

Badania wskazują na kluczową rolę angiogenezy w procesie progresji zmian śród nabłonkowych i raka szyjki macicy. Największe działanie angiogenne wykazuje VEGF. Znanych jest 6 izoform, które powstają na drodze alternatywnego dojrzewania mRNA: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ oraz VEGF₂₀₆. 119 biopłatów (43 wycinki nabłonka prawidłowego, 38 LSIL, 17 HSIL, 21 wycinki stanowił rak płaskonabłonkowy w stopniu zaawansowania klinicznego IB – IIB) szyjki macicy po ocenie patomorfologicznej poddano analizie molekularnej aktywności transkrypcyjnej VEGF (oznaczając ilość kopii mRNA/1 µg całkowitego RNA w badanej tkance) i występowania typów alternatywnego składania mRNA. Oceniano względne ryzyko progresji zmian nowotworowych w zależności od występowania form alternatywnego składania mRNA. Aktywność transkrypcyjna VEGF w grupie HSIL była znamienne wyższa niż w grupach LSIL i prawidłowych tkanek nabłonka, aktywność transkrypcyjna VEGF w grupie LSIL była znamienne wyższa niż w prawidłowych tkankach nabłonka. Nie zaobserwowano wzrostu aktywności transkrypcyjnej VEGF w badanych wycinkach tkankowych raka szyjki macicy w porównaniu z grupą HSIL. W zależności od stwierdzenia izoformy VEGF ryzyko progresji LSIL wynosi odpowiednio: dla VEGF₁₂₁ – 2,28, dla VEGF₁₄₅ – 1,32, dla VEGF₁₆₅ – 1,53, dla VEGF₁₈₃ – 1,73, dla VEGF₁₈₉ – 2,02, dla VEGF₂₀₆ – 1,45. W zależności od stwierdzenia izoformy VEGF ryzyko progresji HSIL wynosi odpowiednio: dla VEGF₁₂₁ – 8,94, dla VEGF₁₈₉ – 12,95, dla VEGF₂₀₆ – 9,81. W zależności od stwierdzenia izoformy VEGF ryzyko progresji raka wynosi odpowiednio: dla VEGF₁₂₁ – 9,35, dla VEGF₁₆₅ – 5,49, dla VEGF₁₈₃ – 4,46, dla VEGF₁₈₉ – 3,58, dla VEGF₂₀₆ – 21,29.

Słowa kluczowe: angiogeneza, rak szyjki macicy, SIL, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆

Ocena ryzyka progresji zmian śród nabłonkowych i raka szyjki macicy w aspekcie występowania typów alternatywnego składania mRNA VEGF – VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆

Prognostic significance of occurrence of alternative splice mRNA VEGF forms – VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ in squamous intraepithelial lesions and cervical cancer

Bogdan Michalski¹, Urszula Mazurek², Adrian Łukasik¹, Anna Fila², Tadeusz Wilczok², Piotr Pordzik¹, Ryszard Poręba¹

¹ Katedra i Oddział Kliniczny Ginekologii i Położnictwa w Tychach,

² Katedra Biologii Molekularnej, Biochemii i Biofarmacji w Sosnowcu, Śląska Akademia Medyczna w Katowicach

WSTĘP

Zmiany śród nabłonkowe małego (LSIL – *low grade squamous intraepithelial lesion*) i dużego stopnia (HSIL – *high grade squamous intraepithelial lesion*), patomorfologicznie klasyfikowane jako zmiany przednowotworowe, reprezentują heterogenną jednostkę kliniczną, posiadającą różnorodny biologiczny potencjał rozwojowy [1]. W przybliżeniu połowa zmian śród nabłonkowych małego stopnia zachowuje się jak zmiana łagodna, często ulegając spon-tanicznej regresji, podczas gdy druga połowa posiada fenotyp

prawdziwie przednowotworowy, pozostając zmianą przetrwałą, lub ulegającą progresji do wyższych stopni patologii morfologicznej [2].

Kolposkopowe obserwacje rysunku naczyń oraz wcześniejsze badania współczynnika średniej gęstości mikronaczyń w prawidłowym i patologicznym nabłonku szyjki macicy [3] wyraźnie wskazują na kluczową rolę angiogenezy w progresji zmian śród nabłonkowych i raka szyjki macicy [4].

Spośród licznych białek opisywanych jako czynniki proangiogenne, które biorą udział w procesie tworzenia nowych naczyń, tylko VEGF,

Investigations show, that angiogenesis has largest meaning in process of progression of cervical cancer. Largest proangiogenic working shows VEGF. Well-known is six isoforms, which come into being mRNA: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ as well as VEGF₂₀₆ on road of alternative maturation. 119 segments (43 segments of proper epithelium, 38 LSIL, 17 HSIL, cervical cancer made up 21 segments in degree of clinical advancement IB – IIB) were pathomorphological estimated and molecular analysis was surrendered. Degree of expression VEGF was estimated (marking quantity of copy mRNA/1 µg RNA in studied tissue). Risk of cancer progression in aspect of occurrence of alternative splice mRNA VEGF forms were estimated. VEGF transcriptive activity in HSIL group was significantly higher in comparison with group LSIL and proper tissues of epithelium groups, VEGF transcriptive activity in LSIL group was significantly higher in comparison with proper tissues of epithelium group. Height of VEGF transcriptive activity in studied tissues segments of cervical cancer were not observed. In dependence from affirming isoforms VEGF risk of progression LSIL carries out suitably: for VEGF₁₂₁ – 2.28, for VEGF₁₄₅ – 1.32, for VEGF₁₆₅ – 1.53, for VEGF₁₈₃ – 1.73, for VEGF₁₈₉ – 2.02, for VEGF₂₀₆ – 1.45. In dependence from affirming isoforms VEGF risk of progression HSIL carries out suitably: for VEGF₁₂₁ – 8.94, for VEGF₁₈₉ – 12.95, for VEGF₂₀₆ – 9.81. In dependence from affirming isoforms VEGF risk of progression of cervical cancer carries out suitably: for VEGF₁₂₁ – 9.35, for VEGF₁₆₅ – 5.49, for VEGF₁₈₃ – 4.46, for VEGF₁₈₉ – 3.58, for VEGF₂₀₆ – 21.29.

Key words: angiogenesis, cervical cancer, squamous intraepithelial lesion, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₅₆, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆.

wg Riseau'a [5], spełnia wszystkie cechy czynnika angiogenego:

- ▶ obecny tylko w czasie trwania procesu angiogenezy,
- ▶ nie występuje, jeżeli w organizmie dorosłym aktualnie nie są tworzone nowe naczynia,
- ▶ jego działanie jest ograniczone ściśle do komórek śródbłonka naczyniowego i bezpośrednio wpływa na ekspresję jego receptorów,
- ▶ jego nadekspresja zawsze wiąże się z powstaniem nowych naczyń,
- ▶ neutralizowanie jego działania (przez naturalne lub syntetyczne inhibitory) lub poprzez zablokowanie funkcji przenoszenia sygnału przez receptor zawsze hamuje powstawanie nowych naczyń.

Gen VEGF, składający się z 8 egzonów, zlokalizowano w prążku 21.3 chromosomu 6, a jego region kodujący zajmuje obszar ok. 14 kb [6]. Na drodze alternatywnego dojrzewania mRNA, dość powszechnie spotykanego zjawiska, polegającego na różnicowym wycinaniu intronów z cząsteczki premRNA, z pojedynczego genu powstają wszystkie izoformy białka VEGF [7].

Znanych jest obecnie sześć izoform tego białka: VEGF₁₂₁ [7], VEGF₁₄₅ [8], VEGF₁₆₅ [9], VEGF₁₈₃ [10], VEGF₁₈₉ [11], oraz VEGF₂₀₆ [11] (liczby oznaczają ilość aminokwasów tworzących dane białko). Cząsteczka mRNA wszystkich izoform posiada eksony 1–5, zawierające informację wymaganą do rozpoznania specyficznych receptorów – VEGFR-1 (Flt-1) i VEGFR-2 (KDR/Flk-1), a różnice dotyczą obecności lub braku eksonów 6, 6', 7 lub 8. Ekson 6 może występować w formie skróconej, jak to się zdarza w izoformie VEGF₁₈₃. Cząsteczka mRNA izoformy VEGF₂₀₆ zawiera wszystkie eksony i jako jedyna zawiera ekson 6'. Pozostałe izoformy VEGF są pozbawione eksonu 6', ponieważ w trakcie obróbki pre-mRNA wykorzystywane jest alternatywne miejsce składania eksonów w miej-

scu 563. VEGF₁₈₉ jest pozbawiony całkowicie eksonu 6' o długości 51 par zasad (co jest równoważne 17 aminokwasom białka), a VEGF₁₈₃ powstaje na skutek odcięcia kolejnych 18 par zasad z końca 3' eksonu 6 liczącego 72 pary zasad. Transkrypt VEGF₁₆₅ nie ma w ogóle eksonu 6, transkrypt VEGF₁₄₅ eksonu 7, a VEGF₁₂₁ jednocześnie eksonu 6 i 7 [12] (ryc. 1.).

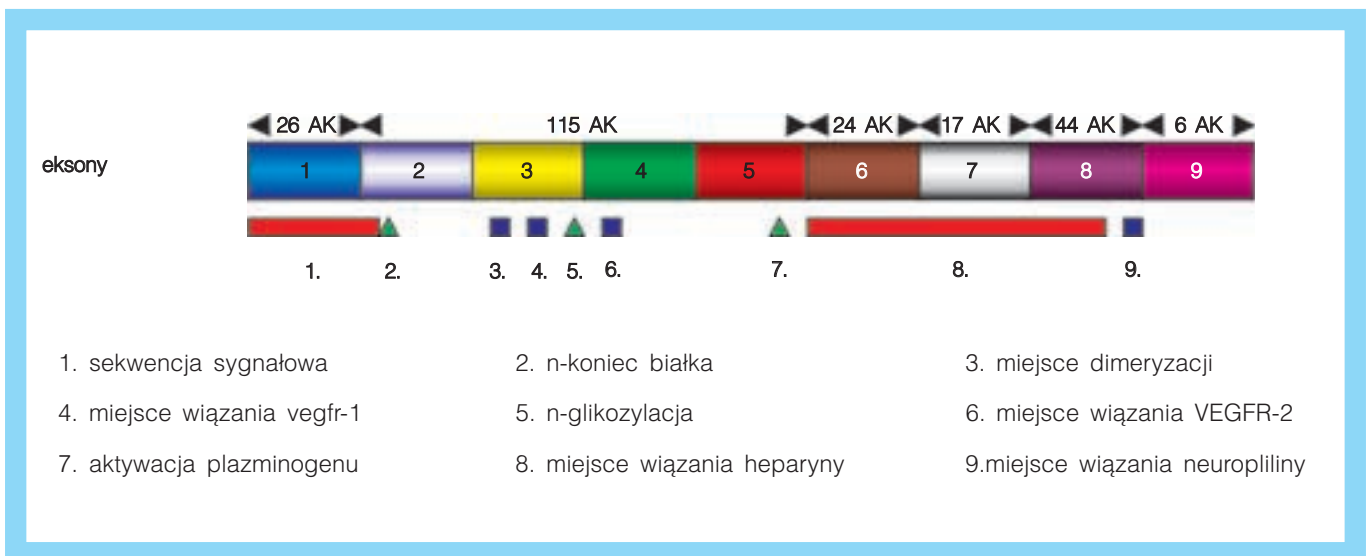
W rodzinie izoform naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF₁₂₁ jest najmniejszym, całkowicie rozpuszczalnym, słabo kwaśnym białkiem, nie wiążącym się z heparyną, o silnych właściwościach mitogennych i zwiększających przepuszczalność naczyń [13].

W przeciwieństwie do VEGF₁₂₁ i VEGF₁₆₅, VEGF₁₄₅ wiąże się z błoną podstawną, dlatego przedstawia formę posiadającego odrębną charakterystykę biologiczną. Izoforma ta zawiera ekson 6, warunkujący możliwość wiązania się z heparyną podobnie, jak VEGF₁₆₅, lecz biologicznie zachowuje się jak VEGF₁₂₁ [14].

VEGF₁₆₅, podobnie jak VEGF₁₂₁ jest zaliczana do czynników rozpuszczalnych. Niemniej poprzez fakt posiadania w swojej budowie domeny, kodowanej przez ekson 7, umożliwiającej wiązanie się z heparyną, nabywa ona nowych, specyficznych właściwości [9].

mRNA VEGF₁₈₃ różni się od większej izoformy VEGF₁₈₉ brakiem tylko 18 bp, a utrata tego fragmentu genomu ma wpływ na ruchliwość białka w komórce i macierzy pozakomórkowej, przenoszenie sygnału, zdolność wiązania heparyny, interakcję z innymi czynnikami wzrostu, aktywność mitotyczną i wiązanie receptorów [15].

W pełnej długości genu ekson 6 i 7 kodują domeny kationowe, która nadaje izoformie VEGF₁₈₉ aktywność wiązania heparyny [6], radykalnie kształtując kierunek działania, wyraźnie skierowany na elementy przestrzeni międzykomórkowej (ECM) stymulując w niej podziały komórek,



Ryc. 1. Struktura białka VEGF₂₀₆ powstającego w wyniku połączenia wszystkich eksonów mRNA VEGF z zaznaczeniem miejsc aktywnych, wiążących receptory i inne czynniki wpływające na specyficzność biologiczną białka w środowisku wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym (AK – liczba aminokwasów kodowanych przez dany ekson)

fosforylację receptorów dla VEGF, wzrost wewnątrzkomórkowego Ca²⁺, ekspresję genów, migrację różnych elementów ECM [16].

VEGF₂₀₆ jest jedyną izoformą posiadającą w swoim składzie wszystkie, kodowane przez gen VEGF eksony [7] i podobnie jak VEGF₁₈₉ posiada miejsce silnie wiążące heparynę i w wyniku tego jest izoformą związaną z powierzchnią komórek [11]. Niewiele doniesień mówi o występowaniu tej izoformy, a jeszcze mniej o roli, jaką spełnia w procesie angiogenezy.

Celem przedstawionej pracy jest ocena wartości diagnostycznej występowania poszczególnych typów alternatywnego składu mRNA VEGF – VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ w prognozowaniu ryzyka progresji zmian śródnabłonkowych i raka szyjki macicy.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło 119 wycinków tkankowych szyjki macicy zakwalifikowanych do następujących grup morfologicznych,:

- I. grupa kontrolna (K) – 43 wycinki tkankowe pochodzące z prawidłowej szyjki macicy,
- II. grupa LSIL (LSIL) – 38 wycinków,

III. grupa HSIL (HSIL) – 17 wycinków,

IV. grupa raka płaskonabłonkowego w stopniu klinicznego zaawansowania IB – IIB (RAK) – 21 wycinków.

Materiał tkankowy bezpośrednio po pobraniu zamrażano do –70°C.

EKSTRAKCYJA RNA

Po wstępnym kruszeniu komórek w ciekłym azocie z homogenatu ekstrahowano DNA i RNA przy zastosowaniu zmodyfikowanej metody wg Chomczyńskiego i Sachi [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 VEGF

Aktywność transkrypcyjną badanych genów wyznaczano na podstawie analizy kinetyki reakcji QRT-PCR, w której matrycą były ekstrakty całkowitego RNA otrzymywane z wycinków tkanek. W pierwszej części badań projektowano reakcję QRT-PCR dla badanych transkryp-

tów i produktów ich modyfikacji posttranskrypcyjnej. Sprawdzano empirycznie i optymalizowano zaprojektowane reakcje oraz potwierdzano specyficzność amplimerów techniką elektroforezy w żelu polakrylamidowym, barwionym srebrem i metodą sekwencjonowania enzymatycznego. Dla wszystkich zaprojektowanych reakcji QRT-PCR przyjęto identyczne warunki termiczne oraz mieszanie 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 µg całkowitego mRNA badanego wycinka.

PROJEKTOWANIE SPECYFICZNYCH STARTERÓW I SOND STOSOWANYCH W REAKCJI QRT-PCR DLA MRNA VEGF

Sekwencję nukleotydów starterów oraz sond dla reakcji RT-QPCR zaprojektowano na podstawie 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/irx/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 VEGF, było sekwencjonowanie produktów amplifikacji prowadzone metodą Sanger [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 zaleceniami 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 Mg²⁺ i Mn²⁺ do mieszaniny reakcyjnej w odpowiednich proporcjach umożliwiło wykonanie reakcji QRT-PCR w jednej próbówce, w mieszaninie reakcyjnej zawierającej 1x Tth PCR Buffer zawierający fluorochrom zapewniający odpowiednie tło dla pomiaru fluorescencji po każdym cyklu termicznym QRT-PCR, 3mM MgCl₂, 400 μM. dATP, 400 μM. dTTP. 400 μM. dGTP, 400 μM. dCTP, 1 x wzmacniacz reakcji PCR, 0,5 μM MnSO₄, 0,3 μM starter 1 i starter 2, 0,2 μM sondy wyznakowanej fluorochromami FAM i TAMRA, 1–10 μg całkowitego RNA, 2,5 U polimerazy DNA Tth. Reakcję Q-RT-PCR wykonywano z zastosowaniem detektora sekwencji ABI PRISM™ 7700.

WYNIKI

Zaobserwowane wielkości maksymalne VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅ i VEGF₁₈₃ w prawidłowej strefie regeneracji nie przekraczały wartości 1 x 10³ kopii mRNA/1 μg całkowitego RNA. Jedynie VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆ charakteryzowały się podwyższonymi wartościami w granicach nawet

do 2 x 10⁴ kopii/1 μg całkowitego. Najczęściej występującą izoformą była VEGF₁₄₅, którą zarejestrowano w 53,49 proc. wszystkich wycinków pochodzących z prawidłowej szyjki macicy (ryc. 2A.). W 1/4 wszystkich przypadków grupy kontrolnej stwierdzono występowanie VEGF₁₆₅ (25,58 proc.) (ryc. 2A.) i VEGF₂₀₆ (25,58 proc.) (ryc. 2B.).

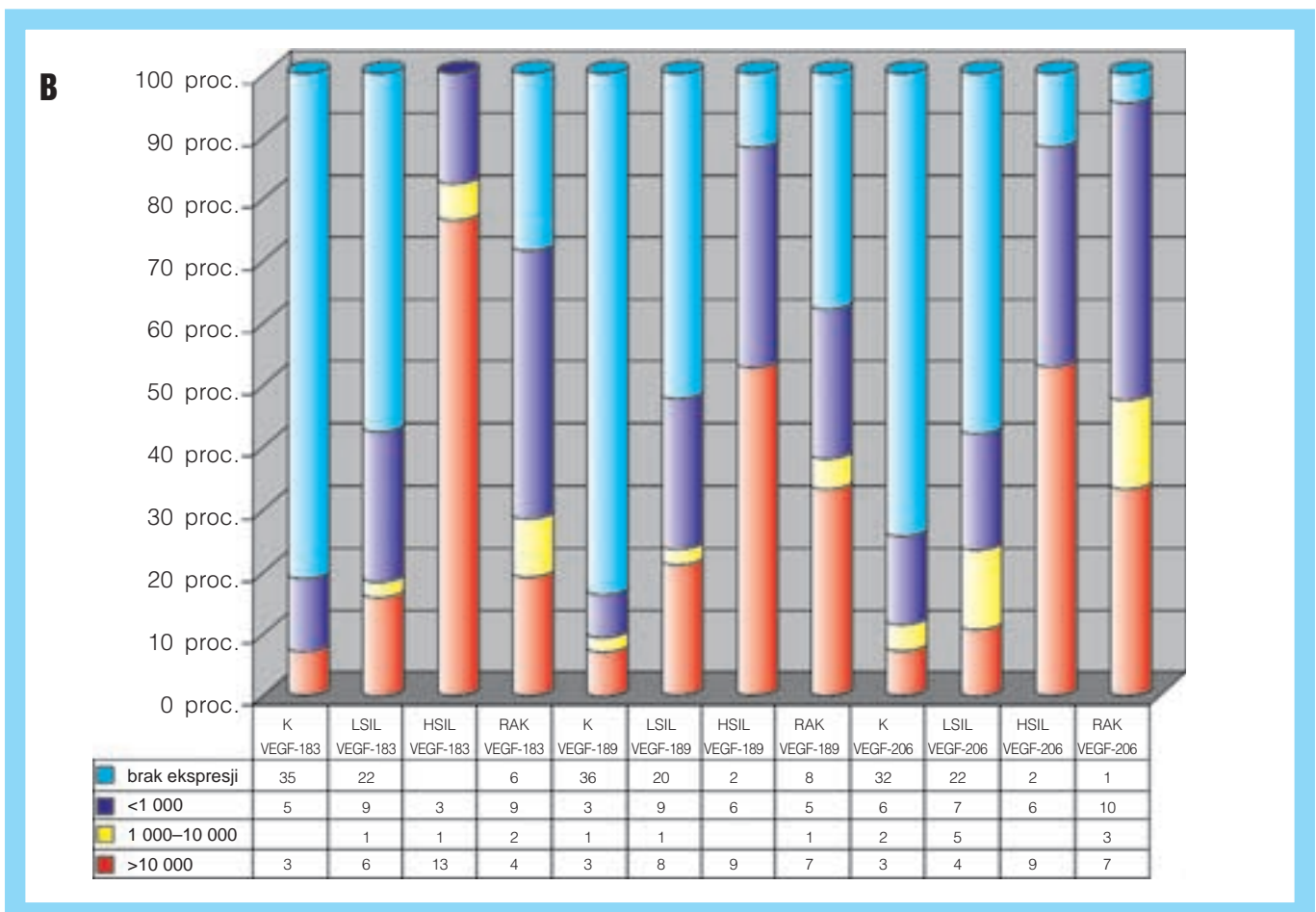
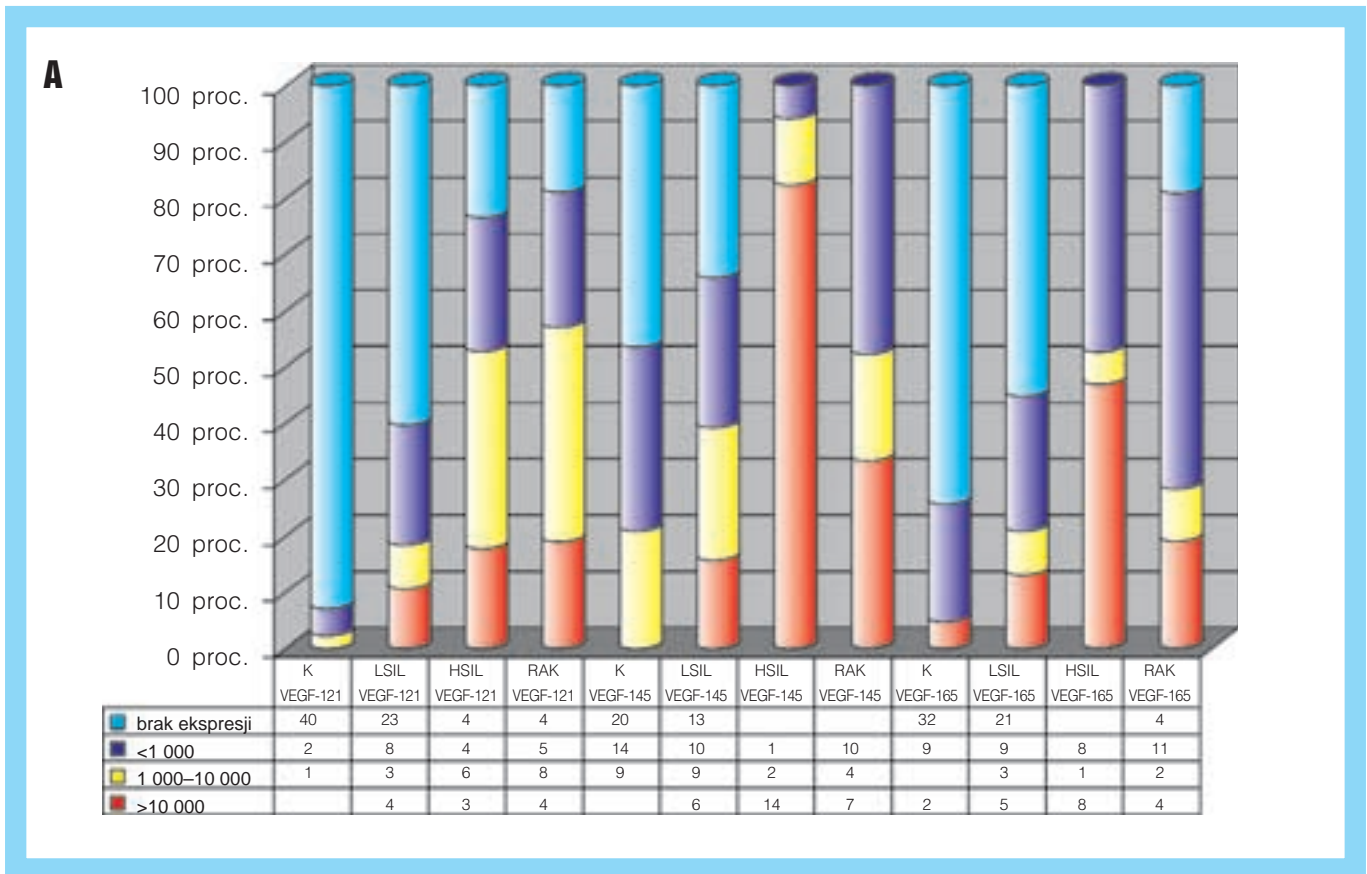
Aktywność transkrypcyjna VEGF w grupie LSIL była znamienne wyższa od grupy kontrolnej (p <0,05), a jedynie ilość kopii mRNA VEGF₂₀₆ nie różniła się znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 2B.). W grupie LSIL znamienne częściej zaobserwowano obecność VEGF₁₂₁ (p <0,001; Chi²_{Pearsona} = 12,3) (ryc. 2A.) oraz VEGF₁₈₉ (p <0,05; Chi²_{Pearsona} = 9,14) w porównaniu do grupy kontrolnej, a w przypadku pozostałych izoform nie potwierdzono statystycznie istotnych różnic w częstości występowania (ryc. 2B.).

Grupa HSIL charakteryzowała się najwyższą aktywnością transkrypcyjną genu VEGF i jakkolwiek zarejestrowane niektóre wartości maksymalne były porównywalne z grupą LSIL, to niemniej liczba kopii mRNA poszczególnych izoform VEGF w większości badanych przypadków mieściła się w zakresie wartości maksymalnych różniąc się znamienne od zaobserwowanych w grupie kontrolnej (p <0,001)

Tab. Ryzyko względne progresji zmiany śród nabłonkowej małego stopnia (LSIL), dużego stopnia (HSIL) i raka szyjki macicy w stopniu klinicznego zaawansowania IB – IIB w zależności od pojawienia się formy alternatywnego składania mRNA VEGF – VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆

	LSIL (N = 38)		HSIL (N = 17)		rak (N = 21)		grupa kontrolna (N= 43)
	n (proc.)	RW	n (proc.)	RW	n (proc.)	RW	n (proc.)
VEGF ₁₂₁	15 (39)	2,28	13 (76)	8,94	17 (81)	9,35	3 (7)
VEGF ₁₄₅	25 (66)	1,32	17 (100)	–	21 (100)	–	23 (53,5)
VEGF ₁₆₅	17 (45)	1,53	17 (100)	–	17 (81)	5,49	11 (25,6)
VEGF ₁₈₃	16 (42)	1,73	17 (100)	–	15 (71)	4,46	8 (18,6)
VEGF ₁₈₉	18 (47)	2,02	15 (88)	12,95	13 (62)	3,58	7 (16,3)
VEGF ₂₀₆	16 (42)	1,45	15 (88)	9,81	20 (95)	21,29	11 (25,6)

N – liczebność grupy,
n – liczba przypadków z badaniem czynnikiem ryzyka,
RW – ryzyko względne



Ryc. 2A. i B. Porównanie procentowego rozkładu aktywności transkrypcyjnej genu VEGF w przedziałach do 1 000, 1 000 – 10 000 i powyżej 10 000 kopii mRNA VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ w 1 µg całkowitego RNA w grupie kontrolnej (K), LSIL, HSIL i raka szyjki macicy

i grupie LSIL ($p < 0,05$). W grupie HSIL zaobserwowano częstsze występowanie mRNA VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,001$) i LSIL ($p < 0,05$) (ryc. 2A. i B.).

Wbrew oczekiwaniom, nie zaobserwowano wzrostu aktywności transkrypcyjnej VEGF w wycinkach tkankowych raka szyjki macicy, a w niektórych przypadkach była niższa od grupy HSIL (ryc. 2A. i B.).

Obserwacja zakresu wartości minimalnych i maksymalnych wykazała podobieństwo do grupy HSIL, aczkolwiek wykazano statystycznie znamienne różnice w porównaniu z grupą kontrolną i LSIL ($p < 0,001$). Częstość występowania poszczególnych izoform VEGF była identyczna jak w grupie HSIL, a jedynie mRNA VEGF₁₈₃ było znamienne częściej rejestrowane niż w grupie HSIL ($p < 0,05$; $\chi^2_{\text{Pearsona}} = 5,8$) (ryc. 2B.).

W sposób bezpośredni w badaniu prospektywnym oceniono ryzyko względne progresji zmian morfologicznych w zależności od występowania formy alternatywnego składania mRNA VEGF (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆). W przypadku stwierdzenia mRNA VEGF₁₂₁ w stosunku do grupy kontrolnej ryzyko progresji LSIL będzie 2,28 razy wyższe (RW = 2,28±1,56; 95 proc. = 0,78 – 5,34) i podobnie w przypadku VEGF₁₈₉ (RW = 2,02±1,06; 95 proc. = 0,06 – 4,09), podczas gdy dla VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃ i VEGF₂₀₆ ryzyko to wzrasta niewiele i mieści się w zakresie – RW = 1,32 – 1,73 (tabela).

W przypadku stwierdzenia występowania mRNA izoformy VEGF₁₂₁ w wycinku z cechami morfologicznymi zmiany śródnabłonkowej dużego stopnia (HSIL), względne ryzyko progresji do form bardziej zaawansowanych będzie 10-krotnie wyższe niż w przypadku niewystępowania tej izoformy w badanym materiale tkankowym (RW =

8,94±7,4; 95 proc. = 5,56 – 23,44). Podobnie w przypadku VEGF₁₈₉ (12,95±11,12 (95 proc. = 8,85 – 34,76), oraz VEGF₂₀₆ ryzyko wzrasta 9,81±8,14 (95 proc. = 6,15 – 25,76) (tabela).

W raku płaskonabłonkowym szyjki macicy najwyższą wartość ryzyka względnego progresji w zależności od występowania form alternatywnego składania mRNA VEGF stwierdzono w przypadku VEGF₂₀₆, który powoduje wzrost ryzyka 21-krotnie (RW = 21,29±23,05; 95 proc. = 23,89 – 66,47) w stosunku do przypadku braku obecności mRNA tej izoformy w badanej tkance (tabela). W przypadku stwierdzenia obecności mRNA VEGF₁₂₁ w stosunku do grupy porównawczej ryzyko progresji jest 9-krotnie wyższe (RW = 9,35±7,64; 95 proc. = 5,62 – 24,32) i podobnie w przypadku VEGF₁₄₅ (RW = 9,77±10,45), VEGF₁₆₅ (RW = 5,45), VEGF₁₈₃ (RW = 4,46) i VEGF₁₈₉ (RW = 3,58).

OMÓWIENIE

Wzrastająca liczba publikacji dowodzi, że raczej wzajemny stosunek izoform VEGF, a nie całkowity VEGF jest odpowiedzialny za angiogenezę, tak w procesach fizjologicznych, jak i stanach patologicznych [19–22]. Niedosyt z fragmentarycznej wiedzy na temat roli tych izoform w strefie regeneracji pogłębia fakt niezwykle ważnego znaczenia tego miejsca, charakteryzującego się podwyższonym potencjałem proliferacyjnym komórek znajdujących się w tej strefie [24] w inicjacji raka szyjki macicy [23], charakteryzującego się podwyższonym potencjałem proliferacyjnym komórek znajdujących się w tej strefie [24].

W prawidłowej szyjce macicy stwierdzono w tej pracy występowanie wszystkich sześciu typów mRNA (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆), których różnice w ekspresji, oraz charakterystycznych układów jednocześnie występujących różnych form

alternatywnego składania są widoczne, zwłaszcza wyższe wartości w aktywności izoform VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆, co może mieć związek z wcześniejszymi obserwacjami zwiększonego potencjału proliferacyjnego nabłonka metaplastycznego w strefie regeneracji szyjki macicy i prawdopodobnym wpływem na intensyfikację angiogenezy właśnie w tym miejscu.

Zaobserwowana w tym eksperymencie ekspresja izoformy VEGF₁₄₅, która zachowuje się podobnie jak VEGF₁₂₁ i VEGF₁₆₅, wiążąc się z błoną podstawną wskazuje na rolę tej izoformy w fizjologicznych procesach modelowania podnabłonkowej sieci naczyniowej w strukturach łącznotkankowych.

Fakt ten, wraz z zaobserwowaną dominującą ekspresją izoformy VEGF₂₀₆, która w swoich właściwościach charakteryzuje się aktywnym działaniem w przestrzeni międzykomórkowej, może sugerować, że zaobserwowana aktywność transkrypcyjna i charakterystyczny układ form alternatywnego składania mRNA VEGF moduluje w podścielisku nabłonkowym już istniejącą prawidłową sieć naczyniową, która w ten sposób dostosowuje się do formującego się nabłonka wielowarstwowego płaskiego z jednowarstwowego gruczołowego w procesie metaplazji. Te 2 fakty mogą także stanowić hipotezę występowania fizjologicznego zjawiska autokrynnej stymulacji proliferacji komórek śródnabłonka naczyń podścieliska [25].

Spośród nielicznych prac badawczych, przedstawiających występowanie poszczególnych form alternatywnego składania VEGF zwraca uwagę wynik analizy Fujimoto i wsp. w raku szyjki macicy, którzy w badanych wycinkach kontrolnych (prawidłowa szyjka macicy) nie stwierdzili obecności VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆, a ekspresję wykazała izoforma VEGF₁₂₁ i VEGF₁₆₅ [26]. Niemniej wyniki te są trudne w porównaniu ze względu na różnice metodologiczne i zakres badanych izoform jednocześnie.

W przeprowadzonym badaniu stwierdzono wyższe wartości aktywności transkrypcyjnej VEGF w badanych wycinkach zmian śródnabłonkowych małego stopnia w porównaniu z grupą kontrolną i jedynie liczba kopii mRNA VEGF₂₀₆ była taka sama w obu porównywanych grupach, co może sugerować prosty wniosek o znaczącym wpływie wzrostu aktywności pozostałych izoform VEGF na proces progresji LSIL. Dalsza obserwacja wzajemnych zależności aktywności transkrypcyjnej i częstości występowania form alternatywnego składania mRNA VEGF nie potwierdzają tej hipotezy i ocena względnego ryzyka progresji LSIL dla VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃ i VEGF₂₀₆ wskazała brak wpływu podwyższonych wartości ilości mRNA tych izoform na wzrost stopnia patologii morfologicznej. Jedynie dwie izoformy VEGF₁₂₁ i VEGF₁₈₉ znamienne częściej pojawiały się w badanej patologii morfologicznej w porównaniu ze zdrową szyjką macicy i wykazywały niewielki wzrost względnego ryzyka progresji tych zmian.

Interesującym faktem jest pojawienie się większej liczby kopii mRNA tak odmiennych we właściwościach i miejscach działania izoform jakimi są VEGF₁₂₁, uważanej za główny czynnik mitogeny komórek śródbłonka [27] i VEGF₁₄₅ mającej główne działanie skierowane na macierz śródkomórkową [11].

Obserwacja ta wskazuje na istotny fakt małego potencjału angiogenego oraz proliferacyjnego LSIL i jest zgodna z obserwowanymi cechami samoistnej regresji tych przypadków [1, 2, 28, 29].

Ocena ryzyka względnego progresji zmiany śródnabłonkowej dużego stopnia wskazała na 3 izoformy – VEGF₁₂₁, VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆ podwyższające znacząco to ryzyko, jakkolwiek wszystkie izoformy charakteryzowały się wyższą aktywnością i częstszym występowaniem w porównaniu z LSIL i grupą kontrolną. Dominacja izoformy krótkiej VEGF₁₂₁ przyczyniającej się do roz-

woju angiogenezy poprzez wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych i wzrost proliferacji komórek śródbłonka, oraz jednoczesna obecność izoform długich, takich jak VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆ wskazuje na pełne zaangażowanie genów w indukowanie procesu angiogenezy, którego fenotyp wyrażony jest morfologicznym obrazem zwiększonej liczby mikronaczyń w podścielisku zmiany.

Dobbs i wsp. zaobserwowali wyraźną korelację pomiędzy współczynnikiem średniej gęstości mikronaczyń podścieliska, a ekspresją VEGF w badaniu immunohistochemicznym 70 wycinków prawidłowej szyjki macicy, zmian śródnabłonkowych (LSIL, HSIL) i raka inwazyjnego [30]. Również badania Obermaira i wsp. w grupie 83 przypadków CIN I – CIN III [3], jak i Guidiego i wsp. 66 kobiet w grupach prawidłowej szyjki macicy, LSIL, HSIL i raka inwazyjnego [4] wskazują zgodnie, że największe nasilenie procesu angiogenezy (maksymalne wartości współczynnika średniej gęstości mikronaczyń i ekspresji VEGF) występuje w grupie patologii śródnabłonkowej dużego stopnia. Tym samym stawia hipotezę, że analiza ekspresji genu VEGF, oraz występowanie form alternatywnego składania mRNA powinno pozwolić na określenie fenotypu angiogenego – *złośliwego* – komórek, pozwalającego na ocenę ryzyka progresji zmian śródnabłonkowych i raka szyjki macicy.

Porównanie wyników aktywności transkrypcyjnej genów VEGF grupy kobiet chorujących na raka szyjki macicy w stopniu klinicznego zaawansowania IB-IIb z grupą kontrolną oraz zmian śródnabłonkowych małego i dużego stopnia, zwraca uwagę podobieństwo ekspresji genu VEGF w grupach kobiet z rozpoznaniem rakiem płaskonabłonkowym szyjki macicy i zmianą śródnabłonkową dużego stopnia, które może wskazywać na pewne granice ekspresji tego genu w zmianie patologicznej i prawdopodobny fakt udziału poszczególnych izoform ra-

czej w procesie przygotowania podścieliska do procesu powstawania przerzutów odległych, a nie w samym procesie proliferacji i wzroście masy guza. Obserwacja ta ma pewne potwierdzenie w pracach badawczych porównujących współczynnik gęstości mikronaczyń w podścielisku guza a stanem klinicznym badanych chorych [31, 32].

Wszystkie warianty alternatywnego składania VEGF indukują angiogenezę i pytanie – dlaczego aż sześć izoform VEGF jest wytwarzanych – w aspekcie przeprowadzonego badania znajduje częściowe wytłumaczenie i jednocześnie wytycza dalsze kierunki badawcze w poznaniu angiogenezy nowotworów.

PIŚMIENNICTWO

1. Östör AG. *Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review*. Int J Gynecol Pathol 1993; 12: 186-92.
2. Mitchell MF, Hittelman WN, Hong WK, Lotan R, Schottenfeld D. *The natural history of cervical intraepithelial neoplasia: an argument for intermediate endpoint biomarkers*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1994; 3: 619-26.
3. Obermair A, Bancher-Todesca, Bilgi S, Kaider A, Kohlberger P, Müllauer-Ertl S, Leodolter S, Gitsch G. *Correlation of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in cervical intraepithelial neoplasia*. J Natl Cancer Inst 1997; 89: 1212-7.
4. 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.
5. Risau W. *What, if anything, is an angiogenic factor?* Cancer Metastasis Rev 1996; 15: 149-51.
6. Ferrara N. *Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis*. Kidney Int 2001; 56: 794-814.
7. Ferrara N. *Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor*. J Mol Med. 1999; 77: 527-43.
8. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodyavsky I, Keshet E, Neufeld G. *VEGF145 a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix*. J Biol Chem 1997; 272: 7151-8.

9. Ruckman J, Green LS, Beeson J, Waugh S, Gillette WL, Henninger DD, Claesson-Welsh L, Janjić N. *2'-fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF₁₆₅). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain.* J Biol Chem 1998; 273: 20556-67.
10. Lei J, Jiang, Pei D. *Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF183.* Biochim Biophys Acta 1998; 1443: 400-6.
11. Grützkau A, Krüger-Krasagakes S, Baumeister H, et al. *Synthesis, storage and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for biological significance of VEGF₂₀₆.* Mol Biol Cell 1998; 9: 875-84.
12. Loch T, Michalski B, Mazurek U, Graniczka M. *Naczyniowo-śródnabłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) i jego rola w procesie nowotworowym.* Post Hig Med Dośw 2001; 55: 257-74.
13. Ferrara N, Davis-Smyth T. *The biology of vascular endothelial growth factor.* Endocrin Rev 1997; 18: 4-25.
14. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.* FASEB J 1999; 13: 9-22.
15. Jingjing L, Xue Y, Agarwal N, Roque RS. *Human Müller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor.* Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40: 752-9.
16. Claffey KP, Robinson GS. *Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: Consequences for tumor growth and metastasis.* Cancer Metastasis Rev 1996; 15: 165-76.
17. Chomczynski P, Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.* Anal Biochem 1987; 162: 156-9.
18. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 5463-7.
19. Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, et al. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer.* Brit J Cancer 1998; 77: 998-1002.
20. Cheung N, Wong MP, Yuen ST, Leung SY, Chung LP. *Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon.* Hum Pathol 1998; 29: 910-4.
21. Tomisawa M, Tokunaga T, Oshika Y, et al. *Expression pattern of vascular endothelial growth factor isoform is closely correlated with tumour stage and vascularisation in renal cell carcinoma.* Eur J Cancer 1999; 35: 133-7.
22. Lee YH, Tokunaga T, Oshika Y, et al. *Cell-retained isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) are correlated with poor prognosis in osteosarcoma.* Eur J Cancer 35, 1089-93.
23. Elson DA, Riley RR, Lacey A, Thordarson G, Talamantes FJ, Arbeit JM. *Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis.* Cancer Res 2000; 60: 1267-75.
24. Soini Y, Pöllänen R, Kemppainen S, Pääkö P, Lehto V-P. *The association of vascular proliferation with HPV status and epithelial PCNA positivity in cervical intraepithelial lesions.* APMIS 1996; 104: 183-90.
25. Folberg R, Hendrix MJC, Maniotis AJ. *Vascular mimicry and tumor angiogenesis.* Am J Pathol 2000; 156: 361-81.
26. Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Ichigo S, Tamaya T. *Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its mRNA in uterine cervical cancer.* Brit J Cancer 1999; 80: 827-33.
27. Zhang H-T, Scott PAE, Morbidelli L, et al. *The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo.* Brit J Cancer 2000; 83: 63-8.
28. Hellberg D, Nilsson S, Valentin J. *Positive cervical smear with subsequent normal colposcopy and histology-frequency of CIN in a long-term follow-up.* Gynecol Oncol 1994; 53: 148-51.
29. Kataja V, Syrjänen SM, Mäntyjärvi R, Yliskoski M, Saarikoski S, Syrjänen K. *Prognostic factor in cervical human papillomavirus infections.* Sex Transm Dis 1992; 19: 154-60.
30. Dobbs SP, Hewett PW, Johnson IR, Carmichael J, Murray JC. *Angiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression in cervical intraepithelial neoplasia.* Brit J Cancer 1997; 76: 1410-5.
31. Tjalma W, Van Marck E, Weyler J, et al. *Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer.* Brit J Cancer 1998; 78: 170-4.
32. Kainz C, Speiser P, Wanner C, et al. *Prognostic value of tumour microvessel density in cancer of the uterine cervix stage IB to IIB.* Anticancer Res 1995; 15: 1549-52.

ADRES DO KORESPONDENCJI

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