

Ocena ekspresji cykliny E w rozrostach i raku błony śluzowej trzonu macicy u kobiet po menopauzie

Evaluation of cyclin E expression in endometrial hyperplasia and cancer in postmenopausal women

Adam Bitner¹, Andrzej Zdziennicki², Edyta Właźlak², Józef Kobos³, Jacek Suzin², Grzegorz Surkont²

¹ Klinika Perinatologii, I Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

² Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologicznej, I Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

³ Zakład Patomorfologii Wieku Rozwojowego, Katedra Biomedycznych Podstaw Pielęgniarstwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

Streszczenie

Cel pracy: Celem pracy była ocena ekspresji cykliny E w rozrostach endometrium bez atypii komórkowej, w rozrostach endometrium z atypią komórkową oraz w rakach endometrium, w porównaniu do ekspresji cykliny E w endometrium atroficznym u kobiet po menopauzie. Dodatkowo oceniliśmy zależność między ekspresją cykliny E a czynnikami prognostycznymi w raku endometrium takimi jak: typ histologiczny nowotworu, stopień klinicznego zaawansowania wg FIGO oraz stopień zróżnicowania histologicznego.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 154 kobiety podzielone na 4 grupy. Do pierwszej grupy włączono 38 kobiet z rozrostem endometrium bez atypii, do drugiej 18 kobiet z rozrostem endometrium z atypią, do trzeciej 62 kobiety z rakiem endometrium, a do czwartej 36 kobiet z endometrium atroficznym. Ekspresję cykliny E oceniono w utrwalonych w formalinie, zatopionych w parafinie preparatach endometrium uzyskanych od badanych kobiet przy użyciu metod immunohistochemicznych. Oceniono indeks komórkowy (LI - labelling index) – liczbę komórek wykazujących ekspresję cykliny E w stosunku do wszystkich komórek w danym polu widzenia

Wyniki: Mediany indeksów komórkowych cykliny E w endometrium atroficznym, rozroście endometrium bez atypii, rozroście endometrium z atypią oraz raku endometrium wynosiły odpowiednio 13,7%, 34,7%, 62%, 72,2%. Różnice te były istotne statystycznie. W pracy nie wykazaliśmy zależności między nasileniem ekspresji cykliny E, a typem histologicznym nowotworu ($p=0,186$), stopniem klinicznego zaawansowania wg FIGO ($p=0,186$) oraz stopniem zróżnicowania histologicznego guza ($p=0,539$).

Wnioski: W procesie rozwoju nowotworu błony śluzowej trzonu macicy u kobiet po menopauzie dochodzi do stopniowego zaburzenia mechanizmów regulujących cykl komórkowy. Ocena ekspresji cykliny E nie może być wykorzystana jako czynnik prognostyczny w raku endometrium.

Słowa kluczowe: **cyklina E / cykl komórkowy / rak endometrium /
/ rozrost endometrium / endometrium atroficzne /**

Adres do korespondencji:

Adam Bitner

Klinika Perinatologii, I Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Polska, 94-029 Łódź, ul. Wileńska 37

telefon: +42 680 47 22

e-mail: adambit@wp.pl

Otrzymano: 15.10.2013

Zaakceptowano do druku: 02.03.2014

Adam Bitner et al. Ocena ekspresji cykliny E w rozrostach i raku błony śluzowej trzonu macicy u kobiet po menopauzie.

Abstract

Objectives: The aim of present study was to determine expression of cyclin E in endometrial hyperplasia without atypia, atypical endometrial hyperplasia and endometrial cancers in comparison with expression of cyclin E in atrophic endometrium of postmenopausal women. We have also estimated relationship between cyclin E expression and prognostic factors for endometrial cancer such as: histological type, cancer stage and histological grade.

Material and methods: 154 women were enrolled into study. Women were divided into 4 groups. The first group consist of 38 women with endometrial hyperplasia without atypia, the second group consist of 18 women with atypical endometrial hyperplasia. The third group comprise 62 women with endometrial cancer and the forth 36 women with atrophic endometrium. Cyclin E expression was estimated in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues obtained from enrolled women with the use of immunohistochemical techniques. We estimated labelling index (LI) – the number of cells that stained for cyclin E in relation to all cells at the certain field of view.

Results: Medians of labelling indices of cyclin E in atrophic endometrium, endometrial hyperplasia with atypia, atypical endometrial hyperplasia and endometrial cancer were 13,7%, 34,7%, 62%, 72,2% respectively. These differences were statistically significant. In our study we haven't found relationship between cyclin E expression and histological type of tumour ($p=0,186$), cancer stage ($p=0,186$) and histological grade ($p=0,539$)

Conclusions: In the carcinogenesis of endometrial tumours in postmenopausal women there is a progressive disorder in mechanisms regulating cell cycle. It seems impossible to use cyclin E as prognostic factor for endometrial cancer.

Key words: **Cyclin E / cell cycle / endometrial cancer / endometrial hyperplasia / atrophic endometrium /**

Wstęp

Rak endometrium jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych występujących u kobiet w Polsce. W 2011 roku standaryzowany współczynnik zachorowalności wynosił 14,9, co stawia go na 3 miejscu wśród zachorowalności na nowotwory złośliwe u kobiet w Polsce, po nowotworach złośliwych sutka oraz oskrzeli i płuc. W tym samym roku standaryzowany współczynnik zgonów wynosił 2,5, co stanowi 11 miejsce wśród przyczyn zgonów z powodu nowotworów u kobiet, po nowotworach złośliwych między innymi oskrzeli i płuc, sutka, jajnika, okrężnicy i szyjki macicy [1].

Większość nowotworów błony śluzowej trzonu macicy rozwija się na bazie rozrostów endometrium [2]. Głównym czynnikiem związanym ze zwiększonym ryzykiem transformacji nowotworowej jest obecność atypii komórkowej. Najważniejszymi czynnikami prognostycznymi w raku endometrium, określającymi szansę na wyleczenie oraz ryzyko nawrotu choroby są typ histologiczny, stopień zróżnicowania histologicznego oraz stopień zaawansowania klinicznego nowotworu [2, 3].

Cykl komórkowy jest to okres wzrostu komórki od momentu jej powstania do chwili gdy ona sama podzieli się na dwie identyczne komórki potomne [4]. Wyróżnia się w nim dwa okresy: M – podziału jądra komórkowego i cytoplazmy oraz I – interfazy. Interfaza stanowi 90% lub więcej całkowitego czasu trwania cyklu komórkowego. Dzieli się na 3 fazy: G1, S i G2. W fazie G1 zachodzą procesy przygotowujące komórkę do replikacji DNA. W fazie S zachodzi proces replikacji DNA. W fazie G2 komórka przygotowuje się do podziału.

Prawidłowy przebieg cyklu komórkowego jest wynikiem istnienia punktów kontrolnych, w których sprawdzana jest prawidłowość replikacji DNA, tworzenia wrzeciona podziałowego oraz segregacji chromosomów. Dwa, najistotniejsze z tych punktów noszą nazwę punktów restrykcyjnych. Pierwszy z nich znajduje się na granicy faz G1/S, a drugi na granicy faz G2/M.

Przebieg cyklu może być zatrzymany w obu punktach restrykcyjnych. Wykrycie uszkodzeń DNA na początku interfazy powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 oraz uruchomienie mechanizmów naprawy DNA. W przypadku gdy naprawa DNA jest niemożliwa komórka kierowana jest na drogę apoptozy. Mechanizm ten zapobiega replikacji uszkodzonego DNA. Przełamanie punktu restrykcyjnego G1/S powoduje, że w fazę S wchodzi komórka z nieprawidłowym materiałem genetycznym. Jest to jeden z etapów na drodze do powstania komórki nowotworowej [4].

Przejście kolejnych punktów kontrolnych jest wynikiem fosforylacji i defosforylacji białek regulujących cykl komórkowy. Za przejście punktu restrykcyjnego G1/S odpowiada kinaza CDK2 (cyclin-dependent protein kinase 2 – kinaza zależna od cyklin 2). Ekspresja tej kinazy jest stała podczas całego cyklu komórkowego, w przeważającej części cyklu występuje jednak w formie nieaktywnej. Aby uzyskać aktywność kinaza CDK musi połączyć się ze specjalnym białkiem regulatorowym zwanym cykliną E. Ekspresja cykliny E jest ściśle skorelowana z fazami cyklu komórkowego. Pojawia się ona w połowie fazy G1, łączy się z kinazą CDK2 i aktywuje ją. Kompleks ten jest niezbędny do wejścia w fazę S (przejścia punktu restrykcyjnego G1/S). Wkrótce po wejściu w fazę S cała obecna w komórce cyklina E ulega rozpadowi w proteasomach [5].

W ostatnich latach prowadzone są badania oceniające związek między zaburzeniami regulacji cyklu komórkowego, a rozwojem chorób nowotworowych. Szereg z tych prac dotyczy potencjalnej roli nieprawidłowej ekspresji cykliny E w procesie kancerogenezy. Do tej pory nadekspresję cykliny E wykazano między innymi w nowotworach pęcherza moczowego, szyjki macicy, jelita grubego oraz odbytnicy [6, 7, 8]. Pojawiają się także doniesienia o zwiększonej ekspresji cykliny E w nowotworach błony śluzowej trzonu macicy [9, 10].

Adam Bitner et al. Ocena ekspresji cykliny E w rozrostach i raku błony śluzowej trzonu macicy u kobiet po menopauzie.

Biorąc pod uwagę opisywane w piśmiennictwie zaburzenia ekspresji cykliny E w zmienionych nowotworowo tkankach postanowiliśmy ocenić rolę tej cykliny w procesie rozwoju raka błony śluzowej trzonu macicy u kobiet po menopauzie.

Cel pracy

Celem pracy była ocena ekspresji cykliny E w rozrostach endometrium bez atypii komórkowej, w rozrostach endometrium z atypią oraz w rakach endometrium, w porównaniu do ekspresji cykliny E w endometrium atroficznym u kobiet po menopauzie.

Dodatkowo postanowiliśmy zbadać możliwość wykorzystania oceny ekspresji cykliny E jako czynnika prognostycznego w nowotworach błony śluzowej trzonu macicy. W tym celu oceniliśmy zależność między ekspresją cykliny E, a wybranymi znanymi czynnikami prognostycznymi raka endometrium takimi jak: typ histologiczny nowotworu, stopień klinicznego zaawansowania wg FIGO oraz stopień zróżnicowania histologicznego.

Materiał i metody

Badania uzyskały pozytywną opinię Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr RNN/68/06/KE

Do badania zakwalifikowano 154 kobiety po menopauzie, leczone w I Katedrze Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2004-2007, u których z powodu krwawień z jamy macicy, mięśniaków macicy, wypadania narządu rodno, patologii szyjki macicy lub guza jajnika przeprowadzono badanie histopatologiczne błony śluzowej trzonu macicy i wykryto endometrium atroficzne, rozrost lub raka endometrium. W zależności od wyniku badania histopatologicznego pacjentki zostały zakwalifikowane do 4 grup. Do pierwszej włączono 38 kobiet z rozrostem endometrium bez atypii, do drugiej 18 kobiet z rozrostem endometrium z atypią, do trzeciej 62 kobiety z rakiem endometrium, a do czwartej 36 kobiet z endometrium atroficznym.

Ekspresję cykliny E oznaczono metodą immunohistochemiczną w systemie detekcyjnym DAKO EnVision według metody immunoperoksydazowej, z użyciem pierwotnego mysiego przeciwciała monoklonalnego przeciwko cyklinie E firmy Novocastra (Wielka Brytania) w Pracowni Histopatologii Instytutu Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Skrawki parafinowe z utrwalonymi w formalinie preparatami tkankowymi o grubości 3-4 mikrometrów, po nałożeniu na szkiełka adhezyjne były odparafinowywane w szeregu składającym się z ksylenów i alkoholi o zmniejszających się stężeniach. Następnie hamowano aktywność endogennej peroksydazy, używając 3% roztworu perhydrolu, przez 5 minut. Otrzymane preparaty podgrzewano 40 min. w łaźni wodnej, w temp. 99°C, w Target Retrieval Solution, pH 9 firmy Dako (Dania). Po ostudzeniu skrawki płukano w 0,05 M buforze TRIS (TBS) o pH 7,6 przez 5 min. Następnie poddawano je inkubacji nocnej w temp. 4°C, w komorze wilgotnej, z odpowiednio rozcieńczonymi przeciwciałem 1:80.

Po inkubacji preparaty płukano w buforze TBS i inkubowano ze znakowanym peroksydazą polimerem, związanym z wtórnymi, kozimi przeciwciałami skierowanymi przeciwko użytym pierwotnym przeciwciałom monoklonalnym. Następnie stosowano substrat dla peroksydazy – tetrachlorek 3,3'-diaminobenzydyny (DAB), uzyskując produkt barwny. Jądra komórkowe podbarwiano hematoksyliną Meyera, a następnie odwadniano skrawki

w szeregu alkoholi o rosnących stężeniach i przeprowadzono przez szereg acetonów i ksylenów.

W uzyskanych w ten sposób preparatach ekspresję cykliny E oceniano w sposób ilościowy przy użyciu optycznego mikroskopu Nixon, MICROPHOT – FAX oraz programu MultiScanBase V.8.08 firmy Computer Scanning Systems Ltd (Polska). Oceniano indeks komórkowy (LI – *labelling index*) – liczbę komórek wykazujących ekspresję cykliny E (liczbę komórek, których jądra wybarwiły się na kolor brązowy), w stosunku do wszystkich komórek endometrium w danym polu widzenia (fot 1-4).

W przypadku rozrostu bez atypii, rozrostu z atypią i raka endometrium, w każdym z preparatów oceniano 10 losowo wybranych pól widzenia z 400x powiększeniem. W przypadku endometrium atroficznego, ze względu na dużą zmienność nasilenia ekspresji cykliny E w obrębie poszczególnych pól widzenia, oceniono 20 losowo wybranych pól widzenia.

W celu statystycznej oceny zebranych danych zastosowano: test t-Studenta, test U Manna-Whitney'a, test Shapiro-Wilka, dokładny dwustronny test Ch2, jednoczynnikową analizę wariancji oraz test Kruskala Wallisa. Dla wszystkich testów przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$. Analizę wykonano przy użyciu programów: SPSS PC i STATISTICA.

Wyniki

Kobiety z nowotworem błony śluzowej trzonu macicy oraz z atypowym rozrostem endometrium były starsze, miały wyższą masę ciała i wskaźnik BMI niż kobiety z rozrostem endometrium bez atypii. W grupie kobiet z nowotworami błony śluzowej trzonu macicy upłynęło więcej lat od ostatniej miesiączki niż w grupach kobiet z rozrostami endometrium. Nie wykazano różnic między badanymi grupami dotyczących wzrostu, wieku wystąpienia ostatniej miesiączki, liczby przeżytych ciąż oraz porodów. Charakterystykę cech klinicznych kobiet w poszczególnych badanych grupach przedstawia tabela I.

Ekspresję cykliny E stwierdziliśmy we wszystkich ocenianych preparatach mikroskopowych. Wykazaliśmy ponadto istotne statystycznie różnice w nasileniu ekspresji cykliny E pomiędzy poszczególnymi badanymi grupami. W grupie pacjentek z rakiem endometrium mediana indeksu komórkowego cykliny E wyniosła 72,2%, w grupie z atypowym rozrostem endometrium 62%, w grupie z rozrostem endometrium bez atypii 34,7%, a w grupie pacjentek z endometrium atroficznym 13,7%. Uzyskane wyniki przedstawiono przy pomocy mediany z przedziałem kwartylowym (tabela II) oraz na rycinie 1.

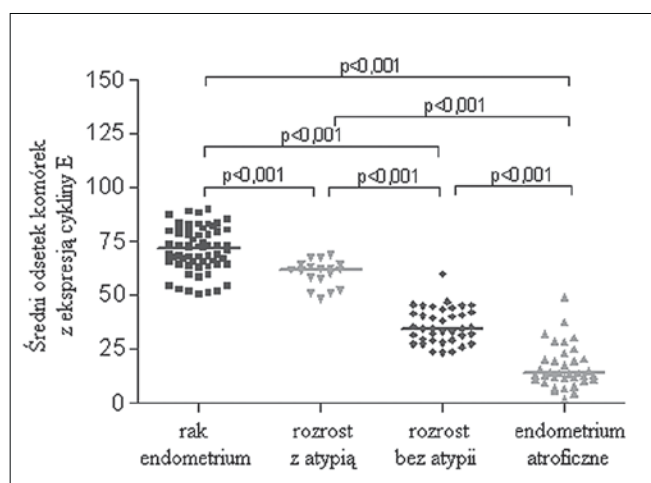
Analizując typ histologiczny nowotworów stwierdzono 51 przypadków (82,3%) raka typu endometrioidalnego, 5 przypadków (8,1%) raka typu śluzowego, 3 przypadki (4,8%) raka jasnokomórkowego, 2 przypadki (3,2%) raka niezróżnicowanego i 1 przypadek (1,6%) raka surowiczego. W celu analizy zależności między nasileniem ekspresji cykliny E, a typem histologicznym nowotworu, ze względu na małą liczebność pacjentek z poszczególnymi typami histologicznymi nowotworów nieendometrioidalnych, pacjentki z typem nowotworu śluzowym, jasnokomórkowym, niezróżnicowanym oraz surowicznym połączono w jedną grupę. Mediana LI cykliny E w nowotworach endometrioidalnych wynosiła 70% natomiast w nowotworach nieendometrioidalnych 76,1%. Nie wykazaliśmy zależności między nasileniem ekspresji cykliny E, a typem histologicznym nowotworu, $p=0,186$. (Rycina 2).

Tabela I. Cechy kliniczne pacjentek w poszczególnych badanych grupach.

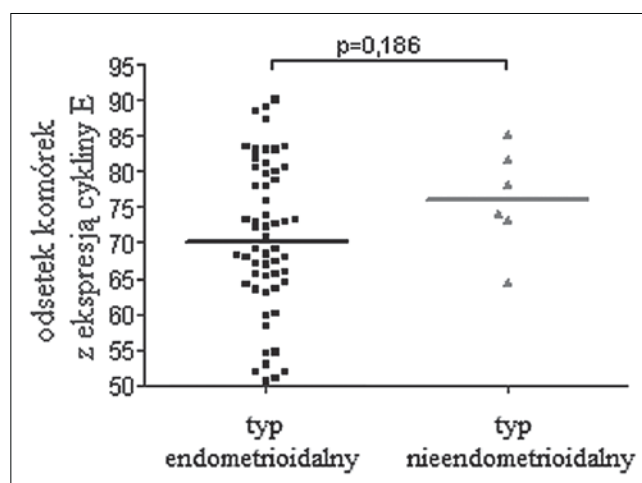
	Rak endometrium		Rozrost z atypią		Rozrost bez atypii		Endometrium atroficzne	
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia	SD
Wiek [lata]	65,65	10,47	58,44	9,44	54,58	9,65	67,5	9,11
Wzrost [m]	1,60	0,06	1,62	0,06	1,61	0,06	1,60	0,05
Masa ciała [kg]	77,7	13,9	83,6	16,4	70,1	14,4	67,1	12,4
BMI [kg/m ²]	29,8	4,8	33,4	5,3	26,5	4,5	26,3	4,5
Wiek ostatniej miesiączki [lata]	49,98	3,82	50,22	3,93	49,71	4,08	49,37	4,68
Liczba lat po menopauzie	15,90	12,35	8,22	9,32	4,87	8,35	17,97	10,79
Liczba ciąż	2,43	1,46	2,11	1,50	1,97	1,30	2,36	1,50
Liczba porodów	1,86	1,19	1,60	1,33	1,5	0,92	1,67	1,07

Tabela II. Mediana indeksu komórkowego cykliny E w poszczególnych badanych grupach.

	Rak endometrium	Rozrost z atypią	Rozrost bez atypii	Atrofia endometrium
Mediana	72,2%	62,0%	34,7%	13,7%
Percentyl 25	64,5%	57,6%	29,4%	10,9%
Percentyl 75	79,9%	64,3%	42,4%	20,4%



Rycina 1. Mediana indeksu komórkowego cykliny E w badanych grupach.



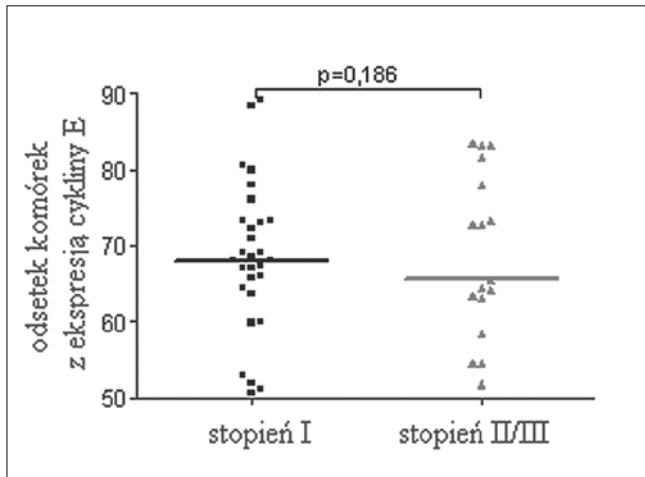
Rycina 2. Zależność między ekspresją cykliny E, a typem histologicznym nowotworu.

Oceniając stopień zaawansowania klinicznego nowotworu stwierdzono 29 przypadków (46,8%) nowotworów w stopniu I, 14 przypadków (22,6%) nowotworów w stopniu II oraz 3 nowotwory (4,8%) w III stopniu zaawansowania. Nie stwierdzono nowotworów w IV stopniu zaawansowania klinicznego choroby. W 16 przypadkach (25,8%) posiadane informacje były niewystarczające do ustalenia stopnia zaawansowania klinicznego. Ze względu na małą liczbę nowotworów w II i III stopniu zaawansowania klinicznego analizowano je łącznie. Mediana LI cykliny E w nowotworach w I stopniu zaawansowania klinicznego

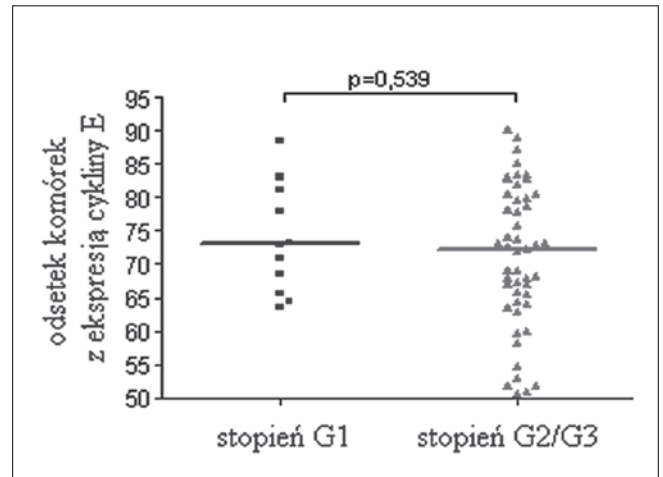
nowotworu wynosiła 68,01%, natomiast w nowotworach w II i III stopniu zaawansowania klinicznego łącznie 65,51%. Nie stwierdziliśmy statystycznie istotnych zależności między nasileniem ekspresji cykliny E, a stopniem zaawansowania klinicznego choroby, $p=0,186$. (Rycina 3).

Oceniając stopień zróżnicowania histologicznego stwierdzono 11 przypadków (17,7%) nowotworów w stopniu G1, 45 (72,7%) w stopniu G2 i 3 (4,8%) w stopniu G3. U 3 pacjentek (4,8%) nie uzyskaliśmy danych dotyczących stopnia zróżnicowania histologicznego.

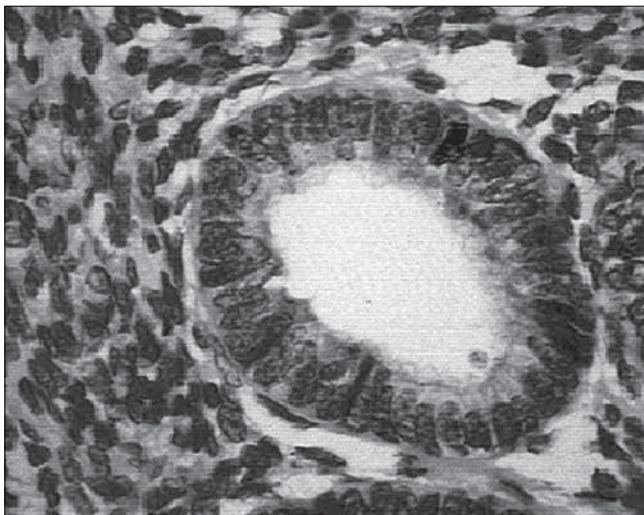
Adam Bitner et al. Ocena ekspresji cykliny E w rozrostach i raku błony śluzowej trzonu macicy u kobiet po menopauzie.



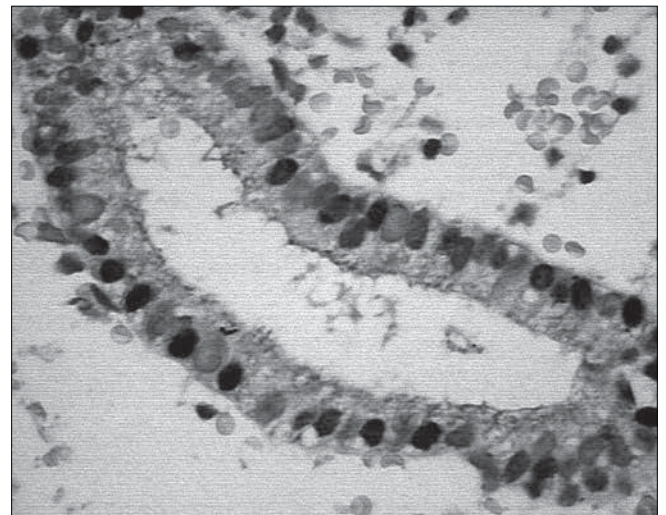
Rycina 3. Zależność między ekspresją cykliny E, a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu.



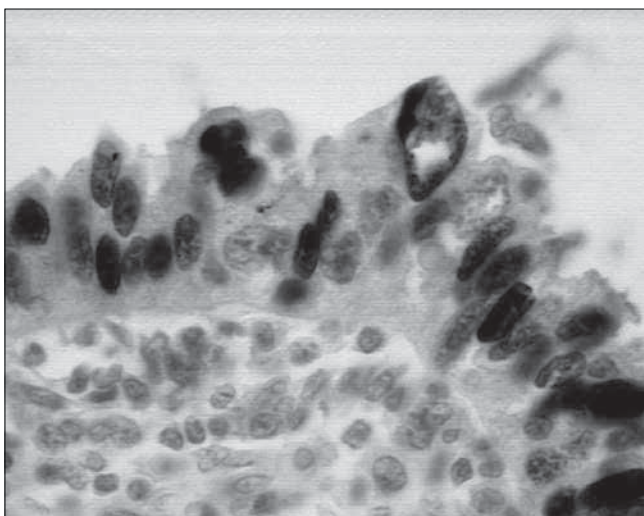
Rycina 4. Zależność między ekspresją cykliny E, a stopniem zróżnicowania histologicznego nowotworu.



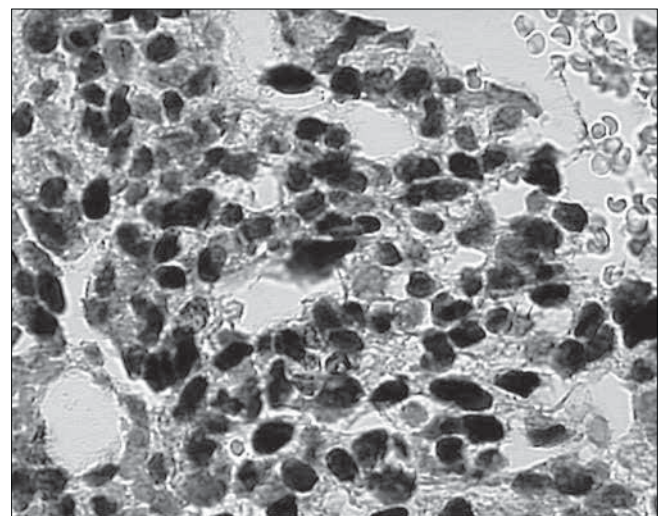
Fotografia 1. Endometrium atroficzne. Ekspresja cykliny E. Powiększenie 400x.



Fotografia 2. Rozrost endometrium bez atypii. Ekspresja cykliny E. Powiększenie 400x.



Fotografia 3. Rozrost endometrium z atypią. Ekspresja cykliny E. Powiększenie 400x.



Fotografia 4. Rak endometrium z atypią. Ekspresja cykliny E. Powiększenie 400x.

Adam Bitner et al. Ocena ekspresji cykliny E w rozrostach i raku błony śluzowej trzonu macicy u kobiet po menopauzie.

Ze względu na małą liczbę nowotworów w stopniu G3 analizowaliśmy je łącznie z nowotworami w stopniu G2. Mediana LI cykliny E komórek nowotworów w stopniu zróżnicowania G1 wyniosła 72,94% natomiast w stopniu G2 i G3 łącznie 72,16%. Dane te były nieistotne statystycznie, $p=0,539$. (Rycina 4).

Dyskusja

Zgodnie z naszą wiedzą jest to jedna z pierwszych prac oceniających w sposób systematyczny zmiany w nasileniu ekspresji cykliny E w procesie kancerogenezy raka błony śluzowej trzonu macicy u kobiet po menopauzie. W pracy wykazaliśmy niewielką, podstawową ekspresję cykliny E we wszystkich preparatach endometrium atroficznego. Mediana LI cykliny E w endometrium atroficznym wyniosła 13,7%. W pracy wykazaliśmy także sukcesywny wzrost nasilenia ekspresji cykliny E w procesie rozwoju raka endometrium począwszy od rozrostu endometrium bez atypii (mediana LI – 34,7%), poprzez uznawany za stan przednowotworowy atypowy rozrost endometrium (mediana LI – 62,0%), kończąc na raku endometrium, w którym mediana ekspresji wyniosła 72,2%.

W dotychczasowych, nielicznych publikacjach oceniających ekspresję cykliny E w chorobach rozrostowych endometrium, autorzy koncentrowali się głównie na wykazaniu obecności lub braku ekspresji cykliny E w rakach błony śluzowej trzonu macicy lub na wykazaniu, że w nowotworach endometrium jest ona wyższa niż w endometrium nowotworowo niezmiennym. Przykładowo Mitselou i wsp. wykazali ekspresję cykliny E w 39,1% jąder komórek nowotworowych, a Shin i wsp. w 66% jąder komórek nowotworowych endometrium [11, 12]. Milde-Langosch i wsp. ocenili, że ekspresja cykliny E w nowotworach endometrium jest znacznie wyższa w porównaniu z normalnym endometrium, nie wyjaśnili jednak jaki rodzaj endometrium uznawali za normalny [13]. Bardziej szczegółowej analizy zmian zachodzących w procesie powstawania raka endometrium dokonali Kato i wsp. oceniając ekspresję cykliny E w rozrostach endometrium oraz rakach błony śluzowej trzonu macicy [14]. Autorzy stwierdzili niską ekspresję cykliny E w rozrostach endometrium, na przykład w złożonym rozroście endometrium z atypią (CAH – *Complex Atypical Hyperplasia*) indeks komórkowy wynosił tylko 0,08%. W pracy wykazano statystycznie istotnie wyższą ekspresję cykliny E w nowotworach endometrium niż w rozrostach – dla raka endometrium w stopniu zaawansowania klinicznego FIGO I, LI wyniósł 39,7% ($p<0,0001$). Trzeba zauważyć, że do badania włączono małą liczbę pacjentek z rozrostami endometrium, w sumie 20, a liczba kobiet z opisywanym już CAH wyniosła tylko 4. Również Gezginc i wsp. wykazali wyższą ekspresję cykliny E w przypadkach nowotworów endometrium niż rozrostów [15]. Horree i wsp. ocenili ekspresję cykliny E, w 16 preparatach endometrium atroficznego, w 23 preparatach z rozrostem endometrium i 39 preparatach z nowotworem endometrium [10]. Podobnie jak w naszej pracy autorzy wykazali stały wzrost ekspresji cykliny E począwszy od endometrium zanikowego poprzez hiperplazję do najwyższej ekspresji w rakach błony śluzowej trzonu macicy.

Analizując wyniki nielicznych, dostępnych w piśmiennictwie publikacji oraz naszego obecnego badania wydaje się więc, że w procesie rozwoju raka błony śluzowej trzonu macicy dochodzi do stopniowego wzrostu nasilenia ekspresji cykliny E od poziomu podstawowego charakterystycznego dla endometrium

atroficznego, poprzez coraz wyższe poziomy ekspresji obserwowane w rozrostach endometrium bez atypii i z atypią, kończąc na wysokich poziomach ekspresji w rakach endometrium. W naszej pracy ponad 72% komórek nowotworowych wykazywało ekspresję cykliny E. Wydaje się, że ten stopniowy wzrost ekspresji cykliny E przyczynia się do zaburzeń w procesie fosforylacji białek biorących udział w regulacji cyklu komórkowego. W konsekwencji może dochodzić do deregulacji cyklu komórkowego prowadzącego do zaburzeń proliferacji, a co za tym idzie do transformacji nowotworowej.

W pracy oceniliśmy również związek między nasileniem ekspresji cykliny E, a czynnikami prognostycznymi nowotworów endometrium. Nie wykazaliśmy zależności między typem histologicznym, stopniem zaawansowania klinicznego oraz stopniem zróżnicowania histologicznego, a nasileniem ekspresji analizowanego białka. W kilku publikacjach autorzy również podjęli temat zależności między czynnikami prognostycznymi nowotworów endometrium, a nasileniem ekspresji cykliny E. Wyniki tych prac różnią się między sobą. Horree i wsp. nie zaobserwowali statystycznie istotnych relacji między ekspresją cykliny E, a stopniem zróżnicowania histologicznego, stopniem klinicznego zaawansowania oraz głębokością naciekania błony mięśniowej trzonu macicy [10]. Podobnie Shin i wsp. oraz Milde-Langosch i wsp. nie wykazali zależności między nasileniem ekspresji omawianej cykliny, a stopniem zaawansowania klinicznego oraz stopniem zróżnicowania histologicznego [12, 13]. W ostatniej cytowanej pracy autorzy nie stwierdzili również zależności między ekspresją cykliny E, a typem histologicznym nowotworu. Z kolei Cassia i wsp. wykazali zależność między nadekspresją cykliny E, a typem histologicznym nowotworu [16]. Badacze wykazali nadekspresję cykliny E w 27,5% nowotworów endometrioidalnych i w 54,5% nowotworów nieendometrioidalnych ($p=0,035\%$). W cytowanej pracy wykazano również związek ekspresji cykliny E ze stopniem zróżnicowania histologicznego (im wyższy stopień, tym wyższa ekspresja, $p=0,011$), natomiast nie wykazano związku ze stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu. Związku między ekspresją badanego przeze mnie białka, a stopniem zaawansowania klinicznego oraz naciekiem przestrzeni naczyniowych nie wykazali również Mitselou i wsp. [11]. Autorzy wykazali natomiast korelację między nasileniem ekspresji białka, a stopniem zróżnicowania histologicznego nowotworu. Zależność taką, to znaczy wzrost nasilenia ekspresji badanego białka w wyższych stopniach zróżnicowania histologicznego nowotworów endometrium ($p=0,035$) obserwowali także Kato i wsp. [14]. Autorzy wykazali także zależność ekspresji cykliny E z naciekiem przestrzeni naczyniowych ($p=0,007$) oraz z naciekiem myometrium ($p=0,033$). Nie wykazali natomiast statystycznie istotnych zależności dotyczących nasilenia ekspresji cykliny E, a stopnia zaawansowania klinicznego, oraz obecności przerzutów do węzłów chłonnych.

Podsumowując wyniki badań dotyczących zależności między czynnikami prognostycznymi guzów endometrium, a nasileniem ekspresji cykliny E są niespójne. W niektórych pracach wykazano związek ze stopniem zróżnicowania histologicznego, typem histologicznym nowotworu, naciekiem przestrzeni naczyniowych lub naciekiem błony mięśniowej endometrium podczas gdy wyniki innych badań wydają się nie potwierdzać takich zależności. Co ciekawe, w żadnej pracy, włączając nasze badanie nie wykazano związku pomiędzy nasileniem ekspresji

Adam Bitner et al. Ocena ekspresji cykliny E w rozrostach i raku błony śluzowej trzonu macicy u kobiet po menopauzie.

cykliny E, a stopniem klinicznego zaawansowania nowotworu według FIGO, będącym najważniejszym czynnikiem prognostycznym w raku endometrium [2]. Wydaje się więc, że oznaczenie ekspresji cykliny E nie może być wykorzystane jako czynnik prognostyczny w raku endometrium.

Wnioski

- 1) W procesie rozwoju nowotworu błony śluzowej trzonu macicy u kobiet po menopauzie dochodzi do stopniowego zaburzenia mechanizmów biorących udział w regulacji cyklu komórkowego.
- 2) Wydaje się, że oznaczanie ekspresji cykliny E nie może być wykorzystane jako czynnik prognostyczny w nowotworach endometrium.

Oświadczenie autorów

1. Adam Bitner – autor koncepcji i założeń pracy, zebranie i analiza danych, interpretacja wyników, przygotowanie przeglądu i analizy literatury – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Grzegorz Surkont – współautor koncepcji i założeń pracy, przygotowanie manuskryptu, uzyskanie funduszy na realizację badań.
3. Jacek Suzin – analiza i interpretacja wyników, kwalifikacja pacjentek do badania, pobieranie materiału do badania.
4. Andrzej Zdziennicki – interpretacja wyników, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
5. Józef Kobos – nadzór merytoryczny nad prawidłową oceną ekspresji cykliny E w preparatach histologicznych, interpretacja wyników.
6. Edyta Wiaźlak – przygotowanie przeglądu piśmiennictwa, zbieranie materiału, analiza wyników.

Źródło finansowania:

Praca wykonana w ramach grantu KBN nr, 507-11-266 oraz pracy własnej nr, 502-11-202.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. Krajowa Baza Danych Nowotworowych [online], 2011, <http://epid.coi.waw.pl/krm> [dostęp 08.01.2014]
2. Gabrys MS, Jędryka M, Czynniki prognostyczne w raku błony śluzowej trzonu macicy. W: *Ginekologia Onkologiczna*. Red. Markowska J. Wrocław, Urban&Partner, 2006, 726-734.
3. Gottwald L, Chałubińska J, Moszyńska-Zielińska M, [et al.]. Endometrioid endometrial cancer- the prognostic value of selected clinical and pathological parameters. *Ginekol Pol.* 2011, 82, 743-748.
4. Siedlecki JA. Choroby nowotworowe. W: *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Red. Bal J. Warszawa, PWN, 2007, 349-365.
5. Grzelakowska –Sztabert B. Zależna od ubikwityny degradacja białek. Nagroda Nobla z Chemii w 2004 roku. Kosmos. *Problemy Nauk Biologicznych*. 2005, 54, 133-148.
6. Richter J, Wagner U, Kononen J, [et al.]. High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer. *Am J Pathol.* 2000, 157, 787-794.
7. Quade BJ, Park JJ, Crum CP, [et al.]. In vivo cyclin E expression as a marker for early cervical neoplasia. *Mod Pathol.* 1998, 11, 1238-1246.
8. Wang A, Yoshimi N, Suzui M, [et al.]. Different expression patterns of cyclins A, D1 and E in human colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996, 122, 122-126.

9. Ito K, Sasano H, Yoshida Y, [et al.]. Immunohistochemical study of cyclins D and E and cyclin dependent kinase (cdk) 2 and 4 in human endometrial carcinoma. *Anticancer Res.* 1998, 18, 1661-1664.
10. Horree N, van Diest PJ, van der Groep P, [et al.]. Progressive derailment of cell cycle regulators in endometrial carcinogenesis. *J Clin Pathol.* 2008, 61, 36-42.
11. Mitselou A, Ioachim E, Zagorianakou N, [et al.]. Expression of the cell-cycle regulatory proteins (cyclins D1 and E) in endometrial carcinomas, correlations with hormone receptor status, proliferating indices, tumor suppressor gene products (p53, pRb), and clinicopathological parameters. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2004, 25, 719-724.
12. Shih HC, Shiozawa T, Kato K, [et al.]. Immunohistochemical expression of cyclins, cyclin-dependent kinases, tumor-suppressor gene products, Ki-67, and sex steroid receptors in endometrial carcinoma, positive staining for cyclin A as a poor prognostic indicator. *Hum Pathol.* 2003, 34, 471-478.
13. Milde-Langosch K, Bamberger AM, Goemann C, [et al.]. Expression of cell-cycle regulatory proteins in endometrial carcinomas, correlations with hormone receptor status and clinicopathologic parameters. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001, 127, 537-544.
14. Kato N, Watanabe J, Jobo T, [et al.]. Immunohistochemical expression of cyclin E in endometrial adenocarcinoma (endometrioid type) and its clinicopathological significance. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003, 129, 222-226.
15. Gezginc ST, Celik C, Dogan NU, [et al.]. Expression of cyclin A, cyclin E and p27 in normal, hyperplastic and frankly malignant endometrial samples. *J Obstet Gynaecol.* 2013, 33, 508-511.
16. Cassia R, Moreno-Bueno G, Rodriguez-Perales S, [et al.]. Cyclin E gene (CCNE) amplification and hCDC4 mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol.* 2003, 201, 589-595.