

Znane są 2 wysoce specyficzne receptory dla VEGF, obecne na komórkach śródbłonna naczyniowego: Flt-1 (VEGFR-1) i Flk-1/KDR (VEGFR-2) oraz forma rozpuszczalna Flt-1 – sFlt-1, która swoją aktywność przejawia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Stwierdzono ich nasiloną ekspresję w przebiegu wielu chorób, u których podstawy patomorfologiczne leżą w zaburzonym procesie angiogenezy. Należą do nich zwłaszcza nowotwory i choroby wykazujące cechy przewlekłego niedotlenienia tkanek. Celem pracy była ocena aktywności transkrypcyjnej i form alternatywnego składania mRNA genów receptorów VEGFR-1 i VEGFR-2 w ocenie progresji zmian śród nabłonkowych i raka szyjki macicy. Materiał badawczy stanowiły 43 wycinki pochodzące z prawidłowej szyjki macicy, 38 – LSIL, 17 – HSIL i 21 wycinków raka płaskonabłonkowego w stopniu klinicznego zaawansowania IB-IIIB. W celu porównania ekspresji Flt-1 i Flk-1 w wycinkach różniących się masą, przyjęto wspólny współczynnik – liczba kopii mRNA/1 µg całkowitego RNA w badanej tkance. W grupie LSIL obecność mRNA genu Flt-1 w zmianie śród nabłonkowej powodował wzrost względnego ryzyka progresji (RW=2,26±1,24). Dla receptora Flk-1, w tej samej grupie współczynnik ten wynosił RW=2,41±1,13. Wykazano 5-krotny wzrost ryzyka względnego progresji zmiany dla genów Flt-1 i Flk-1 w grupie HSIL. W grupie RAK ryzyko progresji zmiany wynosiło odpowiednio RW=8,17±4,25 i RW=4,58±2,1 dla genów Flk-1 i Flt-1. Obecność rozpuszczalnej formy receptora sFlt-1 nie wpływa na wzrost ryzyka progresji zmiany w grupie RAK i w niewielkim stopniu wpływa w grupie HSIL.

**Słowa kluczowe:** angiogeneza, rak szyjki macicy, SIL, Flt-1 (VEGFR-1), Flk-1 (VEGFR-2), sFlt-1.

# Aktywność transkrypcyjna i formy alternatywnego składania mRNA genów receptorów Flt-1, Flk-1 w ocenie ryzyka progresji zmian śród nabłonkowych i raka szyjki macicy

*Transcriptional activity and alternative splice mRNA forms of Flt-1, Flk-1 genes in the estimation of risk progression of squamous intraepithelial lesions and cervical cancer*

Bogdan Michalski<sup>1</sup>, Tomasz Zieliński<sup>1</sup>, Urszula Mazurek<sup>2</sup>, Dariusz Kuśmierz<sup>2</sup>, Tadeusz Wilczok<sup>2</sup>, Ryszard Poręba<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Oddział Kliniczny Położnictwa i Ginekologii w Tychach

<sup>2</sup> Katedra Biologii Molekularnej, Biochemii i Biofarmacji w Sosnowcu  
Śląska Akademia Medyczna w Katowicach

## WSTĘP

Sygnal angiogeny naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) jest przenoszony poprzez 2 wysoce specyficzne receptory śródbłonna naczyniowego Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase receptor* – VEGFR-1) oraz Flk-1/KDR (*fetal liver kinase 1/kinase insert domain containing receptor* – VEGFR-2), należące do klasy III receptorów, posiadających własną kinazę tyrozynową oraz 7 zewnątrzkomórkowych domen immunoglobulinopodobnych (Ig) [1]. W wiązaniu VEGF do Flt-1 i Flk-1 pośredniczy druga domena Ig [2]. W trakcie badań nad angiogenezą zachodzącą w tkance łożyskowej odkry-

to i opisano obecność krótszej, rozpuszczalnej formy receptora Flt-1 (sFlt-1), niezwiązanej z błoną komórkową śródbłonna [1].

Chociaż VEGF jest wydzielany przez różne komórki organizmu, to ekspresja Flk-1 i Flt-1 jest ściśle ograniczona do śródbłonna naczyniowego [3]. Nadekspresję tych receptorów obserwowano przede wszystkim w chorobach nowotworowych i procesach patologicznych z towarzyszącym niedotlenieniem tkanek [4], jakkolwiek relatywnie niską ekspresję obserwuje się także w śród nabłonku prawidłowych naczyń [1].

Wczesne badania Petersa i wsp. dobrze opisały lokalizację i właściwości receptora Flt-1, po-

*So far there have been known two highly specific VEGF receptors that occur in vascular endothelium: Flt-1 (VEGFR-1) and Flk-1/KDR (VEGFR-2) and the soluble form of Flt-1 – sFlt-1. High expression of these receptors was observed in many cancers and as a result of chronic tissue hypoxia. The aim of this study was to evaluate transcriptive activity and forms of alternative splicing of VEGFR-1 and VEGFR-2 genes mRNA and their relationship with the progression of squamous intraepithelial lesions and cervical cancer. Tissue specimens used for molecular analysis were obtained from 119 women. After histological examination they were divided into several morphological groups: control group – 43 specimens of normal cervix, LSIL group – 38 specimens, HSIL group – 17 specimens, RAK group – 21 specimens of squamous cancer in IB-IIB stage. To compare genes expression in specimens different in weight, there was established a common coefficient – a number of copies of mRNA per 1 µg of total mRNA. In LSIL group, the presence of Flt-1 gene mRNA in squamous intraepithelial lesions caused an increase in relative risk of progression ( $RR=2.26\pm 1.24$ ), whereas, in the same group, this parameter for Flk-1 gene mRNA was  $RR=2.41\pm 1.13$ . A fivefold increase in the progression relative risk in HSIL group was shown. In RAK group the progression risk for Flt-1 and Flk-1 genes was  $RR=8.17\pm 4.25$  and  $RR=4.58\pm 2.1$ , respectively. The presence of the soluble form sFlt-1 had no effect on the increase in the progression risk in RAK group and had a minimal effect in HSIL group.*

**Key words:** angiogenesis, cervical cancer, squamous intraepithelial lesion, Flt-1 (VEGFR-1), Flk-1 (VEGFR-2), sFlt-1.

twierdząc jego udział w procesie neowaskularyzacji, gojeniu się ran i wczesnych etapów organogenezy, stwierdzając jego obecność w pęcherzyku żółtkowym embrionów mysich; potwierdzili rolę Flt-1 w procesie wzrostu, różnicowania się śródbłonna i mechanizmach naprawczych naczyń [5]. Istnieje podobieństwo w pozytywnej regulacji ekspresji Flt-1 i VEGF w patologii z towarzyszącym niedotlenieniem tkanek; oba czynniki posiadają w regionie transkrypcyjnym, w pozycji 976 do 937, miejsce wiążące HIF-1, którego nie stwierdzono w genomie Flk-1 [6]. Obserwacja ta sugeruje, że niedotlenienie nie tylko wpływa na ekspresję VEGF, ale także parakrynnie wpływa na indukcję Flt-1 poprzez mechanizm VEGF-zależny [7].

Flk-1/KDR jest głównym regulatorem waskulogenezy w okresie embriogenezy i angiogenezy w stanach patofizjologicznych organizmu dojrzałego [8]. Badania hybrydyzacji *in situ* mRNA Flk-1 mysich embrionów wykazały obecność tego receptora w komórkach endotelialnych we wszystkich etapach procesu embrio- i organogenezy, poczynając od momentu pojawienia się wysepek krwiotwórczych w pęcherzyku żółtkowym 8,5-dniowego zarodka [8]. Ekspresja receptora towarzyszy proliferacji komórek śródbłonna, tworzeniu się nowych naczyń i całego drzewa naczyniowego oraz drastycznie spada w tkance mózgowej po uzyskaniu jej pełnej dojrzałości [8]. Sygnał mitogenowy przenoszony na drodze VEGF-Flk-1 spełnia osiową rolę w angiogenezie nowotworowej, jakkolwiek badania eksperymentalne wskazują zróżnicowane rozmieszczenie tego sygnału w tkance nowotworowej. W badaniach eksperymentalnych centrum zmiany charakteryzowało się mniejszą liczbą naczyń w porównaniu z bogatym unaczynieniem na obwodzie [9].

Rozpuszczalna forma receptora Flt-1 (sFlt-1) została wykryta w medium hodowlanym komórek HUVEC i w surowicy pacjentów chorujących na różne nowotwory; nie wykryto natywnej formy rozpuszczalnego receptora Flk-1 (sFlk-1) [10]. sFlt-1 jest kodowany przez gen Flt-1, pozbawiony jest jedynie szóstej i siódmej domeny immunoglobulinopodobnej, podczas gdy pierwsza, druga i trzecia są niezbędne dla prawidłowego wiązania się VEGF [11]. Ponadto receptor pozbawiony jest domeny śródbłonkowej i wewnątrzkomórkowej kinazy tyrozynowej. Ta specyficzna budowa powoduje, że sFlt-1 łącząc się z wybranymi izoformami VEGF zachowuje się jak czynnik antyangiogeny, zmniejszając efekt biologiczny VEGF [10].

Celem pracy było zbadanie aktywności transkrypcyjnej genów receptorów VEGF – VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1) oraz występowanie form alternatywnego składania mRNA Flt-1 – sFlt-1 w ocenie progresji zmian śródnamionkowych i raka szyjki macicy.

## MATERIAŁ I METODY

Bezpośrednim materiałem badawczym przeznaczonym do analizy molekularnej było 119 wycinków tkankowych zakwalifikowanych do następujących grup morfologicznych:

- I. Grupa kontrolna (K) – 43 wycinki tkankowe pochodzące z prawidłowej szyjki macicy,
- II. Grupa LSIL – 38 wycinków,
- III. Grupa HSIL – 17 wycinków,
- IV. Grupa raka płaskonamionkowego w stopniu klinicznego zaawansowania IB-IIB (RAK) – 21 wycinków.

Wycinki do badania molekularnego były pobrane w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca biopsji do badania histopatologicznego, w celu uzyskania jak największej zgodności patologii molekularnej i morfologicznej w badanych gru-

pach. Materiał tkankowy przeznaczony do oceny ekspresji genów, bezpośrednio po pobraniu, zamrażano do  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### Ekstrakcja RNA

Po wstępnym kruszeniu komórek w ciekłym azocie z homogenatu ekstrahowano DNA i RNA przy zastosowaniu zmodyfikowanej metody wg Chomczyńskiego i Sacchi [17], a następnie wyznaczano stężenie kwasu nukleinowego w ekstrakcie techniką spektrofotometryczną z zastosowaniem RNA/DNA kalkulator *Gene Quant* LKB – Pharmacia Biotech.

### Analiza aktywności transkrypcyjnej genu Flt-1 i Flk-1

Aktywność transkrypcyjną badanych genów wyznaczano na podstawie analizy kinetyki reakcji QRT-PCR, w której matrycą były ekstrakty całkowitego RNA otrzymane z wycinków tkanek. W pierwszej części badań projektowano reakcję QRT-PCR dla badanych transkryptów i produktów ich modyfikacji potranskrypcyjnej. Sprawdzano empirycznie i optymalizowano zaprojektowane reakcje oraz potwierdzano specyficzność amplimerów techniką elektroforezy w żelu poliakrylamidowym barwionym srebrem i metodą sekwencjonowania enzymatycznego. Dla wszystkich zaprojektowanych reakcji QRT-PCR przyjęto identyczne warunki termiczne oraz mieszaninę reakcyjną różniącą się tylko zestawem oligonukleotydów – starterów i sond wyznakowanych fluorochromami FAM i TAMRA. W drugim etapie wyznaczono liczby kopii mRNA badanych transkryptów w  $1\ \mu\text{g}$  całkowitego mRNA badanego wycinka.

### Projektowanie specyficznych starterów i sond stosowanych w reakcji QRT-PCR dla mRNA Flt-1, Flk-1 i sFlt-1

Sekwencję nukleotydów starterów oraz sond dla reakcji

RT-QPCR zaprojektowano przy użyciu programu komputerowego Primer Express™ Version 1.0 ABI PRISM, na podstawie sekwencji badanych genów pochodzących z bazy danych Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ix/genbank>). Korzystając z bazy danych BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.0.11 porównano kolejność nukleotydów genu VEGF, znalezione pod numerem dostępu – *accession* – NM\_003376 (266), M63978.

### Sekwencjonowanie amplimerów

Ostatnim etapem sprawdzenia specyficzności zaprojektowanych reakcji QRT-PCR umożliwiających detekcję produktów modyfikacji potranskrypcyjnej mRNA Flt-1 i Flk-1 było sekwencjonowanie produktów amplifikacji prowadzone metodą Sangera [18]. Amplifikację sekwencyjną prowadzono z zastosowaniem dideoksynukleotydów wyznakowanych odpowiednio: ddATP barwnikiem dichloro[R6G], ddCTP barwnikiem dichloro[ROX], ddGTP barwnikiem dichloro[R110] i ddTTP barwnikiem dichloro[TAMRA] w termocyklerze GeneAmp PCR System 9600 firmy Perkin Elmer. Następnie otrzymane produkty rozdzielono przy użyciu automatycznego analizatora sekwencji ABI PRISM™ 310. i zanalizowano stosując program *DNA Sequencing Analysis Software*™ Version 3.7. Kolejne etapy sekwencjonowania przeprowadzono zgodnie z zaleceniem protokołu dołączonego do zestawu odczynników sekwencyjnych zalecanych przez firmę Perkin Elmer.

### Wyznaczanie liczby kopii mRNA techniką QRT – PCR

Otrzymany w ekstrakcji RNA stanowił matrycę w reakcji Q-RT-PCR prowadzonej jednostopniowo z zastosowaniem termostabilnego enzymu Tth. Wprowadzenie jonów  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$  do mieszaniny reakcyjnej w odpowiednich proporcjach

umożliwiło wykonanie reakcji QRT-PCR w jednej próbówce, w mieszaninie reakcyjnej zawierającej  $1\ \times\ \text{Tth PCR Buffer}$  zawierający fluorochrom zapewniający odpowiednie tło dla pomiaru fluorescencji po każdym cyklu termicznym QRT-PCR,  $3\ \text{mM MgCl}_2$ ,  $400\ \mu\text{M}$  dATP,  $400\ \mu\text{M}$  dTTP,  $400\ \mu\text{M}$  dGTP,  $400\ \mu\text{M}$  dCTP,  $1\ \times\ \text{wzmacniacz}$  reakcji PCR,  $0,5\ \mu\text{M MnSO}_4$ ,  $0,3\ \mu\text{M}$  starter 1 i starter 2,  $0,2\ \mu\text{M}$  sondy wyznakowanej fluorochromami FAM i TAMRA,  $1\text{--}10\ \mu\text{g}$  całkowitego RNA,  $2,5\ \text{U}$  polimerazy DNA Tth. Reakcję Q-RT-PCR wykonywano z zastosowaniem detektora sekwencji ABI PRISM™ 7700.

### WYNIKI

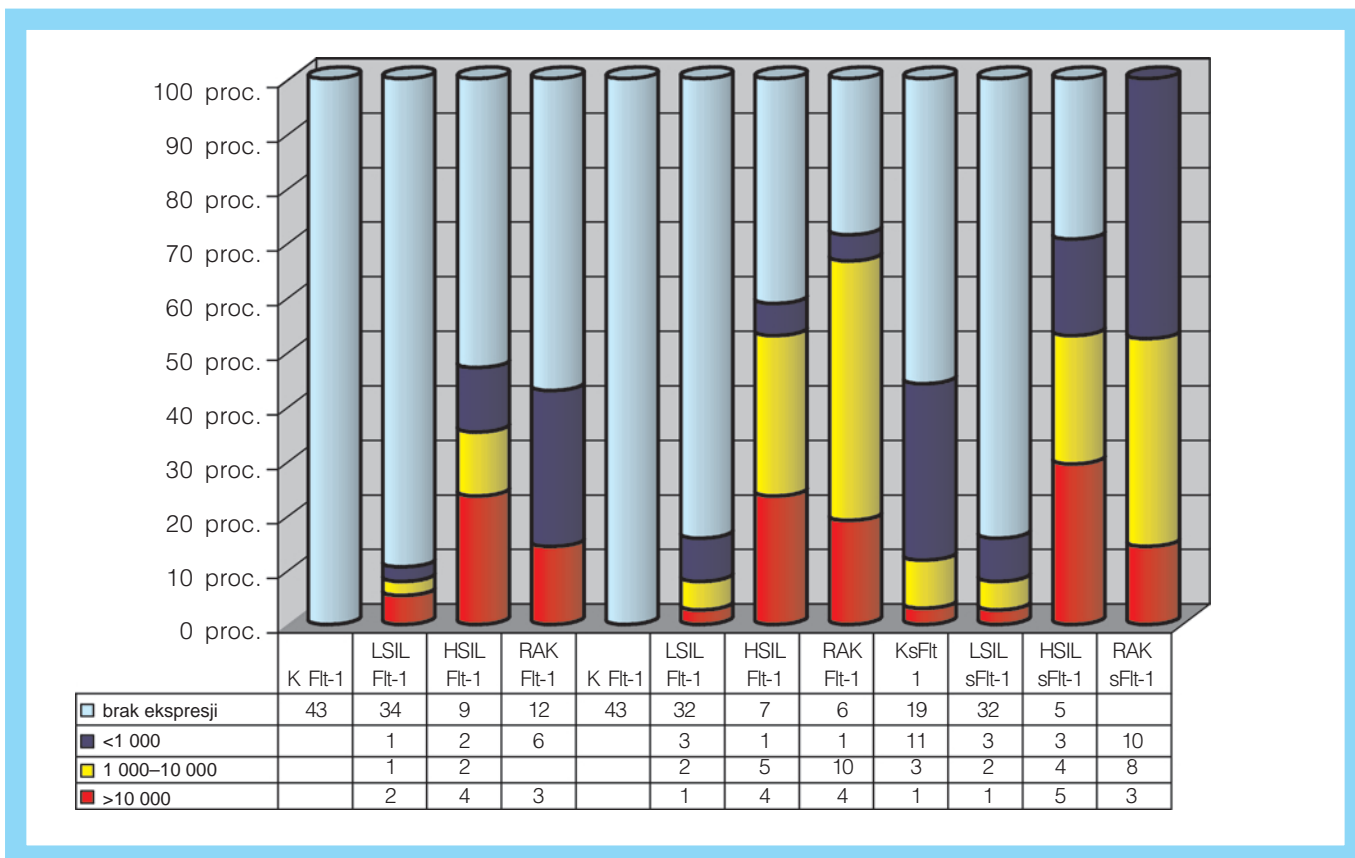
#### Aktywność transkrypcyjna i formy alternatywnego składania mRNA Flt-1 i Flk-1 w grupie kontrolnej

W 65,12 proc. badanych wycinków nie zarejestrowano aktywności transkrypcyjnej jakiegokolwiek genu receptorów VEGF, podczas gdy w 34,88 proc. jedynym zaobserwowanym typem mRNA była rozpuszczalna forma receptora Flt-1 – sFlt 1. Aktywność transkrypcyjna tego genu charakteryzowała się zróżnicowanymi wartościami nie przekraczając jednak liczby  $3,2 \times 10^4$  kopii mRNA/ $1\ \mu\text{g}$  całkowitego RNA. W 2,32 proc. przypadków zarejestrowano wysoką aktywność transkrypcyjną powyżej 10 000 kopii mRNA w  $1\ \mu\text{g}$  całkowitego RNA badanego wycinka przy 25,58 proc. niskiej ekspresji poniżej 1 000 kopii mRNA (rycina).

#### Aktywność transkrypcyjna i formy alternatywnego składania mRNA Flt-1 i Flk-1 w grupie LSIL

W grupie LSIL, poza obecnością mRNA sFlt-1 występującego w grupie kontrolnej ( $p > 0,05$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 1,26$ ), zarejestrowano aktywność transkrypcyjną genów receptorów VEGF i stwierdzono obecność





**Ryc. Porównanie procentowego rozkładu aktywności transkrypcyjnej genów receptorów VEGF w przedziałach do 1 000, 1 000-10 000 i powyżej 10 000 kopii mRNA Flt-1, Fik-1 i sFlt-1 w 1 µg całkowitego RNA w grupie kontrolnej (K), LSIL, HSIL i raka szyjki macicy (RAK).**

mRNA Flt-1 w 11 proc. ( $p < 0,05$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 28,7$ ) i Fik-1 w 16 proc. ( $p < 0,05$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 12,5$ ) badanych wycinkach tkankowych (tabela). W wycinkach tkankowych wykazujących aktywność transkrypcyjną Flt-1 procentowy rozkład przypadków w przedziałach niskiej, średniej, wysokiej ekspresji był identyczny, mieścił się w zakresie 3–5 proc. i różnił się znacząco od grupy kontrolnej ( $p < 0,02$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 4,6$ ) (rycina).

W przypadku Fik-1 8 proc. było poniżej 1 000, 5 proc. w przedziale średnich wartości, i tylko 3 proc. powyżej 10 000 kopii mRNA w 1 µg całkowitego mRNA badanego wycinka różniąc się znacząco od grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 58,9$ ).

Aktywność transkrypcyjna sFlt-1 w LSIL była identyczna jak w grupie kontrolnej i nie zaobserwowano znaczących różnic ( $p > 0,05$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 0,66$ ).

Pojawienie się mRNA sFlt-1 nie wpływa znacząco na wzrost ryzy-

ka względnego progresji LSIL (RW=1,17±0,54; 95 proc.=0,12-2,23). W przypadku stwierdzenia obecności mRNA genu Flt-1 w zmianie śród nabłonkowej powoduje wzrost względnego ryzyka progresji – RW=2,26±1,24; (95 proc.=0,14-4,66). Podobne wartości zaobserwowano dla receptora Fik-1, którego współczynnik RW wynosił 2,41±1,13; (95 proc.=0,2-4,62).

#### Aktywność transkrypcyjna i formy alternatywnego składania mRNA Flt-1 i Fik-1 w grupie HSIL

mRNA receptora Flt-1 zaobserwowano w 47,06 proc. badanych wycinkach i było statystycznie znacząco częściej wykrywane niż w grupie kontrolnej i LSIL ( $p < 0,05$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 9,189$ ) (tabela).

W grupie HSIL zarejestrowana aktywność transkrypcyjna genu Flt-1 była znacząco wyższa od grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 23,35$ ) i LSIL ( $p < 0,05$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 9,19$ ) i tylko w

12 proc. przypadków charakteryzowała się niską ekspresją poniżej 1 000, przy jednoczesnych 24 proc. wysokiej ekspresji powyżej 10 000 kopii mRNA w 1 µg całkowitego mRNA badanego wycinka tkankowego (rycina).

Obecność mRNA receptora Fik-1 stwierdzono w 58,82 proc. wszystkich badanych wycinków i była znacząco wyższa ( $p < 0,05$ ,  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 10,16$ ) w porównaniu z grupą kontrolną (tabela). Aktywność transkrypcyjna genu Fik-1 była również znacząco wyższa od występującej w grupie kontrolnej ( $p < 0,001$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 21,63$ ) i LSIL ( $p < 0,01$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 14,15$ ) (tabela), charakteryzując się większą liczbą przypadków mieszczących się w przedziałach średniej (29 proc.) i wysokiej (24 proc.) ekspresji tego genu.

Rozpuszczalną izoformę receptora Flt-1 (sFlt-1) stwierdzono w 70,59 proc. wszystkich badanych wycinkach tkankowych nie

**Tab. Ryzyko względne progresji zmiany śródnabłonkowej małego (LSIL), dużego stopnia (HSIL) i raka płaskonabłonkowego szyjki macicy w stopniu klinicznego zaawansowania IB – IIB w zależności od pojawienia się formy alternatywnego składania mRNA Flt-1, Flk-1 i sFlt-1**

	LSIL N=38		Grupa kontrolna N=43		Ryzyko względne	Błąd standardowy	95 proc.
	n	proc.	n	proc.			
Flt-1	4	11	0	0	2,41	1,13	0,2–4,62
Flk-1	6	16	0	0	1,17	0,54	0,12–2,23
sFlt-1	16	42	15	34,9	2,26	1,24	0,14–4,66
		HSIL N=17		Grupa kontrolna N=43			
	n	proc.	n	proc.			
Flt-1	8	47	0	0	5,78	2,94	0,08–11,48
Flk-1	10	59	0	0	5,16	2,65	0,04–10,36
sFlt-1	12	71	15	34,9	2,93	1,82	0,64–6,5
		RAK N=17		Grupa kontrolna N=43			
	n	proc.	n	proc.			
Flt-1	9	43	0	0	4,58	2,1	0,46–8,7
Flk-1	15	71	0	0	8,17	4,25	0,13–16,47
sFlt-1	21	100	15	34,9	–	–	–

*n – liczba przypadków z badanym czynnikiem ryzyka*

obserwując jednocześnie cech znamiennej statystycznie różnicy częstości występowania w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p > 0,05$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 6,28$ ) i LSIL ( $p > 0,05$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 3,81$ ) (tabela). Obecność mRNA sFlt-1 w 18 proc. rejestrowano poniżej 1 000, w 24 proc. w przedziale średniej ekspresji i w 29 proc. powyżej 10 000 kopii mRNA w 1  $\mu\text{g}$  całkowitego mRNA badanego wycinka bez wyraźnej różnicy w stosunku do grupy kontrolnej ( $p > 0,05$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 2,65$ ) i z wyższą ekspresją w porównaniu z LSIL ( $p < 0,05$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 10,17$ ) – rycina.

W sposób bezpośredni, w badaniu prospektywnym, ocena ryzyka względnego progresji zmian morfologicznych w zależności od wystąpienia mRNA Flk-1 wykazały 5-krotnie wyższe ryzyko progresji zmiany w stosunku do wycinka tkankowego bez potranskrypcyjnej obecności mRNA tego genu ( $\text{RW} = 5,16 \pm 2,65$ ; 95 proc. = 0,04–10,36). W przypadku stwierdzenia w badanym wycinku tkankowym obecności mRNA Flt-1 ryzyko progresji będzie podobne, jak w przypadku genu poprzedniego re-

ceptora i wynosi  $\text{RW} = 5,78 \pm 2,94$ ; 95 proc. = 0,08–11,48. Obecność mRNA sFlt-1 w ocenianym fragmencie tkankowym w grupie HSIL wskazał na niewielki wzrost względnego ryzyka progresji zmiany ( $\text{RW} = 2,93 \pm 1,82$ ; 95 proc. = 0,64–6,5) – tabela.

#### Aktywność transkrypcyjna i formy alternatywnego składania mRNA Flt-1 i Flk-1 w grupie raka szyjki macicy

W grupie raka płaskonabłonkowego zarejestrowana aktywność transkrypcyjna genu Flt-1 była znamiennej wyższa od grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 21,44$ ), LSIL ( $p < 0,01$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 11,34$ ) i nie zaobserwowano różnicy w porównaniu z grupą HSIL ( $p > 0,05$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 4,2$ ) – rycina.

Aktywność transkrypcyjna genu Flk-1 również była znamiennej wyższa od występującej w grupie kontrolnej ( $p < 0,001$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 32,02$ ) i LSIL ( $p < 0,001$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 22,92$ ) i w 5 proc. przypadków zarejestrowano niską ekspresję poniżej 1 000, w 48 proc. mieściła się w przedziale średnich wartości

i w 19 proc. było powyżej 10 000 kopii mRNA w 1  $\mu\text{g}$  całkowitego mRNA badanego wycinka tkankowego (rycina). Nie stwierdzono różnic w aktywności transkrypcyjnej tego receptora w porównaniu z grupą HSIL ( $p > 0,05$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 1,34$ ).

Obecność mRNA sFlt-1 w 48 proc. rejestrowano poniżej 1 000, w 38 proc. w przedziale średnich wartości i w 14 proc. powyżej 10 000 kopii mRNA w 1  $\mu\text{g}$  całkowitego mRNA badanego wycinka z wyraźną różnicą w stosunku do grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 26,94$ ) i LSIL ( $p < 0,001$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 21,39$ ), oraz HSIL ( $p < 0,05$ ;  $\text{Chi}^2_{\text{Pearsona}} = 10,3$ ) – rycina.

Ocena ryzyka względnego progresji zmian morfologicznych w zależności od występowania mRNA poszczególnych receptorów zaobserwowano, że rozpuszczalna forma receptora Flt-1 (sFlt-1) nie wpływa na wzrost ryzyka progresji zmiany. Występowanie mRNA Flk-1 w tkance raka szyjki macicy powoduje sześciokrotny wzrost względnego ryzyka progresji ( $\text{RW} = 5,16 \pm 4,91$ ; 95 proc.

=3,24–16,02). W przypadku mRNA Flt-1 względne ryzyko progresji jest nieco niższe (RW=4,58) – tabela.

## OMÓWIENIE

W przeprowadzonych badaniach w tej pracy nie zarejestrowano obecności mRNA Flt-1 i Flk-1/KDR we wszystkich wycinkach tkankowych prawidłowej strefy regeneracji szyjki macicy, a jedynym typem receptora obecnym w badanych materiale była rozpuszczalna forma Flt-1 – sFlt-1, której mRNA występowało w 34,88 proc. wszystkich wycinków w przeciwieństwie do doniesienia Guidi i wsp. [13], którzy wykazali obecność mRNA receptorów VEGF – Flt-1 i KDR w 66,7 proc. prawidłowych wycinkach szyjki macicy. Obserwacje te mogą potwierdzać udział tej izoformy receptora Flt-1 w fizjologicznym procesie metaplasty i prawidłowym formowaniu podnabłonkowej sieci naczyń.

Funkcja, jaką pełni sFlt-1 w procesie angiogenezy czeka na pełne wyjaśnienie, ale można przyjąć jej hipotetyczną rolę jako fizjologicznego stabilizatora jednowarstwowego śródbłonka naczyniowego uczestniczenia na zasadzie sprzężenia zwrotnego w końcowych etapach angiogenezy i przepuszczalności naczyń, oraz fizjologicznego hamulca wzrostu naczyń w tkance prawidłowej [10]. Mechanizmem biologicznej regulacji, leżącym u podstaw takiego działania, jest możliwość tworzenia heterodimerycznych połączeń z VEGF i jego receptorami na powierzchni błony komórkowej endotelium.

W przeciwieństwie do badań hybrydyzacyjnych Guidi i wsp. [13], w których wykazano obecność mRNA Flt-1 w 66,7 proc. i KDR w 100 proc. przypadków zmian śród nabłonkowych małego stopnia, w prezentowanej pracy nie zaobserwowano tak częstej ekspresji wymienionych receptorów i obecność mRNA pierwszego receptora stwierdzono tylko w 11

proc., a Flk-1 w 16 proc. wycinkach w grupie kobiet ze zmianami śród nabłonkowymi małego stopnia. Pojawienie się ekspresji receptorów VEGF – Flt-1 i Flk-1, nieobserwowanej w grupie kontrolnej jest zrozumiałe na podstawie zdobytej wiedzy o sposobie przenoszenia sygnału mitogenowego i chemotaktycznego, inicjowanego ekspresją VEGF [14], a zwłaszcza znaczący udział Flk-1/KDR w progresji zmian nowotworowych. Wymienieni autorzy wskazują jednocześnie, że pomimo obserwowania mRNA prawie we wszystkich badanych preparatach to wysoka ekspresja była obserwowana tylko w przypadku zmian śród nabłonkowych dużego stopnia i raku szyjki macicy [13].

W przeprowadzonych w tej pracy obserwacjach aktywności transkrypcyjnej poszczególnych przypadków zmian śród nabłonkowych małego stopnia zwraca uwagę fakt występowania tej samej ilości mRNA sFlt-1, jak w grupie kontrolnej oraz w kilku tylko procentach wartości ekspresji Flt-1 i Flk-1 przekraczały 104 kopii w 1 µg całkowitego mRNA badanego wycinka tkankowego, co wskazuje na niewielki wzrost aktywności angiogennej tych przypadków, zwracając zasadniczą uwagę na rolę tych receptorów w przenoszeniu sygnału mitogenowego i proliferacyjnego VEGF [14].

Porównawczo obserwacje dokonane w trakcie badania ekspresji genów VEGF, Flt-1 i Flk-1 w raku piersi stwierdziły jej obecność tak w komórkach nabłonkowych zmiany nowotworowej, jak i komórkach podścieliska poza błoną naczyniową [15]. Dane te sugerują, że VEGF i jego receptory mogą odgrywać znaczącą rolę nie tylko w parakrynej regulacji progresji zmiany, ale także w mniej poznawanych wzajemnych zależnościach autokrynych [15].

Zaobserwowanie w tej pracy aktywności transkrypcyjnej receptorów Flt-1 i Flk-1 w badanych przy-

padkach zmian śród nabłonkowych szyjki macicy sugeruje, że pojawienie się tej aktywności powinno być wyraźnym wskaźnikiem wiążącym się z ryzykiem progresji zmiany, aczkolwiek prowadzona dalsza ocena względnego ryzyka progresji zmiany śród nabłonkowej w porównaniu z grupą kontrolną nie wskazała na znaczny jego wzrost; RW dla Flt-1 =2,26±1,24 (95 proc. =0,14–4,66) i RW dla Flk-1 =2,41±1,13 (95 proc.=0,2–4,62). Obserwacja ta potwierdza fakt nie w pełni poznanej drogi przenoszenia sygnału oraz autokrynej i parakrynej regulacji ekspresji genów VEGF, Flt-1 i Flk-1 w patologii śród nabłonkowej i raku szyjki macicy. Wątpliwości te potwierdzają liczne badania eksperymentalne, w których obserwowano ekspresję wymienionych genów w różnych liniach komórkowych i różnych modelach badawczych [16–24].

Przeprowadzona w tej pracy analiza ryzyka względnego progresji zmiany śród nabłonkowej dużego stopnia do bardziej zaawansowanej zmiany morfologicznej w zależności od pojawienia się form alternatywnego składanie mRNA receptorów VEGF, wykazała niewielki jego wzrost przy obecności sFlt-1, chociaż brak znamienych różnic w aktywności transkrypcyjnej i występowaniu mRNA tej formy receptora w badanej tkance pomiędzy HSIL i grupą kontrolną, podczas gdy obecność mRNA pozostałych receptorów powoduje wzrost ryzyka względnego progresji; w przypadku Flt-1 – prawie 6-krotnie i Flk-1 – 5-krotnie. Wysokie znamienne różnice aktywności transkrypcyjnej tych receptorów pomiędzy HSIL, grupą kontrolną oraz LSIL wskazują na możliwość zastosowania oceny aktywności transkrypcyjnej wymienionych czynników angiogennych, jako czułych markerów progresji zmiany śród nabłonkowej i raka szyjki macicy.

Wbrew oczekiwaniom, wraz ze wzrostem patologii morfologicznej,

nie zaobserwowano wzrostu aktywności transkrypcyjnej Flt-1 i Flk-1 w badanych wycinkach tkankowych raka szyjki macicy, a w niektórych przypadkach była niższa od grupy HSIL.

Prezentowane w tej pracy obserwacje aktywności transkrypcyjnej Flt-1 i Flk-1 zwracają uwagę na 2 interesujące zjawiska – występowanie mRNA sFlt-1 we wszystkich badanych wycinkach tkankowych raka płaskonabłonkowego szyjki macicy oraz znaczenie wyższej liczby kopii tej izoforny w porównaniu z grupą kontrolną, LSIL i HSIL.

Rola rozpuszczalnej formy receptora Flt-1 – sFlt-1 nie jest w pełni poznana, jakkolwiek przypuszcza się, że poprzez duże powinowactwo do wszystkich izoform VEGF stabilizuje te czynniki w przestrzeni międzykomórkowej, chroniąc je przed działaniem znajdujących się w niej proteaz i tym samym przedłużając czas półtrwania cytokin angiogennych w środowisku zewnątrzkomórkowym [25]. W badaniu eksperymentalnym ekspresji genu Flt-1 pozbawionego domeny tyrozynowo-tymidynowej w łóżyskach mysich zaobserwowano prawidłowy proces angiogenezy i jedynie supresję chemotaksji monocytów, niejako w odpowiedzi na VEGF [26]. Przeprowadzony eksperyment *in vivo* wskazał także na funkcję sFlt-1, polegającą na wyłapywaniu izoform VEGF ze środowiska międzykomórkowego, zmniejszenie ich dostępności do śródbłonka naczyniowego i tym samym zmniejszenie efektu mitogennego wywołanego przez VEGF [26].

Po zakończeniu badań wycinków pochodzących z raka płaskonabłonkowego szyjki macicy najwyższą wartość ryzyka względniego progresji w zależności od występowania form mRNA Flk-1 i Flt-1 zaobserwowano w przypadku Flk-1, który powoduje wzrost ryzyka 5-krotnie w stosunku do

przypadku braku obecności mRNA tego receptora. W przypadku mRNA Flt-1 względne ryzyko progresji jest tylko nieco niższe (RW=4,58).

Udokumentowanie zasadniczej roli receptorów Flt-1, sFlt-1 i Flk-1 w angiogenezie nowotworów sprawia, że są poszukiwane różne biologiczne czynniki przerywające przenoszenie sygnału mitogennego do komórek śródbłonka poprzez supresję receptora, stając się celem poszukiwania nowych metod terapeutycznych w onkologii. Jedną z nich jest zastosowanie rekombinowanej rozpuszczalnej formy Flk-1 (sFlk-1) silnie wiążącą się z receptorem, a wiązanie to nie wymaga obecności heparyny [27]; inną zastosowanie specyficznego przeciwciała (scFv anty-KDR) całkowicie blokujące drogę przenoszącą sygnał angiogenezy VEGF/KDR/Flk-1 [28].

#### PIŚMIENNICTWO

1. Klagsbrun M, D'Amore P. *Vascular endothelial growth factor and its receptors*. Cytokine Growth Factor Rev 1996; 7: 259-70.
2. Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. *Requirement for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor*. J Biol Chem 1998; 273: 11197-204.
3. Ferrara N. *Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis*. Kidney Int 2001; 56: 794-814.
4. Ferrara N, Davis-Smyth T. *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocrin Rev 1997; 18: 4-25.
5. Peters KG, De Vries C, Williams LT. *Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth*. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 8915-9.
6. Shen B-Q, Lee DY, Gerber H-P, Keyt BA, Ferrara N, Zioncheck TF. *Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro*. J Biol Chem 1998; 273: 29979-85.
7. Suzuki H, Seto K, Shinoda Y, Mori M, Ishimura Y, Suematsu M, Ishii H. *Pa-*

- racrine upregulation of VEGF receptor mRNA in endothelial cells by hypoxia-exposed Hep G2 cells*. Am J Physiol 1999; 276: G92-G97.
8. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Moller NPH, Risau W, Ullrich A. *High affinity VEGF binding and developmental expression suggest flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis*. Cell 1993; 72: 835-46.
9. Vajkoczy P, Thurnher A, Hirth KP, Schilling L, Schmiedek P, Ullrich A, Menger MD. *Measuring VEGF-flk-1 activity and consequences of VEGF-flk-1 targeting in vivo using intravital microscopy: clinical applications*. Oncologist 2000; 5 suppl 1: 16-9.
10. Chen H, Ikeda U, Shimpo M, Maeda Y, Shibuya M, Ozawa K, Shimada K. *Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by transfection with the soluble flt-1 gene*. J Cardiovasc Pharmacol 2000; 36: 496-502.
11. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. FASEB J 1999; 13: 9-22.
12. Chomczynski P, Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem 1987 Apr; 162 (1): 156-9.
13. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. *Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia*. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 1237-45.
14. Ortéga N, Hutchings H, Plouët J. *Signal relays in the VEGF system*. Frontiers in Bioscience 1999; 4: d141-152.
15. Speirs V, Atkin SL. *Preduction of VEGF and expression of the VEGF receptors flt-1 and KDR in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from breast tumours*. Brit J Cancer 1999; 80: 898-903.
16. Backer MV, Backer JM. *Targeting endothelial cells overexpressing VEGFR-2: selective toxicity of Shiga-like toxin – VEGF fusion proteins*. Bioconjugate Chem 2001; 12: 1066-73.
17. Bhatt AJ, Pryhuber GS, Huyck H, Watkins RH, Metlay LA, Maniscalco WM. *Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia*. Am J Respir Crit Care Med 2001; 164: 1971-80.



18. Kearney JB, Ambler CA, Monaco K-A, Johnson N, Rapoport RG, Bautch VL. *Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division.* Blood 2002; 99: 2397-407.
19. Koolwijk P, Peters E, van der Vacht B, et al. *Involvement of VEGFR-2 (kdr/flk-1) but not VEGFR-1 (flt-1) in VEGF-A and VEGF-C-induced tube formation by human microvascular endothelial cells in fibrin matrices in vitro.* Angiogenesis 2001; 4: 53-60.
20. Lu D, Jimenez X, Zhang H, Bohlen P, Witte L, Zhu Z. *Selection of high affinity human neutralizing antibodies to VEGFR2 from a large antibody phage display library for antiangiogenesis therapy.* Int J Cancer 2002; 97: 393-9.
21. McLeod DS., Taomoto M, Cao J, Zhu Z, Witte L, Luty GA. *Localization of VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1) and effects of blocking it in oxygen-induced retinopathy.* Invest Ophthalmol Vis Science 2002; 43: 474-82.
22. Masood R, Gordon EM, Whitley MD, et al. *Retroviral vectors bearing IgG-binding motifs for antibody-mediated targeting of vascular endothelial growth factor receptors.* Int J Mol Med 2001; 8: 335-43.
23. Thuringer D, Maulon L, Frelin C. *Rapid transactivation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk-1 by the bradykinin B2 receptor contributes to endothelial nitric-oxide synthase activation in cardiac capillary endothelial cells.* J Biol Chem 2002; 277: 2028-32.
24. Zeng H, Zhao D, Mukhopadhyay D. *Flt-1-mediated down-regulation of endothelial cell proliferation through pertussis toxin-sensitive G proteins,  $\beta\gamma$  subunits, small GTPase CDC42 and partly by Rac-1.* J Biol Chem 2002; 277: 4003-9.
25. Hornig C, Weich HA. *Soluble VEGF receptors.* Angiogenesis 1999; 3: 33-9.
26. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. *Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice.* Proc Natl Acad Sci 1998; 95: 9349-54.
27. Huang X, Gottstein C, Brekken RA, Thorpe PE. *Expression of soluble VEGF receptor 2 and characterisation of its binding by surface plasmon resonance.* Biochem Biophys Res Comm 1998; 252: 643-8.
28. Zhu Z, Rockwell P, Lu D, Kotanides H, Pytowski B, Hicklin DJ, Bohlen P, Witte L. *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced receptor activation with anti-kinase insert domain-containing receptor single-chain antibodies from a display library.* Cancer Res 1998; 58: 3209-14.

**ADRES DO KORESPONDENCJI**

dr med. **Bogdan Michalski**  
ul. Graniczna 63/36  
40-018 Katowice  
bogdan@proloc.com.pl