Ekspresja białek Id1, epidermalnego czynnika wzrostu (EGF) i jego receptora (EGF-R) w nowotworach złośliwych jajnika

The role of Id1 expression with EGF and EGF-R serum concentration assessment in malignant ovarian tumours

Artur Czekierdowski, Sylwia Czekierdowska, Jarosław Daniłoś, Andrzej Nowakowski, Norbert Stachowicz

I Klinika Ginekologii Onkologicznej i Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Jan Kotarski

Przegląd Menopauzalny 2010; 3: 132–139

Streszczenie

Białka grupy Id mogą kontrolować proces neoangiogenezy nowotworowej poprzez interakcje z silnymi czynnikami mitogennymi: epidermalnym czynnikiem wzrostu (*epidermal growth factor* – EGF) i jego receptorem – EGF-R. Celem pracy było zbadanie, czy ocena ekspresji białka Id1, EGF i EGF-R ma związek ze stopniem zróżnicowania histologicznego i zaawansowania klinicznego raka jajnika. Analizowano dane 95 kobiet, w tym pochodzące od 83 pacjentek z guzami złośliwymi. U pozostałych 12 kobiet stwierdzono zmiany niezłośliwe jajnika. Średnia wieku badanych kobiet wynosiła 52,6 ±15,1 roku (zakres 15–83 lat), w tym 43 pacjentki (45,2%) były przed menopauzą. W grupie badanej prawie połowa guzów złośliwych była rakami surowiczymi (n = 38), ponadto badano 23 raki śluzowe, 7 endometrioidalnych oraz 15 guzów różnego pochodzenia, w tym 6 guzów przerzutowych i 5 germinalnych. Stwierdzono istotne statystycznie różnice w stężeniu czynnika EGF i jego receptora EGF-R w zależności od statusu menopauzalnego (odpowiednio p = 0,01 i p = 0,002). Stopień zróżnicowania histologicznego istotnie wpływał na stężenie EGF (p = 0,01). Ponadto stopień zaawansowania klinicznego miał istotny wpływ na ekspresję Id1 (p = 0,09) oraz na stężenie EGF (p = 0,01). Stwierdzono różnice w ekspresji Id1 w zależności od rodzaju histologicznego guza (p = 0,005) i zaawansowania klinicznego. Stężenie czynnika EGF w surowicy było skorelowane z receptorem EGF-R (p = 0,003) oraz z ekspresją białka Id1 (p = 0,0005). Stężenie receptora EGF-R było dodatnio skorelowane z ekspresją Id1 (p = 0,004). Podsumowując, badanie ekspresji białka Id1 i ocena stężenia EGF i EGFR w surowicy mogą być wykorzystane jako dodatkowe parametry charakteryzujące różne typy złośliwych guzów jajnika u kobiet.

Słowa kluczowe: rak jajnika, białko Id1, EGF, EGFR, angiogeneza

Summary

Introduction: Inhibitors of DNA binding/inhibitors of differentiation (Id) protein family (Id1, Id2, Id3 and Id4) may play an important role in various cancer angiogenesis stimulation through interactions with strong mitogenic and angiogenic factors such as EGF and EGFR.

Aim of the study: Our aim was to assess if the expression of Id1 protein with EGF and EGF-R serum concentration assessment is associated with selected epidemiological, clinical and histological features of malignant ovarian tumours.

Material and methods: The study group included 95 women operated because of ovarian tumours. In this group, 83 masses proved to be malignant. The findings were correlated with the tumour type, histological grading and tumour FIGO stage. Tumour Id1 protein was assessed by immunohistochemistry and EGF with EGF-R serum concentrations were examined by ELISA.

Results: The mean age of the patients was 52.6 ±15.1 years and 43 (45.2%) of women in this group were premenopausal. Histological examination revealed that in the malignant group there were 38 serous ovarian cancers, 23 mucinous cancers, 7 endometrioid cancers and 13 other malignant tumours including 6 metastatic to the ovary. Significant differences were found between concentrations of EGF and EGF-R depending on the patient's menopausal status (p = 0.01 and p = 0.002, respectively). Histological grade was significantly correlated with EGF concentrations in women with malignant ovarian tumours (p = 0.01). FIGO stage was also significantly correlated with Id1 expression (p = 0.09) and EGF concentration (p = 0.01). Also, significant correlations were found between Id1 expression, and histological grade and tumour FIGO stage (both p = 0.005).

Adres do korespondencji:
prof. dr hab. **Artur Czekierdowski**, I Klinika Ginekologii Onkologicznej i Onkologii, Uniwersytet Medyczny, ul. Staszica 16, 20-081 Lublin,
e-mail: a.czekierdowski@am.lublin.pl

EGF and EGF-R concentrations were significantly correlated with each other ($p = 0.008$). Moreover, both EGF and EGF-R concentrations were correlated with Id1 expression ($p = 0.0005$ and $p = 0.004$, respectively).

Conclusion: Our results indicate that Id1 protein and EGF with EGF-R concentration assessment may be used as additional prognostic markers in women with various types of malignant ovarian tumours.

Key words: ovarian cancer, Id1 protein, EGF, EGFR, angiogenesis

Rak jajnika pozostaje jednym z najgorzej rokujących nowotworów narządu płciowego u kobiet. Mechanizmy kontrolujące aktywację i inaktywację wielu genów kontrolujących transformację nowotworową oraz szlaki neoangiogenezy warunkujące powstawanie przerzutów odległych są przedmiotem wielu badań eksperymentalnych i klinicznych. Nowe wyniki badań nad białkami z grupy Id (skrót od *Inhibitor of differentiation/DNA synthesis*) wskazują, że pełnią one istotną funkcję w biologii nowotworów. Obecnie potwierdzono istnienie czterech różnych typów białek Id nazwanych kolejno Id1, Id2, Id3 i Id4. Geny *Id* mają właściwości onkogenów ze względu na ich zdolność do indukcji proliferacji komórek oraz supresji czynników transkrypcyjnych podrodziny białek HLH, których aktywność blokowana jest przez białka Id [1, 2]. Większość białek HLH stymuluje ekspresję genów, jednak, co jest rzadkie w tej grupie, niektóre z białek Id mają głównie działanie hamujące. Białka te blokują wiązanie się DNA z czynnikami transkrypcyjnymi HLH. Z uwagi na onkogenne właściwości białek Id oraz obserwację, że brak ekspresji genów *Id* w liniach komórek nowotworowych prowadzi do zahamowania wzrostu, wydaje się prawdopodobne, że białka Id mogą odgrywać istotną rolę w mechanizmach transformacji nowotworowej [3]. Wyniki wielu badań wskazują ponadto, że większość z nich, w tym białka Id1, Id2 i Id3, może odgrywać ważną rolę we wczesnych etapach kancerogenezy raka wątroby, raka szyjki macicy czy raka endometrium [4, 5]. Białka Id mają własności hamowania apoptozy i różnicowania szeregu komórek, w innych natomiast stymulują ich niekontrolowany wzrost. Stwierdzono, że Id1 jest ważnym regulatorem wzrostu i różnicowania komórek raka sutka [6]. Dotąd niewiele wiadomo na temat znaczenia zaburzonej ekspresji genów *Id* u chorych na raka jajnika. Podwyższoną ekspresję różnych onkoprotein kodowanych przez geny z grupy *Id* stwierdzono w szeregu zaawansowanych klinicznie postaci nowotworów złośliwych, w tym m.in. w raku trzustki, rakach jelita grubego oraz różnych glejakach i szpiczakach [7–9]. W ostatnich latach coraz częściej sugerowana jest ich rola jako potencjalnych nowych markerów nowotworowych [10–12].

Badania dotyczące związku ekspresji Id1 z różnymi typami histologicznymi raka jajnika są do tej pory nieliczne i prowadzono je głównie w hodowlach komórek. Schindl i wsp. [13] wykazali istotne zależności pomiędzy zwiększoną ekspresją Id1 a stopniem zróżnicowania oraz zaawansowania nowotworu i znacznym skróceniem średniego okresu przeżycia tych chorych. Najnowsze badania Maw i wsp. [14] potwierdzają znaczący udział białka Id1 w progresji nowotworowej raka jajnika oraz w powstawaniu naczyń nowotworowych. Wyniki badań Lydena i wsp. [8] zasugerowały m.in., że podwyższona ekspresja Id1 i Id3 w naczyniach krwionośnych nowotworów wpływa na zmianę fenotypu komórek śródbłonka na fenotyp angiogenny i indukuje zjawisko tzw. przełączenia angiogennego (*angiogenic switch*) [15]. Ling i wsp. [12] wykazali, że zwiększona ekspresja Id1 aktywuje gen kodujący czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), co z kolei prowadzi do zwiększonej ekspresji VEGF w guzach. Aktywna forma VEGF stymuluje proliferację komórek śródbłonka i powstawanie nowych naczyń. Obserwację tę potwierdzili Ding i wsp. [16], którzy badali wpływ białek Id1 na receptor epidermalnego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor* – EGF) w komórkach nowotworowych pęcherza moczowego.

Rodzinę receptorów dla EGF stanowią cztery kinazy tyrozynowe typu I – białka te są podobne do siebie strukturalnie i określane są często jako EGF-R (erbB-1), HER-2/neu (erbB-2), HER-3 (erbB3) oraz HER-4 (erbB4). Proteiny te, m.in. łącząc się ze sobą, wzajemnie tworzą struktury homodimeryczne i heterodimeryczne. Homodimeryzacja receptorów EGF-R i heterodimeryzacja z innymi receptorami z rodziny EGF, takimi jak HER-2/neu, indukuje aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych m.in. szlak fosfolipazy C, fosfatydyloinozytol-3'-kinazy, białek G, białek Ras aktywujących GTP-azę [17, 18]. Receptor epidermalnego czynnika wzrostu (EGF-R) jest syntetyzowany w większości typów komórek, z wyjątkiem komórek hematopoetycznych [18]. Receptor dla EGF jest silnym mitogenem, który może wpływać na ujawnianie się w komórkach fenotypu nowotworowego. Aktywacja tego receptora odgrywa ponadto istotną rolę w adhezji komórek nowotworowych, ich migracji, inwazji, przeżyciu i angiogenezie, czyli procesach związanych ze wzrostem nowotworów złośliwych [19, 20].

W jajniku u kobiet EGF-R odgrywa istotną rolę w regulacji wzrostu komórek nabłonkowych jajnika oraz ma wpływ na folikulogenezę. W badaniach nad czynnikami regulującymi syntezę receptorów rodziny EGF-R wykazano, że nadekspresja onkogenu *erb*B-2 jest związana z większą agresywnością biologiczną nowotworów, co może być dodatkowym wskaźnikiem w prognozowaniu raków jajnika [21, 22]. W poprzednim doniesieniu autorzy niniejszej pracy wykazali związek ekspresji białek z grupy Id2 z typem histologicznym i stopniem zróżnicowania różnych typów raka jajnika [23].

Nie zbadano jednak do tej pory możliwego związku białka Id1 z ekspresją innego silnego stymulatora angiogenezy, jakim jest EGF i jego receptor (EGF-R) w różnych typach histologicznych raka jajnika. Celem pracy było zbadanie, czy ocena ekspresji białka Id1 w guzach złośliwych i niezłośliwych jajnika ma związek ze stężeniami EGF i EGF-R oraz ze stopniem zróżnicowania histologicznego i zaawansowania klinicznego nowotworów.

Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 95 kobiet, które były leczone operacyjnie z powodu guzów złośliwych i niezłośliwych jajnika w I Klinice Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie w latach 2007–2009. W każdym przypadku oceniano wiek chorej, jej status menopauzalny, typ histologiczny i stopień zróżnicowania guza oraz stopień zaawansowania klinicznego raka jajnika wg FIGO. Menopauzę zdefiniowano jako wiek, w którym upłynął minimum rok od ostatniego krwawienia, albo ukończone 50 lat życia u kobiet z usuniętą wcześniej macicą. Materiał do badań histologicznych i immunohistochemicznych pobierano z centralnej części zmiany z pominięciem obszarów martwiczych oraz obszarów naciekania sąsiednich narządów. Badania immunohistochemiczne wykonano na skrawkach parafinowych utrwalonych w formalinie o grubości 5 µm. Po odparafinowaniu i uwodnieniu materiału tkankowego w szeregu alkoholowym zastosowano procedurę odsłonięcia determinanty antygenowej, wykorzystując bufor cytrynianowy (0,01 M; pH = 6,0) i inkubację w łaźni wodnej w 98°C przez 30 min. Aktywność endogennej peroksydazy blokowano 3-procentowym roztworem nadtlenku wodoru przez 20 min w temperaturze pokojowej. Preparaty płukano każdorazowo 3 razy po 5 min w buforze TBS, a potem inkubowano z przeciwciałem pierwotnym skierowanym przeciwko badanemu antygenowi Id1 (Invitrogen, USA) w rozcieńczeniu 1 : 50 przez noc w temperaturze 4°C. Następnie zastosowano przeciwciało wtórne z kompleksem streptawidyna/biotyna skoniugowane z peroksydazą (zestaw LSAB2/HRP kit; DAKO, Dania). Peroksydazę wykrywano przy użyciu chromogenu roztworu czterochlorku 3'-3-diaminobenzydyny (DAB, DAKO Dania). Preparaty zostały dodatkowo wybarwione hematoksyliną Mayera. Do oceny preparatów histologicznych wykorzystano mikroskop Olympus CX41 z kamerą cyfrową DP12 zintegrowany z komputerem PC. Obraz mikroskopowy archiwizowano i analizowano przy użyciu programu DP-Soft firmy Olympus (Japonia).

Ocenę półilościową ekspresji białka Id1 przeprowadzono wg zmodyfikowanego sposobu opisanego przez Schindla i wsp. [4]. Określono odsetkowy udział komórek nowotworowych wykazujących ekspresję Id1 oraz intensywność odczynów barwnych, nadając im odpowiednią liczbę punktów w następujący sposób: 0–10% – 0 pkt; 11–20% – 1 pkt; 21–50% – 2 pkt; 51–80% – 3 pkt; powyżej 80% – 4 pkt, oraz za słaby odczyn – 1 pkt, średni odczyn – 2 pkt; intensywny odczyn – 3 pkt. Uzyskane punkty zostały przemnożone przez wartość odsetkową komórek wykazujących ekspresję Id1. Ze względu na stwierdzone różnice w lokalizacji ekspresji Id1 w obszarze jądrowym i/lub cytoplazmatycznym przyznawano odpowiednio 1 (jądro) lub 2 (cytoplazma) punkty. Dodatkowo przyznano punkt za obecność reakcji barwnej w naczyniach nowotworowych. Po zsumowaniu liczba przyznawanych punktów dla ocenianego przypadku wahała się od 0 do 14. W zależności od uzyskanej liczby punktów ekspresję białka Id1 definiowano jako: brak (0 pkt), słabą (2–4 pkt), średnią (5–8 pkt) albo wysoką (9–14 pkt).

Ocena stężenia epidermalnego czynnika wzrostu i jego receptora w surowicy

Krew pacjentek pobraną w dniu operacji z żyły odłokciowej pozostawiano w temperaturze pokojowej przez 30–60 min w celu utworzenia skrzepu. Surowice odwirowywano z prędkością 2500 obrotów na minutę przez 20 min, a następnie zamrażano w próbówkach Eppendorfa w temperaturze –80°C i przechowywano do czasu wykonywania oznaczeń.

Stężenie rozpuszczalnych form EGF i EGF-R1 w surowicy oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu standardowej 96-dołkowej płytki i wykorzystaniu zestawów Human sEGF Immunoassay i Human sEGF-R1 Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, USA). Oznaczenia wykonano zgodnie z podanym przez producenta protokołem. Odczytu absorbancji dokonywano we wszystkich przypadkach przy długości fali 450 nm, stosując 8-kanałowy czytnik Mulitskan RC (Labsystems). Stężenia badanych cytokin obliczano na podstawie krzywej semilogarytmicznej uzyskanej ze stężeń standardowych przy użyciu programu Genesis Life (Labsystems, USA).

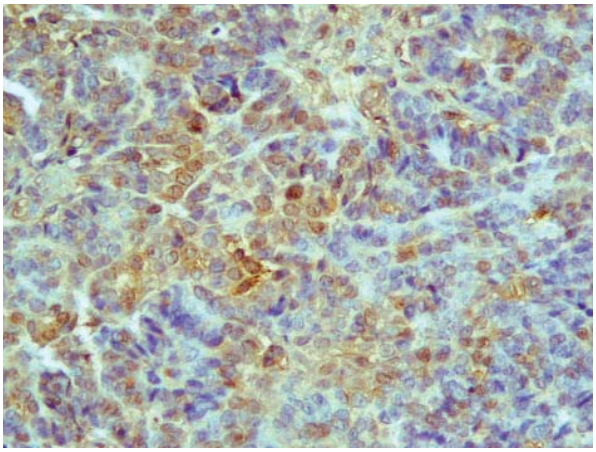
Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu Statistica v.6.0 (Statsoft, Polska). Ze względu na brak zgodności z rozkładem normalnym, do wykrycia istotności różnic między cechami niepowiązanymi dla dwóch grup użyto nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya oraz testu kolejności rang ANOVA wg Kruskala w przypadku więcej niż dwóch grup. Przyjęto 5-procentowy błąd wnioskowania i związany z nim poziom istotności statystycznej $p < 0,05$ wskazujący na istnienie istotnych różnic bądź zależności.

Wyniki

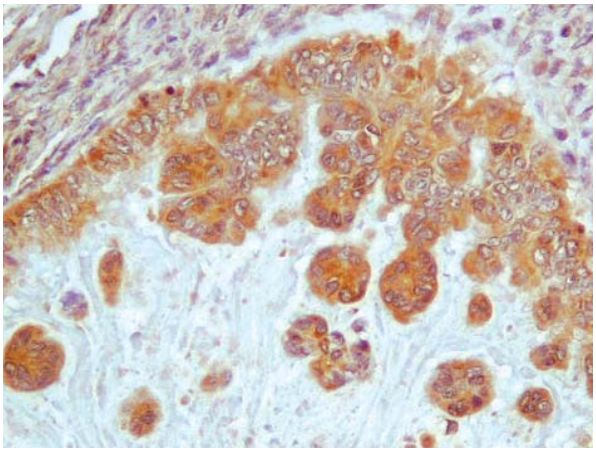
W badanej grupie 95 kobiet z nowotworami przydatków średnia wieku wynosiła 52,6 ±15,1 roku (zakres 15–83 lat), w tym 43 pacjentki (45,2%) były przed menopauzą. U 83 chorych potwierdzono obecność guza złośliwego jajnika, w pozostałych 12 przypadkach zmiany jajnika okazały się niezłośliwe. W badanej grupie prawie połowa guzów złośliwych okazała się rakami surowiczymi

(*n* = 38). U pozostałych kobiet stwierdzono 23 raki śluzowe, 7 endometrioidalnych oraz 15 guzów różnego pochodzenia, w tym 6 guzów przerzutowych i 5 złośliwych guzów germinalnych. Wśród chorych z nowotworem złośliwym jajnika stopień zaawansowania klinicznego wg FIGO przedstawiał się następująco: w I stopniu zaawansowania było 21 chorych, w II stopniu – 6 pacjentek, w III – 49 kobiet, a w IV stopniu – 2 chore. Stopień zróżnicowania histologicznego przedstawiał się następująco: 9 raków w stopniu G1, 35 w stopniu G2, pozostałe 34 guzy były w stopniu G3.

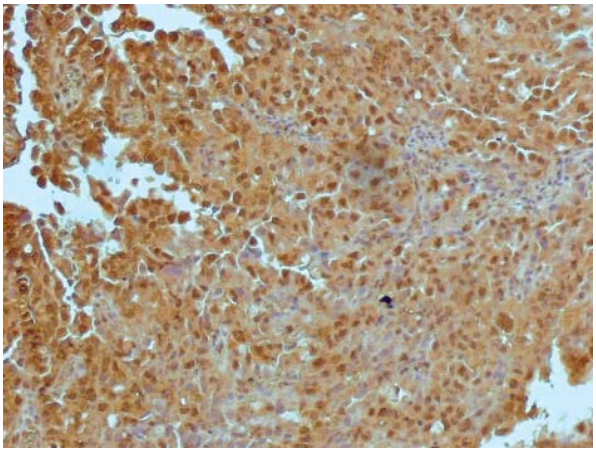
W wyniku oceny ekspresji białka Id1 stwierdzono obecność odczynów barwnych o różnej intensywności w 83 przypadkach nowotworów złośliwych jajnika. Przykłady reakcji barwnej przedstawiono na rycinach 1.–4. W 24 przypadkach (25%) stwierdzono wysoką (9–14 pkt) ekspresję białka Id1. W ponad 40% przypadków (*n* = 40) odnotowano średnią (5–8 pkt), a w pozostałych przypadkach niską (2–4 pkt) ekspresję białka Id1. W pozostałych 12 przypadkach (12%) nie stwierdzono odczynów barwnych w komórkach nowotworowych. W grupie tej połowę przypadków stanowiły guzy niezłośliwe jajnika. W części badanych przypadków stwierdzono odczyny barwne w komórkach wokół mikronaczyń zarówno bezpośrednio sąsiadujących ze światłem kapilary, co wskazuje na endoteliocyty, oraz w komórkach im towarzyszących, wokół ściany naczynia, prawdopodobnie w pericytach (ryc. 4.). Średnie stężenie EGF i jego receptora w całej grupie wynosiło odpowiednio 0,74 pg/ml (0,12–1,5 pg/ml) oraz 150 (0,6–256 pg/ml). Stwierdzono istotne zależności pomiędzy stężeniem EGF i jego receptorem (R = 0,29; *p* = 0,003) (ryc. 5.). Ekspresja Id1 była istotnie skorelowana zarówno ze stężeniami czynnika EGF (*p* = 0,0005), jak i ze stężeniami jego receptora (*p* = 0,004) (ryc. 6. i 7.). Wyniki oce-



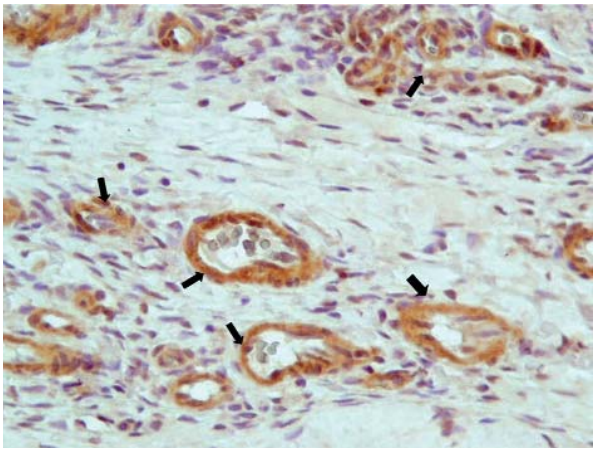
Ryc. 1. Przykład niskiej ekspresji białka Id1 (4 pkt) w surowiczym raku jajnika (powiększenie 200×). Reakcje barwne (kolor brązowy) widoczne przede wszystkim w cytoplazmie



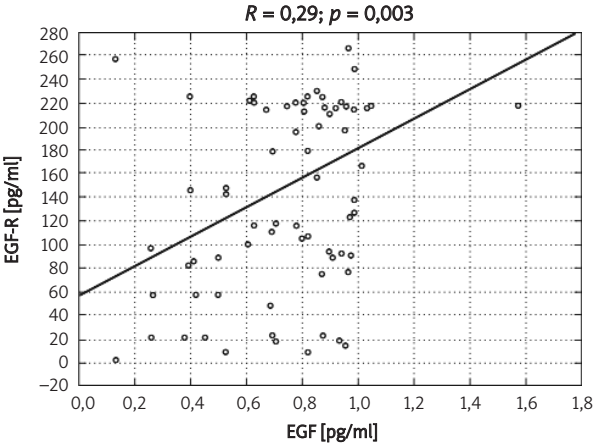
Ryc. 2. Przykład średniej ekspresji białka Id2 (8 pkt) w surowiczym raku jajnika (powiększenie 200×). Część komórek charakteryzuje się bardzo intensywną ekspresją Id1. Odczyny barwne (kolor brązowy) widoczne głównie w cytoplazmie komórek



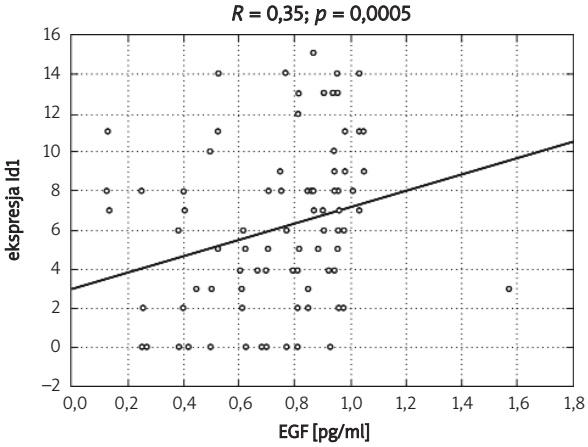
Ryc. 3. Wysoka ekspresja białka Id1 (12 pkt) w surowiczym raku jajnika (powiększenie 200×). Większość komórek nowotworowych wykazuje odczyny barwne (kolor brązowy) zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrach komórkowych



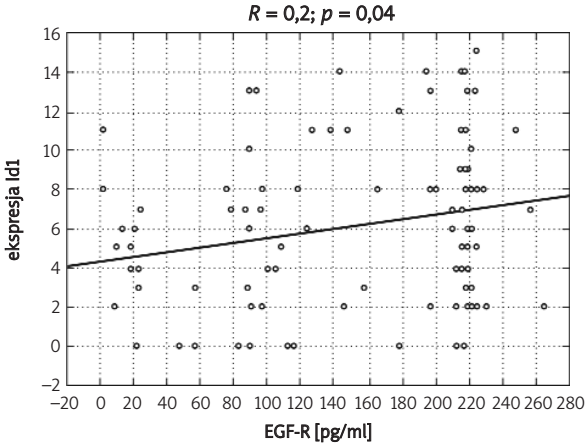
Ryc. 4. Przykład ekspresji białka Id1 wokół mikronaczyń nowotworowych w raku jajnika (powiększenie 200×). Odczyny barwne widoczne w jądrach komórkowych oraz w cytoplazmie. Mikronaczynia zaznaczono strzałkami, w ich świetle widoczne niewybarwione, bezjądrzaste erytrocyty



Ryc. 5. Wykres zależności pomiędzy stężeniem EGF a stężeniem jego receptora (EGF-R) w surowicy



Ryc. 6. Wykres zależności pomiędzy stężeniem EGF a ekspresją białka Id1



Ryc. 7. Wykres zależności pomiędzy stężeniem EGF-R a ekspresją białka Id1

ny ekspresji Id1 oraz stężenia EGF i EGF-R w grupach uwzględniających status menopauzalny, stopień zróżnicowania histologicznego i zaawansowania klinicznego nowotworu oraz rodzaj histologiczny guza przedstawiono w tabeli I. Stężenie EGF było istotnie większe w rakach zaawansowanych klinicznie i nisko zróżnicowanych w porównaniu z rakami nisko zaawansowanymi ($p = 0,01$) i wysoko zróżnicowanymi ($p = 0,01$). Najwyższe wartości stężenia EGF i EGF-R oraz ekspresję Id1 obserwowano w rakach granicznych oraz pierwotnych rakach jajnika, natomiast najniższe w zmianach niezłośliwych. Różnice pomiędzy grupami okazały się statystycznie istotne ($p < 0,05$) lub bliskie istotności w przypadku EGF-R ($p = 0,07$). Rodzaj histologiczny guza wpływał istotnie ($p = 0,005$) na ekspresję białka Id1, która była najwyższa w rakach surowiczych, a najniższa w rakach endometrioidalnych. Ponad 65% przypadków raków surowiczych charakteryzowała się średnią lub intensywną (5–14 pkt) reakcją barwną.

Dyskusja

Receptor EGF jest jednym z czynników istotnych w stymulacji procesu inwazji komórek nowotworowych. Z drugiej strony najnowsze doniesienia sugerują, że białko Id1 pełni kluczową rolę w regulacji szlaku sygnałowego związanego z receptorem EGF. Wyniki badań własnych wskazują na potencjalną przydatność oceny ekspresji białka Id1 oraz oceny stężenia EGF i jego receptora (EGFR) w charakterystyce wybranych guzów złośliwych jajnika u kobiet. W dostępnym piśmiennictwie istnieje niewiele i do tego często sprzecznych doniesień na temat roli białka Id1 i jego potencjalnego związku z EGF i EGFR w progresji raka jajnika. Molekularne mechanizmy odpowiedzialne za udział Id1 w raku jajnika są jak dotąd niejasne. Zhang i wsp [24]. badali wpływ białka Id1 na proliferację komórek nowotworowych jajnika i związek ze szlakiem sygnałowym EGF-R. W trzech liniach nowotworowych jajnika posłużono się wektorem, by zwiększyć ekspresję białka Id1 i określono wskaźnik proliferacji za pomocą cytometri przepływowej. Podwyższona ekspresja Id1 obecna była w ponad 70% przypadków raka jajnika i była istotnie związana z gorszym rokowaniem pacjentek. Stwierdzono, że ektopowa ekspresja Id1 prowadzi do zwiększonej proliferacji komórek. Indukowany wzrost związany był z podwyższoną ekspresją EGFR zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i białkowym. Inaktywacja Id1 poprzez transfekcję antysensownym wektorem Id1 powodowała obniżenie ekspresji EGF-R.

Uzyskane przez autorów niniejszej pracy wyniki badań sugerują, że zwiększona ekspresja Id1 wraz ze zwiększonymi stężeniami EGF i EGF-R często towarzyszą rakowi jajnika i są zależne od typu histologicznego tego nowotworu. Stwierdzone różnice w nasileniu ekspresji Id1 pomiędzy zmianami niezłośliwymi, guzami o granicznej złośliwości oraz inwazyjnymi rakami jajnika su-

Tab. I. Charakterystyka kliniczna pacjentek i ekspresja białka Id-1 oraz EGF i jego receptora w badanych nowotworach złośliwych jajnika

	N	Id1 (zakres)	*p*	EGF (pg/ml) (zakres)	*p*	EGF-R (pg/ml) (zakres)	*p*
status menopauzalny							
przed MNP	43	5 (2–8)	0,31	0,69 (0,49–0,89)	**0,01**	115 (56–210,1)	**0,002**
po MNP	52	7 (3–9)		0,87 (0,74–0,94)		214 (95–219)	
stopień zróżnicowania histologicznego							
G1	9	6 (2–11)	0,28	0,52 (0,39–0,8)	**0,01**	147 (96–210	0,78
G2	35	6 (4–9)		0,87 (0,74–0,93)		211 (89–218)	
G3	34	8 (6–11)		0,93 (0,61–0,96)		206 (92–218)	
stopień zaawansowania klinicznego wg FIGO							
I	21	5 (3–7)	**0,09**	0,8 (0,4–0,87)	**0,01**	178 (104–219)	0,61
II	6	6,5 (3–9)		0,49 (0,49–0,7)		88 (87–218)	
III (49) + IV (2)	51	8 (5–11)		0,9 (0,76–0,94)		211 (94–218)	
typ histologiczny							
zmiany niezłośliwe	12	2 (0–4)	**0,005**	0,62 (0,43–0,79)	**0,08**	98 (39–162)	0,37
raki surowicze	38	7,5 (3–9)		0,86 (0,61–0,94)		210 (94–217)	
raki śluzowe	23	7 (5–11)		0,81 (0,76–0,93)		211 (89–219)	
raki endometrioidalne	7	5 (4–9)		0,88 (0,81–0,98)		126 (87–218)	
inne raki	15	4 (0–8)		0,69 (0,44–0,91)		142 (86–216)	

** MNP – menopauza*

gerują, że zaburzenia związane z ekspresją białek Id1 prawdopodobnie pojawiają się na bardzo wczesnym etapie procesu kancerogenezy. Co ciekawe, wyniki badań przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy wykazały, że już w przypadku nisko zaawansowanych klinicznie raków ponad 70% miało wyraźnie podwyższoną ekspresję białka Id1.

Najnowsze badania Maw i wsp. [14] potwierdzają istotny udział białek z grupy Id w progresji nowotworowej jajnika. Autorzy wykazali, że podwyższona ekspresja Id1 mRNA oraz białka Id1 badana immunohistochemicznie ma związek ze stopniem zaawansowania klinicznego choroby bez względu na rodzaj histologiczny guza. Ponadto u 30 pacjentów z wysoką ekspresją Id1 stwierdzono istotnie niższy wskaźnik przeżycia (53%) w porównaniu z pacjentami z niską ekspresją Id1, u których wskaźnik wynosił 80% [14]. Chaudhary i wsp. [11] wykazali w komórkach nabłonkowych prostaty związek wzrostu ekspresji Id1 z indukcją proliferacji tych komórek. Inne białka tej grupy, w tym Id2 oraz Id4, były odpowiedzialne za regulację procesów różnicowania w komórkach po stymulacji androgenami.

Związek pomiędzy ekspresją receptora EGF a prognozowaniem długości przeżycia chorych na nowotwory jest od dawna przedmiotem wielu badań, jednakże otrzymywane wyniki są często sprzeczne. Nicholson i wsp. [25] przeprowadzili retrospektywną analizę ponad 200 badań klinicznych i stwierdzili, że EGF-R stanowi istotny wskaźnik prognostyczny jedynie w pewnych typach nowotworów, takich jak: raki głowy i szyi, raki jajnika, sutka oraz odbytu, natomiast ma średnią bądź niską wartość w przypadku raków endometrium oraz niedrobnokomórkowego raka płuc. Yonemura i wsp. [26] stwierdzili, że pacjenci chorzy na raka odbytu, u których obserwowano zwiększoną ekspresję zarówno TGF-α, jak i EGF-R, charakteryzowali się gorszym rokowaniem, a 5-letni okres przeżycia zaobserwowano tylko u 12% chorych. W badaniach tych, o ile poziom ekspresji EGFR i TGF-α w guzach chorych był prawidłowy lub jeżeli obserwowano jedynie obecność samego receptora albo jego liganda, odsetek 5-letniego okresu przeżycia pacjentów wzrastał odpowiednio do 45 i 36%. Podobne zależności zaobserwowano w przypadku raka sutka. Aziz i wsp. [27] zbadali 315 kobiet z nowotworami sutka i stwierdzili zwiększoną ekspresję EGF-R w 70 przypadkach (22%). Chore ze zwiększoną ekspresją EGF-R charakteryzowały się krótszym okresem przeżycia w porównaniu z pacjentkami, u których stwierdzono brak EGF-R (odpowiednio 3,39 roku i 4,62 roku). Podobnie, okres wol-

ny od choroby był krótszy u kobiet z obecnym EGF-R. W obszernych badaniach prospektywnych Tsutsui i wsp. [28] zbadali 1029 kobiet z rakiem piersi po przebytej operacji chirurgicznej. Stwierdzono obecność EGF-R w komórkach nowotworowych w 277 przypadkach (27%) oraz wykazano, że chore, u których występuje ekspresja EGF-R, wykazują znacząco gorsze rokowanie w porównaniu z pacjentkami, u których nie obserwowano ekspresji EGF-R. Stwierdzono również, że zwiększone stężenie EGF-R koreluje z zaawansowanym stopniem klinicznym, ze zwiększoną proliferacją komórek nowotworowych oraz z brakiem odpowiedzi pacjentek na terapię hormonalną. Ding i wsp. [29] zbadali rolę Id1 w progresji komórek nowotworowych raka pęcherza moczowego *in vitro* w powiązaniu z czynnikiem EGF-R. Bezpośredni udział Id1 w indukowaniu zdolności inwazyjnych komórek nowotworowych zbadano poprzez ocenę ektopowej ekspresji genu *Id1* w linii komórkowej RT112 raka pęcherza moczowego. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że inaktywacja Id1 przy udziale małych, interferencyjnych cząsteczek RNA może prowadzić do supresji inwazji linii komórek. Wyniki cytowanych badań wykazały ponadto, że podwyższona ekpresja Id1 była związaną ze zwiększoną ekspresją EGF-R oraz z wyższym stopniem klinicznego zaawansowania nowotworu.

Jednymi z najlepiej zbadanych i opisanych ligandów EGF-R związanych z rakiem jajnika są epidermalny czynnik wzrostu (EGF) i transformujący czynnik wzrostu α (*transforming growth factor* α – TGF-α). Czynniki te zidentyfikowano zarówno w guzach litych, jak i w liniach komórkowych nowotworów jajnika. Obecność TGF-α stwierdzono w ok. 50–100%, EGF w 28–71% i amfireguliny w 18% raków jajnika [30, 31]. Ueda i wsp. [32] badali wpływ EGF i TGF-α na migrację i inwazję komórek w liniach z różnych typów nowotworów (SKG-IIIb, OMC-4, SNG-M i OMC-3) i zasugerowali, że czynniki te są pozytywnymi regulatorami w procesie inwazyjnym komórek guza, gdyż stymulują migrację tych komórek, zwiększają ekspresję enzymów proteolitycznych oraz wpływają na ich fenotyp angiogenny [32].

Własne obserwacje sugerują, że również w przypadku białka Id1 jego zwiększona ekspresja może być związana z aktywacją angiogenezy. Stwierdzone intensywne odczyny barwne w komórkach mikronaczyń nowotworowych potwierdzają tę hipotezę. W następnym etapie badań interesująca wydaje się ocena gęstości mikronaczyń proliferujących w powiązaniu z oceną ekspresji białek Id. Najnowsze badania dotyczące wpływu Id2 na VEGF wykazały, że białko to działa hamująco na produkcję VEGF [33]. Komórki nowotworowe wątroby o podwyższonej ekspresji Id2 charakteryzowały się jednocześnie obniżoną ekspresją VEGF. Przeprowadzone dodatkowe badania na genetycznie zmodyfikowanych komórkach z defektem genu Id2 potwierdziły hamujący wpływ tego białka na produkcję i sekrecję VEGF. Autorzy zasugerowali, że zwiększona ekspresja Id2 może częściowo zmniejszać inwazyjność komórek nowotworowych poprzez ograniczenie ich migracji, na którą bezpośrednio wpływa VEGF. W badaniach własnych stwierdzono również istotną rolę zwiększonej ekspresji Id2 w różnych typach raków jajnika [23]. Niezwykle interesujące nowe możliwości leczenia chorych na raka jajnika otwiera wykorzystanie specyficznych przeciwciał i terapia celowana na blokowanie wybranych receptorów czynników angiogennych, w tym przede wszystkim VEGF i EGF [34].

Wniosek

Badanie ekspresji białka Id1 i ocena stężenia EGF i EGF-R w surowicy mogą być wykorzystane jako dodatkowe parametry charakteryzujące różne typy złośliwych guzów jajnika u kobiet.

Piśmiennictwo

1. Iavarone A, Lasorella A. ID proteins as targets in cancer and tools in neurobiology. Trends Mol Med 2006; 12: 588-94.
2. Lasorella A, Takuma U, Iavarone A. Id proteins at the cross-road of development and cancer. Oncogene 2001; 20: 8326-33.
3. Norton JD, Deed RW, Craggs G, Sablitzky F. Id helixloop-helix proteins in cell growth and differentiation. Trends Cell Biol 1998; 8: 58-65.
4. Schindl M, Oberhuber G, Obermair A, et al. Overexpression of Id-1 protein is a marker for unfavorable prognosis in early-stage cervical cancer. Cancer Res 2001; 61: 5703-6.
5. Stighall M, Manetopoulos C, Axelson H, Landberg G. High ID2 protein expression correlates with a favourable prognosis in patients with primary breast cancer and reduces cellular invasiveness of breast cancer cells. Int J Cancer 2005; 115: 403-11.
6. Schoppmann SF, Schindl M, Bayer G, et al. Overexpression of Id-1 is associated with poor clinical outcome in node negative breast cancer. Int J Cancer 2003; 104: 677-82.
7. Maruyama H, Kleef J, Wildi S, et al. Id-1 and Id-2 are overexpressed in pancreatic cancer and in dyplastic lesions in chronic pancreatitis. Am J Pathol 1999; 155: 815-22.
8. Lyden D, Young AZ, Zagzag D, et al. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. Nature 1999; 401: 670-7.
9. Lee KT, Lee YW, Lee JK, et al. Overexpression of Id-1 is significantly associated with tumour angiogenesis in human pancreas cancers. Br J Cancer 2004; 22: 1198-206.
10. Coppe JP, Itahana Y, Moore DH, et al. Id-1 and Id-2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression. Clin Cancer Res 2004; 10: 2044-51.
11. Chaudhary J, Schmidt M, Sadler-Riggleman I. Negative acting HLH proteins Id 1, Id 2, Id 3, and Id 4 are expressed in prostate epithelial cells. Prostate 2005; 64: 253-64.
12. Ling MT, Lau TC, Zhou C, et al. Overexpression of Id-1 in prostate cancer cells promotes angiogenesis through the activation of vascular endothelial growth factor (VEGF). Carcinogenesis 2005; 26: 1668-76.
13. Schindl M, Schoppmann SF, Strobel T, et al. Level of Id-1 protein expression correlates with poor differentiation, enhanced malignant potential, and more aggressive clinical behavior of epithelial ovarian tumors. Clin Cancer Res 2003; 9: 779-85.
14. Maw MK, Fujimoto J, Tamaya T. Overexpression of inhibitor of DNA-binding (ID)-1 protein related to angiogenesis in tumor advancement of ovarian cancers. BMC Cancer 2009; 9: 430-6.
15. Benezra R, Rafii S, Lyden D. The Id proteins and angiogenesis. Oncogene 2001; 20: 8334-441.
16. Ding Y, Wang G, Ling MT, et al. Significance of Id-1 up-regulation and its association with EGFR in bladder cancer cell invasion Int J Oncol 2006; 28: 847-54.
17. Zhang H, Berezov A, Wang Q, et al. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. J Clin Invest 2007; 117: 2051-8.

18. Bublil EM, Yarden Y. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. Curr Opin Cell Biol 2007; 19: 124-34.
19. Johnston JB, Navaratnam S, Pitz MW, et al. Targeting the EGFR pathway for cancer therapy Curr Med Chem 2006; 13: 3483-92.
20. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. New Eng J Med 2008; 358: 1160-74.
21. Lassus H, Sihto H, Leminen A, et al. Gene amplification, mutation, and protein expression of EGFR and mutations of ERBB2 in serous ovarian carcinoma. J Mol Med 2006; 84: 671-81.
22. Stadlmann S, Gueth U, Reiser U, et al. Epithelial growth factor receptor status in primary and recurrent ovarian cancer. Mod Pathol 2006; 19: 607-10.
23. Czekierdowska S, Czekierdowski A, Kotarski J. Ekspresja białek Id2 w nowotworach złośliwych jajnika. Prz Menopauz 2009; 41: 20-5.
24. Zhang X, Ling MT, Feng H, et al. Id-I stimulates cell proliferation through activation of EGFR in ovarian cancer cells. Br J Cancer 2004; 91: 2042-7.
25. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. Eur J Cancer 2001; 37: 9-15.
26. Yonemura Y, Takamura H, Ninomiya I, et al. Interrelationship between transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in advanced gastric cancer. Oncology 1992; 49: 157-61.
27. Aziz SA, Pervez S, Khan S, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a prognostic marker: an immunohistochemical study on 315 consecutive breast carcinoma patients. J Pak Med Assoc 2002; 52: 104-10.
28. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2002; 71: 67-75.
29. Ding Y, Wang G, Ling MT, et al. Significance of Id-1 up-regulation and its association with EGFR in bladder cancer cell invasion. Int J Oncol 2006; 28: 847-54.
30. Kohler M, Bauknecht T, Grimm M, et al. Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in human ovarian carcinomas. Eur J Cancer 1992; 2: 1432-7.
31. Stromberg K, Johnson GR, O'Connor DM, et al. Frequent immunohistochemical detection of EGF supergene family members in ovarian carcinogenesis. Int J Gynecol Pathol 1994; 13: 342-7.
32. Ueda M, Ueki M, Terai, et al. Biological implications of growth factors on the mechanism of invasion in gynecological tumor cells. Gynecol Obstet Invest 1999; 48: 221-8.
33. Tsunedomi R, Iizuka N, Tamesa T, et al. Decreased ID2 promotes metastatic potentials of hepatocellular carcinoma by altering secretion of vascular endothelial growth factor. Clin Cancer Res 2008; 14: 1025-31.
34. Zeineldin R, Muller CY, Stack MS, Hudson LG. Targeting the EGF receptor for ovarian cancer therapy. J Oncol 2010; 2010: 414676.