

Ekspresja surwiwiny, SDF-1 i CXCR4 na komórkach nowotworowych raka jajnika

Expression of survivin, SDF-1 and CXCR4 on tumor cells in ovarian cancer

Nowak-Markwitz Ewa¹, Puła Bartosz², Szajnik Marta¹, Dziegiel Piotr^{2,3,4},
Piotrowska Aleksandra², Zabel Maciej^{2,3}, Spaczyński Marek¹

¹ Klinika Onkologii Ginekologicznej, Katedra Ginekologii, Potożnictwa i Onkologii Ginekologicznej, Uniwersytet Medyczny, Poznań

² Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Akademia Medyczna we Wrocławiu

³ Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

⁴ Dolnośląskie Centrum Onkologii we Wrocławiu

Streszczenie

Cel pracy: Rak jajnika cechuje się największą śmiertelnością wśród złośliwych nowotworów kobiecych narządów płciowych. Brak możliwości wczesnego wykrywania oraz mało skuteczne metody leczenia zaawansowanej choroby wskazują na pilną potrzebę określenia najbardziej optymalnego biomarkera, który będzie miernikiem predykcji rokowania i odpowiedzi chorych na stosowane leczenie. Celem badań była ocena ekspresji surwiwiny, chemokiny SDF-1 i jej receptora CXCR-4 w rakach jajnika.

Materiał i metodyka: Materiał do badań stanowiły próbki pierwotnych nabłonkowych nowotworów złośliwych jajnika pobrane od 82 chorych. Charakterystykę kliniczną (wiek, stadium zaawansowania FIGO, grading, histopatologia oraz wywiad rodzinny, a także follow-up) uzyskano na podstawie historii chorób. Wykonano badania immunohistochemiczne ekspresji surwiwiny, SDF-1 i CXCR-4 oraz skorelowano wyniki z danymi histoklinicznymi.

Wyniki: Wykazano, że tylko ekspresja surwiwiny koreluje ze stopniem dojrzałości histologicznej guza (grading). Nie wykazano istotnej statystycznie korelacji ekspresji SDF-1 i CXCR-4 z danymi kliniczno-patologicznymi. Aby określić czy SDF-1 i CXCR-4 mogą być uznane za biomarker raków jajnika potrzebne są badania na większej grupie chorych.

Słowa kluczowe: rak jajnika / surwiwina / SDF-1, CXCR-4 / immunohistochemia /

Summary

Background: epithelial ovarian cancer (EOC) has the highest mortality rate among patients with gynecologic malignancies. Lack of specific and early symptoms and of screening tests causes that most patients are diagnosed in advanced stage of disease. Radical surgery followed by chemotherapy does not bring satisfactory curative effects.

Objectives: the urgent need exists to define the optimum biomarker for ovarian cancer to predict patients' response to curative therapy. Our current study aimed at correlation between the expression of survivin, SDF-1, CXCR-4 on tumor tissue and clinical outcome of patients with ovarian cancer.

Adres do korespondencji:

Ewa Nowak-Markwitz
Klinika Onkologii Ginekologicznej UM w Poznaniu
60-535 Poznań, ul. Polna 33
tel. 61 841 93 73; fax 61 841 94 65
e-mail: ewamarkwitz@poczta.fm

Otrzymano: 15.06.2010
Zaakceptowano do druku: 01.09.2010

Results: we showed that survivin expression correlates with histological grading of the tumor. No correlation was found in terms of SDF-1/CXCR-4 expression and clinicopathologic data.

Conclusions: further studies covering larger number of patients are needed to determine whether SDF-1 and CXCR-4 might be considered as biomarkers for ovarian cancer.

Key words: **ovarian cancer / survivin / SDF-1 / CXCR-4 / immunohistochemistry /**

Wstęp

Rak jajnika cechuje się największą śmiertelnością wśród złośliwych nowotworów kobiecych narządów płciowych. Brak wczesnych i specyficznych objawów oraz nieskuteczne programy przesiewowe sprawiają, że większość kobiet diagnozowana jest w zaawansowanym stadium choroby. Radykalna chirurgia z następową chemioterapią nie przynoszą zadowalających wyników terapeutycznych od wielu lat. Rozwój nowotworu jest bezsprzecznie wynikiem gromadzących się przez lata mutacji [1-3].

Jednak agresywność raka nie jest prostym wynikiem zmian genetycznych, ale przede wszystkim interakcji komórek nowotworowych z komórkami gospodarza i z jego układem immunologicznym. Rak jajnika, podobnie jak inne nowotwory złośliwe rozwija wiele mechanizmów prowadzących do stworzenia korzystnego dla siebie mikrośrodowiska. Jednym z nich jest indukowanie przewlekłego stanu zapalnego i hamowanie układu immunologicznego. Nowotwór wykorzystuje do tego celu produkowane przez siebie, a także przez komórki immunologiczne, cytokiny prozapalne, chemokiny, czynniki wzrostu i wiele innych. Produkowane białka mogą działać na różne komórki w mikrośrodowisku raka w tym na komórki zapalne, a także auto- lub parakrynnie na komórki nowotworowe.

Wyniki badań pokazują jednoznacznie, że komórki nowotworowe mogą „zapożyczać” cechy komórek immunologicznych w celu indukowania przewlekłego stanu zapalnego co jest jedną z dróg ucieczki nowotworu (*tumor escape*) spod kontroli układu immunologicznego [4-6].

Chemokiny to małe peptydy, biorące udział głównie w odporności oraz w zapaleniach. W ostatnich latach zwraca się również uwagę na udział chemokin w powstawaniu guza, jego progresji oraz przerzutowaniu [7]. Mikrośrodowisko raka jajnika cechuje obecność wielu różnych chemokin, które uwalniane są zarówno przez komórki rakowe jak i przez komórki gospodarza, na przykład leukocyty, fibroblasty czy komórki endotelium. Szczególnie chemokina CXCL12 nazywana również SDF-1 (*stroma-derived factor*) oraz jej receptor CXCR4 odgrywają istotną rolę w wielu nowotworach złośliwych [8-10]. Nieprawidłowa ekspresja tej chemokiny lub jej receptora wpływa na potencjał proliferacyjny komórek rakowych, rekrutację komórek zapalnych w miejsce guza, angiogenezę oraz przerzutowanie [11, 12]. Istnieje pilna potrzeba określenia najbardziej optymalnego biomarkera, który będzie miernikiem predykcji rokowania i odpowiedzi chorych na stosowane leczenie.

Cel pracy

Celem pracy była próba oceny ekspresji surwiwiny, SDF-1 i CXCR-4 na komórkach nowotworowych raka jajnika, a następnie skorelowanie uzyskanych wyników z danymi kliniczno-patologicznymi.

Materiał i metodyka

Tkanki.

Materiał do badań stanowiły próbki pierwotnych nabłonkowych nowotworów złośliwych jajnika pobrane od 82 chorych, które poddane zostały cytoredukcji w latach 1999-2005.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę lokalnej Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Charakterystyka kliniczna (wiek, stadium zaawansowania FIGO, *grading*, histopatologia oraz wywiad rodzinny, a także *follow-up*) uzyskano na podstawie historii chorób. Rozpoznanie histopatologiczne i stopień dojrzałości histologicznej guza (*grading*) oceniono według kryteriów WHO i potwierdzono oceną H+E. Stopień zaawansowania klinicznego nowotworu (I-IV) oceniono zgodnie z wytycznymi FIGO.

Immunohistochemia (IHC).

Wycinki z guzów zostały utrwalone w roztworze 10% zbuforowanej formaliny, odwodnione a następnie zatopione w parafinie. Wszystkie reakcje immunohistochemiczne dla każdego z badanych antygenów zostały przeprowadzone na skrawkach parafinowych o grubości 4µm. Do badań użyto następujących przeciwciał pierwszorzędowych: mysie anti-CXCR4 (Invitrogen, USA), mysie anti-surwiwina (DAKO, Denmark) i królicze anti-SDF-1 (Santa Cruz, USA).

W skrócie: odparafinowywanie skrawków oraz odkrywanie antygenów przeprowadzono w Dako PT Link w buforze o wysokim pH (9,0) w temp 97°C przez 20min. Następnie skrawki przepłukano w buforze TBS i inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem w Dako Autostainer Link48 przez 20min. w temp. pokojowej. Do wizualizacji badanych antygenów użyto zestawu odczynników Envison FLEX i poddano barwieniu kontrastującemu hematoksylina zgodnie z zaleceniami producenta. Reakcję z CXCR4 wzmocniono dodatkowo używając FLEX Linker Mouse. Reakcje IHC zostały przeprowadzone z kontrolą negatywną. Wszystkie urządzenia oraz odczynniki poza pierwszorzędowymi przeciwciałami pochodziły z DakoCytomation, (Danemark). Reakcje immunohistochemiczne oceniano pod mikroskopem świetlnym BX-42 (Olympus, Japan).

Do oceny nasilenia ekspresji SDF-1, CXCR4 zastosowano półilościową metodę IRS wg Remmele [13], w której brano pod uwagę intensywność reakcji barwnej oraz odsetek pozytywnych komórek nowotworowych w preparacie. Skala ta ma zakres 0-12 punktów: 0 – brak reakcji; 1-2 – słaba reakcja; 3-4 – umiarkowana silna reakcja; 6-12 – silna reakcja.

Nasilenie ekspresji surwiwiny w komórkach nowotworowych było ocenione przy użyciu siatki mikrometrycznej o wymiarach 10x10mm (100mm²) (Olympus, Japan) pod 400x powiększeniem, gdzie zliczano ilość pozytywnych komórek do całkowitej ilości komórek nowotworowych.

Tabela I. Kliniczno-patologiczna charakterystyka pacjentek ujętych w badaniu. Pacjentki włączone w badania nie były poddane chemioterapii przed zabiegiem chirurgicznym; bd-brak danych.

Charakterystyka	Pacjentki (n=82)
Wiek	
Zakres	49-75
Średnia	49
Dojrzałość guza	
G1	17
G2	33
G3	24
bd	8
FIGO	
I	10
II	10
III	59
IV	3
Histopatologia	
Serosum	41
Endometrioides	9
Clear cell	3
Mucinosum	6
Solidum	15
Borderline	1
Inne	7

Analiza statystyczna.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica. Skorelowano dane dotyczące ekspresji badanych antygenów z danymi klinicznymi i histopatologicznymi (wiek chorych, FIGO, ilość wznów, czas do pojawienia się pierwszej wznowy, czas przeżyć chorych, *grading* i rozpoznanie histopatologiczne). Dane w badaniu zostały wyrażone za pomocą średnich i odchylenia standardowego dla rozkładu normalnego lub za pomocą mediany i zakresu. W zależności od normalności rozkładu i porównywanych parametrów stosowano testy t-Studenta, ANOVA, Kruskala-Wallisa. Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$ wskazujący na obecność istotnych statystycznie różnic lub zależności pomiędzy badanymi grupami.

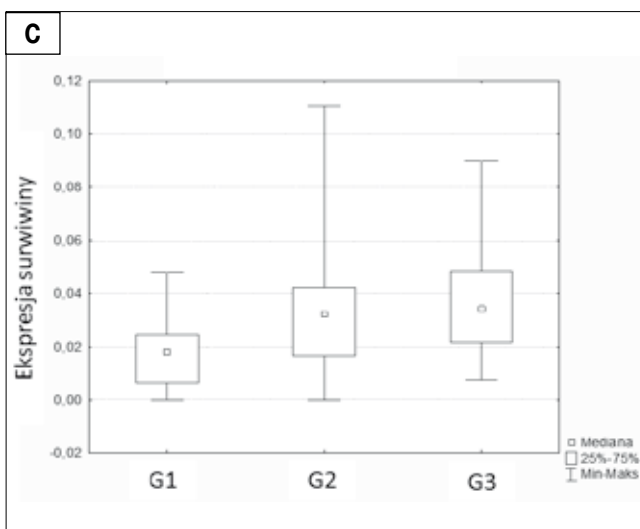
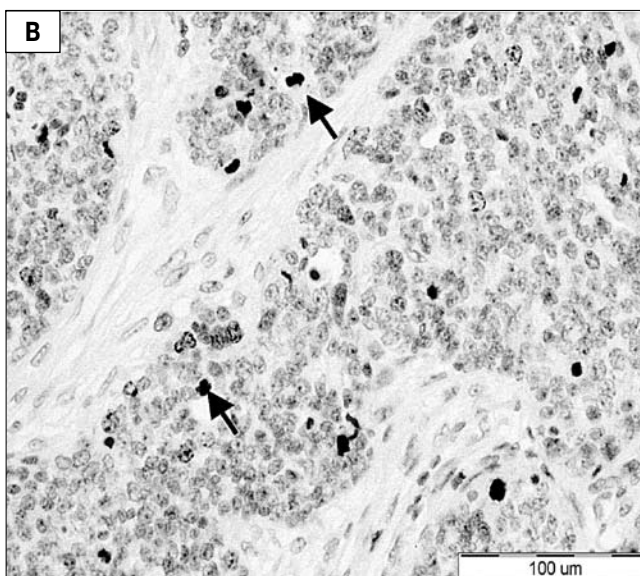
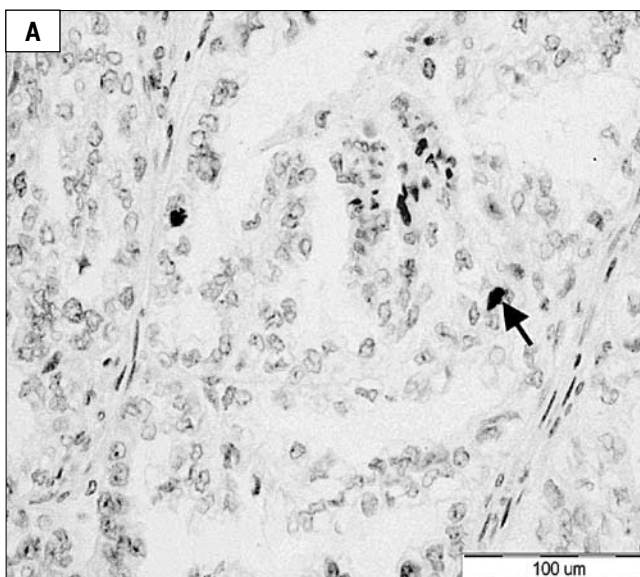
Wyniki

Charakterystyka chorych.

Grupę badaną stanowiły 82 chore w wieku od 23 do 79 lat (średnia wieku 49 lat) leczone z powodu pierwotnych nabłonkowych nowotworów złośliwych jajnika w różnym stopniu dojrzałości histologicznej (G1-G3) i zaawansowania klinicznego (FIGO I-IV). Zbiorczą charakterystykę chorych przedstawiono w tabeli I.

Ekspresja surwiwiny koreluje ze stopniem dojrzałości histologicznej guza.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono jądrową ekspresję surwiwiny we wszystkich badanych przypadkach (100%). Obecność białka SDF-1 wykazano w 79/82 (96%) przypadków. SDF-1 wykazywało ekspresję w jądrach komórkowych i w cytoplazmie.



Rycina 1. Ekspresja surwiwiny w jądrach komórkowych komórek raka jajnika. **A** – Pojedyncze dodatnie komórki nowotworowe (strzałka) w raku G1; **B** – Wiele dodatnich komórek nowotworowych wykazujących ekspresję surwiwiny; **C** – Wykres zależności ekspresji surwiwiny w zależności od stopnia dojrzałości histologicznej guza (G1-G3) ($p < 0,05$).

Wykazano również ekspresję cytoplazmatyczną CXCR-4 w 80/82 (97%) przypadków. Uzyskane wyniki ekspresji na komórkach nowotworowych skorelowano z danymi klinicznymi i histopatologicznymi. Wykazano istotnie statystyczną ($p < 0,05$) korelację pomiędzy ekspresją surwiwiny a stopniem dojrzałości histologicznej guza. (Rycina 1).

Nie stwierdzono istotnej korelacji pomiędzy ekspresją SDF-1 i CXCR-4 na komórkach nowotworowych z danymi kliniczno-patologicznymi.

Dyskusja

Badania immunohistochemiczne nad antygenami ulegającymi ekspresji na komórkach nowotworowych raka jajnika przyczyniają się do odkrycia nowych biomarkerów. Biomarker może określić predykcję prognozowania u chorych poddanych leczeniu chirurgicznemu i chemioterapii. W naszych badaniach podjęliśmy próbę korelacji ekspresji trzech markerów surwiwiny, CXCR-4 i SDF-1 z danymi kliniczno-patologicznymi.

SDF-1 jest niewielką cytokiną zbudowaną z 68 aminokwasów, o wadze 8kDa. Po raz pierwszy została sklonowana przez Tashiro i pierwotnie zidentyfikowana jako czynnik wzrostu dla progenitorowych komórek B, czynnik chemotaktyczny dla komórek T i monocytów oraz czynnik biorący udział w limfopoezie i mielopoezie [8]. Głównym receptorem SDF-1 jest CXCR-4. Fizjologicznie SDF-1 ulega ekspresji na wielu różnych narządach, na przykład w sercu, wątrobie, mózgu, nerkach, mięśniach szkieletowych. Ekspresję SDF-1 i CXCR-4 wykazano również w licznych nowotworach złośliwych, w tym w raku jajnika [7, 9, 10, 12]. W szeregu guzów wykazano również, że nadekspresja tego białka w tkance nowotworowej jest złym czynnikiem prognostycznym. Jiang et al. przeprowadzili badania na liniach komórkowych raka jajnika i wykazali, że CXCL12 i jego receptor CXCR-4 promują proliferację, migrację i inwazję komórek nowotworowych oraz że wzmagają sekrecję cytokin VEGF-1 i integrin beta-1, które wzmagają neoangiogenezę, adhezję, proliferację i inwazję komórek nowotworowych [11, 14].

W naszych badaniach nie wykazaliśmy istotnych korelacji pomiędzy ekspresją SDF-1/CXCR-4 i danymi histopatologicznymi i obserwacją chorych po leczeniu (*follow-up*). Aby określić czy badane antygeny mogą być uznane za biomarker raków jajnika potrzebne są badania na większej grupie chorych.

Wnioski

Ekspresja surwiwiny koreluje ze stopniem dojrzałości histologicznej raka jajnika. Aby określić czy SDF-1 i CXCR-4 mogą być uznane za biomarker raków jajnika potrzebne są badania na większej grupie chorych.

Piśmiennictwo

1. Greenlee R, Hill-Harmon M, Murray T, [et al.]. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin.* 2001, 51, 15-36.
2. Didkowska J, Wojciechowska U, Tarkowski W. *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2004*. Warszawa: Centrum Onkologii. 2006.
3. Lee Y, Park N. Prognostic value and clinicopathological significance of p53 and PTEN in epithelial ovarian cancers. *Gynecol Oncol.* 2009, 112, 475-480.
4. Gonda T, Tu S, Wang T. Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell Cycle.* 2009, 8, 2005-2013.
5. Shan W, Liu J. Inflammation: a hidden path to breaking the spell of ovarian cancer. *Cell Cycle.* 2009, 8, 3107-3111.
6. Nolen B, Lokshin A. Targeting CCL11 in the treatment of ovarian cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2010, 14, 157-167.
7. Kryczek I, Wei S, Keller E, [et al.]. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007, 292, C987-995.
8. Tashiro K, Tada H, Heiker R, [et al.]. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science.* 1993, 261, 600-603.
9. Scotton C, Wilson J, Scott K, [et al.]. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 2002, 62, 5930-5938.
10. Scotton C, Wilson J, Milliken D, [et al.]. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Res.* 2001, 61, 4961-4965.
11. Jiang Y, Wu X, Shi B, [et al.]. Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression. *Gynecol Oncol.* 2006, 103, 226-233.
12. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, [et al.]. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med.* 2001, 7, 1339-1346.
13. Remmele W, Stegner H. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe.* 1987, 8, 138-140. German.
14. Jiang Y, Wu X, Xing H, [et al.]. Role of CXCL12 in metastasis of human ovarian cancer. *Chin Med J (Engl).* 2007, 120, 1251-1255.

Badania zostały sfinansowane z grantu MNiSW nr N407 049 32/2064.