

Ocena stężeń naskórkowego czynnika wzrostu w surowicy kobiet leczonych z powodu nabłonkowych guzów jajnika

Serum epidermal growth factor levels in epithelial ovarian tumours

Paweł Sadlecki, Małgorzata Walentowicz-Sadłeczka, Marek Grabiec

Katedra i Klinika Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu;
kierownik Katedry i Kliniki: dr hab. n. med. Marek Grabiec, prof. Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika

Przeгляд Menopauzalny 2011; 3: 187–190

Streszczenie

Wstęp: Najliczniejszą grupę pierwotnych nowotworów jajnika stanowią guzy wywodzące się z nabłonka powierzchniowego i podścieliska. Stanowią one ok. 60% wszystkich nowotworów jajnika oraz ok. 80–90% nowotworów złośliwych jajnika. Naskórkowy czynnik wzrostu (*epidermal growth factor* – EGF) modyfikuje wzrost guzów nowotworowych, wpływając na ich zdolności do proliferacji oraz inwazyjność. Stymuluje również angiogenezę poprzez zwiększanie ekspresji czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) oraz aktywację proliferacji, migracji i różnicowania komórek śródbłonka.

Cel pracy: Celem pracy była ocena stężeń EGF w surowicy pacjentek leczonych z powodu łagodnych i złośliwych nabłonkowych guzów jajnika.

Materiał i metody: Stężenia EGF w surowicy zostały określone za pomocą zestawów ELISA (Quantikine R&D). W badaniu wzięto udział 30 pacjentek z rakiem jajnika oraz 25 pacjentek z łagodnymi nabłonkowymi guzami jajnika.

Wyniki: W surowicy pacjentek z rakiem jajnika stwierdzono istotnie statystycznie większe średnie stężenia EGF w porównaniu z grupą z guzami łagodnymi (90,16 pg/ml vs 36,70 pg/ml; $p < 0,05$). Czulość oraz swoistość oznaczeń EGF w surowicy w diagnostyce różnicowej łagodnych i złośliwych guzów jajnika wynosiła odpowiednio 60% i 66,7%.

Wnioski: Określenie przedoperacyjnych stężeń EGF w surowicy może być przydatne w diagnostyce różnicowej guzów jajnika.

Słowa kluczowe: naskórkowy czynnik wzrostu, guzy jajnika, angiogeneza.

Summary

Background: Epithelial ovarian cancer is the leading cause of cancer deaths resulting from gynaecological malignancies. Like most other epithelial tumours, epithelial ovarian cancer spreads initially by direct extension into adjacent organs. EGF expression has been demonstrated in many solid tumours, including ovarian cancer. EGF and its receptor are involved in the process of tumour genesis and progression. EGF also stimulates angiogenesis, which is considered essential for tumour growth and the development of metastases.

Aim of the study: The aim of our study was to determine the levels of EGF in the sera of patients with benign and malignant epithelial ovarian tumours.

Methods: EGF serum concentrations were measured by ELISA test (Quantikine R&D).

Results: The median EGF concentrations were found to be significantly higher in the sera of ovarian cancers than in benign tumours.

Conclusion: Pre-treatment EGF serum levels might be regarded as an additional tool in the differentiation of ovarian tumours.

Key words: epidermal growth factor, ovarian tumours, angiogenesis.

Adres do korespondencji:

Paweł Sadlecki, Katedra i Klinika Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Ujejskiego 75, 85-168 Bydgoszcz, tel. +48 52 365 52 42, e-mail: pawelsadlecki@wp.pl

Wstęp

Guzy jajnika stanowią jedno z ważniejszych zagadnień w onkologii ginekologicznej. Najliczniejszą grupą pierwotnych nowotworów jajnika są guzy wywodzące się z nabłonka powierzchniowego i podścieliska. Stanowią one ok. 60% wszystkich nowotworów jajnika i ok. 80–90% nowotworów złośliwych jajnika [1]. Rak jajnika jest główną przyczyną zgonów z powodu nowotworów żeńskich narządów płciowych [2]. Według światowych statystyk z ostatnich lat, zachorowalność na raka jajnika wykazuje stały wzrost [3]. Nowotwór ten najczęściej rozwija się u kobiet po 40. r.ż., u młodszych kobiet występuje rzadko [3]. Rak jajnika u kobiet po 50. r.ż. charakteryzuje się zdecydowanie gorszym rokowaniem [4].

Naskórkowy czynnik wzrostu (*epidermal growth factor* – EGF) został po raz pierwszy opisany przez Cohena w 1962 r. [5]. Czynnik ten jest syntetyzowany jako prekursor składający się z 1217 aminokwasów o masie 140–150 kDa. Forma dojrzała zbudowana jest z 53 aminokwasów, z których 6 stanowią reszty cysteinowe określające aktywność biologiczną EGF [6]. Naskórkowy czynnik wzrostu wywiera efekt biologiczny za pomocą należącego do kinaz tyrozynowych receptora błonowego (*epidermal growth factor receptor* – EGFR), reagującego zarówno z EGF, jak i transformującym czynnikiem wzrostu alfa (*transforming growth factor α* – TGFα) [7]. Rodzina receptorów EGFR składa się z czterech członków: EGFR-1 (ERBB1 lub HER1), będącego receptorem dla EGF i TGFα, EGFR-2 (ERBB2 lub HER2), którego liganda do dziś nie poznano, oraz EGFR-3 (ERBB3 lub HER3) i EGFR-4 (ERBB4 lub HER4), które są receptorami dla neuregulin [8]. Receptor EGF występuje zarówno w tkankach prawidłowych, jak i nowotworowych. Opisano zależność pomiędzy ekspresją tego receptora a czasem przeżycia chorych; brak ekspresji EGFR w raku jajnika, piersi i pęcherza moczowego koreluje z dłuższym czasem przeżycia [9]. Udowodniono, że EGF hamuje apoptozę w komórkach guzów litych, które wykazują jego nadekspresję [10]. Naskórkowy czynnik wzrostu moduluje rozwój nowotworu poprzez wpływ na cykl komórkowy. Udowodniono, że indukcja syntezy cykliny D1, białka wymaganego do progresji cyklu komórkowego z fazy G1, jest zależna od EGF [11]. Naskórkowy czynnik wzrostu wpływa ponadto na migrację, adhezję oraz właściwości inwazyjne komórek nowotworowych [12]. Istnieją dowody na istotną rolę EGF oraz EGFR w procesie angiogenezy. Mechanizm działania proangiogennego EGF polega najprawdopodobniej na wspólnym z TGFα zwiększaniu ekspresji czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) [13], a także proliferacji, migracji oraz różnicowania komórek śródbłonka [14].

Cel pracy

Celem pracy była ocena stężeń EGF w surowicy pacjentek z nabłonkowymi guzami jajnika oraz określenie

przydatności oznaczeń tego czynnika w różnicowaniu łagodnych i złośliwych guzów jajnika.

Materiał i metody

W badaniu wzięto udział 66 pacjentek hospitalizowanych na Oddziale Ginekologii Aseptycznej, Katedry i Kliniki Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej *Collegium Medicum* w Bydgoszczy Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu. Grupę badaną stanowiło 30 pacjentek z rakiem jajnika (surowicy – 21, śluzowy – 3, jasnokomórkowy – 3, endometrioidalny – 2, niezróżnicowany – 1). Średni wiek w tej grupie wynosił 55,80 ±10,43 roku, pacjentki po menopauzie stanowiły 60% ($n = 18$).

Grupę porównawczą tworzyło 25 pacjentek z łagodnymi guzami jajnika (gruczolakotorbielak surowicy – 11, torbiel endometrialna – 8, gruczolakotorbielak śluzowy – 6). Średni wiek w tej grupie wynosił 49,08 ±14,31 roku, pacjentki po menopauzie stanowiły 40% ($n = 10$). Wszystkie pacjentki w tej grupie miały guz zlokalizowany w jednym z jajników. Badanie histopatologiczne guzów zostało przeprowadzone w Zakładzie Patomorfologii Szpitala Uniwersyteckiego nr 2 im. dra Jana Bizuela w Bydgoszczy. Guzy jajników klasyfikowano zgodnie z kryteriami histologicznymi podanymi przez Światową Organizację Zdrowia (*World Health Organization* – WHO) w 1995 r. [15].

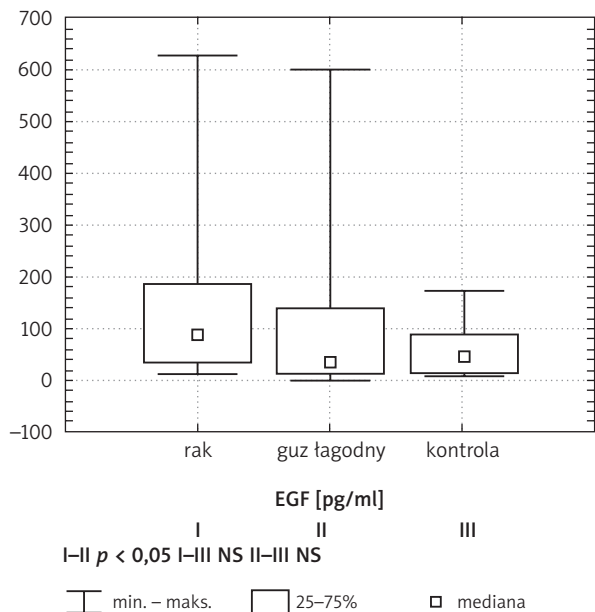
Grupę kontrolną stanowiło 11 zdrowych kobiet w średnim wieku 52,45 ±11,28 roku, odsetek badanych po menopauzie wynosił w tej grupie 55% ($n = 6$).

U pacjentek z guzami jajnika zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego przed operacją pobierano 10 ml krwi żyłnej z żyły łokciowej. Pacjentkom miesiączkującym krew pobierano w I fazie cyklu. Po ok. 30 min od pobrania krew została odwirowana (1000 obr./min przez 15 min). Surowicę zamrożono w temperaturze –70°C do czasu wykonania oznaczeń. Stężenie EGF oznaczono metodą ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), zestawem odczynników Quantikine firmy R&D Systems Inc. (Minneapolis, USA). Surowicę przed wykonaniem oznaczenia rozcieńczono dwudziestokrotnie. Czulość metody: 0,7 pg/ml, wartości referencyjne w surowicy: nieoznaczalne – 622 pg/ml, wartości oznaczalne w 97% (wg producenta odczynnika). Pomiaru dokonano przy użyciu aparatu Labsystems Multiskan RC. Oznaczenie EGF w surowicy wykonano w Katedrze i Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej *Collegium Medicum* w Bydgoszczy Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego Statistica for Windows firmy StatSoft®. Testowanie normalności rozkładu wykazało, że badane parametry mają rozkład różny od normalnego. Dlatego analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testów nieparametrycznych: Kruskala-Wallisa (analiza wariancji) i U Manna-Whitneya oraz Wilcoxon. Zmienność opisano, podając średnią pozycyjną, czyli medianę (Me) oraz

kwartyl pierwszy (Q1) i trzeci (Q3). Przyjęto poziom istotności $p \leq 0,05$ za statystycznie istotny. Ocenę trafności diagnostycznej przeprowadzono na podstawie wyników histopatologicznych, podając czułość, swoistość i dokładność każdej z metod. Wszystkie pacjentki wyraziły świadomą zgodę na uczestnictwo w badaniu. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu – KB/522/2004.

Wyniki

W grupie pacjentek z rakiem jajnika stwierdzono statystycznie istotnie większe stężenia EGF w surowicy w porównaniu z pacjentkami z guzami łagodnymi jajnika (90,16 pg/ml vs 36,70 pg/ml, $p \leq 0,05$). Stężenie EGF w grupie kontrolnej wynosiło 49,7 pg/ml i nie osiągnęło progu istotności statystycznej w stosunku do pozostałych grup (ryc. 1.). Porównano również stężenia EGF w surowicy w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego oraz stopnia zróżnicowania histopatologicznego raka jajnika. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy I/II a III/IV stopniem zaawansowania klinicznego raka jajnika (tab. I). Nie stwierdzono również istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi stopniami zróżnicowania histopatologicznego raka jajnika (tab. II). W celu oceny przydatności oznaczenia stężeń EGF w surowicy w diagnostyce raka jajnika określono przedział ufności średniej arytmetycznej, za wartość progową przyjęto dolną granicę przedziału ufności. Następnie na podstawie rozpoznań histopatologicznych określono czułość, swoistość i dokładność metody (tab. III).



Ryc. 1. Stężenia naskórkowego czynnika wzrostu w surowicy w badanych grupach pacjentek

Dyskusja

Naskórkowy czynnik wzrostu charakteryzuje się szerokim zakresem działania, który obejmuje stymulację proliferacji komórek, regulację różnicowania tkanek, modulację naprawy tkanek, apoptozę oraz stymulację angiogenezy [16–18]. Mechanizm działania proangiogenego EGF nie został dokładnie poznany, przypuszcza się, że polega na bezpośredniej aktywacji proliferacji, migracji i różnicowania komórek śródbłonna naczyniowego, a także na wspólnym z TGF α zwiększaniu ekspresji VEGF [13, 14]. Naskórkowy czynnik wzrostu jest ligandem EGFR (ERBB1). Wykazano, że w przypadku 70% raków jajnika wykazuje ekspresję tego receptora [19, 20]. W badaniu przeprowadzono analizę stężeń EGF w surowicy pacjentek z rakiem jajnika, guzami łagodnymi jajnika oraz zdrowych. Stwierdzono istotnie statystycznie większe stężenia EGF w surowicy pacjentek

Tab. I. Porównanie stężeń naskórkowego czynnika wzrostu w surowicy w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego raka jajnika według Międzynarodowej Federacji Ginekologów i Położników (*International of Gynaecology and Obstetrics – FIGO*)

	Stopień zaawansowania klinicznego raka jajnika		p
	I–II (n = 8)	III–IV (n = 22)	
EGF [pg/ml]	Me 53,45	98,76	NS
	Q1 30,15	44,30	
	Q3 95,55	200,40	

Me – mediana, Q1 – pierwszy kwartyl, Q3 – trzeci kwartyl, NS – brak istotności statystycznej.

Tab. II. Porównanie stężenia naskórkowego czynnika wzrostu w surowicy w zależności od stopnia zróżnicowania histopatologicznego raka jajnika

	Stopień zróżnicowania histopatologicznego raka jajnika			p
	G1 (n = 6)	G2 (n = 10)	G3 (n = 14)	
	I	II	III	
EGF [pg/ml]	Me 51,30	139,35	94,46	NS
	Q1 14,90	34,50	78,80	
	Q3 63,70	216,80	186,10	

Me – mediana, Q1 – pierwszy kwartyl, Q3 – trzeci kwartyl, NS – brak istotności statystycznej.

Tab. III. Ocena trafności diagnostycznej oznaczenia naskórkowego czynnika wzrostu w surowicy w różnicowaniu łagodnych i złośliwych guzów jajnika

	Wartość graniczna	Czułość [%]	Swoistość [%]	Dokładność [%]
EGF	74,52 pg/ml	60,00	66,67	63,63

z rakiem jajnika w porównaniu z pacjentkami z guzami łagodnymi (90,16 pg/ml vs 36,7 pg/ml; $p \leq 0,05$). Podobne wyniki uzyskał Baron i wsp., którzy analizowali stężenia EGF w surowicy pacjentek z rakiem jajnika. Stężenia EGF w surowicy pacjentek z rakiem jajnika były istotnie większe w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych kobiet [21]. Istotnie statystycznie większe stężenia EGF u pacjentek z rakiem jajnika stwierdzili również Ridderheim i wsp., którzy analizowali stężenia tego czynnika w moczu pacjentek z różnymi nowotworami złośliwymi, w tym 74 z rakiem jajnika [22]. Pacjentki, które zmarły z powodu raka jajnika, miały istotnie statystycznie większe stężenia EGF i TGF α w moczu w porównaniu z żyjącymi po pierwotnym leczeniu operacyjnym [22]. W pracy przeanalizowano również zależności pomiędzy stężeniem EGF w surowicy a stopniem zaawansowania klinicznego oraz zróżnicowania histopatologicznego, nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie różnic w stężeniach EGF w surowicy. Podobne wyniki uzyskali Shah i wsp., którzy również nie wykazali istotnych statystycznie różnic pomiędzy stężeniami EGF w surowicy a stopniem zaawansowania klinicznego i zróżnicowania histopatologicznego raka jajnika [23]. Stwierdzony w badaniach brak zależności pomiędzy stężeniami EGF a głównymi czynnikami prognostycznymi w raku jajnika może sugerować, że EGF jest wydzielany w sposób stały i niezależny od stopnia zaawansowania choroby. W badaniu oceniono przydatność oznaczenia stężeń EGF w surowicy w diagnostyce raka jajnika. Wartości EGF powyżej 74,52 pg/ml korelowały z rozpoznaniem histopatologicznym raka jajnika z 60-procentową czułością, 66,67-procentową swoistością oraz 63,63-procentową dokładnością. Powyższe dane wskazują na możliwość wykorzystania oznaczenia stężeń EGF w surowicy w diagnostyce różnicowej guzów jajnika jako metody uzupełniającej stosowanej łącznie z innymi badaniami.

Wnioski

Określenie przedoperacyjnych stężeń EGF w surowicy może być przydatne w diagnostyce różnicowej guzów jajnika. Jednak ze względu na stosunkowo niską dokładność diagnostyczną zastosowanie jej jako pojedynczej metody diagnostycznej jest ograniczone.

Badanie powstało w ramach Grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: 2P05E 088 30

Piśmiennictwo

- Bręborowicz J, Bręborowicz D. Patologia nowotworów jajnika wywodzących się z nabłonka pokrywającego i z podścieliska. W: Markowska J (red.) Onkologia ginekologiczna. Urban & Partner, Wrocław 2006; 771-81.
- Rejestr nowotworów. COI, Warszawa 2009.
- Pectasides D, Papaxoinis G, Fountzilias G, et al.; Hellenic Cooperative Oncology Group. Epithelial ovarian cancer in Greece: a retrospective study of 1,791 patients by the Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG). *Anticancer Res* 2009; 29: 745-51.
- Arias-Pulido H, Smith HO, Joste NE, et al. Estrogen and progesterone receptor status and outcome in epithelial ovarian cancers and low malignant potential tumors. *Gynecol Oncol* 2009; 114: 480-5.
- Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 1962; 237: 1555-62.
- Savage CR Jr, Hash JH, Cohen S. Epidermal growth factor. Location of disulfide bonds. *J Biol Chem* 1973; 248: 7669-72.
- Xiaorong Z, Wentao D, Huifen Z, et al. Epidermal growth factor (EGF) induces apoptosis in a transfected cell line expressing EGF receptor on its membrane. *Cell Biol Int* 2006; 30: 653-8.
- Kupryjańczyk J, Siedlecki JA. Molekularna patogenezę nowotworów złośliwych. Markowska J (red.). W: Onkologia ginekologiczna. Urban & Partner, Wrocław 2006; 23-43.
- Berchuck A, Rodriguez GC, Kamel A, et al. Epidermal growth factor receptor expression in normal ovarian epithelium and ovarian cancer. I. Correlation of receptor expression with prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 669-74.
- Snider AJ, Zhang Z, Xie Y, Meier KE. Epidermal growth factor increases lysophosphatidic acid production in human ovarian cancer cells: roles for phospholipase D2 and receptor transactivation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298: C163-70.
- Perry JE, Grossmann ME, Tindall DJ. Epidermal growth factor induces cyclin D1 in a human prostate cancer cell line. *Prostate* 1998; 35: 117-24.
- Verbeek BS, Adriaansen-Slot SS, Vroom TM, et al. Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts. *FEBS Lett* 1998; 425: 145-50.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-39.
- Grotendorst GR, Soma Y, Takehara K, Charette M. EGF and TGF- α are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. *J Cell Physiol* 1989; 139: 617-23.
- International Histological Classification of Tumours. No. 9. Histological typing of ovarian tumours. 2nd ed. World Health Organization, Geneva 1995.
- Yucel-Lindberg T, Brunius G. Epidermal growth factor synergistically enhances interleukin-8 production in human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 β . *Arch Oral Biol* 2006; 51: 892-8.
- Poon SL, Hammond GT, Leung PC. Epidermal growth factor-induced GnRH-II synthesis contributes to ovarian cancer cell invasion. *Mol Endocrinol* 2009; 23: 1646-56.
- Aybay C, Karakus R, Yucel A. Characterization of human epidermal growth factor in human serum and urine under native conditions. *Cytokine* 2006; 35: 36-43.
- Laskin J, Sandler AB. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 1-17.
- Zeineldin R, Muller CY, Stack MS, Hudson LG. Targeting the EGF receptor for ovarian cancer therapy. *J Oncol* 2010; 2010: 414676.
- Baron AT, Lafky JM, Boardman CH, et al. Serum sErbB1 and epidermal growth factor levels as tumor biomarkers in women with stage III or IV epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 129-37.
- Ridderheim M, Cajander S, Tavelin B, et al. EGF/TGF- α and progesterone in urine of ovarian cancer patients. *Anticancer Res* 1994; 14: 2119-23.
- Shah NG, Bhatavdekar JM, Doctor SS, et al. Circulating epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Neoplasma* 1994; 41: 241-3.