

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. Kristýna Kubínová

Určení frekvence mutací genu pro fumaráthydratázu u pacientek s děložními myomy

Frequency of Fumarate hydratase gene mutations in patients with uterine fibroids

Doktorská dizertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Michal Mára, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala 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, 20.12.2013

MUDr. Kristýna Kubínová

Identifikační záznam:

KUBÍNOVÁ, Kristýna. Určení frekvence mutací genu pro fumaráthydratázu u pacientek s děložními myomy [*Frequency of Fumarate hydratase gene mutations in patients with uterine fibroids*]. Praha, 2013. 54 stran, 6 příloh. Doktorská dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Gynekologicko-porodnická klinika. Školitel Mára, Michal.

PODĚKOVÁNÍ

Tato dizertační práce vznikla pod vedením mého školitele Doc. MUDr. Michala Máry, CSc. Je mou milou povinností mu tímto poděkovat za trpělivost a předání cenných zkušeností pro vznik této práce a při přípravě publikací.

Spolupracovníkům z Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch Kliniky dětského a dorostového lékařství VFN a 1. LF UK v Praze Ing. Markétě Tesařové, Ph.D. a MUDr. Kamile Veselé, Ph.D. z Ústavu lékařské biologie a genetiky VFN a 1. LF UK v Praze děkuji za pomoc při sestavení designu studie a zvládnutí laboratorních technik. Za statistické zpracování děkuji Ing. Aleně Dohnalové z Fyziologického ústavu 1. LF UK v Praze.

Přednostovi Gynekologicko-porodnické kliniky VFN a 1. LF UK v Praze prof. MUDr. Aloisi Martanovi, DrSc. a předsedovi oborové rady prof. MUDr. Jaroslavu Živnému, DrSc za podporu a vytvoření podmínek pro zpracování práce.

Mé poděkování rovněž patří grantové agentuře IGA MZ, která pomohla financovat značnou část nákladů spojených s uvedeným laboratorním výzkumem.

V neposlední řadě děkuji svojí rodině a partnerovi za zázemí a oporu v realizaci této dizertační práce.

ABSTRAKT

Úvod: Děložní myomy jsou nejčastějším benigním onemocnění ženského pohlavního traktu s vrcholem výskytu ve čtvrtém a pátém decenniu. Etiopatogeneza děložních myomů zůstává i v současné době z velké části neobjasněna. Nesporný podíl na vzniku děložních myomů mají faktory genetické. Byla identifikována řada genů, jejichž mutace jsou popisovány u určitého procenta pacientek s děložní myomatózou. Jedním z kandidátských genů je i gen pro fumaráthydratázu (FH). Heterozygotní germinální mutace tohoto genu způsobují dva dědičné syndromy: Multiple smooth muscle tumors of the skin and uterus (MCUL1)/ Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome (HLRCC) charakterizované familiárním výskytem kožní leiomyomatózy, děložních myomů mezi 20-30 rokem života a renálním papilárním karcinomem. Cílem naší práce bylo identifikovat frekvenci výskytu mutací FH u mladých pacientek se sporadickými děložními myomy.

Metodika: Do studie byly zařazeny pacientky s děložními myomy diagnostikovanými do 30 let věku, jako kontrolní skupina sloužil soubor pacientek do 30 let s absencí děložních myomů. V lymfocytech izolovaných z periferní krve pacientek byla stanovena aktivita fumaráthydratázy (fumarázy) a kontrolního enzymu citrátsyntázy a byla porovnána s kontrolním souborem. Následně byla provedena mutační analýza genu FH. Dále bylo provedeno měření aktivity a množství fumaráthydratázy ve tkáni leiomyomů.

Výsledky: U 14 pacientek (34,1 %) ze souboru (n=41) byla nalezena snížená aktivita fumarázy na 2-50 % kontrolních hodnot. Po DNA analýze se však heterozygotní mutaci FH podařilo prokázat jen u 2 pacientek (4,9 %). V jednom případě se jednalo o již dříve popsanou mutaci c.584T>C a u druhé pacientky jsme identifikovali novou mutaci c.892G>C. Obě pacientky zdědily mutace FH od svých matek, u kterých také došlo k rozvoji děložních myomů okolo 30. roku života. Ve vzorcích myomové tkáně (n=22) byla v jednom případě prokázána výrazná redukce aktivity i množství fumarázy, mutace FH nebyla však u této pacientky identifikována.

Souhrn: Naší prací jsme prokázali, že výskyt mutací FH je u sporadických myomů relativně nízký.

Klíčová slova: děložní myom, leiomyom, fumaráthydratáza, fumaráza, gen FH

ABSTRACT

Introduction: Uterine fibroids are the most common benign tumours of female genital tract with the peak incidence in the 4th and 5th decennium. The aetiology of uterine fibroids still remains poorly understood. Genetic factors play undisputed role in the onset of uterine fibroids. Up to date numerous gene mutations were identified in certain percentage of patients with uterine fibroids. One of the candidate genes is Fumarate hydratase gene (FH). Heterozygous germline mutations of FH cause two hereditary syndromes: Multiple smooth muscle tumours of the skin and uterus (MCUL1)/ Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome (HLRCC) characterised by leiomyomata of the skin, early onset uterine fibroids between 20-30 years of age and renal papillary carcinoma. The aim of our thesis was to identify the frequency of FH mutations in patients with early onset sporadic uterine fibroids.

Methods: Patients with the diagnosis of uterine fibroids up to the age of 30 years were enrolled in the study. Control group consisted of patients with absence of uterine fibroids. Activities of Fumarate hydratase and control protein Citrate synthase were measured in lymphocytes and compared to the results obtained from the healthy controls. Mutation analysis of FH gene was performed. Activity of Fumarate hydratase and its amount was determined also in the leiomyomata tissue.

Results: 14 patients out of 41 (34.1 %) showed reduced activity of Fumarate hydratase to 2-50 % measured in the control group. Heterozygous mutations in the FH were, however, identified only in two patients (4.9 %). In one case the mutation c.584T>C was previously described and in the other case the mutation c.892G>C was newly identified. Both the patients inherited the mutations from their mothers who also developed uterine fibroids around 30 years of age. In the leiomyoma tissue samples (n=22) one case of reduced activity and amount of Fumarate hydratase was recorded. This patient was not identified as FH mutation carrier.

Conclusion: Our data show that the frequency of FH mutations in patients with sporadic fibroids is relatively low.

Key words: uterine fibroid, leiomyoma, Fumarate hydratase, Fumarase, FH gene

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY	11
1.1 Děložní myomy	12
<i>1.1.1 Deskripce, incidence</i>	12
<i>1.1.2 Klasifikace, histopatologie</i>	12
<i>1.1.3 Symptomatika, diagnostika, terapie</i>	14
<i>1.1.4 Vliv děložních myomů na reprodukci</i>	15
<i>1.1.5 Etiologie děložních myomů, patogeneze, rizikové faktory</i>	16
<i>1.1.6 Genetické faktory</i>	18
1.2 Fumarát hydratáza	19
<i>1.2.1 Deskripce</i>	19
<i>1.2.2 Deficit fumarát hydratázy</i>	20
<i>1.2.3 Heterozygotní mutace genu FH</i>	20
<i>1.2.4 Mechanismus tumorogeneze</i>	20
2 HYPOTÉZA A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	22
3 MATERIÁL A METODIKA	25
3.1 Soubor pacientek	26
3.2 Stanovení aktivity fumaráthydratázy	27
3.3 DNA analýza	27
3.4 Stanovení aktivity fumaráthydratázy ve tkáni leiomyomů	27
3.5 Určení množství fumaráthydratázy ve tkáni leiomyomů	28
3.6 Statistická analýza	28

4	VÝSLEDKY	29
4.1	Základní charakteristika	30
4.2	Aktivita fumaráthydratázy	30
4.3	Mutační analýza	32
4.4	Stanovení aktivity fumaráthydratázy ve tkáni leiomyomů	34
4.5	Stanovení množství fumaráthydratázy ve tkáni leiomyomů	37
4.6	Přehled leiomyomů se sníženou aktivitou fumaráthydratázy a sníženým množstvím fumaráthydratázy	38
4.7	Histopatologické nálezy	39
5	DISKUZE	40
6	ZÁVĚR	45
7	LITERATURA	47
8	VLASTNÍ PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU	53

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMPK	AMP-aktivovaná protein kináza (AMP-activated protein kinase)
bcl-2	B-cell lymfoma-2
bp	pár bází (base pair)
CS	citrátsyntáza
COC	kombinovaná perorální kontracepce
COMT	katechol-O-methyltransferáza
CT	počítačová tomografie (Computer tomography)
EGF	epidermální růstový faktor (Epidermal growth factor)
FGF	růstový faktor fibroblastů (Fibroblast growth factor)
FH	gen pro fumaráthydratázu
GnRHA	agonisté gonadoliberinu
HIF	Hypoxia inducible factors
HLRCC	Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome
IGF	Insuline-like growth factor
LUAO	laparoskopická okluze uterinních arterií (Laparoscopic uterine artery occlusion)
MCUL1	Multiple smooth muscle tumors of the skin and uterus
MHz	megahertz
MRgFUS	magnetickou rezonancí vedený fokusovaný ultrazvuk
MRI	magnetická rezonance (Magnetic resonance imaging)
p53	protein 53
PDGF	růstový faktor z destiček (Platelet derived growth factor)

RFA	radiofrekvenční ablace myomu
STUMP	hladkosvalový nádor nejistého maligního potenciálu (Smooth muscle tumor of uncertain malignant potential)
TGF- β	transformující růstový faktor (Transforming growth factor)
TNF	tumor nekrotizující faktor (Tumor necrosis factor)
UAE	embolizace děložních tepen (Uterine artery embolization)
UPA	ulipristal acetát
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular endothelial growth factor)

Kapitola 1:
ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1 Děložní myomy

1.1.1 *Deskripce, incidence*

Děložní myomy jsou benigní, monoklonální tumory vycházející z hladké svaloviny myometria. Ve tkáni myomů se vyskytuje velké množství extracelulární matrix obsahující kolagen (nejhojněji zastoupen typ I a III), fibronektin a proteoglykany (Parker, 2008).

Děložní myom je nejčastějším nezhoubným nádorem v oblasti ženského genitálního traktu. I přes vysoký výskyt je obtížné stanovit přesnou incidenci tohoto onemocnění vzhledem k tomu, že řada děložních myomů je asymptomatická (Holub/I, 2009; Parker, 2008). Symptomy jsou přítomny jen u 25 % pacientek a frekvence výskytu je udávána mezi 30-40 % pacientek ve 4. decenniu (Okolo, 2008). Skutečný výskyt děložních myomů je však vyšší. V práci zkoumající histopatologické nálezy u 100 pacientek, které podstoupily hysterektomii z jakékoliv indikace, byly děložní myomy popsány v 77 % případů. Řada takto popsaných myomů byla však drobná, velikosti okolo 2 mm. Vzhledem k časté absenci symptomů a limitacím zobrazovacích metod je tedy výskyt děložních myomů podhodnocen (Parker, 2008).

Incidence děložních myomů se liší dle rasové příslušnosti. U černé rasy je incidence děložních myomů signifikantně vyšší v porovnání s bělošskou populací. U žen černé pleti je také zaznamenáván nižší věk výskytu symptomů jakožto i nižší věk, ve kterém pacientky podstoupily hysterektomii (Holub/I, 2009).

1.1.2 *Klasifikace, histopatologie*

Děložní myomy lze dle vztahu k vrstvám děložní stěny rozlišit na submukózní, intramurální a subserózní.

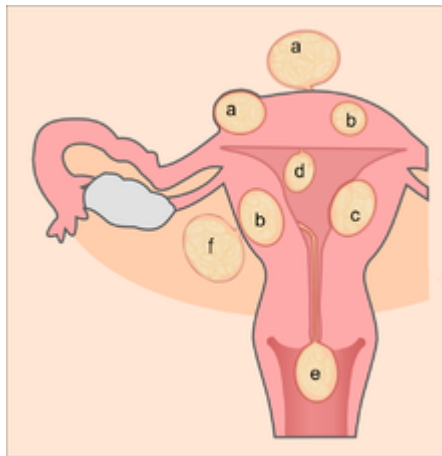
Nejčastějším typem jsou myomy intramurální, lokalizované ve stěně děložní. Růstem vytváří myomy masu narušující vnitřní či vnější povrch dělohy, což, zejména v případě objemných myomů může ztěžovat jejich anatomickou klasifikaci.

Submukózní myomy jsou lokalizovány v těsně blízkosti endometria a tvoří 5-10 % děložních myomů. Tento typ myomů je často provázen klinickými symptomy, zejména

abnormálním děložním krvácením. Zvláštním typem je takzvaný myom pendulující či intrakavitální.

Subserózní myomy jsou lokalizovány pod peritoneem kryjícím povrch dělohy. I v této podskupině se mohou vyskytovat pendulující myomy, u nichž existuje riziko torze a následné nekrózy. Při růstu do peritoneální dutiny mohou myomy působit útlak okolních orgánů. Při růstu laterálně mezi listy plica lata hovoříme o tzv. intraligamentózních myomech (McLucas, 2008).

Obr. 1.: Anatomická klasifikace děložních myomů



Schematické znázornění typů myomů: *a*=subserózní myomy, *b*=intramurální myomy, *c*=submukózní myomy, *d*=pendulující submukózní myom, *e*=myoma nascens, *f*=intraligamentózní myom. Převzato a upraveno (zdroj wikipedia.org).

Dle klasifikace WHO se histopatologicky leiomyocelulární nádory dělí na leiomyom, hladkosvalový nádor nejistého maligního potenciálu (STUMP) a leiomyosarkom. Převažujícím typem je benigní leiomyom, který lze rozdělit na několik histologických a růstových variant, které zahrnují například mitoticky aktivní leiomyom, celulární leiomyom, atypický leiomyom či myxoidní leiomyom. Tyto varianty mohou na mikroskopické úrovni napodobovat určitými rysy nádory maligní a je tedy nutno je správně diagnostikovat.

Nádory nejistého biologického chování a leiomyosarkomy jsou vzácné. Leiomyosarkomy představují pouze 1% maligních nádorů dělohy.

Kritérii pro hodnocení biologické povahy nádoru jsou stupeň jaderných atypií, mitotický index, přítomnost a typ nekrózy a vztah nádoru k okolí (Dundr, 2009).

1.1.3 Symptomatika, diagnostika, terapie

Více než 50 % děložních myomů je asymptomatických. U zbývajících žen mohou být symptomy výrazné, podílí se na morbiditě a zhoršují jejich kvalitu života. Klinicky se myomy prezentují širokým spektrem příznaků zahrnujícím děložní krvácení, poruchy menstruačního cyklu, bolesti a tlak v podbříšku, problémy s močením, defekací a při pohlavním styku. Mezi dalšími lze jmenovat těhotenské komplikace jako je předčasný porod, abrupci placenty či patologickou polohu plodu (Gupta, 2008; Parker, 2008).

U přibližně 62 % pacientek se symptomatickými děložními myomy je diagnostikována mnohočetná myomatóza. Ženy černé pleti jsou obecně více symptomatické a mají častěji diagnostikovány mnohočetné a objemné myomy (Gupta, 2008).

Metodou volby v diagnostice děložních myomů je ultrazvuk. Kombinací transabdominálního a transvaginálního vyšetření jsme schopni popsat počet, typ a lokalizaci dominantních myomů. Sonohysterografie umožňuje popis a diferenciaci diagnostiku submukózních myomů a patologií endometria.

MRI je vhodná zejména při nejasnostech o biologické povaze tumoru, diferenciaci diagnostice adenomyózy a při sledování pacientek po okluzivní léčbě (McLucas, 2008).

Volba léčebného postupu se liší u pacientek s reprodukčními anebo dokončenými reprodukčními plány. Lze ji rozdělit na léčbu farmakologickou (symptomatická či kauzální, kam řadíme GnRHa či UPA), chirurgickou (myomektomie, hysterektomie), okluzivní (UAE, LUAO) a ablační (RFA, MRgFUS, myolýza). Expektační postup je možný u pacientek asymptomatických či pacientek s klinicky nesignifikantními myomy (Agdi, 2008; Bratby, 2008; Donnez, 2012; Istre, 2008; Mára/I, 2009).

Metodou volby u pacientek s klinicky významnými myomy ve fertilním věku je dělohu šetřící výkon, tedy myomektomie (laparotomická, laparoskopická či hysteroskopická) (Agdi, 2008; Mára/III, 2009). Okluzivní metody jsou u pacientek s reprodukčními plány méně vhodné pro vysokou incidenci prvotrimestrálních abortů a vysoký výskyt nitroděložních patologií zejména po UAE (Mara, 2012). Farmakologická kauzální terapie analogy

gonadoliberinu (GnRHA) je pro vysoký výskyt menopauzálních symptomů, nízkou účinnost v objemové redukci myomů a opětný nárůst myomů po ukončení léčby určena spíše jako „pretreatment“ před plánovanou chirurgickou léčbou (Istre, 2008; Mára/II, 2009). Obdobně i léčba pomocí ulipristal acetátu (UPA) vede k malé objemové redukci přítomných myomů, není však provázena vedlejšími klimakterickými symptomy (Donnez, 2012).

Metody ablační a hysterektomie, představující definitivní řešení děložní myomatózy, jsou indikovány u pacientek s ukončenými reprodukčními plány (Istre, 2008).

1.1.4 Vliv děložních myomů na reprodukci

I přes nepochybný klinický význam děložních myomů zůstává souvislost mezi myomy a neplodností stále neobjasněná. Dle řady studií jsou děložní myomy prokazatelnou příčinou neplodnosti jen u 2-3 % pacientek. Mezi předpokládané mechanismy, kterými myomy ovlivňují fertilitu, řadíme (Holub/II, 2009; Khaund, 2008):

- narušení implantace z důvodu nepravidelného růstu endometria, porušení celistvosti endometria či zhoršení cévního zásobení při implantaci plodového vejce nad myomem,
- zhoršení transportu spermií a embrya pro poruchy děložní kontraktility či rozšíření děložní dutiny,
- děložní myomy mohou být příčinou tubární neprůchodnosti.

Výskyt děložních myomů je spojován s opakovanými těhotenskými ztrátami. Nejvyšší riziko je u myomů lokalizovaných submukózně, u intramurálních myomů se submukózní komponentou a dále se zvyšuje při mnohočetné myomatóze. Posouzení role myomektomie na zlepšení reprodukčních výsledků pacientek s děložními myomy je limitováno nedostatkem randomizovaných kontrolovaných studií. Recentní data ukazují na nejednoznačný efekt myomektomie ve srovnání s expektačním postupem u intramurálních či subserózních myomů. Ve skupině pacientek se submukózními myomy nebo myomy výrazně dislokovanou dutinou vede jejich odstranění ke snížení incidence samovolných potratů (Olive, 2010; Metwally, 2012).

Vztah děložních myomů a pozdních těhotenských komplikací je všeobecně akceptovaný fakt. Myomy mohou být příčinou poruch placentace, poruch placentární perfúze,

nepravidelné polohy plodu, poruch děložní kontraktility a s tím spojeným zvýšeným rizikem císařského řezu a postpartální hemorhagie (Holub/II, 2009; Olive, 2010).

1.1.5 Etiologie děložních myomů, patogeneze, rizikové faktory

I přes vysoký výskyt děložních myomů je jejich etiopatogeneze stále z velké části neobjasněna.

Děložní myomy představují estrogen- a progesteron dependentní tkáň, dosud však není znám přesný mechanismus působení a součinnosti těchto hormonů na iniciaci jejich růstu. Pravděpodobnou roli hraje zvýšená exprese estrogenových receptorů a silnější odpověď na estrogení stimulaci v buňkách myomů v porovnání se zdravým myometriem. Role progesteronu v patogenezi děložních myomů je neméně významná. V porovnání s okolním myometriem byla v myomech zaznamenána vyšší koncentrace progesteronových receptorů A a B. Buňky děložních myomů vykazují zvýšenou mitogenní aktivitu v luteální fázi menstruačního cyklu a v těhotenství. Ukazuje se tedy, že oba ovariální steroidy mají klíčovou úlohu ve stimulaci růstu myomů (Holub/I, 2009; Okolo, 2008).

Růstové faktory lokálně produkované buňkami hladkého svalstva a fibroblasty mohou stimulovat růst myomů. Regulace exprese růstových faktorů je zvyšována rovněž ovariálními steroidy. Estrogen i progesteron zvyšují expresi VEGF, IGF, PDGF a EGF. Studie zabývající se rolí růstových faktorů však přinesly rozporuplné výsledky. FGF-2 (Fibroblast growth factor), jeden z kandidátních růstových faktorů zvyšující proliferaci, migraci a diferenciaci endoteliálních buněk, buněk hladké svaloviny a fibroblastů, stimuluje růst buněk myomu in vitro, in vivo tento vliv nebyl prokázán. Obdobně nejednoznačné výsledky byly publikovány i u následujících růstových faktorů: EGF, PDGF a TGF. Nejvíce pozornosti bylo věnováno roli vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF). VEGF stimuluje syntézu endoteliálních buněk a zvyšuje permeabilitu cév. Ovariální steroidy zvyšují expresi VEGF. Proliferace buněk tumoru je závislá na cévním zásobení, VEGF indukovaná angiogeneze tak facilituje jejich růst. V buňkách myomů byla prokázána silná exprese VEGF- α oproti okolnímu myometriu (Fleischer, 2008; Okolo, 2008).

Dalším studovaným patogenetickým faktorem je apoptóza. Apoptóza, tedy programovaná buněčná smrt, je jedním z fyziologických procesů v lidském těle a nezbytná je správná koordinace pro- a proti-apoptotických faktorů. Mezi hlavní pro-apoptotické faktory

řadíme p53 a TNF- α . Naopak onkogen bcl-2 apoptózu blokuje a převaha proti-apoptické aktivity vede k prodlouženému přežívání buněk, což může přispívat k růstu myomů stejně jako jiných tumorů. Dle některých studií ovariální steroidy, především progesteron, „upregulují“ expresi bcl-2 v buňkách děložních myomů. Exprese TNF- α byla ve zvýšené míře prokázána v buňkách děložních myomů ve srovnání s myometriem, přesná role TNF- α v regulaci růstu myomů však zatím není známá. V expresi genu p53 v buňkách myomů a myometria nebyl prokázán signifikantní rozdíl, po léčbě GnRHa však buňky myomů vykazovaly vyšší expresi toho genu, což vede k hypotéze, že se p53 podílí na zvýšení pro-apoptických procesů vlivem hypoestrinismu (Okolo, 2008).

Byla identifikována řada rizikových faktorů vzniku děložních myomů:

Jedním z rizikových faktorů je věk. Diagnóza děložních myomů je nejpravděpodobnější u žen, které překročily 40. rok a incidence se dále zvyšuje směrem k menopauze. Také časný věk menarche je spojován s vyšší incidencí děložních myomů (Holub/I, 2009).

Ačkoli nebyl dosud identifikován specifický gen u non-syndromických myomů, je výskyt děložních myomů častější u žen s pozitivní rodinnou anamnézou. Příbuzné 1. stupně žen s děložní myomatózou mají 2,5násobně zvýšené riziko nálezu myomu. Stejně tak byl popsán častější výskyt děložních myomů u monozygotních dvojčat ve srovnání s dvojčaty dizygotními. U žen s pozitivní anamnézou děložních myomů byla prokázána silná exprese VEGF- α (Holub/I, 2009; Okolo, 2008).

Obezita, nízký věk menarche a expozice neoponovaným estrogenům patří mezi rizikové faktory, oproti tomu užívání COC, parita a kouření cigaret, lze označit za faktory protektivní (Othman, 2008).

Ženy černé pleti mají troj- až pětinasobné riziko vzniku děložních myomů ve srovnání s kavkazskou populací. Myomy jsou u pacientek černé pleti diagnostikovány v nižším věku, jsou četnější a více symptomatické. Nedávno bylo potvrzeno, že polymorfismy v genech pro COMT (katechol-O-methyltransferáza) a genu CYP17 (kódující cytochrom P450C17 α), hrajících roli v syntéze a metabolismu estrogenů spolu s variabilitou v expresi a funkci estrogenových a progesteronových receptorů mají vliv na vyšší prevalenci myomů u žen černé pleti (Okolo, 2008; Othman, 2008).

1.1.6 Genetické faktory

Genetický podklad vzniku děložních myomů byl podpořen řadou epidemiologických, molekulárních a cytogenetických studií.

Cytogenetické studie vzorků resekovaných leiomyomů vedly ke zjištění, že 40-50 % myomů vykazuje chromozomální aberace. Nejčastějšími jsou translokace chromozomů 12 a 14, delece chromozomu 7 a trizomie chromozomu 12.

Přibližně ve 20 % případů myomů s abnormálním karyotypem nacházíme translokaci 12. a 14. chromozomu, která byla zároveň první cytogenetickou abnormalitou popsanou v buňkách leiomyomů (Meloni, 1992). Objev, že chromozomální aberace stejné oblasti genu 12q jsou přítomné i v řadě dalších mezenchymálních tumorů (například fibroadenomy prsu, lipomy, endometriální polypy, angiomyxomy a adenomy slinných žláz), vedl k předpokladu, že se klíčové geny pro tumorigenezi nachází právě v oblasti 12q14-15 (Henning, 1999; Hodge, 2007). Další podrobné mapování této oblasti vedlo k identifikaci skupiny genových proteinů (High Mobility Group) tzv. HMGA. Tyto non-histonové komponenty chromatinu slouží jako architektonické faktory ovlivňující buněčné procesy: diferenciaci, smrt, růst a proliferaci a jsou pravděpodobně zodpovědné za odlišný růst myomů (Reeves, 2001).

Dalším častým typem aberace, vyskytujícím se v 17-20 % děložních myomů je delece chromozomu 7. Tento typ aberace se vyskytuje častěji v buňkách děložních myomů než v jiných tumorech, byl však identifikován i v lipomech, endometriálních polypech a u některých hematologických malignit (Hodge, 2009). Delece chromozomu 7 v myomech nalézáme často v kombinaci s dalšími abnormalitami jako je translokace chromozomů 12 a 14 (Ligon, 2008).

Je pozoruhodné, že u buněčných kultur s delecí či translokací chromozomu 7 většinou nacházíme mozaiku, tedy buňky s normálním karyotypem 46 XX (Xing, 1997). Tyto kultury vykazují pomalý růst ve srovnání s buňkami, v nichž je zároveň přítomna translokace chromozomů 12 a 14. Děložní myomy s aberací chromozomu 12 jsou také často objemnější než myomy s abnormalitami chromozomu 7. Tato skutečnost naznačuje, že gen v oblasti 7q22 hraje roli v regulaci buněčného růstu (Rein, 1998).

Aberace chromozomu 6, konkrétně 6p21 jsou popisovány u výše zmíněných mezenchymálních tumorů (lipomy, endometriální polypy, plicní hamartomy) a v děložních myomech se vyskytují s frekvencí < 5 % (Ozisik, 1995).

Mezi další méně časté chromozomální abnormality pozorované v buňkách děložních myomů patří změny chromozomu X, strukturální přestavby mezi chromozomy 1 a 3, zejména

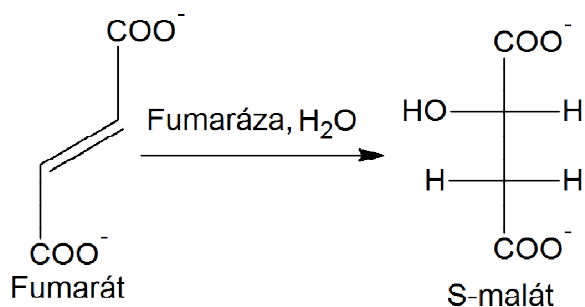
ve formě ring chromozomu 1 a dále monozomie a delece dlouhého raménka chromozomu 10 (Ligon, 2008; Mark, 1990).

1.2 Fumaráthydratáza

1.2.1 Deskripce

Fumaráthydratáza (fumaráza) je klíčovým enzymem citrátového neboli Krebsova cyklu, který katalyzuje reverzibilní přeměnu fumarátu na malát (Obr. 2). Citrátový cyklus je jedním z hlavních součástí energetického metabolismu buňky a poskytuje intermediáty pro biosyntézu aminokyselin, porfyrinů, aj. Fumaráthydratáza je evolučně relativně vysoce konzervována napříč živočišnými druhy. V lidských buňkách je fumaráza lokalizována v mitochondriální matrix a v cytosolu (Alam, 2003; Alam, 2/2005). Jedinou výjimkou je mozková tkáň, ve které byl identifikován pouze mitochondriální izoenzym (Toro, 2003). Obě formy fumarázy (mitochondriální a cytosolická) jsou kódovány jediným genem (genem FH). Mitochondriální izoenzym obsahuje N-terminální sekvenci, cytosolická forma je syntetizována bez signální sekvence. Gen FH je lokalizován na chromozómu 1q42.3-43, skládá se z 10 exonů a kóduje protein o velikosti 510 aminokyselin včetně signální sekvence na N-konci (Eng, 2003; Tomlinson, 2002; Yogev, 2010; Yogev, 2011).

Obr. 2: Reakce katalyzovaná fumarázou



1.2.2 Deficit fumaráthydratázy

Toto vzácné, autozomálně recesivní onemocnění je způsobeno germinální mutací v obou kopiích FH. Je charakterizováno encefalopatií, poruchou neurologického vývoje, křečemi a acidurií. Onemocnění je letální v časném věku. Výrazné snížení aktivita fumarázy vede k vysokému vylučování fumarátu močí (Alam, 2/2005; Deschauer, 2006; Toro, 2003).

1.2.3 Heterozygotní mutace genu FH

Heterozygotní germinální mutace genu FH způsobuje dva syndromy: Multiple smooth muscle tumors of the skin and uterus (MCUL1) a Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome (HLRCC). Syndrom MCUL1 je charakterizován mnohočetnou kožní leiomyomatózou a výskytem děložních myomů u jedinců ženského pohlaví. Kožní leiomyomy vychází z musculi arectores pilorum a klinicky se projeví ve druhé až čtvrté dekádě, typicky jako silně bolestivé noduly na trupu či končetinách reagující na změnu teploty či trauma. Kožní leiomyomatóza také často bývá prvním z projevů onemocnění. U jedinců mužského pohlaví dosahuje výskyt kožních lézí 100 %, u žen 55 % (Alam 2/2005). Děložní myomy jsou u postižených žen obvykle mnohočetné, symptomatické a vyskytují se mezi 20. až 30. rokem života. V rámci syndromu HLRCC je navíc popisován familiární výskyt renálního papilárního karcinomu typu II (Alam 2/2005; Alam 10/2005; Bardella, 2012; Tomlinson, 2002).

U postižených jedinců je redukována aktivita fumarázy v buňkách lymfocytů (Pithukpakorn, 2006). Absence nebo výrazná redukce aktivity fumaráthydratázy může být příčinou tumorogeneze a fumaráza tedy funguje pravděpodobně jako tumor supresor. Dále byla v nádorech těchto pacientů nalezena ztráta heterozygotnosti genu FH, což naznačuje, že se jedná o Knudsonův „two-hit“ model rozvoje tumoru (Tomlinson, 2002).

1.2.4 Mechanismus tumorogeneze

Mechanismus rozvoje nádorů s deficitní fumarázovou aktivitou je zřejmě spojen s aktivací hypoxie indukujícího faktoru (HIF). HIF je heterodimer skládající se z labilní HIF- α a stabilní HIF- β podjednotky. Nejvýznamnější funkcí HIF je podpora adaptace buněk na hypoxii. V buňkách leiomyomů a renálních buňkách pacientů postižených syndromem

MCUL1/HLRCC dochází k intracelulární akumulaci fumarázy, což vede ke stabilizaci podjednotky HIF- α a transkripci cílových genů v prostředí normoxie mimikující hypoxické podmínky (tzv. pseudohypoxie).

Somatické buňky mohou přežívat s defektem v Krebsově cyklu, pro buňky mozkové tkáně je však homozygotní germinální mutace FH letální. Somatické buňky s deficitem FH pravděpodobně překonávají poruchu energetického metabolismu využitím glukózy nebo glutamátu jako hlavního zdroje energie (Bardella, 2012; O'Flaherty, 2010).

Buňky s defektem FH vykazují vyšší rezistenci proti programované buněčné smrti. Ochrana proti apoptóze je pravděpodobně zprostředkována aktivací AMP-aktivované protein kinázy (AMPK). AMPK je vysoce konzervovaný indikátor energetického stavu buněk (Hardie, 2013). Akumulace fumarátu v FH defektních buňkách vede k aktivaci AMPK. Aktivace AMPK ovlivňuje geny rodiny bcl-2 regulující apoptotický mechanismus na mitochondriální úrovni (Bardella, 2012).

Kapitola 2:

HYPOTÉZA A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

2 HYPOTÉZA A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Děložní myomy jsou bezesporu z velké části geneticky podmíněným onemocněním, naše poznatky o etiopatogenezi tohoto onemocnění však jsou stále nedostatečné. Kromě značné heterogenity tohoto onemocnění a časté absenci příznaků byla do nedávné doby studiu děložních myomů věnována relativně malá pozornost, pravděpodobně pro jejich nízký potenciál k maligní transformaci. V současné době se zvyšuje frekvence výskytu děložních myomů u pacientek v reprodukčním věku, což patrně souvisí se společenských trendem odsouvání reprodukčních plánů do pozdějšího věku, a myomy tedy představují značný nejen medicínský, ale i socioekonomický problém. Objev existence dvou syndromů, asociovaných s výskytem děložních myomů u žen v nízkém věku, způsobených heterozygotní mutací genu FH určil další možný směr zkoumání etiopatogeneze děložních myomů.

Cílem naší práce bylo určit, zda a případně s jakou frekvencí se vyskytují mutace genu FH u sporadických, non-syndromických myomů, tedy u mladých žen s diagnózou děložního myomu a negativní osobní a rodinnou anamnézou ostatních projevů syndromu MCUL1/HLRCC (kožní leiomyomatóza, renální papilární karcinom typ II). Dále jsme chtěli určit případný diferenciační faktor podrobným rozbořem osobní anamnézy a analýzou histopatologických vzorků získané tkáně myomu. Dílčím cílem bylo nabídnout pacientkám s pozitivitou mutací FH vyšetření rodinných příslušníků a posoudit potřebu dalšího sledování vzhledem k předpokládané roli fumarázy jako tumor supresoru a publikované asociaci mutací genu FH s renálním papilárním karcinomem v rámci syndromu HLRCC (Alam 2003; Stewart, 2008; Toro, 2003).

Naše hypotéza možné asociace mutací genu FH u non-syndromických pacientek s děložními myomy do 30 let věku byla založena na faktu, že v rámci syndromu MCUL1/HLRCC se děložní myomy prezentují v průměru rovněž ve 30 letech (Alam 2/2005, Stewart, 2008). V použité metodice jsme vycházeli z publikovaných dat, která prokazují, že mutace genu FH vede ke snížené aktivitě fumarázy a tu lze měřit z lymfocytů izolovaných z periferní krve (Tomlinson, 2002).

Specifickým cílem práce bylo tedy v souboru 41 pacientek, u nichž došlo k rozvoji děložních myomů do věku 30 let včetně:

- stanovit aktivitu fumarázy a citrátsyntázy jako kontrolního enzymu a provést mutační analýzu genu FH ve vzorcích DNA izolovaných z krve v porovnání se zdravými kontrolami,
- stanovit specifickou aktivitu fumaráthydratázy a citrátsyntázy jako kontrolního enzymu ve vzorcích děložních leiomyomů,
- stanovit množství fumaráthydratázy a β -aktinu ve vzorcích děložních leiomyomů pomocí elektroforézy.

Kapitola 3:

MATERIÁL A METODIKA

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Soubor pacientek

Do studie byly zařazeny pacientky s děložními myomy. Jako kontrolní skupina byly použity pacientky s absencí děložních myomů. Výběr pacientek vhodných do studie probíhal retro- i prospektivně. Jednalo se o pacientky registrované v ambulanci pro léčbu děložních myomů na Gynekologicko-porodnické klinice VFN a 1. LF UK v Praze. Všechny ženy zařazené do studie včetně kontrol podepsaly informovaný souhlas se studií. Provedení studie bylo schváleno etickou komisí VFN a 1. LF UK v Praze. Nábor pacientek probíhal v letech 2009-2010.

Vhodné kandidátky byly získány na základě anamnestických dat a ultrazvukového vyšetření (ultrazvukový přístroj General Electric, Voluson 730, Milwaukee, USA, použité sondy: vaginální sonda 5-9 MHz a abdominální sonda 2-5 MHz). Pacientky zařazené do studie splňovaly vstupní kritéria: věk v době diagnózy děložního myomu do 30 let včetně, velikost děložního myomu nad 3 cm/nebo v případě retrospektivně vybraných pacientek údaj v operačním protokolu o odstranění myomu nad 3 cm a ultrazvukové vyšetření prokazující přítomnost myomu(ů) a negativní rodinná anamnéza na výskyt kožní leiomyomatózy a renálního papilárního karcinomu. Pacientky obdržely podrobný dotazník na osobní a rodinnou anamnézu a symptomy související s děložními myomy (silná, bolestivá menstruace, pánevní bolest, bolest při defekaci, močení, pohlavním styku a časté nutkání na močení).

Jako kontroly byly definovány ženy do 30 let s negativním nálezem v malé pánvi, tedy s absencí děložních myomů, potvrzeným na základě ultrazvukového vyšetření (ultrazvukový přístroj General Electric, Voluson 730, Milwaukee, USA) a negativní rodinnou anamnézou na výskyt kožní leiomyomatózy a renálního papilárního karcinomu.

Po podpisu informovaného souhlasu byl pracovníky Gynekologicko-porodnické kliniky VFN pacientkám odebrán vzorek nesrážlivé krve a u prospektivně zařazených pacientek byl v rámci myomektomie odebrán i vzorek tkáně myomu do tekutého dusíku. Všechny vzorky byly následně transportovány do Laboratoře pro studium mitochondriálních poruch Kliniky dětského a dorostového lékařství VFN 1. LF UK.

Všechny pacientky s děložními myomy zařazené do studie (retro i prospektivně) podstoupily na Gynekologicko-porodnické klinice VFN dělohu šetřící výkon, myomektomii

laparotomickou, laparoskopickou, hysteroskopickou či kombinovanou. Výsledky operačních protokolů a histopatologického vyšetření tkáně byly zaznamenány.

Údaje o velikosti dominantního myomu a počtu myomů byly získány z předoperačního ultrazvukového vyšetření.

3.2 Stanovení aktivity fumaráthydratázy

Aktivita fumarázy a kontrolního enzymu citrátsyntázy byla v izolovaných lymfocytech stanovena spektrofotometricky a porovnána s aktivitou zjištěnou v lymfocytech zdravých kontrol. Jako významná redukce aktivity fumaráthydratázy v lymfocytech bylo považováno snížení nejméně na 50 % aktivity kontrol.

3.3 DNA analýza

DNA k analýze byla izolována ze vzorku periferní krve pacientek. Všechny exony a přilehlé intronové oblasti byly amplifikovány pomocí PCR a následně sekvenovány v obou směrech na genetickém analyzátoru ABI 3100 Avant (Applied Biosystems). Analýza delecí jednoho nebo více genů byla provedena pomocí MLPA kitu SALSA MLPA P198 Fumarase deficiency (MRC Holland) dle doporučení výrobce.

3.4 Stanovení aktivity fumaráthydratázy ve tkáni leiomyomů

Pro stanovení aktivity fumaráthydratázy byla provedena optimalizace vstupního množství proteinu použitého v reakci specifické pro danou tkáň pomocí měření rozmezí množství proteinu v kyvetě, při kterém je hodnota specifické aktivity nezávislá na koncentraci proteinu. Byla měřena aktivita fumaráthydratázy při různých množstvích proteinu v reakční směsi. Ze závislosti změny absorbance na množství proteinu byl hledán úsek, kde je závislost lineární. Jako nejvhodnější rozmezí bylo vybráno 40-70 µg proteinu/objem reakční směsi.

Aktivita fumarázy a kontrolního enzymu citrátsyntázy byla v tkáni leiomyomu stanovena spektrofotometricky a porovnána s aktivitou zjištěnou v kontrolním vzorku. Kontrolním vzorkem byla tkáň myomu od starší pacientky. Jako významná redukce aktivity

fumaráthdratázy ve vzorku myomové tkáně bylo považováno snížení nejméně na 60 % specifické aktivity zjištěné v kontrolním vzorku.

3.5 Určení množství fumaráthdratázy ve tkáni leiomyomů

K určení množství fumarázy bylo 30 μg buněčného lyzátu separováno pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Fumaráthdratáza byla detekována pomocí „Western blotu“ s následnou imunodetekcí. Jako kontrola množství nanášeného proteinu na gel byl použit protein β -aktin. Pro vyhodnocení intenzity signálu byl použit program AlphaEaseFC Stand Alone (Alpha Innotech). Intenzita signálu fumaráthdratázy byla vztažena na intenzitu signálu β -aktinu.

3.6 Statistická analýza

Pro testování kvantitativních parametrů (věk, počet myomů a velikost dominantního myomu) byl použit neparametrický test Mann-Whitneyův. Pro testování kvalitativních parametrů byl použit test závislost χ^2 (chí-kvadrát) a při malých četnostech Fisherův test. Hladina významnosti p byla považována za statisticky významnou při hodnotách menších nebo rovných 0,05.

Kapitola 4:

VÝSLEDKY

4 VÝSLEDKY

4.1 Základní charakteristika:

Do studie bylo zahrnuto 41 pacientek, u kterých došlo k rozvoji děložních myomů před 30. rokem života včetně. Základní charakteristiky zkoumané skupiny jsou uvedeny v tabulce 1. Kontrolní skupinu tvořilo 42 zdravých žen do 30 let s absencí děložního myomu.

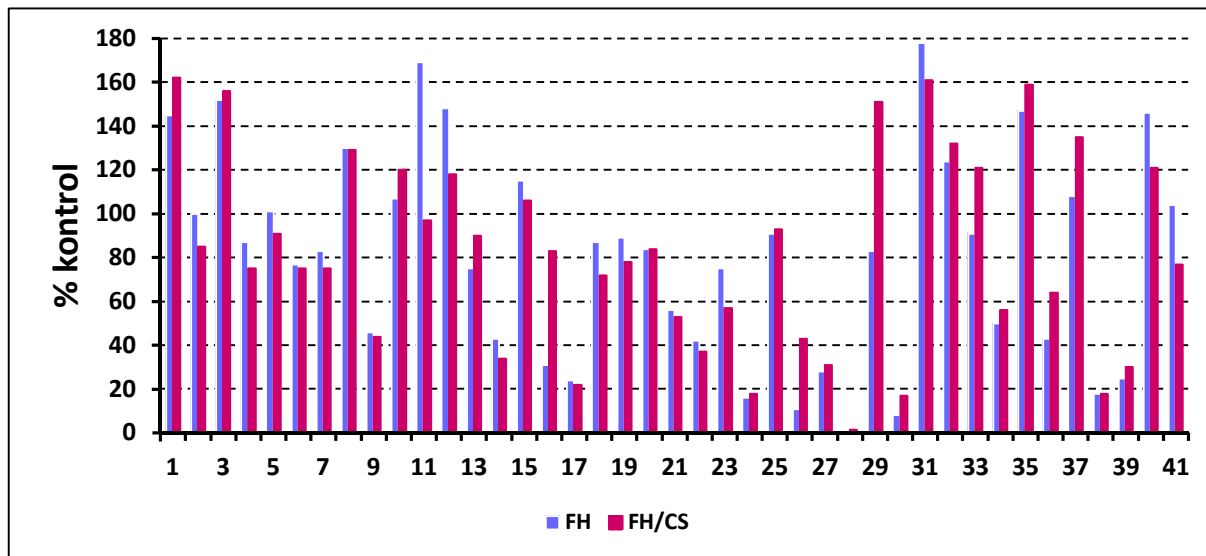
Tabulka 1: Základní charakteristika zkoumané skupiny

	Průměr ± SD
Věk v době diagnózy (roky)	27,5 ± 3,2
Počet myomů na pacientku	1,4 ± 1,1
Velikost dominantního myomu (mm)	62,6 ± 24,6

4.2 Aktivita fumaráthydratázy

Aktivita fumaráthydratázy a kontrolního enzymu citrátsyntázy byla změřena ve všech 41 vzorcích a byla porovnána s kontrolním souborem. Výrazná redukce aktivity fumarázy na 2-50 % kontrolních hodnot byla zaznamenána ve 14 (34,1%) vzorcích (vzorky č. 9, 14, 16, 17, 22, 24, 26, 27, 28, 30, 34, 36, 38, 39)- Obr. 3. Z těchto byl v 11 vzorcích dále snížen i poměr aktivit fumarázy ku citrátsyntáze na 1-44 % kontrol (vzorky č. 9, 14, 17, 22, 26, 27, 28, 30, 38, 39).

Obr. 3.: Aktivita fumarázy (FH), aktivita fumarázy normalizovaná na aktivitu kontrolního enzymu citrát syntézy (FH/CS) vyjádřená jako procento kontrol ve 41 vzorcích izolovaných lymfocytů



Pacientky byly dle výsledků aktivity fumarázy dále rozděleny do skupiny s normální aktivitou (skupina A) a sníženou aktivitou fumarázy (skupina B). Byla provedena analýza základních charakteristik těchto skupin spolu s osobní a rodinnou anamnézou pacientek se zaměřením na přítomnost symptomů spojených s děložními myomy a výskyt myomů v rodinné anamnéze u příbuzných 1. stupně (tabulka 2). Všechny sledované parametry, s výjimkou průměrného věku v době diagnózy, se statisticky významně nelišily.

Tabulka 2: Pacientky s normální a sníženou aktivitou fumaráthydratázy

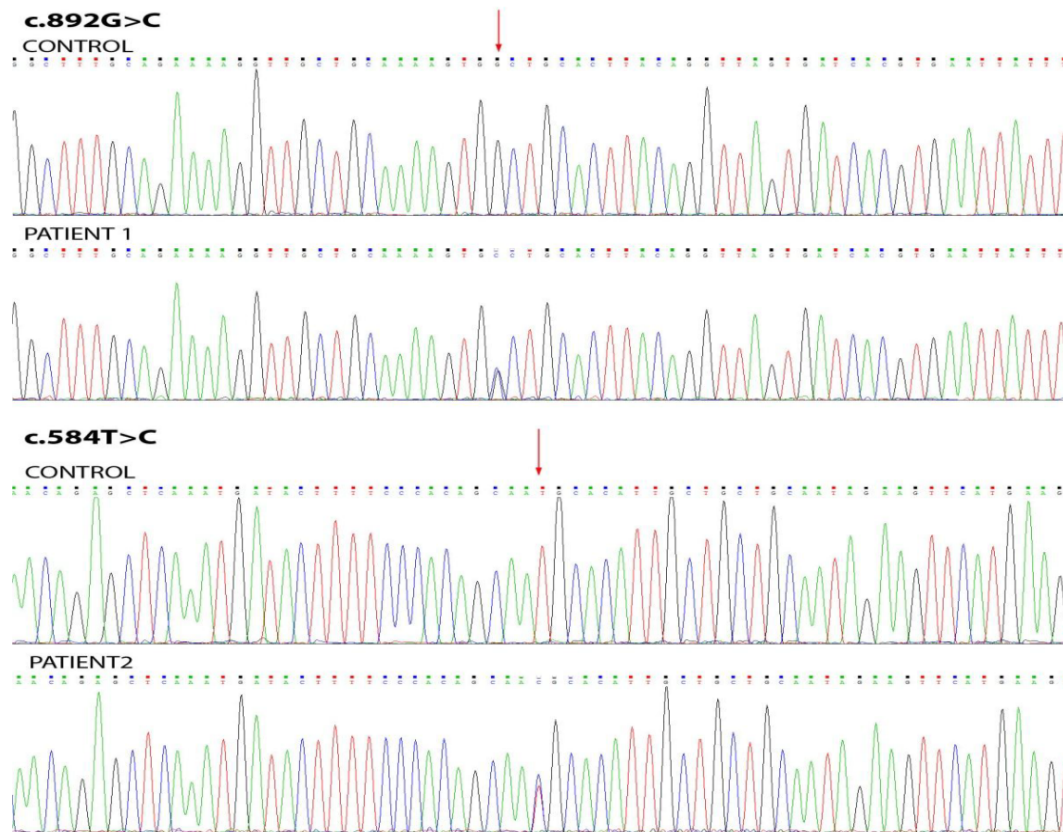
	Skupina A	Skupina B	<i>p</i>
Počet pacientek	n= 27	n= 14	
Věk v době diagnózy (průměr, roky)	26,7	29,0	0,024
Počet myomů (průměr)	1,4	1,2	0,921
Velikost dominantního myomu (průměr, mm)	64,9	58,2	0,121
Přítomnost symptomů před operací (%)	81,5	71,4	0,692
Přítomnost myomů u příbuzných 1. st (%)	55,6	35,7	0,228
Přítomnost kožní leiomyomatózy v rodinné anamnéze	0	0	nelze
Přítomnost renálního karcinomu v rodinné anamnéze	0	0	nelze

4.3 Mutační analýza

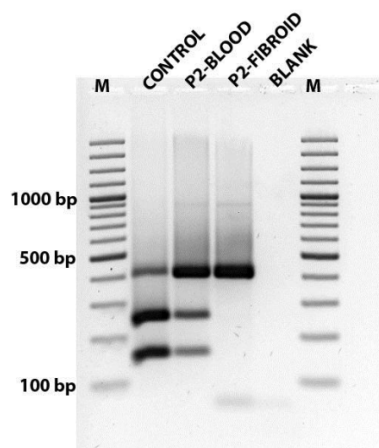
Ve všech 41 vzorcích izolovaných z krve byla provedena mutační analýza genu FH. Byly nalezeny 2 (4,9%) heterozygotní mutace genu FH (pacientky č. 14 a 16). U pacientky 14 byla identifikována nová, dosud nepopsaná mutace c.892G>C. Pacientka 14 měla děložní myomy diagnostikované ve věku 28 let. Na Gynekologicko-porodnické klinice VFN podstoupila v roce 2008 laparoskopické odstranění dvou myomů (50 mm intramurální myom zadní stěny děložní a 20 mm subserózní myom děložního fundu). Histologicky se jednalo o leiomyomy obvyklé struktury. U pacientky 16 byla nalezena dříve popsaná mutace c.584T>C (Obr. 4). Pacientka 16 měla ve věku 30 let diagnostikovanou mnohočetnou děložní myomatózu. Podstoupila otevřenou myomektomii, během které byly odstraněny dva dominantní (160 mm myom z fundu děložního a 65 mm myom přední stěny) a mnohočetné drobné intramurální myomy. Histopatologickým vyšetřením byly potvrzeny leiomyomy obvyklé struktury s místy regresivními změnami. V dostupném zbytku parafinem fixovaného děložního leiomyomu pacientky 16 byla nalezena mutace c.584T>C v homozygotním stavu, což naznačuje ztrátu heterozygotity v leiomyomu (Obr. 5). Mutační analýza FH byla také provedena u matek obou pacientek, u kterých byly prokázány shodné mutace.

Ve všech dostupných vzorcích DNA byly pomocí MLPA analýzy vyloučeny heterozygotní delece jednoho či více exonů genu FH.

Obr. 4: Identifikace germinálních mutací FH u pacientek 14 a 16.



Obr. 5: PCR-RFLP analýza u pacientky 16



Fragmenty o velikosti 249 bp a 150 bp odpovídají nemutované alele genu FH, fragment o velikosti 399 bp odpovídá mutované alele. Ve vzorku myomu nebyla nemutovaná alela detekována.

4.4 Stanovení aktivity fumaráthydratázy ve tkáni leiomyomů

U 22 pacientek (pacientky č. 9, 13, 17-21, 25-32, 34, 36-41; vzorky označeny jako 1_m-23_m), které byly do studie zařazeny prospektivně a podstoupily v letech 2009-2010 intervenci na Gynekologicko-porodnické klinice VFN a 1. LF UK, byl odebrán vzorek tkáně leiomyomu k vyšetření aktivity fumarázy a kontrolního enzymu citrátsyntázy. Jako kontrola byl použit vzorek leiomyomu pacientky ve věku 38 let. U 10 (45,5 %) z těchto pacientek byla předchozím vyšetřením zjištěna snížená aktivita fumarázy v lymfocytech a zároveň byla vyloučena germinální mutace FH.

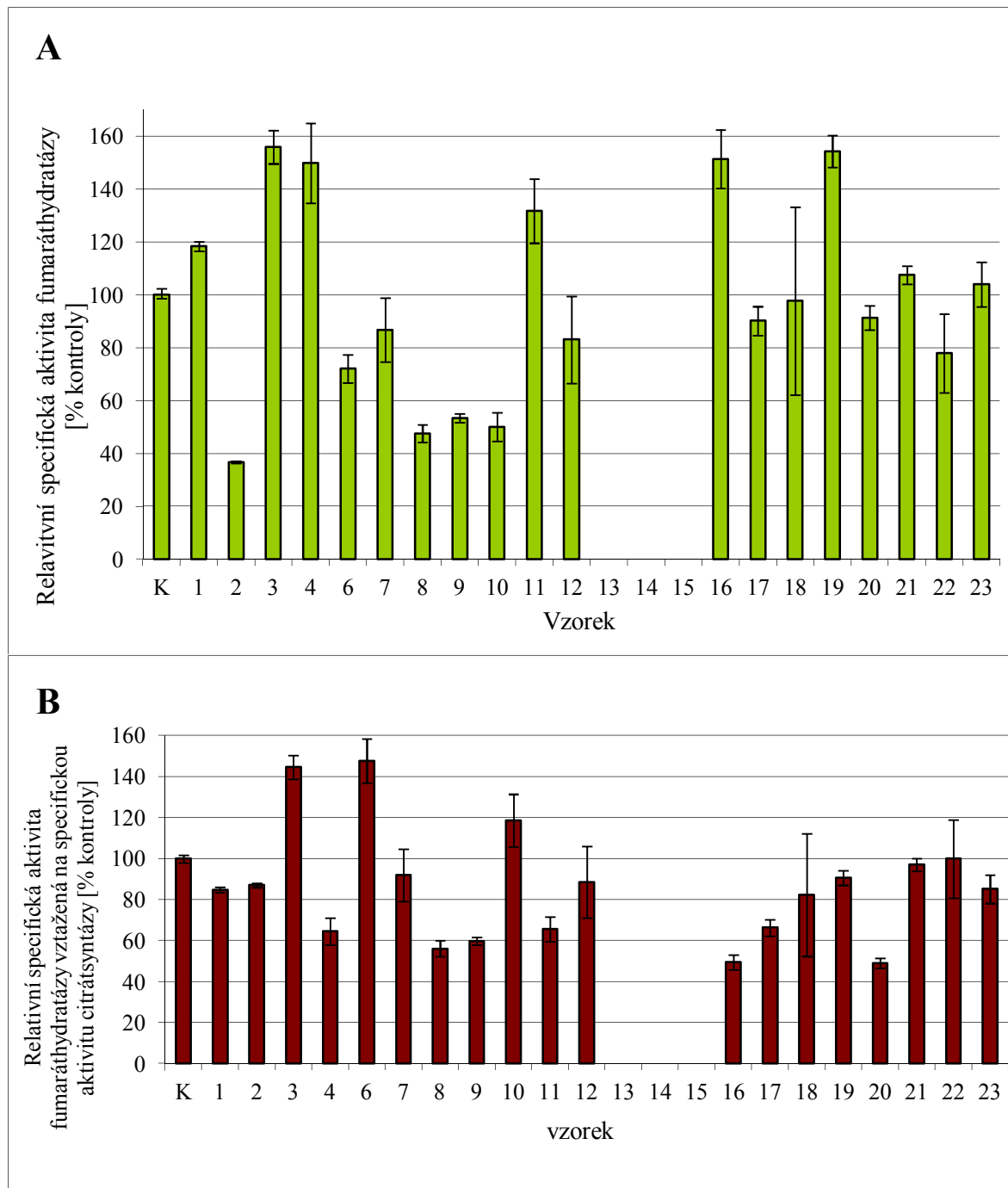
Výsledky analýzy jsou shrnuty v tabulce 3. Specifická aktivita fumaráthydratázy a aktivita fumaráthydratázy vztažená na specifickou aktivitu citrátsyntázy jsou znázorněny na obrázku 6.

Ke snížení aktivity fumarázy pod 60 % kontroly došlo, jak je patrné z obrázku 6A, ve vzorcích: 2_m, 8_m, 9_m a 10_m. Z obrázku 6B je patrné snížení poměru specifických aktivit fumarázy ku citrátsyntáze pod 60 % kontroly u vzorků: 8_m, 9_m, 16_m a 20_m. Ve vzorcích 13-15 nebyla aktivita fumarázy vůbec detekována, taktéž aktivita citrátsyntázy byla v těchto vzorcích na hranici rozlišovací schopnosti použité metody.

Tabulka 3: Hodnoty specifické aktivity fumaráthydratázy, citrátsyntázy, jejich poměr a aktivita fumarázy v lymfocytech u jednotlivých pacientek

vzorek	Specifická aktivita [nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹]*		Poměr specifických aktivit: fumaráthydratáza/ citrátsyntáza	Aktivita fumarázy v lymfocytech
	fumaráthydratáza	citrátsyntáza		
Kontrola	29,4	42,9	0,69	
1_m	34,8	59,5	0,59	<i>snížená</i>
2_m	10,8	18,0	0,60	<i>normální</i>
3_m	45,8	46,0	1,00	<i>snížená</i>
4_m	44,1	99,0	0,45	<i>normální</i>
6_m	21,2	20,8	1,02	<i>normální</i>
7_m	25,5	40,2	0,63	<i>normální</i>
8_m	14,0	36,1	0,39	<i>normální</i>
9_m	15,7	38,0	0,39	<i>normální</i>
10_m	14,7	18,0	0,78	<i>snížená</i>
11_m	38,7	85,7	0,45	<i>snížená</i>
12_m	24,4	40,0	0,61	<i>snížená</i>
13_m	0,0	0,0	0,00	<i>normální</i>
14_m	0,0	3,5	0,00	<i>snížená</i>
15_m	0,0	0,0	0,00	<i>normální</i>
16_m	44,5	130,1	0,34	<i>normální</i>
17_m	26,5	57,9	0,46	<i>snížená</i>
18_m	28,7	50,6	0,57	<i>snížená</i>
19_m	45,4	72,5	0,61	<i>normální</i>
20_m	26,9	79,3	0,34	<i>snížená</i>
21_m	31,6	47,2	0,67	<i>snížená</i>
22_m	22,9	33,2	0,69	<i>normální</i>
23_m	30,6	52,0	0,59	<i>normální</i>

Obr. 6: Specifická aktivita fumaráthydratázy (A) a specifická aktivita fumaráthydratázy vztažená na specifickou aktivitu citrátsyntázy



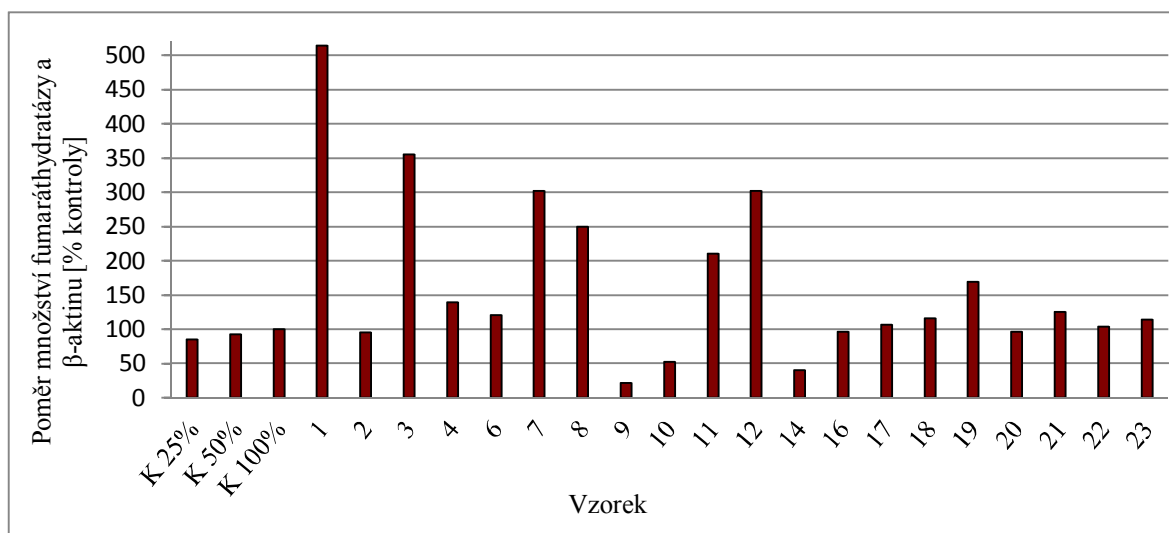
Na obrázku jsou vzorky myomů označeny čísly 1-23, kontrolní leiomyom označen jako K.

4.5 Stanovení množství fumaráthydratázy ve tkáni leiomyomů

Množství fumarázy ve vzorcích tkání vztažené na množství β -aktinu v procentech je znázorněno na obrázku 7. Obrázek 8 znázorňuje stanovení množství fumarázy pomocí elektroforézy. Ve vzorcích 13_m a 15_m byla intenzita signálu fumarázy a β -aktinu na hranici detekce použité metody a proto nebyla vyhodnocena.

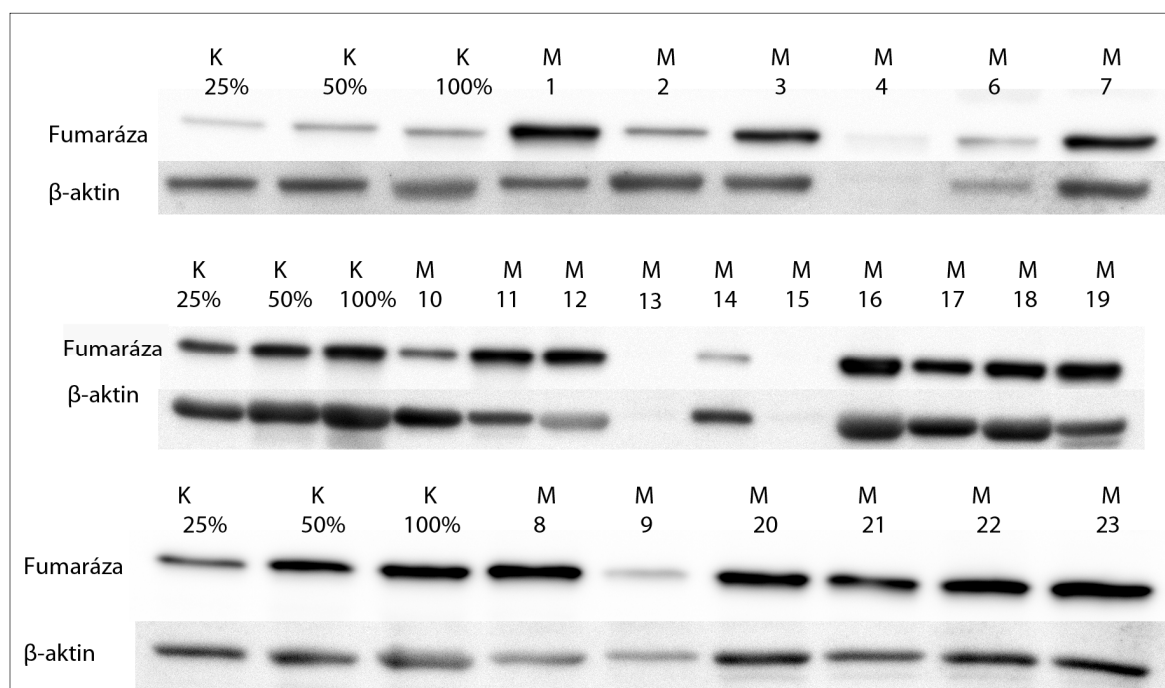
Výrazné snížení množství fumarázy vztažené na množství β -aktinu bylo pozorováno u vzorků 9_m, 10_m a 14_m. K nejvýznamnější redukci poměru fumarázy a β -aktinu vůči kontrole došlo ve vzorku 9_m, kde poměr dosáhl jen 22 % poměru kontroly.

Obr. 7: Poměr množství fumarázy a β -aktinu v procentech



Vzorky leiomyomů jsou označeny příslušných číslem. Kontrolní vzorek je označen K 25%, K 50% a K 100 %.

Obr. 8: stanovení množství fumarázy pomocí elektroforézy



Vzorky myomů jsou na obrázku označeny: M a příslušné číslo vzorku. Kontrolní vzorek je označen K 25%, K 50% a K 100 %.

4.6 Přehled leiomyomů se sníženou aktivitou fumaráthydratázy a sníženým množstvím fumaráthydratázy

Tabulka 4 uvádí přehled vzorků se sníženou aktivitou fumaráthydratázy vztaženou na specifickou aktivitu citrátsyntázy v leiomyomech, množstvím fumaráthydratázy v leiomyomech a aktivitu fumaráthydratázy stanovenou v lymfocytech izolovaných z periferní krve. Pouze u jedné pacientky (označena jako vzorek 9_m) bylo zaznamenáno výrazné snížení aktivity i množství fumaráthydratázy. U této pacientky byla také nalezena snížená aktivita fumaráthydratázy v lymfocytech. Vzorek 14_m nebyl do vyhodnocování zahrnut z důvodu nekrotického poškození tkáně.

Tabulka 4: Přehled vzorků se sníženou aktivitou a množstvím fumaráthydratázy a aktivita stanovená v lymfocytech u těchto pacientek

Leiomyom	Specifická aktivita fumaráthydratázy vztažená na specifickou aktivitu citrátsyntázy v leiomyomu [% kontroly]	Specifická aktivita fumaráthydratázy vztažená na specifickou aktivitu citrátsyntázy v lymfocytech [% kontroly]	Množství fumaráthydratázy v leiomyomu [% kontroly]
2	87	72	95
9	60	43	21
10	118	31	52
16	50	56	96
20	49	30	96

4.7 Histopatologické nálezy

U všech pacientek (97,6 %) s výjimkou jedné byla histopatologicky ověřena diagnóza benigního leiomyomu. U pacientky 34 (podskupina se sníženou aktivitou fumarázy v lymfocytech, vzorek leiomyomu 16_m) byl diagnostikován hladkosvalový nádor nejistého maligního potenciálu (STUMP). Tato pacientka však nebyla identifikována jako nosička mutace FH.

Kapitola 5:

DISKUZE

5 DISKUZE

Přes benigní biologickou povahu představují děložní myomy vzhledem k vysoké prevalenci u žen ve fertilním věku značný socioekonomický problém. Z tohoto důvodu je v současné době věnována studiu etiopatogeneze děložních myomů pozornost. Pokroku ve výzkumu bylo dosaženo zejména na poli cytogenetiky. Bylo prokázáno, že až 50 % děložních myomů vykazuje chromozomální odchylky (Ligon, 2008). Hypotéza genetického podkladu tohoto onemocnění byla také podpořena epidemiologickými daty. Bylo prokázáno, že příbuzní prvního stupně žen s děložními myomy mají 2,5 násobně zvýšené riziko vzniku děložní myomatózy a také byl prokázán vyšší výskyt děložních myomů u monozygotických dvojčat v porovnání s dvojčaty dizygotickými (Okolo, 2008; Hodge, 2007). Dalším důkazem o genetickém podkladu děložních myomů byl objev dvou vzácných autozomálně dominantních syndromů-MCUL1 a HLRCC způsobených heterozygotní germinální mutací FH.

Cytogenetické studie na rodinách postižených syndromem MCUL1/HLRCC prokázaly, že 71-93 % pacientů jsou nosiči mutace genu FH, penetrance mutací FH je tedy u postižených jedinců vysoká (Alam 7/2005; Perrier- Trudova, 2011; Toro, 2003; Wei, 2006). V důsledku zárodečné mutace FH byla v lymfocytech postižených jedinců nalezena snížená aktivita fumarázy (Alam 9/2005; Hodge, 2007; Pithukpakorn , 2006; Tomlinson, 2002). Studie publikovaná v roce 2008 zahrnující 105 žen z rodin s výskytem syndromu HLRCC poukázala na nižší střední věk výskytu děložních myomů u žen při pozitivitě germinální mutace FH (FH_{mut} -pozitivní, střední věk 28 let) ve srovnání s FH_{mut} - negativními ženami (38 let) (Stewart, 2008).

Relativně málo prací se věnovalo určení frekvence výskytu mutací FH u sporadických děložních myomů (Barker, 2002; Barker, 2006; Kiuru, 2002; Lehtonen, 2004). Kiuru a kol. provedli mutační analýzu 41 vzorků děložních leiomyomů a 53 sarkomů (extra- i uterinních). Ve zkoumaných vzorcích děložních myomů nebyla identifikována žádná mutace FH, v jednom vzorku děložního sarkomu u pacientky ve věku 32 let byly identifikovány dvě mutace FH a jedna z nich byla nalezena i ve zdravé tkáni (Kiuru, 2002). Ve studii z roku 2006 Barker a kol. na 45 vzorcích děložních myomů od pacientek ve věku 32-53 let (průměrný věk 42 let) popsali jeden případ snížení aktivity fumarázy, zároveň byla nalezena jedna germinální mutace FH a alelická ztráta nemutované alely (Barker, 2006). Práce stejných autorů z roku 2002 na 129 vzorcích děložních myomů od 21 pacientek prokázala v sedmi případech ztrátu

heterozygoty v oblasti kódující gen FH, somatická mutace však v těchto případech odhalena nebyla (Barker, 2002). Obdobné výsledky přinesla i práce Lehtonena a kol., na 153 vzorcích myomů od 46 pacientek se podařilo identifikovat ztrátu heterozygoty v pěti případech, mutační analýzou však byly odhaleny jen dvě somatické mutace FH (Lehtonen, 2004).

Barker a kol. předpokládají, že germinální mutace FH by mohly způsobovat až 5 % sporadických myomů (Barker, 2006). Studie symptomů MCUL1/HLRCC zároveň odhalila, že 7 % FH_{poz} pacientek vykazuje děložní myomy jako jediný klinický projev tohoto syndromu a 9 % pacientů je klinicky zcela němých (Alam, 7/2005).

Náš soubor je unikátní v tom, že doposud nebyla publikována práce zaměřená na systematickou analýzu výskytu mutací FH u mladých pacientek (do 30 let věku včetně) s diagnózou sporadických děložních myomů a absencí ostatních klinických projevů syndromu MCUL1/HLRCC v osobní a rodinné anamnéze. V našem souboru 41 pacientek byla u 14 (34,1 %) pacientek v lymfocytech prokázána snížená aktivita FH, u 11 z nich byl snížen i poměr aktivit fumaráthydratázy a kontrolního enzymu citrátsyntázy. U těchto pacientek bude dále provedena mutační analýza promotoru genu FH a analýza cDNA na přítomnost možných nestříhových mutací lokalizovaných v intronech genu.

U dvou pacientek ze souboru (4,9 %) byly identifikovány somatické heterozygotní mutace FH.

V případě pacientky 14 se jednalo o novou, dosud nepopsanou mutaci c.892G>C, která vede k záměně vysoce konzervovaného Ala298 na Pro. Mutace p.Ala298Pro je lokalizována v blízkosti aktivního místa enzymu a pravděpodobně negativně ovlivňuje katalytický mechanismus (Picaud, 2011).

U druhé pacientky byla nalezena mutace c.584T>C dříve popsaná v rodině s hereditární leiomyomatózou (Toro, 2003). Mutace má za následek aminokyselinovou záměnu p.Met195Thr, která je lokalizovaná v centrálních helixech a má vliv na stabilitu enzymu, protože ruší intrapodjednotkové interakce (Picaud, 2011). V dostupném parafínem fixovaném vzorku leiomyomu byla mutace c.584T>C přítomná v homozygotním stavu, naznačujícím ztrátu heterozygoty v leiomyomu, která je v souladu s hypotézou aktivace pseudohypoxické odpovědi, umožňující růstovou výhodu buněk s deficitem fumarázy (Lehtonen, 2004). Parafínem fixovaný vzorek myomu u pacientky 14 bohužel nebyl dostatečný k provedení mutační analýzy FH ve tkáni leiomyomu.

Obě pacientky zdědily mutace genu FH od svých matek, u kterých také došlo k rozvoji děložních myomů okolo 30. roku života a nebyl u nich zaznamenán výskyt ostatních symptomů MCUL1/HLRCC.

Nejzávažnější riziko pro nosiče mutace FH představuje nebezpečí vzniku renálního papilárního karcinomu. Celkové riziko vzniku renálního papilárního karcinomu je však mezi rodinami postiženými HLRCC relativně nízké (2-6 %). Renální papilární karcinom vykazuje hormonální závislost, jeho růst je pravděpodobně ovlivňován ovariálními steroidy a je tedy častější u jedinců ženského pohlaví. Dosud neexistuje konsensus ohledně doporučeného screeningu nosičů mutace FH na přítomnost renálního karcinomu. Renální papilární karcinom se při ultrazvukovém vyšetření může zobrazovat jako izoechogenní ložisko, metodou volby je tedy vyšetření pomocí CT či MRI. Proti pravidelnému screeningu hovoří relativně vysoká radiační zátěž při CT vyšetření nebo zátěž ekonomická v případě MRI (Alam, 7/2005). Argumentem pro screening je především vysoká mortalita pokročilého onemocnění, ale dobrá odpověď na léčbu při zachytu počátečních stádií (Lehtonen, 2004). Alam a kol. tedy doporučují pravidelný screening v případě výskytu renálního papilárního karcinomu v rodině nosičů mutace FH.

Histopatologické vyšetření děložních myomů u pacientek se syndromem MCUL1/HLRCC nejčastěji prokazuje benigní leiomyom (Alam, 7/2005). Práce publikovaná v letošním roce poukazuje na častější výskyt buněčných atypií či zvýšenou celularitu vzorků, žádný ze zkoumaných myomů však nesplňoval kriteria malignity (Sanz-Ortega, 2013). Skupina finských autorů se zabývala případnou úlohou FH v iniciaci maligní transformace leiomyomů. Ve studii publikované roku 2006 na vzorcích 67 sporadických leiomyosarkomů u žen mladších 45 let byla prokázána germinální mutace FH pouze v 1 (1,5 %) případě (Ylisaukko-Oja, 2006). V našem souboru byl u většiny pacientek diagnostikován benigní leiomyom. Jedinou výjimkou byla pacientka s diagnózou STUMP. Aktivita fumarázy v lymfocytech i v tkáni leiomyomu u této pacientky byla snižena, pacientka však byla vyloučena jako nosička germinální mutace FH.

Porovnání věku, výskytu symptomů, velikosti dominantního myomu, počtu myomů a rodinné anamnézy skupin pacientek s normální a sníženou aktivitou fumarázy nevedlo k identifikaci diferenciačního parametru. Ve sledovaných parametrech se, s výjimkou věku v době diagnózy, skupiny mezi sebou statisticky významně nelišily. Věk v době diagnózy

myomů byl paradoxně statisticky významně nižší ve skupině s normální aktivitou fumarázy, statistická analýza však byla limitována velikostí vzorku.

Ve 22 vzorcích myomové tkáně bylo provedeno stanovení aktivity a množství fumarázy. Vzorky 13-15 nebyly do vyhodnocování zahrnuty, protože aktivity fumaráthydratázy ani citrátsyntázy nebyly vůbec detekovány. Množství fumarázy a β -aktinu bylo velmi nízké nebo na hranici detekce použité metody a v tkáních těchto tří vzorků leiomyomů byly navíc patrné známky nekrózy. Nulová aktivita a snížené množství fumaráthydratázy v těchto vzorcích byly pravděpodobně způsobeny rozsáhlým nekrotickým poškozením těchto tkání.

Ve vzorcích 2_m a 10_m byla snížená specifická aktivita fumarázy i specifická aktivita citrátsyntázy a výsledný poměr specifických aktivit byl srovnatelný nebo dokonce vyšší než u kontrolního vzorku, což může být způsobeno heterogenitou tkáně. Zřejmě byl v těchto tkáních jiný poměr buněk a vaziva než v kontrolním vzorku. Snížení množství fumarázy a specifických aktivit ve vzorku 10_m by mohlo být také dáno menším množstvím mitochondriálních proteinů ve vzorku. Fakt, že ve vzorcích 16_m a 20_m je poměr specifických aktivit redukován pod 60 % kontroly, přestože specifická aktivita fumarázy ve vzorcích snížena nebyla, je zřejmě také způsoben heterogenitou tkáně.

Ve vzorcích 8_m a 9_m byla specifická aktivita fumarázy zmenšena na cca polovinu, zatímco specifická aktivita citrátsyntázy byla téměř srovnatelná s kontrolním vzorkem. Výsledný poměr specifických aktivit fumarázy a citrátsyntázy je tedy 55-60 % poměru specifických aktivit kontrolního vzorku. Ve vzorku 9_m je dále patrné i snížení množství fumarázy. U vzorku 9_m byla vyloučena germinální mutace v exonech genu FH pomocí sekvenační analýzy v lymfocytech pacientky.

Nosiči mutací genu FH mohou být jednoduše detekováni pomocí měření aktivity fumarázy v lymfocytech izolovaných z periferní krve. Obě pacientky s mutací FH měly sníženou aktivitu fumarázy v lymfocytech, pouze pacientka 14 měla snížený poměr aktivity fumaráthydratázy vztážený ke kontrolnímu enzymu citrátsyntáze. V případě pacientky 16 byl vzorek periferní krve hemolytický, což mohlo ovlivnit aktivitu kontrolního enzymu. Otázkou do budoucna zůstává vhodnost použití citrátsyntázy jako kontrolního enzymu při stanovení aktivity fumaráthydratázy. Na posouzení vhodnosti kombinace využívaných enzymů je ovšem zapotřebí více pozitivních vzorků.

Kapitola 6:

ZÁVĚR

6 ZÁVĚR

Naše práce jako první systematicky analyzuje frekvenci výskytu mutací genu pro fumaráthydratázu u mladých pacientek se sporadickými myomy, tedy u pacientek, u nichž se v osobní a rodinné anamnéze nevyskytují další projevy syndromu MCUL/HLRCC. Námi prokázaná frekvence výskytu mutací FH dosahovala 4,9 %. Tento výsledek je v korelaci s dříve publikovanými daty výskytu mutací tohoto genu u žen s děložními myomy bez použití věkové hranice. Mutace FH byly popsány u 2 pacientek, jednalo se o jednu mutaci již dříve popsanou a jednu zatím nepublikovanou. V případě již dříve popsané mutace byla ve tkáni leiomyomu prokázána ztráta heterozigosity, což je ve shodě s hypotézou o pseudohypoxémické odpovědi. Zároveň jsme studií potvrdili, že nosiči heterozygotních mutací FH mohou být snadno zachyceni pomocí vyšetření aktivity fumarázy v lymfocytech.

Vzhledem k možné asociaci mutací FH s výskytem renálního karcinomu je nutná obezřetnost zejména u pacientek s velmi symptomatickými děložními myomy vyskytujícími se v mladém věku, zejména pokud získáme údaj o diagnóze kožní leiomyomatózy u pacientky či rodinných příslušníku a výskytu renálního karcinomu v rodinné anamnéze. Tyto pacientky jsou indikovány k mutační analýze FH a pravidelnému screeningu na renální karcinom. U pacientek se sporadickými myomy, které jsou nosičky mutace FH bez výskytu renálního papilárního karcinomu v rodinné anamnéze, je riziko vzniku renálního karcinomu relativně nízké a každoroční vyšetření pomocí CT by pro ně představovalo nemalou radiační zátěž, není tedy zatím doporučováno. Otázkou do budoucna zůstává, zda při předpokládané hormonální závislosti tohoto karcinomu a popsaném vyšším výskytu u jedinců ženského pohlaví, neindikovat u nošiček mutace FH pravidelné screeningové vyšetření pomocí MRI.

Kapitola 7:
LITERATURA

7 LITERATURA

1. Agdi M, Tulandi T. Endoscopic management of uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008;22:707-16.
2. Alam NA, Rowan AJ, Wortham NC, et al. Genetic and functional analyses of FH mutations in multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis, hereditary leiomyomatosis and renal cancer, and fumarate hydratase deficiency. *Hum Mol Genet.* 2003;12:1241-52.
3. Alam NA, Barclay E, Rowan AJ, et al. Clinical features of multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis: an underdiagnosed tumor syndrome. *Arch Dermatol.* 2005 Feb;141:199-206.
4. Alam NA, Olpin S, Leigh IM. Fumarate hydratase mutations and predisposition to cutaneous leiomyomas, uterine leiomyomas and renal cancer. *Br J Dermatol.* 2005 Jul;153:11-7.
5. Alam NA, Olpin S, Rowan A, et al. Missense mutations in fumarate hydratase in multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis and renal cell cancer. *J Mol Diagn.* 2005 Oct;7:437-43.
6. Barker KT, Bevan S, Wang R, et al. Low frequency of somatic mutations in the FH/multiple cutaneous leiomyomatosis gene in sporadic leiomyosarcomas and uterine leiomyomas. *Br J Cancer.* 2002;87:446-8.
7. Barker KT, Spendlove HE, Banu NS, et al. No evidence for epigenetic inactivation of fumarate hydratase in leiomyomas and leiomyosarcomas. *Cancer Lett.* 2006;235:136-40.
8. Bardella C, Olivero M, Lorenzato A. Cells lacking the fumarase tumor suppressor are protected from apoptosis through a hypoxia-inducible factor-independent, AMPK-dependent mechanism. *Mol Cell Biol.* 2012;32:3081-94.
9. Bratby MJ, Belli AM. Radiological treatment of symptomatic uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008;22:717-34.
10. Deschauer M, Gizatullina Z, Schulze A, et al. Molecular and biochemical investigations in fumarase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2006;88:146-52.
11. Donnez J, Tomaszewski J, Vázquez F, et al. Ulipristal acetate versus leuprolide acetate for uterine fibroids. *N Engl J Med.* 2012;366:421-32.

12. Dundr P. Histopatologická klasifikace leiomyocelulárních nádorů. In MÁRA, M. Děložní myomy: Moderní diagnostika a léčba. Praha: *Grada Publishing*. 2009. 231 s. ISBN 978-80-247-1854-5.
13. Eng C, Kiuru M, Fernandez MJ, et al. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:193-202.
14. Fleischer R, Weston GC, Vollenhoven BJ, et al. Pathophysiology of fibroid disease: angiogenesis and regulation of smooth muscle proliferation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2008;22:603-14.
15. Gupta S, Jose J, Manyonda I. Clinical presentation of fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2008;22:615-26.
16. Hardie DG. AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. *Diabetes*. 2013;62:2164-72.
17. Henning Y; Deichert U; Bonk U., et al. Chromosomal translocations affecting 12q14-15 but not deletions of the long arm of chromosome 7 associated with a growth advantage of uterine smooth muscle cells. *Molecular human reproduction*. 1999;5:1150-4.
18. Hodge JC, Morton CC. Genetic heterogeneity among uterine leiomyomata: insights into malignant progression. *Hum Mol Genet*. 2007;16 Spec No 1:R7-13.
19. Hodge Jc, Park PJ, Dreyfuss JM, et al. Identifying the molecular signature of the interstitial deletion 7q subgroup of uterine leiomyomata using a paired analysis. *Genes, chromosomes & cancer*. 2009;48:865-85.
20. Holub Z/I. Epidemiologie a etiopatogeneze děložních myomů. In Mára, M. Děložní myomy: Moderní diagnostika a léčba. Praha: *Grada Publishing*. 2009. 231 s. ISBN 978-80-247-1854-5.
21. Holub Z/II. Myomy a fertilita, těhotenství a porod. In Mára, M. Děložní myomy: Moderní diagnostika a léčba. Praha: *Grada Publishing*. 2009. 231 s. ISBN 978-80-247-1854-5.
22. Istre O. Management of symptomatic fibroids: conservative surgical treatment modalities other than abdominal or laparoscopic myomectomy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2008;22:735-47.
23. Kiuru M, Lehtonen R, Arola J, et al. Few FH mutations in sporadic counterparts of tumor types observed in hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer families. *Cancer Res*. 2002;62:4554-7.

24. Khaund A, Lumsden MA. Impact of fibroids on reproductive function. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008;22:749-60.
25. Ligon AH, Morton, CC. Leiomyomata: heritability and cytogenetic studies. *Human reproduction update.* 2008;22:603-14.
26. Lehtonen R, Kiuru M, Vanharanta S, et al. Biallelic inactivation of fumarate hydratase (FH) occurs in nonsyndromic uterine leiomyomas but is rare in other tumors. *Am J Pathol.* 2004;164:17-22.
27. Mára M/I. Expektační postup. In Mára, M. Děložní myomy: Moderní diagnostika a léčba. Praha: *Grada Publishing.* 2009. 231 s. ISBN 978-80-247-1854-5.
28. Mára M/II. Možnosti farmakologické léčby myomů. In Mára, M. Děložní myomy: Moderní diagnostika a léčba. Praha: *Grada Publishing.* 2009. 231 s. ISBN 978-80-247-1854-5.
29. Mára M/III. Laparoskopická myomektomie. In Mára, M. Děložní myomy: Moderní diagnostika a léčba. Praha: *Grada Publishing.* 2009. 231 s. ISBN 978-80-247-1854-5.
30. Mara M, Kubinova K, Maskova J, et al. Uterine artery embolization versus laparoscopic uterine artery occlusion: the outcomes of a prospective, nonrandomized clinical trial. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2012;35:1041-52.
31. Mark J, Havel G; Grepp C, et al. Chromosomal patterns in human benign uterine leiomyomas. *Cancer genetics and cytogenetics.* 1990;44:1-13.
32. Meloni AM, Surti U, Contello AM, et al. Uterine leiomyomas : cytogenetic and histologic profile. *Obstetrics and gynecology.* 1992;80:209-17.
33. Metwally M, Cheong YC, Horne AW. Surgical treatment of fibroids for subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;11:CD003857.
34. McLucas B. Diagnosis, imaging and anatomical classification of uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008;22:627-42.
35. O'Flaherty L, Adam J, Heather LC, et al. Dysregulation of hypoxia pathways in fumarate hydratase-deficient cells is independent of defective mitochondrial metabolism. *Hum Mol Genet.* 2010;19:3844-51.
36. Okolo S. Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008;22:571-88.
37. Olive DL, Pritts EA. Fibroids and reproduction. *Semin Reprod Med.* 2010;28:218-27.
38. Othman EE, Al-Hendy A. Molecular genetics and racial disparities of uterine leiomyomas. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2008;22:589-601.

39. Ozisik YY, Meloni AM, Altungoz O, et al. Translocation (6;10)(p21;q22) in uterine leiomyomas. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1995;79:136-8.
40. Parker W. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertility and sterility*. 2007;87:725-36.
41. Perrier-Trudova V, Rustin P, Barrois M, et al. French National Cancer Institute "Inherited predisposition to kidney cancer" network. Novel FH mutations in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) and patients with isolated type 2 papillary renal cell carcinoma. *J Med Genet*. 2011;48:226-34.
42. Pithukpakorn M, Wei MH, Toure O, et al. Fumarate hydratase enzyme activity in lymphoblastoid cells and fibroblasts of individuals in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *J Med Genet*. 2006;43:755-62.
43. Picaud et al. Structural basis of fumarate hydratase deficiency. *J Inherit metab Dis*. 2011;34:671-6.
44. Rein MS, Powell WL, Walters FC., et al. Cytogenetic abnormalities in uterine myomas are associated with myoma size. *Molecular human reproduction*. 1998;4:83-6.
45. Reeves R. Molecular biology of HMGA proteins : hubs of nuclear function. *Gene*. 2001;277:63-81.
46. Sanz-Ortega J, Vocke C, Stratton P, et. al, Morphologic and molecular characteristics of uterine leiomyomas in hereditary leiomyomatosis and renal cancer (HLRCC) syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2013;37:74-80.
47. Stewart L, Glenn GM, Stratton P, et al. Association of germline mutations in the fumarate hydratase gene and uterine fibroids in women with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *Arch Dermatol*. 2008;144:1584-92.
48. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nature Genetics*. 2002;30:406-10.
49. Toro JR, Nickerson ML, Wei MH, Warren MB, Glenn GM, Turner ML 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.
50. Wei MH, Toure O, Glenn GM, et al. Novel mutations in FH and expansion of the spectrum of phenotypes expressed in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *J Med Genet*. 2006;43:18-27.

51. Xing YP, Powell WL, Morton CC. The del(7q) subgroup in uterine leiomyomata : genetic and biologic characteristics. Further evidence for the secondary nature of cytogenetic abnormalities in the pathobiology of uterine leiomyomata. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1997;98:69-74.
52. Ylisaukko-Oja SK, Kiuru M, Lehtonen HJ, et al. Analysis of fumarate hydratase mutations in a population-based series of early onset uterine leiomyosarcoma patients. *Int J Cancer*. 2006;119:283-7.
53. Yogev O, Yogev O, Singer E, et al. Fumarase: a mitochondrial metabolic enzyme and a cytosolic/nuclear component of the DNA damage response. *PLoS Biol*. 2010 9;8:e1000328.
54. Yogev O, Naamati A, Pines O. Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions. *FEBS J*. 2011;278:4230-42.

Kapitola 8:

VLASTNÍ PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU

8 VLASTNÍ PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

S IF:

1. **Kubínová K**, Tesarova M, Hansikova H, et al. Fumarate hydratase gene mutation in two young patients with sporadic uterine fibroids. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013;39:410-4 (**IF 0.94**).
2. **Kubínová K**, Mara M, Horak P, et al. Reproductive outcome after myomectomy: comparison of patients with and without second look hysteroscopy and laparoscopy. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2012;21:118-24 (**IF 1,33**).
3. Horak P, Mara M, Dundr P, **Kubínová K**, et al. Effect of a selective progesterone receptor modulator on induction of apoptosis in uterine fibroids in vivo. *Int J Endocrinol.* 2012 ;2012:436174. (**IF 1,867**).
4. Mara M, **Kubínová K**, Maskova J, et al. Uterine artery embolization versus laparoscopic uterine artery occlusion: the outcomes of a prospective, nonrandomized clinical trial. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2012;35:1041-52 (**IF 2.09**).

Bez IF

1. **Kubínová K**, Mára M, Horák P, et al. Genetické faktory v etiopatogeni děložních myomů. *Ceska Gynekol.* 2012;77:58-60.
2. **Kubínová K**, Mára M, Novotná M, et al. Laparoskopická konzervativní léčba děložních myomů. *Ceska Gynekol.* 2012;77:326-30.