

# Ekspresja genu czynnika wzrostowego fibroblastów w mięśniakach macicy

## Fibroblast growth factor gene expression in uterine leiomyomas

Wolańska Małgorzata<sup>1</sup>, Bańkowska-Guszczyn Emilia<sup>1</sup>, Jaworski Stefan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

<sup>2</sup> Klinka Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

### Streszczenie

**Cel pracy:** Celem pracy jest ocena ekspresji genów czynnika wzrostowego fibroblastów kwaśnego (aFGF) oraz zasadowego (bFGF), ocena ich zawartości oraz aktywności kolagenolitycznej w przebiegu wzrostu masy mięśniaków.

**Materiał i metody:** Materiałem były operacyjnie wyluszczone, małe (do 10g) i duże (powyżej 100g) mięśniaki trzonu macicy. Stosowano metody RT-PCR, zymografię oraz metodę immunoenzymatyczną (ELISA).

**Wyniki:** Wykazano wzrost ekspresji genu aFGF, nasilenie aktywności kolagenolitycznej oraz wzrost zawartości FGF w przebiegu wzrostu masy mięśniaków.

**Wnioski:** Przemianie myometrium w kierunku mięśniaka i wzrostowi jego masy towarzyszy nasilenie ekspresji genu aFGF. Wzrost aktywności kolagenolitycznej sprzyja uwalnianiu obu izoform FGF z kompleksów ze składnikami macierzy pozakomórkowej.

Słowa kluczowe: **czynnik wzrostu fibroblastów / mięśniak macicy /**

### Summary

**Objectives:** The aim of the study was the evaluation of acidic and basic FGF expression, as well as collagenolytic activity in human uterine leiomyomas at various stages of tumour growth.

**Material and Methods:** Studies were performed on human myometrium and uterine leiomyomas of various weights (small: i.e. less than 10 g, and large: i.e. more than 100 g). The RT-PCR method was used to determine the acidic and basic FGF mRNA levels. The content of both FGF was evaluated by immunoenzymatic method (ELISA). The collagenolytic activity was detected by zymography.

**Results:** A distinct increase in the expression of aFGF, the amounts of both FGFs, and collagenolytic activity was observed during the tumour growth.

**Conclusions:** Myometrium conversion into leiomyoma and an increase in its mass is accompanied by a significant increase in aFGF gene expression. The collagenolytic activity elevation favours a release of both FGF isoform from complexes with extracellular matrix components.

Key words: **fibroblast growth factor / leiomyoma /**

### Adres do korespondencji:

Małgorzata Wolańska  
Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,  
ul. Mickiewicza 2c, 15-089 Białystok,  
tel. 085 748 56 10,  
e-mail: ma.wolanska@interia.pl

Otrzymano: 28.06.2008  
Zaakceptowano do druku: 28.07.2008

## Wstęp

Do najlepiej poznanych czynników wzrostowych fibroblastów należą: kwaśny FGF (aFGF) oraz zasadowy FGF (bFGF) [1, 2]. Czynniki te wykazują wielokierunkową aktywność biologiczną. Odgrywają kluczową rolę w przebudowie tkanek, pobudzają podziały i chemotaksję komórek oraz ich różnicowanie.

Jednocześnie czynniki wzrostowe wpływają na ekspresję wielu genów zarówno enzymów związanych z procesami syntezy, jak i degradacji składników macierzy pozakomórkowej. W ten sposób czynniki wzrostowe mogą kontrolować metabolizm macierzy, a tym samym zawartość jej składników [3, 4].

Macierz pozakomórkowa jest rezerwuarem FGF, reguluje jego biodostępność. Czynniki te pozostają w kompleksach z proteoglikanami, zawierającymi siarczany heparanu. Uwolnienie czynnika wzrostowego z kompleksów umożliwia połączenie ze swoistym receptorem i przekazanie sygnału do wnętrza komórki, co skutkuje wzrostem ekspresji różnych genów, konsekwencją czego może być zmiana metabolizmu. Degradacja macierzy przy udziale licznych metaloproteinaz powoduje uwalnianie czynników wzrostowych ze wspomnianych kompleksów [5, 6, 7].

Nasze wcześniejsze badania wykazały, że w przebiegu wzrostu mięśniaków dochodzi do akumulacji peptydowych czynników wzrostowych, takich jak IGF-I, EGF, PDGF, TGF- $\beta$  czy FGF [8, 9, 10, 11].

Zawartość niektórych zwiększa się wraz ze wzrostem masy mięśniaków, co niewątpliwie sprzyja rozrostowi mięśniaków. Zasadniczy wpływ na ilość peptydowego czynnika wzrostowego w tkance odgrywa proces ekspresji kodującego go genu. Wzrost mRNA najczęściej skutkuje wzrostem zawartości konkretnego białka – czynnika wzrostowego.

## Cel pracy

Macierz pozakomórkowa jest rezerwuarem peptydowych czynników wzrostowych, które dopiero po uwolnieniu przejawiają swoją aktywność biologiczną.

Zatem zasadnym i interesującym wydaje się być ocena ekspresji genów aFGF i bFGF oraz ocena aktywności kolagenolitycznej w przebiegu wzrostu mięśniaków macicy.

## Materiał i metody

### 1. Materiał tkankowy

Materiałem do badań były operacyjnie usuwane mięśniaki macicy: małe – o masie do 10g (n-12) oraz mięśniaki duże, których masa przekraczała 100g (n-12).

Materiał uzyskiwano po amputacji nadpochwowej trzonu macicy lub po całkowitym jej usunięciu. Mięśniaki były poddane ocenie histologicznej, do badań kwalifikowano mięśniaki gładkokomórkowe (*leiomyomata*), które cechowały się indeksem mitotycznym poniżej 5, brakiem martwicy i nieznamienną atypią.

Materiałem kontrolnym były fragmenty niezmiennionej mięśniakowato macicy, usuwanej z innych przyczyn klinicznych (n-10). Badany materiał pochodził od pacjentek operowanych z różnych wskazań medycznych w Klinice Ginekologii UMB. Od wszystkich kobiet materiał pobierano w fazie proliferacyjnej cyklu miesięcznego.

Na przeprowadzone badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

### 2. Ocena zawartości aFGF i bFGF

Zawartość badanych czynników wzrostowych oceniano przy pomocy metody immunoenzymatycznej (ELISA), stosując gotowe zestawy firmy R&D Systems, USA oraz procedury zalecane przez producenta w załączonych instrukcjach.

### 3. Ocena aktywności kolagenolitycznej

Aktywność kolagenolityczną oceniano metodą zymografii [12]. Ekstrakty tkankowe poddawano elektroforezie na 10% żelu poliakrylamidowym, zawierającym żelatynę w stężeniu 1,5mg na ml żelu. Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu prądu 150V [13]. Po jej zakończeniu usuwano SDS poprzez inkubację żelu w 2% roztworze Triton X-100, w temperaturze 37°C, przez 30min., a następnie w 0,05M buforze Tris-HCl, o pH 8,0 zawierającym 0,005M CaCl<sub>2</sub>. Żele barwiono 1% roztworem Coomassie Brilliant Blue R-250.

### 4. Ocena ekspresji genu

Ocenę ekspresji genów aFGF, bFGF oraz  $\beta$ -aktyny - jako kontroli ekspresji białek, przeprowadzono metodą RT-PCR. RNA izolowano przy pomocy odczynnika Trizol TRI Reagent według instrukcji dostarczonej przez producenta. Próbkę 3 $\mu$ g RNA użyto do reakcji odwrotnej transkrypcji przy pomocy RevertAid™ First Stand cDNA Synthesis Kit i starterów oligo(dT)<sub>18</sub>. Próbkę cDNA o objętości 10 $\mu$ l poddano reakcji PCR w aparacie Master Cycler Gradient (Eppendorf) z zastosowaniem specyficznych starterów (aFGF 5'-CAAACTCCTCTACTGTA-GCAACGGG-3' sens, 5'-TTGCTTTCTGGCCATAGTGAGTCCG-3' antysens; bFGF (R&D Systems Inc.),  $\beta$ -aktyny (R&D Systems Inc.) według instrukcji producenta starterów. Wyniki PCR analizowano na 2% żelu agarozowym, z dodatkiem bromku etydyny [14].

## Wyniki

Tabela I przedstawia zawartość badanych czynników wzrostowych. Jak wynika z tabeli w badanych tkankach zdecydowanie przeważa bFGF. Występuje on w ilościach nanogramowych w przeliczeniu na gram tkanki. Drugi z czynników – aFGF występuje w ilościach pikogramowych. W obydwu przypadkach ich zawartość zwiększa się wraz ze wzrostem masy mięśniaków.

Tabela I. Zawartość peptydowych czynników wzrostowych w *myometrium* i w mięśniakach macicy.

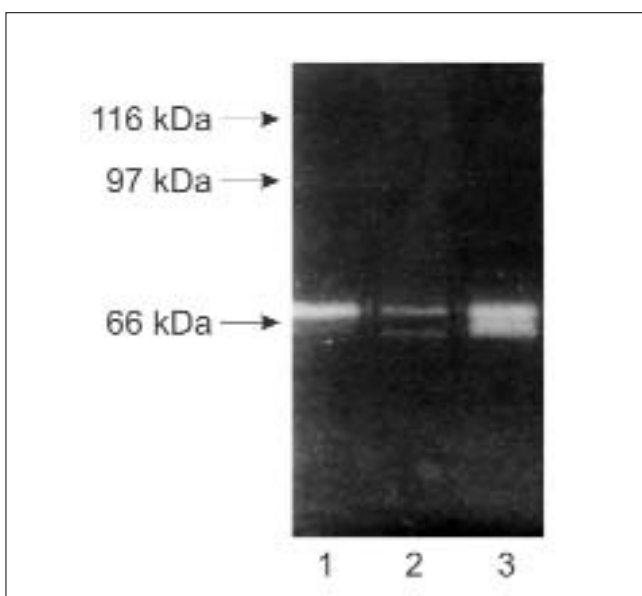
Czynnik wzrostowy	Myometrium	Mięśniak mały Small leiomyoma	Mięśniak duży Large leiomyoma
aFGF pg/g	39,13 $\pm$ 6,8	62,96 $\pm$ 12,3*	129,57 $\pm$ 21,7 <sup>a1</sup>
bFGF ng/g	20,41 $\pm$ 3,5	58,08 $\pm$ 10,2*	118,8 $\pm$ 20,8 <sup>a2</sup>

\*p<0,001 vs. myometrium

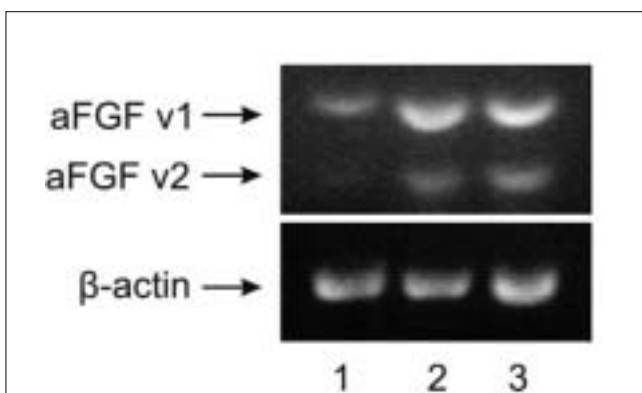
<sup>a1</sup>p<0,001 vs. mięśniak mały (small leiomyoma)

## Ekspresja genu czynnika wzrostowego fibroblastów w mięśniakach macicy.

Zymogram przedstawiony na rycinie 1 wskazuje na wzrost aktywności kolagenolitycznej w przebiegu wzrostu mięśniaków. W ekstrakcie z *myometrium* (ścieżka 1) występuje pojedyncze pasmo, o masie cząsteczkowej około 70kDa, odpowiadające latentnej formie żelatynazy A. Podobne, chociaż mniej intensywne pasmo, widoczne jest na zymogramie ekstraktu z mięśniaków małych. Równocześnie jednak pojawia się drugie pasmo, o nieco niższej masie cząsteczkowej, odpowiadające aktywnej formie tego enzymu (ścieżka 2). Podobny obraz zaobserwowano w przypadku ekstraktu z mięśniaków dużych (ścieżka 3). Intensywność pasm odpowiadających zarówno latentnej, jak i aktywnej formie żelatynazy jest zdecydowanie większa.

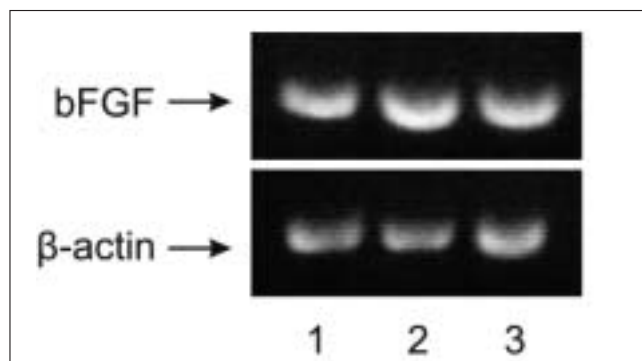


**Rycina 1.** Aktywność kolagenolityczna w *myometrium* (ścieżka 1), w mięśniakach małych (ścieżka 2) i w mięśniakach dużych (ścieżka 3). Elektroforezie poddano 20µg białka zawartego w ekstraktach. Po lewej stronie zaznaczono pozycje standardów mas cząsteczkowych.



**Rycina 2.** Ekspresja genu aFGF, poniżej zaznaczono ekspresję  $\beta$ -aktyny 1. *Myometrium*, 2. Mięśniaki małe, 3. Mięśniaki duże.

Rycina 2 przedstawia ekspresję genu aFGF w badanych tkankach. Obserwuje się wzrost ekspresji genu aFGF w mięśniakach małych i dużych, w porównaniu z tkanką kontrolną. Widoczne są dodatkowe pasma, co wynika z alternatywnego składowania mRNA [15]. W celu weryfikacji ilości naniesionego RNA przedstawiono ekspresję  $\beta$ -aktyny.



**Rycina 3.** Ekspresja genu bFGF, poniżej zaznaczono ekspresję  $\beta$ -aktyny 1. *Myometrium*, 2. Mięśniaki małe, 3. Mięśniaki duże.

Rycina 3 przedstawia ekspresję genu bFGF. Zarówno w mięśniakach małych, jak i dużych gen ten podlega ekspresji. Jednak nie obserwuje się wzrostu mRNA w porównaniu do macicy kontrolnej. Jako materiał porównawczy przedstawiono ekspresję  $\beta$ -aktyny.

## Dyskusja

W procesach rozrostowych dochodzi nie tylko do zmiany morfologii i funkcji komórek, ale również do przebudowy otaczającej je macierzy pozakomórkowej. Między komórkami a macierzą istnieje ścisły kontakt fizyczny i funkcjonalny. Macierz jest wytworem komórek, a ich funkcjonowanie jest uzależnione od składników macierzy. Zmiany w zawartości składników macierzy pozakomórkowej mogą być spowodowane wzmoczoną czy spowolnioną ich syntezą lub degradacją. Procesy te podlegają regulacji przez peptydowe czynniki wzrostowe [16, 17, 18].

Nasze wcześniejsze badania [6] wykazały, iż w przebiegu wzrostu mięśniaków dochodzi do przebudowy macierzy pozakomórkowej. Wykazano, iż mięśniaki różnią się znacząco od mięśnia macicy zawartością i relacjami ilościowymi głównych składników macierzy pozakomórkowej: kolagenu, elastyny i glikozoaminoglikanów. Mięśniaki zarówno małe, jak i duże zawierają więcej kolagenu w porównaniu z mięśniem macicy, jednak ilość tego białka maleje wraz ze wzrostem masy mięśniaków. W mięśniakach, zwłaszcza dużych, stwierdziliśmy znaczący wzrost zawartości glikozoaminoglikanów, a w szczególności siarczanu heparanu. Tak wysoka jego zawartość w mięśniakach macicy sprzyja wiązaniu niektórych peptydowych czynników wzrostowych [5, 6, 7, 19].

Zwraca uwagę fakt, iż zarówno aFGF, jak i bFGF występują przede wszystkim pod postacią wielkocząsteczkowych kompleksów, co wykazaliśmy we wcześniejszej publikacji [9].

W trakcie elektroforezy na żelu poliakryloamidowym z reguły pozostają one na szczycie lub w niewielkim stopniu penetrują w jego głąb. Jednak w przypadku bFGF, wykazaliśmy również obecność pasm, o ruchliwości elektroforetycznej, odpowiadającej wolnemu czynnikowi wzrostowemu [9]. Zaobserwowane zmiany skłoniły do oceny ilościowej badanych czynników. Wykazaliśmy, że zdecydowanie dominuje bFGF, natomiast aFGF występuje w ilościach wielokrotnie mniejszych. Na uwagę zasługuje jednak fakt, iż zawartość obydwu izoform kilkukrotnie zwiększa się w przebiegu wzrostu masy mięśniaków. Dlatego też można założyć, iż czynniki te mogą odgrywać kluczową rolę w przebudowie macierzy pozakomórkowej w przebiegu wzrostu masy mięśniaków [9, 20].

Peptydowy czynnik wzrostowy może wyrzucić efekt regulacyjny na komórkę tylko wtedy, gdy zwiąże się ze specyficznym dla siebie receptorem błonowym i przekaże sygnał do wnętrza komórki [21, 22]. Stan taki jest możliwy po uwolnieniu czynnika z kompleksów ze składnikami macierzy. W badanych tkankach tylko izoforma bFGF występuje w postaci wolnej, zdolnej do aktywacji receptora [9]. W warunkach fizjologicznych z reguły funkcjonuje równowaga pomiędzy ilością czynników wolnych i związanych ze składnikami macierzy [4, 19].

Wykazany przez nas wzrost aktywności kolagenolitycznej w przebiegu wzrostu masy mięśniaków, zapewne sprzyja uwalnianiu czynników wzrostowych z połączeń ze składnikami macierzy. Metaloproteinazy, oprócz degradacji kolagenu, uczestniczą w trawieniu innych składników, kompleksujących peptydowe czynniki wzrostowe. Proteoliza składników macierzy pozakomórkowej uwalnia związane z nimi peptydowe czynniki wzrostowe, a te wchodzi w reakcje z ich specyficznymi receptorami. Możliwa jest również aktywacja receptorów peptydowych czynników wzrostowych przez metaloproteinazy [23]. Metoda zymografii [12] pozwala na ocenę obecności zarówno aktywnych metaloproteinaz, jak i nieaktywnych ich proenzymów. Różnią się one masą cząsteczkową o około 10kDa [24].

Wynik zymografii wskazuje, że *myometrium* zawiera jeden z enzymów kolagenolitycznych - żelatynazę A, głównie w postaci nieaktywnego proenzymu. Na zymogramach mięśniaków małych widoczne są obie formy żelatynazy A, z przewagą formy nieaktywnej. Mięśniaki duże zawierają również obie formy tego enzymu, z wyraźną dominacją postaci aktywnej. Przedstawione wyniki wskazują, że największą aktywność kolagenolityczną wykazują mięśniaki duże. Być może zmiany wtórne, występujące w dużych mięśniakach, prowadzą do powstania większej ilości zdenaturowanego kolagenu, który jest podstawowym substratem dla żelatynazy A. Może to wyjaśniać ubytek kolagenu obserwowany w mięśniakach dużych [6]. Ponadto nasze wcześniejsze badania wykazały, iż w przebiegu wzrostu masy mięśniaków wzrasta aktywność wielu różnych metaloproteinaz i glikozydaz [25, 26] co sprzyja uwalnianiu peptydowych czynników wzrostowych i innych cytokin, ułatwia ich wiązanie przez receptory błonowe, co skutkuje nasileniem różnych efektów biologicznych.

Peptydowe czynniki wzrostowe odgrywają ważną rolę w biologii komórek nowotworowych. Niektóre onkogeny kodują białka ściśle spokrewnione lub identyczne z czynnikami wzrostowymi. W komórce nowotworowej ulegają one z reguły

nadekspresji lub amplifikacji, co w efekcie końcowym zdecydowanie prowadzi do wzrostu ilości czynników wzrostowych. Nadekspresja oznacza zwiększone wytwarzanie mRNA i wynikające stąd zwiększenie ilości białka, w tym przypadku czynnika wzrostowego. Amplifikacja oznacza z kolei zwielokrotnienie liczby kopii genu, co w efekcie końcowym daje również większą ilość wytwarzanego białka. Ponieważ komórki nowotworowe posiadają jednocześnie receptory dla wielu czynników wzrostowych, ulegają wielostronnemu, autokrynnemu lub parakrynnemu pobudzeniu [27, 28].

Wielu autorów wskazuje na podwyższoną ekspresję genów licznych cytokin w mięśniakach [29, 30]. W naszych badaniach wykazaliśmy wzrost ekspresji genu aFGF w przebiegu wzrostu mięśniaków w porównaniu do tkanki kontrolnej. Wykazaliśmy obecność dodatkowych pasm mRNA, pojawiających się wskutek alternatywnego składowania tego kwasu. Występują one głównie w mięśniakach, co koreluje ze wzrostem ilości tego czynnika w przebiegu wzrostu masy mięśniaków. Ekspresja genu bFGF jest podobna w mięśniakach, w porównaniu do tkanki kontrolnej. Być może wzrost ilości tego czynnika w mięśniakach może być efektem jego wcześniejszej akumulacji. Nie wykluczamy, że powstały w trakcie transkrypcji mRNA charakteryzuje dłuższy czas „przeżycia”, czego efektem może być wzrost bFGF w miarę wzrostu mięśniaków.

## Wnioski

1. Wzrost aktywności kolagenolitycznej sprzyja uwalnianiu obu izoform FGF z kompleksów ze składnikami macierzy pozakomórkowej.
2. Przemianie *myometrium* w kierunku mięśniaka i wzrostowi jego masy towarzyszy nasilenie ekspresji genu aFGF.

## Piśmiennictwo

1. Ornitz D, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001, 2, 1-12.
2. Wiedlocha A, Sorensen V. Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004, 286, 45-79.
3. Marquart F, Gillery P, Kalis B, [et al]. Cytokines and fibrosis. *Eur J Dermatol.* 1994, 4, 91-97.
4. Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* 1997, 11, 51-59.
5. Gallagher J. Heparan sulphate proteoglycans. The control of cell growth. In: *Extracellular matrix 2*. Ed. Comper W. Amsterdam: *Harwood Academic Publishers*, 1996, 230-245.
6. Wolańska M, Sobolewski K, Drożdżewicz M, [et al]. Extracellular matrix components in uterine leiomyoma and their alteration during the tumour growth. *Mol Cell Biochem.* 1998, 189, 145-152.
7. Wolańska M, Sobolewski K, Drożdżewicz M. Glikoaminoglikany w mięśniakach macicy. *Ginekol Pol.* 1998, 69, 12-16.
8. Wolańska M, Bańkowski E. An accumulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) in human myometrium and in uterine leiomyomas in various stages of the tumour growth. *Eur Cytokine Netw.* 2004, 154, 359-363.
9. Wolańska M, Bańkowski E. Fibroblast growth factors (FGF) in human myometrium and uterine leiomyomas in various stages of tumour growth. *Biochimie.* 2006, 88, 141-146.
10. Wolańska M, Jaworski S. Czynniki wzrostu naskórka (EGF) w przebiegu wzrostu mięśniaków macicy. *Ginekol Pol.* 2005, 76, 643-647.
11. Wolańska M, Bańkowski E. Transforming growth factor beta and platelet-derived growth factor in human myometrium and in uterine leiomyomas at various stages of tumour growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007, 130, 238-244.
12. Unemori E, Werb Z. Reorganization of polymerized actin: a possible trigger for induction of procollagenase in fibroblasts cultured in and on collagen gels. *J Cell Biol.* 1986, 103, 1021-1031.

## Ekspresja genu czynnika wzrostowego fibroblastów w mięśniakach macicy.

13. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227, 680-685.
14. Hossain M, Fielding K, Trescher W, [et al]. Human FGF-1 gene delivery protects against quinolinate-induced striatal and hippocampal injury in neonatal rats. *Eur J Neurosci*. 1998, 10, 2490-2499.
15. Martineau Y, Le Bec C, Monbrun L, [et al]. Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. *Mol Cell Biol*. 2004, 24, 7622-7635.
16. Bosman F, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. 2003, 200, 423-428.
17. Ricciardelli C, Rodgers R. Extracellular matrix of ovarian tumors. *Semin Reprod Med*. 2006, 24, 270-282.
18. Schonherr E, Hausser H. Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *Dev Immunol*. 2000, 7, 89-101.
19. Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. 1991, 64, 867-869.
20. Dębski R. Biologia mięśniaków. Hormony i cytokiny. Aspekty genetyczne. W: Mięśniaki macicy. Red. Markowska J. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2000, 34-41.
21. Schuppan D, Ruhl M. Matrix in signal transduction and growth factor modulation. *Braz J Med Biol Res*. 1994, 27, 2125-2141.
22. Lee J, Juliano R. Mitogenic signal transduction by integrin and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells*. 2004, 17, 188-202.
23. Przybyłowska K, Błasiak J. Metalloproteinazy macierzowe i ich rola w procesie nowotworowym. *Postępy Biochem*. 2001, 47, 212-223.
24. Lemaitre V, D\_Armiento J. Matrix metalloproteinases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2006, 78, 1-10.
25. Wolańska M, Sobolewski K, Bańkowki E, [et al]. Matrix metalloproteinases of human leiomyoma in various stages of tumorgrowth. *Gynecol Obstet Invest*. 2004, 58, 14-18.
26. Wolańska M, Sobolewski K, Cechowska-Pasko M, [et al]. The activities of some glycosaminoglycan-degrading enzymes in uterine leiomyomas. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003, 110, 73-78.
27. Petruzelka L. Diagnosis and treatment of tumor metastases. *Vnitr Lek*. 2001, 47, 555-560.
28. Jarzab B. Nowotwory. W: Patofizjologia kliniczna dla studentów medycyny. Red. Zahorska-Markiewicz B, Małecka-Tendera E. Wrocław: Volumed, 2001, 31-75.
29. Sozen I, Arici A. Interaction of cytokines, growth factors and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyoma. *Fertil Steril*. 2002, 78, 1-12.
30. Fayed Y, Tsibris J, Langenberg P, [et al]. Human uterine leiomyoma cells: binding and growth responses to epidermal growth factor, platelet-derived growth factors and insulin. *Lab Invest*. 1989, 60, 30-37.