi-square test; ^c Fisher's test

*Longer hospital stay than usual (i.e., more than 48 h after UAE, 72 h after laparoscopic myomectomy, and 144 h after open myomectomy)

prolonged hospital stay due to severe vaginal bleeding (treated by pharmacotherapy), one patient developed a rash as a probable reaction to analgesics, and one woman was treated for postpuncture headache after epidural anesthesia. Additionally, a subcutaneous hematoma of approximately 5 cm developed in one woman at the site of puncture in the

right groin and was managed by conservative therapy. After myomectomy two patients (one after LM and one after OM) required transfusion due to severe anemia, one woman developed a urinary tract infection, and one woman a wound infection. One patient underwent surgical evacuation of subfascial hematoma 1 day after OM.

Table 5 Late postprocedural results

	UAE (<i>n</i> = 58)	Myomectomy (<i>n</i> = 62)	<i>P</i>
Mean follow-up, mo ± SD (range)	26.2 ± 14.2 (6–55)	23.7 ± 13.9 (6–54)	NS ^a
Relief from symptoms*	88.5% (46/52)	87.9% (51/58)	NS ^b
6 mo after procedure Serum FSH, IU/L ± SD (range)	7.89 ± 6.0 (4.0–48.9)	6.49 ± 2.0 (3.6–12.3)	NS ^a
FSH >10 IU/L	8 (13.8%)	2 (3.2%)	<0.05 ^c
Significant elevation of FSH [†]	3 (5.2%)	0	NS ^c
Regrowth or recurrence of fibroid(s)	6 (10.3%)	5 (8.1%)	NS ^b
Reinterventions	19 (32.8%)	2 (3.2%)	<0.0001 ^b
Reinterventions for regrowth or recurrence of fibroid(s)	4 (6.9%)	2 (3.2%)	NS ^c
Complications	8 (13.8%)	5 (8.1%)	NS ^b

Note. UAE, uterine artery embolization; NS, nonspecific difference; SD, standard deviation. Tested by: ^a Mann-Whitney test; ^b chi-square test; ^c Fisher's test

*Lower sum of six followed symptoms at 6 months after procedure than preprocedurally (based on the questionnaire)

[†] At least 5 IU/L increase at 6 months after procedure (compared with preprocedural level)

Tables 5 and 6 summarize late clinical results and results of imaging studies at 6 months after the procedure. The mean length of follow-up was approximately 2 years in both groups; 81% of women after embolization and 79% after surgery have been followed for more than 1 year, and 50% of patients in group E and 43% in group M have been followed for at least 2 years. Both methods were similarly effective when cumulative evaluation of all symptoms at 6 weeks after the procedure was considered. While it seemed at preliminary evaluation of results that representation of patients with total relief from all myoma-related symptoms would be significantly higher in group M, it now appears that their number is only insignificantly higher (32 of 58 women, i.e., 55 %) in this group than after embolization (26 of 52 women, i.e., 50%).

With respect to the main goal of the therapy (gravidity) and trial design, both groups differed significantly in the frequency of reinterventions. Secondary myomectomy was performed in 19 cases in group E: 9 by LM, 8 by laparotomy, and 2 by hysteroscopy. The mean interval from UAE to reintervention was 12.4 months (±12.2 months; median, 7.0 months). The persistence of a large fibroid (>5 cm) at 6 months after UAE was the most frequent indication (15 cases, including 5 patients with UAE technical failure), and in 4 cases we reintervened due to regrowth of a fibroid (see Table 5). In group M, the reintervention was indicated only in cases of clinically significant recurrence. Remyomectomy was performed in two women (one by LM and one by open surgery) at a 15- and 30-month interval from primary therapy, respectively.

We recorded a relatively low frequency of late complications. All these incidents (dyspareunia, pelvic pain, endometritis, and one episode of metrorrhagia) after myomectomy were regarded as mild and nonserious. No

Table 6 Results of imaging studies 6 months after uterine artery embolization (UAE)

Mean shrinkage of diameter of dominant fibroid on US (58 patients)	31.7%
Mean shrinkage of volume of dominant fibroid on MRI*	58.7%
Mean volume of dominant fibroid on MRI*	69 cm ³ (pre-UAE: 166 cm ³)
Partial infarction of dominant fibroid on MRI*	28.9% (11 / 38)
No infarction of dominant fibroid on MRI*	2.6% (1 / 38)

*Calculated from only 38 patients with both (pre- and post-UAE) MRI scans

serious or life-threatening complications have occurred after UAE either, but in four women there were complications related to ovarian function. One patient with 6 weeks of amenorrhea had no further menopausal symptoms, had a normal FSH level (6.4 IU/L) at 6 months after UAE, and is pregnant now. A transitory, but significant FSH elevation, to 15.0, 30.4, and 48.9 IU/L, respectively, occurred in three women with preprocedural FSH <10 IU/L (Table 5). One of these women suffered amenorrhea for 2 months and did not respond to progesterone, but her cycle adjusted spontaneously. This woman has not tried to conceive to date. Another two patients with FSH elevation were clinically asymptomatic (from the time of embolization until now, which is 53 and 35 months, respectively), but they both underwent unsuccessful therapy for sterility, including two and three IVF cycles, respectively, to date. Low response to ovarian stimulation with gonadotropins (high consumption of FSH, low number of reacting follicles) and poor development of most embryos were common for their cycles.

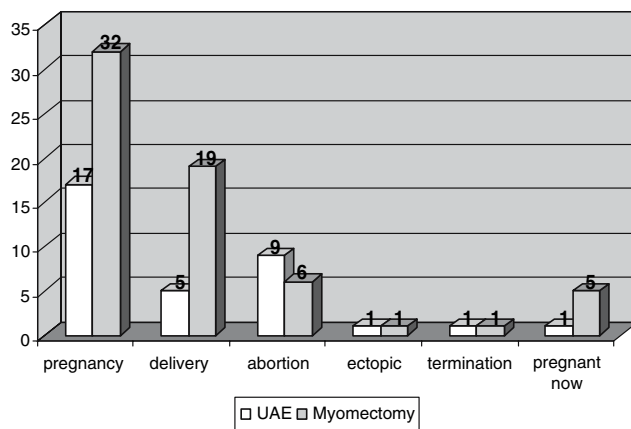


Fig. 1 Reproductive results of 26 women after uterine artery embolization (UAE) and 40 women after myomectomy. Statistical difference between the groups (p value): pregnancy, NS^b; delivery, <0.05^b; abortion, <0.05^b; ectopic gestation, NS^c; pregnancy termination, NS^c; pregnant now, NS^c. Tested by: ^bchi-square test; ^cFisher's test. NS, nonsignificant

Overall there were eight patients with a FSH concentration >10 IU/L at 6 months after UAE (including four women with a pre-UAE value >10 IU/L and three with an increase of >5 IU/L) and two patients with FSH > 10 IU/L at 6 months after myomectomy (including one with pre-procedural FSH > 10 IU/L and no case of significant increase). No patients had climacteric vasomotor symptoms and no patient required HRT. Two patients complained of temporarily decreased sexual appetite after embolization (this improved within 12 months): 1 of them in connection with noticeable hypomenorrhea and the other patient in connection with the feeling of “vaginal dryness.” No case of uterine rupture, urgent hysterectomy or other emergency surgery, or hospitalization for late complications after embolization or myomectomy has occurred in the whole cohort to date.

Existing reproductive and first perinatal results are summarized in Fig. 1 and Table 7. From the limited cohort of patients who have already tried to conceive (26 after UAE and 40 after myomectomy), 13 from group E (mean age, 32.8 years; range, 22 to 40 years) and 31 from group M (mean age, 34.3 years; range, 27–42 years) have already become pregnant. Four women after embolization and one patient after myomectomy have already become pregnant two times; one woman after myomectomy gave birth to twins (after IVF). The mean interval between the procedure and gravidity was 18 and 13 months in groups E and M, respectively. This difference could be partially influenced by the rate of secondary myomectomy in the two groups of pregnant women: it was performed in 5 of 13 pregnant women after UAE but in 1 only patient of 31 pregnant patients in group M. Presenting the results in the language of reproductive medicine, the pregnancy rate after UAE

was 50% to date, delivery rate 19%, and abortion rate 64%, while after myomectomy the pregnancy rate was 78%, delivery rate 48%, and abortion rate 23%. The differences in all these parameters were statistically significant ($p < 0.05$, χ^2 test). Relative risk (RR) of women treated with UAE not to get pregnant was 2.22 (95% confidence interval, 1.11 < RR < 4.44); not to deliver, 1.54 (1.08 < RR < 2.18); and to abort, 2.79 (1.25 < RR < 6.22).

Discussion

Comparison of myomectomy and UAE, two very different therapeutic approaches, is difficult and could appear misleading, particularly in some parameters (invasiveness, complication rate, reinterventions). Nevertheless, the question of possible use of uterine fibroid embolization in young women with active reproductive plans is very important from the point of view of gynecology and reproductive medicine. The surgical therapy is, especially in some patients, technically difficult, invasive, and risky, and therefore comparison of UAE with myomectomy as a possible alternative to existing standard therapy is most desirable [9].

There are many reports about gravidities and reproductive results after embolization in the literature today [10–15]. Surprisingly, there is an apparent nearly absolute lack of prospective studies comparing not only myomectomy and UAE, but also different fibroid treatments in relation to fertility (e.g., myomectomy with expectation). Only four papers [16–19] compare clinical results of embolization and myomectomy. But they are not randomized studies, only one is prospective [19], and only one is aimed at obstetrical, not *just* reproductive results [17].

In this study we confirmed in a midterm time horizon and in a larger cohort of patients most of the results from our preliminary evaluation [6]. Myomectomy and embolization were comparable as far as technical success rate, frequency of early and late complications, and symptomatic effectiveness are concerned. We also verified lower invasiveness of the radiological approach compared to myomectomy (hospital stay, recovery period, acute phase markers). The rate of serious complications was very low in both groups. The trial does not give the answer to the management of large or recurrent fibroids (see exclusion criteria) but our goal was to keep the study group as homogeneous as possible, which is always difficult in uterine fibroid patients. Unlike other studies, we did not focus on economical comparisons between the two treatment methods [20], mainly because the cost of UAE is many times higher than that of myomectomy at the site of this study, and there are significant differences between *open* and laparoscopic myomectomy.

Table 7 Perinatal results

	UAE (<i>n</i> = 5)	Myomectomy (<i>n</i> = 19)	<i>p</i>
Mean age of mothers, yr ± SD (range)	32.2 ± 4.1 (29–39)	34.4 ± 4.4 (27–42)	NS ^a
Mean birth weight, g ± SD (range)	3042 ± 316 (2830–3600)	3035 ± 538 (1600–3940)	NS ^a
Mean completed gestational weeks ± SD (range)	38.8 ± 0.6 (38–40)	37.5 ± 2.4 (31–40)	NS ^a
Preterm delivery (<37th week)	0	5 (26.3%)	NS ^b
Cesarean section	3 (60.0%)	13 (68.4%)	NS ^b
Postpartum hemorrhage	1 (20.0%)	0	NS ^b
Perinatal hypoxia of neonate	0	0	—
Pre-eclampsia	0	2 (10.5%)	NS ^b
Fetal intrauterine growth restriction	0	2 (10.5%)	NS ^b

Note. UAE, uterine artery embolization; NS, nonspecific difference; SD, standard deviation. Tested by: ^a Mann-Whitney test; ^b Fisher's test

The relatively high rate of LMs (two-thirds) might seem surprising and it certainly does not represent a typical picture of a broad gynecological practice. But we believe that these patients should always be referred to centers of reproductive surgery with experienced endoscopic surgeons. With respect to certain limits for LM (mentioned under Materials and Methods), many studies have already proved the equal safety and potency of the laparoscopic approach in comparison to the open procedure [21, 22].

The technical failure rate of UAE was higher than the rates reported in other studies [23, 24], mainly as a result of the unusual or unfavorable anatomy (anastomoses to ovarian artery) present. Another reason for the higher failure rate could be the nature of our patient group, comprised of young women desiring pregnancy. This might account for a particularly careful approach to their treatment. Only the results of the EMMY trial showed a similar frequency of technical failures [25], but in their case, in addition to difficult anatomy, the absence of one of the uterine arteries was the most common reason.

In accordance with our expectations, there were far more reinterventions in the group treated by embolization (Table 5). But these numbers do not reflect the frequency of method failure or the rate of recurrence. Instead, they seem to be the logical consequences of the different character of the two procedures (UAE leaves fibroids in situ), of the main goal of the therapy (to optimize the uterine condition before planned conception), and of methods adapted to it (specific strategy for indications of reinterventions).

The fact that in the initial study postprocedural MRI was performed only in patients where significant shrinkage of fibroid had not occurred (including 6 patients with unilateral embolization only) could account for the relatively high number of cases with at least partially maintained fibroid perfusion at 6 months after UAE (12 patients of 38 evaluated; see Table 6). If we had performed this examination in all women, including those with a good clinical response

and Doppler US evidence of infarcted fibroid, this number would have been expected to be significantly lower.

Existing reproductive results could be partially influenced by the short duration of the follow-up and mainly by the unequal number of patients who tried to conceive in each group: 40 after myomectomy and only 26 after embolization ($p < 0.05$, χ^2 test). Nevertheless, the statistically significant differences observed in the number of successful deliveries (19 after myoma enucleation and only 5 after UAE) and in the number of early pregnancy losses (6 after myomectomy and 9 after embolization; in all cases spontaneous or missed miscarriage in the first trimester) were in support of the surgical approach. We can only speculate whether these reproductive results are due to an error of small numbers, whether they reflect the influence of UAE on ovarian function, uterine perfusion, and implantation quality, or whether they reflect a direct influence of embolization on the uterine cavity and endometrium [26–28].

The fact that the rate of abortions after UAE was higher than 60% (in contrast with 23% after myomectomy) is the most alarming result of the study to date, in contrast to existing reports from other authors [10, 12, 17]. The post-UAE abortion rate was 16.7% in the Ontario multicenter, prospective trial (24 pregnancies in 21 women of mean age 34 years), 27% in the retrospective trial of Carpenter and Walker (26 pregnancies; mean age of patients, 37 years), and 24% after UAE and 15% after laparoscopic myomectomy in the controlled retrospective multicenter trial of Goldberg et al. (53 pregnancies; mean age, 38 years), but the difference was not statistically significant. In our cohort, the mean age of pregnant women after UAE was lower (32.8 years) than that of pregnant women after myomectomy (34.3 years), and at the same time, it was lower than in the aforementioned trials. The mean age of women who aborted after embolization was only slightly higher (33.0 years), and that is why the age factor does not explain the frequency of abortions after UAE. The abortion rate was

expressed as a quotient of all abortions in all begun pregnancies, thus including two patients with terminations in early gravidity (one termination due to extrauterine gravidity and one termination in the eighth week of gestation). Even when excluding these two cases from the overall abortion rate, this number would still be notably higher (53%). On the other hand, the pregnancy success rate after UAE is significantly higher in our cohort (50%) than the rate reported by Carpenter and Walker, where only 26 (33%) of 79 women conceived after embolization.

It is difficult to compare obstetrical results at the moment because only a small number of patients after embolization have passed the first trimester of pregnancy. The statistical analysis did not prove any significant differences in any of the parameters studied between the two groups, however, Table 6 provides an interesting summary of existing perinatal results and complications. It is remarkable to point out that, provided a pregnant woman after UAE successfully passed the first trimester, we subsequently did not record any of the serious pregnancy complications (e.g., gestational hypertension, fetal growth retardation, malpresentation, or prematurity) repeatedly described in other trials [10, 12, 17].

At the beginning of this trial we asked ourselves the question whether the less invasive method of fibroid embolization in women with reproductive plans is as effective and safe as myomectomy. After more than 4 years of the trial duration it can be concluded that both methods are comparable in terms of technical success rate, safety, and symptomatic efficacy. UAE is a less invasive approach, but also, as it appears at this midterm following, it is less definitive if the aim is to maximally eradicate fibroids before gravidity. For a definitive case comparison of reproductive and perinatal results we need to analyze more patients who try to conceive after the procedures and use a longer follow-up. However, the existing results clearly indicate that myomectomy is a method with a greater chance of success in women who plan to get pregnant early after the procedure.

Acknowledgments The study was supported by a grant from the Internal Grant Agency (IGA) of the Ministry of Health of the Czech Republic (NR/8099-3). The authors wish to thank Mrs. Alena Dohnalova for statistical consultations and analysis of the results, Pavel Dundr, M.D., for histopathological examinations of all excised myomas, and Petr Kriz, M.D., for pain management of all treated patients.

References

- Ravina JH, Herbreteau D, Ciraru-Vigneron N, et al. (1995) Arterial embolization to treat uterine myomata. *Lancet* 346:671–672
- Payne JF, Robboy SJ, Haney AF (2002) Embolic microspheres within ovarian arterial vasculature after uterine artery embolization. *Obstet Gynecol* 100:883–886
- Stringer NH, Grant T, Park J, et al. (2000) Ovarian failure after uterine artery embolization for treatment of myomas. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 7:395–400
- Vashisht A, Studd JW, Carey AH, et al. (2000) Fibroid embolization: a technique not without significant complications. *Br J Obstet Gynaecol* 107:1166–1170
- Olive DL, Lindheim SR, Pritts EA (2004) Non-surgical management of leiomyoma: impact on fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 16:239–243
- Mara M, Fucikova Z, Maskova J, et al. (2006) Uterine fibroid embolization versus myomectomy in women wishing to preserve fertility: preliminary results of a randomized controlled trial. *Eur J Obstet Gynecol Reprod* 126:226–233
- Razavi MK, Wolanske KA, Hwang G, et al. (2002) Angiographic classification of ovarian artery to uterine artery anastomoses: initial observations in uterine fibroid embolization. *Radiology* 224:707–712
- Pelage JP, Le Dref O, Beregi JP, et al. (2003) Limited uterine artery embolization with tris-acryl gelatin microspheres for uterine fibroids. *J Vasc Interv Radiol* 14:15–20
- Fauconnier A, Pelage JP, Lacombe P, et al. (2004) Embolization of uterine fibroids and infertility: Is a clinical trial conceivable? *Gynecol Obstet Fertil* 32:818–24
- Carpenter TT, Walker WJ (2005) Pregnancy following uterine artery embolization for symptomatic fibroids: a series of 26 completed pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 112:321–325
- McLucas B, Goodwin S, Adler L, et al. (2001) Pregnancy following uterine fibroid embolization. *Int J Gynaecol Obstet* 74:1–7
- Pron G, Mocarski E, Bennett J, et al. (2005) Pregnancy after uterine artery embolization for leiomyomata: the Ontario multicenter trial. *Obstet Gynecol* 105:67–76
- Ravina JH, Vigneron NC, Aymard A, et al. (2000) Pregnancy after embolization of uterine myoma: report of 12 cases. *Fertil Steril* 73:1241–1243
- Walker WJ, Pelage JP (2002) Uterine artery embolization for symptomatic fibroids: clinical results in 400 women with imaging follow up. *Br J Obstet Gynecol* 109:1262–1272
- Kim MD, Kim NK, Kim HJ, et al. (2005) Pregnancy following uterine artery embolization with polyvinyl alcohol particles for patients with uterine fibroid or adenomyosis. *CardioVasc Interv Radiol* 28:611–615
- Broder MS, Goodwin S, Chen G, et al. (2002) Comparison of long-term outcomes of myomectomy and uterine artery embolization. *Obstet Gynecol* 100:864–868
- Goldberg J, Pereira L, Berghella V, et al. (2004) Pregnancy outcomes after treatment for fibromyomata: uterine artery embolization versus laparoscopic myomectomy. *Am J Obstet Gynecol* 191:18–21
- Razavi MK, Hwang G, Jahed A, et al. (2003) Abdominal myomectomy versus uterine fibroid embolization in the treatment of symptomatic uterine leiomyomas. *AJR* 180:1571–1575
- Siskin GP, Shlansky-Goldberg RD, Goodwin SC, et al. (2006) A prospective multicenter comparative study between myomectomy and uterine artery embolization with polyvinyl alcohol microspheres: long-term clinical outcomes in patients with symptomatic uterine fibroids. *J Vasc Interv Radiol* 17:1287–1295
- Goldberg J, Bussard A, McNeil J, et al. (2007) Cost and reimbursement for three fibroid treatments: abdominal hysterectomy, abdominal myomectomy, and uterine fibroid embolization. *CardioVasc Interv Radiol* 30:54–58
- Dubuisson JB, Fauconnier A, Fourchette V, et al. (2001) Laparoscopic myomectomy: predicting the risk of conversion to an open procedure. *Hum Reprod* 16:1726–1731
- Seracchioli R, Rossi S, Govoni F, et al. (2000) Fertility and obstetric outcome after laparoscopic myomectomy of large

- myomata: a randomized comparison with abdominal myomectomy. *Hum Reprod* 15:2663–2668
23. Pron G, Bennett J, Common A, et al. (2003) Technical results and effects of operator experience on uterine artery embolization for fibroids: the Ontario Uterine Fibroid Embolization Trial. *J Vasc Interv Radiol* 14:545–554
 24. Kröncke TJ, Gauruder-Burmester A, Gronewold M, et al. (2004) Technical success rate, peri-interventional complications and radiation exposure of the transarterial embolization for leiomyomas of the uterus. *Rofo* 176:580–589
 25. Volkers NA, Hehenkamp WJ, Birnie E, et al. (2006) Uterine artery embolization in the treatment of symptomatic uterine fibroid tumors (EMMY trial): periprocedural results and complications. *J Vasc Interv Radiol* 17:471–480
 26. Honda I, Sato T, Adachi H, et al. (2003) Uterine artery embolization for leiomyoma: complications and effect on fertility. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 63:294–302
 27. Tropeano G, Litwicka K, Di Stasi C, et al. (2003) Permanent amenorrhea associated with endometrial atrophy after uterine artery embolization for symptomatic uterine fibroids. *Fertil Steril* 79:132–135
 28. Tulandi T, Sammour A, Valenti D, et al. (2002) Ovarian reserve after uterine artery Embolization for leiomyomata. *Fertil Steril* 78:197–198

Současné poznatky o etiopatogenezi děložních myomů

Etiopathogenesis of Uterine Fibroid: Current Knowledge

Sosna O., Kužel D., Mára M.

Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN, Praha, přednosta prof. MUDr. A. Martan, DrSc

ABSTRACT

Objective: To sum up the knowledge of etiology and pathogenesis of uterine fibroids.

Type of study: Review.

Setting: Department of Obstetrics and Gynaecology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague.

Subject of study: A summary of what is known about development of uterine fibroids.

Conclusion: In this overview of etiology and pathogenesis of uterine fibroids we have attempted to analyze the literature and present prevailing evidence and opinions.

Key words: uterine fibroid, leiomyoma, risk and growth factors, initiators of tumorigenesis.

SOUHRN

Cíl studie: Shrnutí poznatků o etiologii a patogenezi děložních myomů.

Typ studie: Přehled.

Název a sídlo pracoviště: Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN v Praze.

Předmět studie: Soubor poznatků o vývoji děložních myomů.

Závěr: V tomto přehledu etiopatogeneze děložní myomatózy jsme se pokusili analyzovat dostupná literární data a prezentovat převládající názory a důkazy.

Klíčová slova: děložní myom, leiomyom, rizikové a růstové faktory, iniciátory tumorogeneze.

ÚVOD

Děložní myom (leiomyom, uterine fibroid) představuje nejčastější nezhoubný nádor u žen ve fertilmním věku a postmenopauze. Vytváří se u velké části žen a stává se symtomatickým asi u jedné třetiny z nich. Nejčastějším steskem žen s myomatózní dělohou jsou hypermenorea, bolesti v podbřišku, problémy s močením, defekací nebo při pohlavním styku, sterilita nebo opakované těhotenské ztráty [7]. Myomatózní děloha je navíc nejčastější indikací k provedení hysterektomie. Až do nedávné doby byla vzniku leiomyomů navzdory jejich prevalenci věnována jen malá pozornost. Důvodem byl možná jejich nízký potenciál k maligní transformaci. Ačkoli jsou příčiny vzniku děložních myomů stále neznámé, současná vědecká literatura obsahuje řadu informací týkajících se epidemiologie, genetiky, hormonálních aspektů a molekulární biologie těchto tumorů. Smyslem tohoto review je analýza a sumarizace dostupných dat pro lepší pochopení etiopatogeneze děložní myomatózy.

RIZIKOVÉ FAKTORY A PREDISPOZICE

I když budou jednotlivé rizikové faktory (RF) probírány jednotlivě, často dochází k jejich vzájemné interakci a překrývání a je rovněž nutné podotknout, že mnohdy půjde pouze o domněnky a předpokládané mechanismy vlastní etiopatogeneze či tumorigeneze.

Časný nástup menarche se pokládá za mírný RF vzniku děložní myomatózy. S časným nástupem pravidelných menstruačních cyklů nastává pravděpodobně zvýšená mutace genů kontrolujících proliferaci buněk myometria [5].

Za další rizikový faktor se považuje nuliparita či infertilita oproti snížené incidenci děložních myomů u vícero díček, což se vysvětluje vyšší expozicí neoponovanými estrogeny při anovulačních cyklech nulipar a žen se sníženou fertilitou [10]. Obvyklé literární zdroje naopak považují leiomyomy za příčinu, nikoliv následek infertility.

Několik epidemiologických studií demonstuje zvýšenou prevalenci děložní myomatózy v závislosti na rostoucím věku žen [18]. Za kritickou hranici věku pro vznik myomu považují někteří autoři věk kolem čtyřicítky. Pozorovaný nárůst může ale také souviset s akcelerací růstu již preexistujících fibroidů nebo manifestací klinických obtíží. U posmenopauzálních žen v klidovém období dochází spíše jen ke zmenšování objemu myomů absencí stimulace estrogeny a progesteronem, protože histologická verifikace počtu děložních myomů u premenopauzálních a postmenopauzálních žen nevykazuje signifikantní rozdíl.

Zřejmě existuje i asociace zvýšené incidence děložních leiomyomů u pacientek s obezitou. Rozsáhlé prospektivní studie potvrdily zvýšené riziko vzniku myomů v závislosti na rostoucím body mass indexu [11]. Taktéž mezi pacientkami po hysterektomii nebo myomektomii mírně převažují ženy s nadváhou. Z hlediska patofyziolo-

gie jde o sníženou produkci sex hormon binding globulinu v játrech obézních žen rezultující ve vyšší hladiny volného aktivního estrogenu v periferní krvi. Svou roli hraje také zvýšená konverze estrogenů v tukové tkáni.

Potenciálním rizikovým faktorem jsou i některé dietetické zvyklosti. U konzumentů hovězího masa, jiného červeného masa a šunky oproti konzumaci zeleniny dochází ke střednímu nárůstu rizika tvorby děložních myomů [8]. To zřejmě souvisí se zvýšeným příjmem tuku v potravě, ale objektivní studie chybí. Je však jasné, že nízkotučná dieta a zvýšený příjem vlákniny snižují sérové hladiny estrogenů. V poslední době je sledován i vliv fytoestrogenů obsažených např. v sóje. Pozorovaný antiestrogenní efekt fytoestrogenů může být částečně vysvětlen jejich kompeticí s endogenním estradiolem na estrogenových receptorech nebo jejich modulací (selective estrogen receptor modulators podobně jako např. tamoxifen). Jako preventivní faktor etiopatogeneze děložních myomů se uvádí zvýšená tělesná aktivita, což potvrzují studie provedené na skupinách atletů.

Rizikovým faktorem pro vznik leiomyomů je i rasová příslušnost. U žen černé pleti kromě vyšší incidence děložních myomů dochází k časnější manifestaci klinických obtíží pod obrazem mnohočetné myomatózy. Byly doloženy signifikantní rozdíly v metabolismu estrogenů u různých etnik, nelze však říci, zda jde o faktory genetické nebo enviromentální [1].

Paradoxně za protektivní faktor vzniku děložních myomů je považováno kouření. S počtem vykouřených cigaret za den relativní riziko ještě více klesá. Tento ochranný efekt však u exkuřeček mizí. Inhibicí aromatázy účinkem nikotinu dochází ke snížené konverzi androgenů na estrogeny a u kuřeček rovněž bývají vyšší hladiny sex hormon binding globulinu, a tím nižší koncentrace aktivního volného estrogenu [12].

Nejasnost panuje v názoru na vliv orální kontracepce na vznik myomů. Zdá se, ale že s délkou užívání orálních kontraceptiv klesá riziko vzniku děložních myomů. Pozitivní efekt vedoucí ve svém důsledku ke snížení rizika vzniku myomu má pravděpodobně depotní medroxyprogesteronacetát [13]. Hormonální substituční terapie (HRT) v postmenopauze může mírně stimulovat růst leiomyomů, nebo alespoň blokovat jejich zmenšování po menopauze. Rozhodující není ani tak dávka nebo způsob aplikace HRT, jako typ použitého gestagenu.

Ačkoliv experimentálně na hlodavcích dochází účinkem tamoxifenu (antiestrogen) k regresí děložních myomů, prokázaly některé recentní studie opačný účinek u žen s karcinomem prsu na terapii tamoxifenem ve smyslu růstu nebo zvětšení myomů [3]. Zmenšení myomů naopak obvykle nastává účinkem GnRH agonistů. Zkoumán je i vliv exogenních estrogenů (xenoestrogenů) s jejich agonistickým nebo antagonistickým účinkem v lidském organismu. Prokázán je estrogenní vliv některých dnes již nepoužívaných pesticidů, jako je DDT (dichlordifenyltrichlorethan), který je i po delší době detekovatelný v tukové tkáni savců. Prokazatelně vyšší koncentrace DDT byly detekovány v děložních leiomyomech oproti normálnímu myometriu.

Zvýšené riziko tvorby myomů provází i dlouhodobá antihypertenzní terapie nebo anamnéza hlubokého pánevního zánětu při nitroděložním tělísku.

INICIÁTOŘY TUMOROGENEZE A GENETICKÉ PREDISPOZICE

Zajímavá teorie patogeneze leiomyomů srovnává jejich tvorbu s tkáňovou odpovědí při traumatu s tvorbou keloidů (hypertrofických jizev). Potencionálním „traumatem“ může být např. ischemie myometria uvolněním vazoaktivních mediátorů (prostaglandiny, vazopresin) při menses. Nastává tak zvýšená proliferace buněk hladké svaloviny a extracelulární fibróza [15]. Aktivace endotelu při jeho mikrotraumatu, vede k nárůstu tvorby FGF (fibroblast growth factor), což rovněž působí proliferaci buněk myometria. V leiomyomech byla opakovaně prokázána zvýšená exprese FGF.

V posledních letech je věnována zvýšená pozornost genetickým změnám v souvislosti s výskytem děložních myomů co do predispozice a heredice. Zkoumán je vliv etnicity, zvýšený familiární výskyt nebo incidence leiomyomů u dvojčat. Je referován vyšší výskyt děložních myomů u monozygotických dvojčat oproti dizygotickým, což nahrává některým genetickým teoriím [6]. Rovněž se zdá zvýšený výskyt mezi příbuznými sledovaných probandek. Mnohočetný výskyt leiomyomů (v kůži a děloze) provází tzv. hereditární leiomyomatózu neboli Reedův syndrom. Onemocnění postihuje muže i ženy. Mutací genu pro fumarát hydratázu dochází ke ztrátě tumorsupresorových mechanismů. Jde o autozomálně dominantní typ dědičnosti s neúplnou penetrancí s rizikem maligní transformace leiomyomu na leiomyosarkom nebo vznikem renálního papilárního karcinomu [14].

V literatuře je všeobecně přijímána premisa, že tyto nádory jsou monoklonální. Leiomyomy tak rostou pravděpodobně z jednoho typu buněk. Nejvíce genetických výzkumů stále využívá k zjištění chromozomálních abrací (translokace, delece, duplikace) metody klasické karyotypizace. Ukazuje se, že asi 40-50 % děložních myomů vykazuje určité chromozomální aberace. Nejčastější je translokace mezi 12. a 14. chromozomem, delece raménka 7. chromozomu a trizomie 12 [9]. Histologicky pak nacházíme častěji zvýšeně buněčné myomy nebo myomy s atypii. S velikostí myomů roste i počet atypii. Nejméně atypii vykazovaly myomy submukózní oproti intramurálním a subserózním.

ESTROGEN A PROGESTERON JAKO PROMOTORI RŮSTU LEIOMYOMU

Vliv estrogenů, antiestrogenů a progesteronu na růst fibroidů byl již výše zmíněn. Při léčbě antiprogesteronom (RU 486) dochází k regresi děložních myomů se sníženou expresí progesteronových receptorů v nich.

V těhotenství dochází naopak spíše k růstu myomů a platí, že čím větší myom, tím větší tendence k růstu. Může tak docházet k jejich degeneraci a ischemii provázenými krvácením a bolestmi v podbřišku. Navozený hypoestrinní stav při léčbě GnRH analogy vede naopak k celkovému zmenšení dělohy a regresi mnoha myomů. Na mechanismu zmenšení se podílí atrofie buněk leiomyomu, apoptóza, hypoperfuze a ischemie. Ukončení terapie GnRH analogy však vede k rychlému nárůstu fibroidů do téměř původní velikosti. Proto jsou tyto preparáty využívány v rámci předoperační přípravy, na níž navazuje provedení myomektomie nebo hysterektomie [16].

Někteří autoři demonstrují zvýšenou aktivitu aromatázy v leiomyomech a akceleraci konverze estradiolu na estron proti normálnímu myometriu [17]. To platí i o expresi receptorů pro estrogeny a progesteron s maximem u submukózních myomů. Nejasnost panuje i v názoru na zastoupení estrogenových receptorů alfa a beta v leiomyomech a normálním myometriu, zdá se však, že jejich exprese se mění v závislosti na menstruačním cyklu. Progesteronové receptory A ale jasně převládají v tkáni leiomyomu i normálním myometriu proti receptorům typu B.

RŮSTOVÉ FAKTORY A JEJICH RECEPTORY

Mitogenní efekt estrogenů je zprostředkován přes tzv. růstové faktory, které jsou lokálně produkovány buňkami myometria nebo fibroblasty. Jedná se o polypeptidy nebo proteiny s širokým spektrem biologických účinků. Zvýšená exprese růstových faktorů nebo jejich receptorů může vést až k tumorogenezi.

V poslední době byly v myometriu i tkáni fibroidů identifikovány různé růstové faktory nebo jejich receptory.

Transforming growth factor beta (TGF beta) patří mezi multifunkční cytokiny s promitotickým účinkem nebo indukci syntézy extracelulárního matrix vedoucí k fibrotizaci [2]. Basis fibroblast growth factor (bFGF) působí na proliferaci buněk hladké svaloviny včetně myometria a leiomyomů a je hojně uložen v extracelulárním matrix myomů. Epidermal growth factor (EGF) kromě promitotické aktivity podléhá účinku progesteronu během luteální fáze menstruačního cyklu se zvýšením jeho aktivity. Platelet-derived growth factor (PDGF) jako potentní mitogen působí v synergii s ostatními růstovými faktory [4].

Úloha vascular endothelial growth faktoru (VEGF), který není mitogenem pro buňky hladké svaloviny, je stimulace angiogeneze a vzestup cévní permeability, která je esenciální pro růst tumorů. Mnoho rozporuplných údajů poskytuje literatura v souvislosti s insulin-like growth faktorem (IGF), který se asi také podílí na růstu děložních myomů přes své receptory typu I. Ačkoli známe prolaktin hlavně v souvislosti s jeho hypofyzární produkcí, byl tento hormon izolován i z myometria, endometria a tkáně leiomyomů, kde jeho produkce pravděpo-

dobně podléhá vlivu ovariálních hormonů. Zatím co estrogeny jeho produkci stimulují, progesteron vykazuje inhibiční efekt na sekreci prolaktinu v těchto tkáních. Proto se o prolaktinu uvažuje jako o potenciálním růstovém faktoru pro myometrální i myomové buňky.

Podporováno grantem GA UK č. 38108.

ZÁVĚR

Smyslem tohoto přehledu je shrnutí poznatků o etiopatogenezi děložní myomatózy, která v podstatě tvoří velký zdravotní problém ve společnosti posledních 20 let. Ačkoli ještě nedávno byl původ děložních myomů poměrně neprobádanou oblastí, současné literární zdroje poskytují dostatek informací, závěrů a hypotéz na toto téma. Bližší objasnění změn na genetické a molekulární úrovni snad v budoucnu přinese exaktnější vysvětlení vzniku tohoto onemocnění. Vzhledem k vysoké incidenci fibroidů u žen nejrůznějších etnik, se u nich předpokládá jeden společný původce. Ze závěrů četných studií by tedy měly do budoucna vyplynout i doporučení a opatření ke snížení výskytu děložní myomatózy, a tak se posunout z oblasti terapeutické do oblasti preventivní.

LITERATURA

1. Al Hendy, A., Salama, SA. Catechol-O- methyltransferase polymorphism is associated with increased uterine leiomyoma risk in different ethnic groups. *J Soc Gynecol Incest*, 2006, 13, p. 136-144.
2. Arci, A., Sozen, I. Transforming growth factor beta 3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertil Steril*, 2000, 73, p. 1006-1011.
3. Deligdisch, L. Hormonal pathology of the endometrium. *Mod Pathol*, 2000, 13, p. 285-294.
4. Dixon, D., Hasseman, J., et al. Immunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. *Environ Health Perspect*, 2000, 108, p. 795-802.
5. Flake, GP., Andersen, J., Dixon, D. Etiology and pathogenesis of sterrine leiomyomas: a review. *Environ Health Perspect*, 2003, 111, 8, p. 1037-1054.
6. Gross, K., Morton, C. Genetics and the development of fibroids. *Clin Obstet Gynecol*, 2001, 44, p. 335-349.
7. Hanney, AF. Clinical decision making regarding leiomyomata: What we neder in the next millenium. *Environ Health Perspect*, 2000, 108, 5, p. 835-839.
8. Chiaffarino, F., Parazzini, F., La Vecchia, C., et al. Diet and uterine myomas. *Obstet Gynecol*, 1999, 94, p. 395-398.
9. Ligon, A., Morton, C. Genetic of uterine leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, 28, p. 235-245.
10. Marshall, LM., Spiegelmann, D., Goldman, MB., et al. A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata. *Fertil Steril*, 1998, 70, p. 432-449.
11. Sato, F., Kudo, R., Miyake, H. Body fat distribution and uterine leiomyomas. *J Epidemiol*, 1998, 8, p. 176-180.
12. Schwartz, SM. Epidemiology of uterine leiomyomata. *Clin Obstet Gynecol*, 2001, 44, p. 316-320.
13. Schwartz, SM., Marshall, LM., Baird, DD. Epidemiologic contributions to understanding the etiology of uterine leiomyomata. *Environ Health Perspect*, 2000, 108, 5, p. 821-827.
14. Stewart, E., Morton, C. The genetics of uterine leiomyomata. *Obstet Gynecol*, 2006, 107, 4, p. 917-921.
15. Stewart, E., Nowak, R. Leiomyoma – related bleeding: a classic hypothesis updated for the molecular era. *Hum Repris Update*, 1996, 2, p. 295-306.
16. Stoval, T., Ling, F., Henry, L., Woodruff, M. A randomized trial evaluating leuprolide acetate before hysterectomy as treatment of leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol*, 1991, 164, p. 1420-1423.
17. Sumitani, H., Shozu, M., Segawa, T., et al. In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. *Endocrinology*, 2000, 141, p. 3852-3861.
18. Velebil, P., Wingo, PA., Wilcox, LS. Rate of hospitalisation for gynecologic disorders among reproductive-age women in the United States. *Obstet Gynecol*, 1995, 86, p. 764-769.

MUDr. Ondřej Sosna
Gynekologicko-porodnická klinika
I. LF UK a VFN
Apolinářská 18
128 51 Praha 2