

Fosforylaza tymidynowa jako płytkopochodny czynnik wzrostowy komórek śródbłonna raka endometrium

The thymidine phosphorylase as the platelet-derived endothelial cell growth factor of endometrial cancer

Kubiak Robert¹, Miszczak-Zaborska Elżbieta², Smolarek Monika²,
Wójcik-Krowiranda Katarzyna³, Bartkowiak Jacek²

¹ Zakład Patologii Nowotworów, Katedra Onkologii UM w Łodzi

² Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Biochemii Medycznej w Łodzi

³ I Klinika Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej UM w Łodzi

Streszczenie

Cel pracy: Celem pracy była ocena korelacji pomiędzy aktywnością fosforylasy tymidynowej (TP) a ekspresją płytkopochodnego czynnika wzrostowego komórek śródbłonna (PD-ECGF) w raku endometrium.

Materiały i metody: Do badań zakwalifikowano 40 pacjentek z rakiem endometrium, którym pobrano wycinki z guzów operowanych w I Klinice Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej UM w Łodzi. Kontrolę stanowiły wycinki z endometrium pobrane od 15 kobiet poddanych zabiegowi usunięcia macicy z przyczyn nieonkologicznych.

Aktywność TP oznaczano w cytozolu metodą spektrofotometryczną, a ekspresję PD-ECGF w tych samych guzach metodą immunohistochemiczną. Otrzymaną aktywność TP porównywano z gęstością mikronaczyń (MD) mierzoną immunohistochemicznie oraz ze stopniem dojrzałości histopatologicznej i stopniem zaawansowania klinicznego wg FIGO.

Wyniki: Aktywność cytozolowa TP była statystycznie skorelowana z ekspresją PD-ECGF w raku endometrium. Ponadto stwierdzono statystycznie wyższą aktywność cytozolową TP w raku endometrium niż w prawidłowym endometrium, w którym nie zależała od fazy cyklu miesięczkowego kobiet. W raku endometrium aktywność ta była skorelowana z gęstością mikronaczyń w guzie, a nie zależała od stopnia dojrzałości histopatologicznej i stopnia zaawansowania klinicznego wg FIGO.

Wnioski: TP wydaje się być aktywną formą czynnika wzrostowego PD-ECGF w raku endometrium, co jest zgodne z danymi literaturowymi utożsamiającymi TP z PD-ECGF w innych guzach oraz z badaniami własnymi ukazującymi skorelowanie aktywności TP w cytozolu z ekspresją PD-ECGF i z angiogenezą. Odpowiednie modulowanie tej aktywności może być wykorzystane w terapiach stosowanych po operacji.

Słowa kluczowe: **fosforylaza tymidynowa / płytkopochodny czynnik wzrostowy komórek śródbłonna / nowotwory endometrium /**

Adres do korespondencji:

Robert Kubiak,
Zakład Patologii Nowotworów Katedry Onkologii UM Łódź,
92-145 Łódź, ul. Paderewskiego 4
tel 042 6895781; e-mail: kubiak.ro@gmail.com

Otrzymano: 28.06.2008
Zaakceptowano do druku: 27.07.2009

Abstract

Objectives: The aim of the study was to assess the correlation between the activity of thymidine phosphorylase (TP) and the platelet derived-endothelial cell growth factor (PD-ECGF) expression in endometrial carcinoma.

Methods: The study group consisted of 40 tissue samples taken from patients with endometrial carcinoma, who underwent surgery in First Clinic of Gynecology and Oncologic Gynecology of Medical University in Lodz. The control tissue samples were taken from patients who were operated on for non-oncologic reason.

The activity of TP was measured by the spectrophotometric method in the cytosol of tumor cells, and the immunohistochemical staining of PD-ECGF was performed in the same tumors.

The results of TP activity were compared with the microvessel density (MD) assessed by immunohistochemical analysis and with clinico-pathological features like tumor grade and FIGO stage.

Result: A positive correlation between the enzyme activity and expression of TP/PD-ECGF protein was found. Moreover, a significantly higher TP activity was confirmed in malignant tumors from endometrial cancer patients when compared to the controls.

A positive correlation between the enzyme activity and MD was also stated, but there was no connection to the grade of tumors and FIGO stage.

Since the TP activity proved to be related to PD-ECGF expression and angiogenesis, we can state that TP seems to be an active form of PD-ECGF growth factor in endometrial carcinoma. This is in agreement with the results of many publications on other malignancies. The proper modulation of this activity may be useful in adjuvant therapies.

Key words: **thymidine phosphorylase / platelet derived-endothelial cell growth factor / endometrial neoplasms /**

Wnioski

Rak błony śluzowej trzonu macicy zajmuje w Polsce piąte miejsce wśród zachorowań na nowotwory (11,8%) i jest najczęściej rozpoznawanym rakiem narządu rodnych kobiet po sześćdziesiątym roku życia. Zachorowalność na niego stale wzrasta. Obserwuje się również zwiększającą liczbę młodych kobiet w okresie reprodukcyjnym zapadających na tę chorobę [1].

Fosforylaza tymidynowa (TP) katalizuje odwracalną fosforolizę tymidyny do tyminy i 2-deoksyrybozylo-1-fosforanu [2]. W cytozolu komórek ssaków TP odgrywa ważną rolę w degradacji nukleozydów oraz w procesie odzyskiwania pirymidyn. Mechanizm tego procesu jest od lat wykorzystywany w chemioterapii opartej na pochodnych fluoropirymidynowe. Z tego względu, nadal poszukiwane są skuteczne aktywatory enzymu [3, 4].

W 1987 roku wyizolowano z płytek krwi proteinę, która okazała się klasycznym czynnikiem wzrostu. Została nazwana płytkopochodnym czynnikiem wzrostowym komórek śródbłonna (PD-ECGF), ponieważ poprzez związanie się ze swoistymi receptorami komórkowymi wykazywała czynność angiogenną [5]. W 1989 roku PD-ECGF został oczyszczony z ludzkich płytek krwi [6]. Okazało się, że PD-ECGF ma zdolność stymulacji biosyntezy DNA, wzrostu komórkowego oraz chemotaksji komórek śródbłonna *in vitro* oraz angiogenezy *in vivo* [6].

W połowie lat dziewięćdziesiątych wzrosło zainteresowanie TP, gdyż zaczęto ją identyfikować z PD-ECGF [7-10]. Badania wykazały, że aktywność TP, ekspresja PD-ECGF, czy ekspresja genu PD-ECGF w guzach może być wyższa niż w tkankach prawidłowych [11-16], a może też być zlokalizowana poza nowotworem, w makrofagach naciekających, czy komórkach zrębowych guza [15,17-19]. Wyższa ekspresja czynnika wzrostowego PD-ECGF koreluje z bardziej intensywnym tworzeniem nowych naczyń, większą agresywnością guza i krótszym czasem przeżycia chorych [15, 20, 21]. Gdy badano enzym TP, to stwierdzono, że wysoka aktywność TP promuje proliferację komórek śródbłonkowych przez redukcję stężenia tymidyny [22] i że produkt

degradacji tymidyny, 2'-deoksyryboza, posiada angiogenną i chemotaktyczną aktywność [4]. Jak wynika z nowszych badań, w tkance nowotworowej TP jest aktywowana przez chemiczny i fizyczny stres [23]. Indukcja ta chroni komórki guza przed apoptozą i pomaga przetrwać niekorzystne warunki, poprzez zwiększenie metabolizmu nukleozydowego oraz angiogenezy [24]. Z tego względu, poszukiwane są skuteczne inhibitory enzymu.

Cel pracy

Opinia, że czynnik wzrostowy PD-ECGF promuje neoangiogenezę zyskuje poparcie, jednak precyzyjny mechanizm jego działania pozostaje niejasny [25]. Sądzi się, że PD-ECGF posiada aktywność TP i dlatego prowadzone są obecnie badania aktywności TP w różnorodnych tkankach nowotworowych i prawidłowych, w powiązaniu z wielorakimi czynnikami, celem szukania współzależności między nimi.

Na podstawie badań immunohistochemicznych stwierdzono, że ekspresja PD-ECGF w raku *endometrium* jest wyższa niż w prawidłowym *endometrium* i może korelować z gęstością mikronaczyń (*microvessel density* – MD) [26, 27], natomiast badań aktywności TP i jej korelacji z MD w raku *endometrium* do tej pory nie prowadzono. Biorąc pod uwagę powyższe, celem pracy była ocena aktywności enzymu TP w cytozolu komórek *endometrium* prawidłowego i nowotworowego oraz skorelowanie tej aktywności z ekspresją PD-ECGF i z gęstością mikronaczyń w guzie w powiązaniu ze stopniem zaawansowania klinicznego wg FIGO oraz stopniem zróżnicowania histopatologicznego raka *endometrium*.

Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły około 2 gramowe wycinki z guzów *endometrium*, pobrane w trakcie zabiegu od 40 pacjentek w wieku pomenopauzalnym leczonych chirurgicznie z powodu raka *endometrium* w I Klinice Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej UM w Łodzi o stopniu zaawansowania klinicznego wg

Fosforylaza tymidynowa jako płytkopochodny czynnik wzrostowy komórek śródblonka raka *endometrium*.

FIGO (FIGO I, n = 26; FIGO II, n = 7; FIGO III, n = 7) i stopniu zróżnicowania histopatologicznego (G-1, n = 17; G-2, n = 17; G-3, n = 6). Kontrolę stanowiły próbki *endometrium* pobrane od 15 kobiet w wieku przedmenopauzalnym poddanych zabiegowi ginekologicznemu w związku z nieonkologicznymi schorzeniami. Podczas operacji 6 z nich znajdowało się w fazie lutealnej, 9 w fazie folikularnej cyklu miesięczkowego.

Po pobraniu, wycinki tkanki (guza lub odwarstwionego *endometrium* w przypadku zmian nienowotworowych) zamrażano w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w zamrażarce niskotemperaturowej (-80° C).

Rozpoznanie histopatologiczne

Fragmety tkankowe po uprzednim utrwaleniu w 10% formalinie były zatapiane w parafinie, a następnie z blozków parafinowych wykonywane były skrawki, które barwiono hematoksyliną i eozyną. Rozpoznanie histopatologiczne ustalane były na podstawie kryteriów WHO bezpośrednio po zabiegu operacyjnym w I Klinice Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej UM. Dla celów pracy preparaty były ponownie przejrzane w Zakładzie Patologii Nowotworów Katedry Onkologii UM w Łodzi.

Badanie gęstości mikronaczyń metodą immunohistochemiczną

W tym celu stosowano mysie monoklonalne przeciwciała CD31 firmy Dako w rozcieńczeniu 1:50, z wcześniejszym przygotowaniem w kuchence mikrofalowej (2x10 min. 360 W) w buforze cytrynowym o pH6.0. Inkubacja z przeciwciałem trwała 1,5 godziny. Po zakończeniu barwienia preparaty dobarwiano hematoksyliną a efekt barwny uzyskiwano za pomocą diaminobenzydyny. Kontrolę negatywną stanowiły przypadki barwione identycznie, jednak z pominięciem przeciwciała pierwszej fazy.

Przeciwciała CD31 jest stosunkowo swoistym i czułym markerem komórek endotelialnych. Przy jego pomocy dokonywano obliczeń gęstości naczyń w guzie. Za pozytywny wynik barwienia uznawano każdą pojedynczą wybarwioną brunatnie komórkę lub grupę komórek bez względu na obecność światła wewnątrz naczyń. Jako wynik MD przyjmuje się średnią ilość naczyń na jedno pole widzenia pod powiększeniem 400x obliczoną z 10 pól.

Badanie ekspresji PD-ECGF metodą immunohistochemiczną

Zastosowano mysie monoklonalne przeciwciała anti-TP firmy NovoCastra (klon P-GF.44C) w rozcieńczeniu 1:30, z wcześniejszym gotowaniem w kuchence mikrofalowej (2x10min. 360W) w buforze cytrynowym o pH 6.0. Inkubacja z przeciwciałem trwała 1/2 godziny. Sposób przygotowania preparatów do barwienia był taki sam jak w przypadku barwienia CD31. (Wykorzystano przeciwciała monoklonalne – CD 31 (klon JC 70) przeciwko PECAM firma Dako, PD-ECGF firma NovoCastra. W obu przypadkach wykorzystano system wywołujący firmy Dako „EnVision HRP System”).

Jako dodatnie przypadki przyjmowano takie, w których stwierdzano powyżej 5% dodatnich komórek w polu widzenia pod dużym powiększeniem (400x). Przyjęto skalę od 0 do 3 wg Fujiwaki i wsp. [26]. Barwiły się głównie cytoplazma, czasem jądra komórek nabłonkowych, oraz część komórek podścieliska, których jednak nie oceniano a jedynie komórki nabłonkowe.

Przygotowanie materiału w postaci frakcji cytozolowej

Materiał zamrożony w postaci wycinków z guzów *endometrium* i prawidłowego *endometrium* rozdrabniano przy 40C i homogenizowano w homogenizatorze Ultra-Turrax firmy Janke-Kunkel w ciągu 1min. w buforze zawierającym 1mM EDTA, 0,02% 2-merkaptoetanol, 2mM fluorek fenylometanosulfonowy (PMSF), 10mM Tris-maleinian (pH6,5), z dodatkiem takiej ilości gliceryny, aby uzyskać jej 10% roztwór. Następnie homogenat wirowano w 100 000 x g przez 1 godzinę w temperaturze 40°C. Frakcję cytozolową w ten sposób otrzymaną zbierano i analizowano w niej aktywność fosforylasy tymidynowej bezpośrednio po wirowaniu.

Oznaczanie aktywności fosforylasy tymidynowej

Aktywność TP oznaczano w cytozolu komórek metodą spektrofotometryczną według metody Yoshimura i wsp. [11], zmodyfikowanej przez Miszczak-Zaborską i wsp.[14] wykorzystującej powstawanie wolnej zasady pirymidynowej w obecności arsenianu w środowisku zasadowym. W tych warunkach, w zakresie promieniowania ultrafioletowego ($\lambda=300$ nm) następuje przesunięcie widma tyminy w stosunku do tymidyny. Mieszanina inkubacyjna w końcowej objętości 0,5ml zawierała 0,1M bufor Tris-arsenowy (pH6,5), 10mM tymidynę, oraz badany preparat cytozolowy. Po godzinnej inkubacji w 37°C reakcja była zatrzymywana przez dodanie 0,5ml 1M NaOH, a powstałą tyminę mierzono poprzez pomiar absorpcji przy długości fali 300nm wobec ślepej próby odczynnikowej i po odjęciu pochłaniania próby, w której reakcja była zatrzymana przez dodanie 0,5ml 1M NaOH przed dodaniem preparatu enzymatycznego. Wartość absorpcji mnożono przez współczynnik, który dla metody spektrofotometrycznej w obecności arsenianu wyniósł 0,3, uzyskując wynik w μ M tyminy (T) w próbce. Współczynnik ten został obliczony na podstawie równania $y = ax + b$, dla $y =$ absorpcja , $x =$ stężenie tyminy po wykreśleniu krzywej wzorcowej zależności absorpcji od stężenia tyminy w μ M w próbce, gdzie ΔA wyniosło 3,3. Aktywność enzymu mierzono bezpośrednio po otrzymaniu cytozolu przy pomocy spektrofotometru firmy Beckman DU 650.

Aktywność właściwa TP została określona w mikromolach uwolnionej tyminy w ciągu jednej godziny reakcji, w temperaturze 37°C przeliczonej na miligram białka. Stężenie białka w materiale oznaczono metodą Bradforda [28].

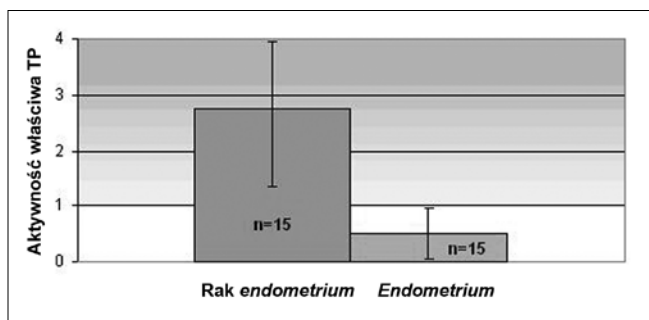
Metody statystyczne

W analizie statystycznej uwzględniono średnią statystyczną, odchylenie standardowe (SD), oraz test t-Studenta. Wartość $p < 0,05$ uznano za istotną. Przy badaniu korelacji zastosowano test istotności współczynnika Pearsona.

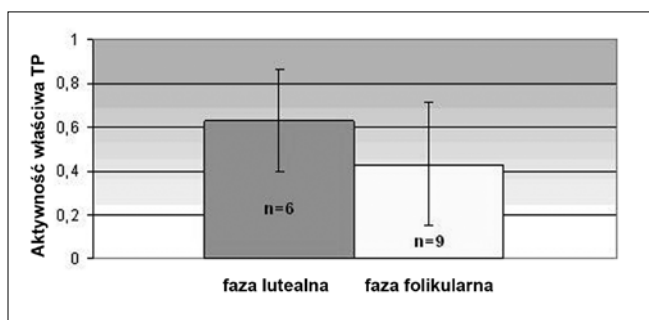
Wyniki

Aktywność właściwa TP oznaczona w cytozolu komórek raka *endometrium* była istotnie statystycznie wyższa niż w *endometrium* prawidłowym ($p < 0,001$). (Rycina 1).

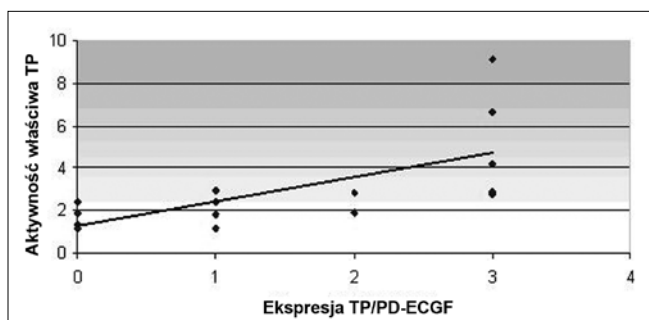
Aktywność właściwa TP oznaczona w *endometrium* uzyskanym od kobiet poddanych zabiegowi związanemu z nieonkologicznymi dolegliwościami znajdujących się w fazie lutealnej, aczkolwiek wyższa niż w *endometrium* kobiet znajdujących się w fazie folikularnej cyklu miesięczkowego, była jednak bez statystycznej istotności, $p > 0,05$ (dla fazy lutealnej aktywność TP wyrażona w μ M tyminy/h/mg białka wynosiła $0,63 \pm 0,23$ natomiast dla fazy folikularnej $0,43 \pm 0,28$).



Rycina 1. Porównanie cytozolowej aktywności właściwej TP w raku *endometrium* (n = 40) i *endometrium* prawidłowym (n = 15), $p < 0,001$.



Rycina 2. Korelacja pomiędzy cytozolową aktywnością właściwą TP badaną metodą spektrofotometryczną a ekspresją PD-ECGF badaną immunohistochemicznie w raku *endometrium* (n = 40, $p < 0,0005$).

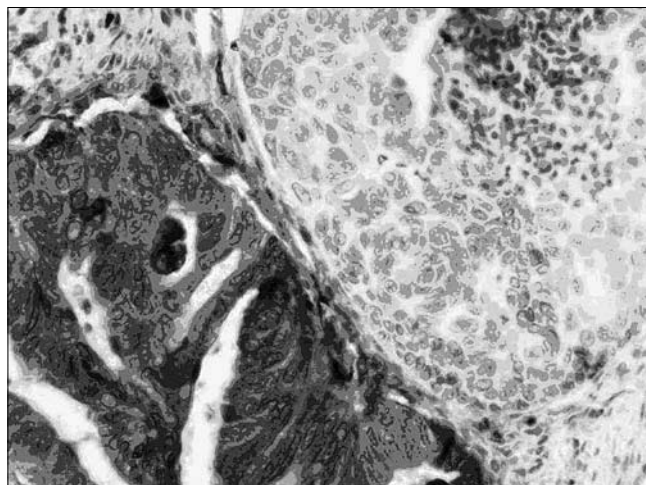


Rycina 3. Silny odczyn immunohistochemiczny przeciwko PDECGF. Zastosowano mysie monoklonalne przeciwciała anti-TP firmy NovoCastra (klon P-GF.44C) W prawym górnym rogu gniazdo raka z metaplastją płaskonabłonkową – brak ekspresji (pow. 200x).

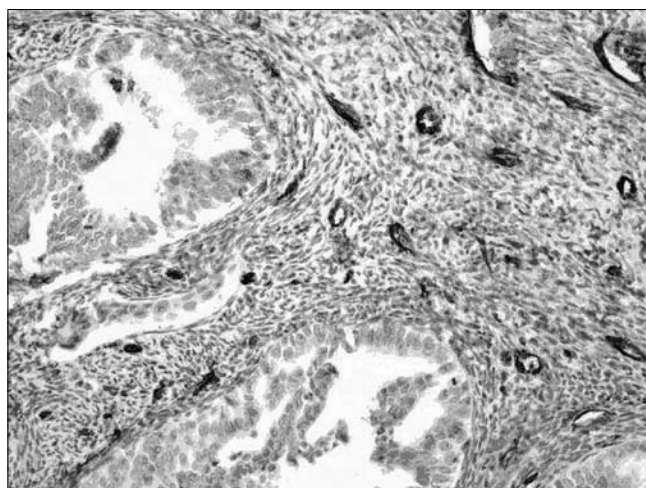
W raku *endometrium* stwierdzono istotną statystycznie korelację pomiędzy aktywnością właściwą TP badaną w cytozolu metodą spektrofotometryczną a ekspresją PD-ECGF badaną immunohistochemicznie ($p < 0,0005$). (Rycina 2).

Silną reakcję barwną z użyciem przeciwciała przeciwko PD-ECGF obejmującą zarówno cytoplazmę jak i jądra komórek raka endometrialnego przedstawiono na rycinie 3. Widoczne jest gniazdo raka z metaplastją płaskonabłonkową pozbawione dodatniej ekspresji.

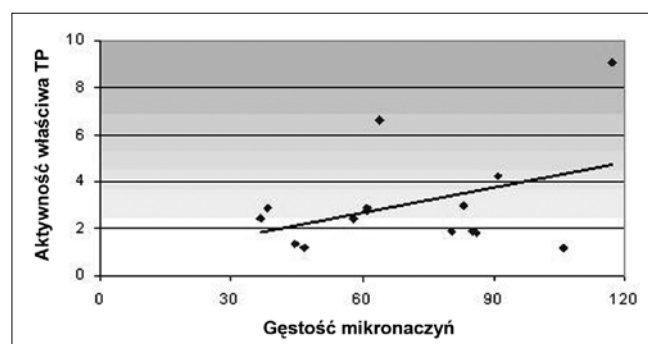
Odczyn immunohistochemiczny z użyciem przeciwciała CD31 ujawniający komórki śródbłonna naczyń w raku *endometrium* przedstawiono na rycinie 4.



Rycina 4. Odczyn immunohistochemiczny z użyciem przeciwciała CD31 ujawniający komórki śródbłonna naczyń. Zastosowano mysie monoklonalne przeciwciała CD31 firmy Dako (pow. 100x).



Rycina 5. Korelacja pomiędzy cytozolową aktywnością właściwą TP badaną metodą spektrofotometryczną a gęstością mikronaczyń badaną immunohistochemicznie w raku *endometrium* (n = 40; $p < 0,001$).



Rycina 6. Cytozolowa aktywność właściwa TP w raku *endometrium* o różnym stopniu zaawansowania choroby. (FIGO I, n = 26; FIGO II, n = 7; FIGO III, n = 7; $p > 0,05$).

Stwierdzono istotną statystycznie korelację pomiędzy aktywnością właściwą TP badaną spektrofotometrycznie w cytozolu a gęstością mikronaczyń badaną immunohistochemicznie ($p < 0,001$). (Rycina 5).

Fosforylaza tymidynowa jako płytkopochodny czynnik wzrostowy komórek śródblonka raka *endometrium*.

Tabela I. Cytozolowa aktywność właściwa TP w mikromolach T x mg białka⁻¹ x h⁻¹ w zależności od stopnia zróżnicowania histopatologicznego raka *endometrium*.

Stopień zróżnicowania histopatologicznego	Średnia	SD	P
G-1, n = 17	2,3	1,9	P >0,05
G-2, n = 17	3,4	2,1	
G-3, n = 6	2,6	1,1	

Nie stwierdzono natomiast istotnej statystycznie korelacji między cytozolową aktywnością właściwą enzymu w raku a stopniem zaawansowania klinicznego wg FIGO i stopniem zróżnicowania histopatologicznego ($p > 0,05$). (Rycina 6, tabela I).

Dyskusja

Z danych literaturowych wynika, że aktywność TP była wyższa w niektórych tkankach nowotworowych niż w odpowiadających im tkankach prawidłowych [11, 12, 15, 21]. Dane uzyskane wcześniej w naszym laboratorium potwierdziły te doniesienia dla raka sutka i raka jajnika [13, 14], ale nie dla mięśniaka macicy [16]. Wysoka aktywność TP w guzach bywa wykorzystywana w leczeniu pacjentów pochodnymi fluoropirymidynowymi, w metabolizmie których enzym ten bierze udział [3,4], ale w guzach wątroby oraz tarczycy na przykład nie stwierdzono znaczących różnic między aktywnością TP w tkance prawidłowej i nowotworowej [12]. W prezentowanej pracy stwierdziliśmy, iż aktywność właściwa TP mierzona spektrofotometrycznie w cytozolu komórek zmienionego nowotworowo *endometrium* była statystycznie istotnie wyższa niż w *endometrium* niezmienionym nowotworowo, co jest zgodne z danymi uzyskanymi przez Suzuki i wsp. dla fosforylasy pirymidynowej badanej spektrofotometrycznie w cytozolu prawidłowym i nowotworowym tkanek macicy [29]. Wysoka aktywność TP może być więc wykorzystana obok chemioterapii [3, 4, 30] w radioterapii, co zostało opisane w pracy Tominoga i wsp. czy Nakashima i wsp. [31, 32].

Ekspresję czynnika wzrostowego PD-ECGF w *endometrium* niezmienionym nowotworowo podczas przebiegu cyklu menstruacyjnego kobiety badali Fujimoto i wsp. i stwierdzili, że ekspresja PD-ECGF była wyższa w fazie lutealnej w porównaniu z fazą folikularną cyklu [33]. Badania przeprowadzone przez Zhang'a i wsp. wykazały wyższą ekspresję PD-ECGF w komórkach nabłonka wydzielniczego w późnej fazie lutealnej i menstruacyjnej, natomiast niższą w fazie proliferacyjnej *endometrium*. Badania przeprowadzone przez Abbas i wsp. w 2004 roku potwierdziły wcześniejsze doniesienia [34, 35]. W naszej pracy dla fazy lutealnej aktywność TP wyrażona w μM tyminy/h/mg białka była również wyższa, bo wynosiła $0,63 \pm 0,23$ natomiast dla fazy folikularnej niższa, bo wynosiła $0,43 \pm 0,28$. Nie była to jednak różnica statystycznie znamienne. Trzeba nadmienić, że badania te nie były głównym celem naszej obecnej pracy i zbyt mała liczba przypadków, która stanowiła dostępną kontrolę, nie pozwala nam na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków.

Stwierdziliśmy natomiast w prezentowanej pracy, że ekspresja PD-ECGF mierzona immunohistochemicznie była istotnie statystycznie skorelowana z cytozolową aktywnością TP mierzoną spektrofotometrycznie w tych samych guzach *endometrium*. Podobną korelację ujawnili Takebayashi i wsp. również dla guzów litych [12].

W 1993 roku Akiyama i wsp. przeprowadzili badania, w których częściowe komplementarne DNA enzymu TP (cDNA) otrzymanego z ludzkiego łożyska zostało sklonowane przy pomocy reakcji PCR. Zbadana została sekwencja nukleotydowa najdłuższego klonu (288 par zasad) [36]. Okazało się, że sekwencja ta była w 100% identyczna z sekwencją PD-ECGF reszty 149- 244 [36]. PD-ECGF wykazał strukturalne i biochemiczne podobieństwo z TP, której aktywność enzymatyczną mierzono radiochemicznie [8]. Stwierdzono, że PD-ECGF i TP były produktami tego samego genu, oraz tą samą jednostką transkrypcyjną [7]. Porównana została także masa molekularna ludzkiego oczyszczonego białka TP oraz rekombinantu PD-ECGF: (rPD-ECGF). Wynosiły one odpowiednio 55kDa dla TP i 52 kDa dla PD-ECGF. Mniejsza masa cząsteczkowa PD-ECGF wynikała z tego, iż przy N-terminalnym końcu polipeptydu PD-ECGF występowało o 10 aminokwasów mniej [9]. Dowiedziono również, że przeciwciała anti-PD-ECGF miały zdolność rozpoznawania TP, natomiast przeciwciała anti-TP rozpoznawały rPD-ECGF [7, 36]. Dotychczas jednak cały skład aminokwasowy cząsteczki TP nie został ustalony. Korelacja cytozolowej aktywności TP z ekspresją PD-ECGF, którą stwierdziliśmy w prezentowanej pracy wydaje się jednak potwierdzać pogląd, że PD-ECGF jest białkową, nieaktywną formą TP.

W raku *endometrium* po raz pierwszy w 1998 roku Fujiwaki i wsp. [26] odważyli się nazwać badaną przez siebie ekspresję PD-ECGF immunohistochemiczną ekspresją TP, którą zaobserwowali w badanych 41% guzów. Stwierdzili oni również znaczną korelację między ekspresją TP a MD, a jako że w raku *endometrium* uważa się wysoką gęstość mikronaczyń za niezależny czynnik prognostyczny [38-40], więc na tej podstawie wyciągnęli również wniosek, że i TP może pełnić ważną rolę w angiogenezie [26]. Wyniki te były zgodne z uzyskanymi dla ekspresji TP w raku jelita grubego, sutka, płuc oraz żołądka [43,44,45,46]. W prezentowanej pracy zbadano korelację między cytozolową aktywnością TP a MD. Aktywność enzymu była dodatkowo skorelowana z MD i dlatego wydaje się również, że aktywność ta może pełnić ważną rolę w angiogenezie potwierdzając jednocześnie pogląd, że PD-ECGF jest białkową, nieaktywną formą TP.

Głównym celem Sivridis i wsp. było zbadanie ekspresji i dystrybucji TP w raku *endometrium*, którą stwierdzono immunohistochemicznie w komórkach nowotworowych, zrębowych fibroblastach i makrofagach oraz w komórkach mięśniówki gładkiej. Badania te wykazały, że białko TP było produkowane i uwalniane przez komórki nowotworowe, a w odpowiedzi na wzrost guza oraz zwiększanie się jego inwazyjności było uwalniane bardziej wydajnie przez zrębowe fibroblasty i komórki mięśniówki *endometrium*. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stopniem zaawansowania klinicznego wg FIGO, a ekspresją białka TP, natomiast zauważono zależność tej ekspresji od stopnia złośliwości histologicznej raka *endometrium* [17]. W prezentowanej pracy w ocenie ekspresji białka PD-ECGF barwiły się głównie cytoplazma, czasem jądra komórek nabłonkowych, oraz część komórek podścieliska. Nie stwierdziliśmy istotnej statystycznie korelacji między cytozolową aktywnością TP a stopniem zróżnicowania

histopatologicznego raka i stopniem zaawansowania klinicznego wg FIGO, choć aktywność TP w FIGO I była wyższa niż w FIGO II i FIGO III. Fox i wsp., Gasparini i wsp. wykryli również, że procesy neoangiogenezy odgrywały zasadniczą rolę w początkowych stadiach tworzenia raka sutka, którym towarzyszyła wysoka ekspresja PD-ECGF/TP [45, 46]. Suzuki i wsp. nie stwierdzili znaczącej korelacji pomiędzy cytozolem aktywnością enzymu a stopniem zaawansowania klinicznego i stopniem zróżnicowania histopatologicznego raka *endometrium*, a Mazurek i wsp. [27, 47] pomiędzy ekspresją białka TP a podanymi wyżej parametrami w tym raku. Nasze wyniki otrzymane spektrofotometrycznie dla cytozolowej aktywności TP potwierdziły te otrzymane przez Suzuki i wsp. i immunohistochemicznie dla ekspresji białka TP przez Mazurka i wsp. sugerując jednocześnie, że aktywność TP odpowiada białku PD-ECGF w raku *endometrium* [27, 47].

Mechanizm działania TP na angiogenezę pozostaje do końca niewyjaśniony, choć wg nowszej teorii Browna i wsp. 2-deoxy-D-ryboza, produkt działania enzymatycznego TP, wywoływała komórkowy stres oksydacyjny, co generowało powstawanie wolnych rodników i promowało wydzielanie czynników angiogenicznych, więc szukanie inhibitorów tej aktywności enzymatycznej wydaje się być nadal uzasadnione [23].

Wnioski

TP wydaje się być aktywną formą czynnika wzrostowego PD-ECGF w raku *endometrium*, co jest zgodne z danymi literaturowymi utożsamiającymi TP z PD-ECGF w innych guzach oraz z badaniami własnymi ukazującymi skorelowanie aktywności TP w cytozolu z ekspresją PD-ECGF i z angiogenezą. Odpowiednie modulowanie tej aktywności może być wykorzystane w terapiach stosowanych po operacji.

Praca została wykonana w ramach grantu KBN 4 T09B 038 22

Piśmiennictwo

- Jesionek-Kupnicka D, Bierkiewicz A. Onkologia. Podręcznik dla studentów i lekarzy. Gdańsk: Medical Press, 2004.
- Itzsch M, el Kouni M, Cha S. Kinetic studies of thymidine phosphorylase from mouse liver. *Biochemistry*. 1985, 24, 6799-6807.
- Ackland S, Peters G. Thymidine phosphorylase: its role in sensitivity and resistance to anticancer drugs. *Drug Resist Updat*. 1999, 2, 205-214.
- Focher F, Spadari S. Thymidine phosphorylase: a two-face Janus in anticancer chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2001, 1, 141-153.
- Miyazono K, Heldin C. High-yield purification of platelet-derived endothelial cell growth factor: structural characterization and establishment of a specific antiserum. *Biochemistry*. 1989, 28, 1704-1710.
- Miyazono K, Okabe T, Urabe A, [et al.]. Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets. *J Biol Chem*. 1987, 262, 4098-4103.
- Sumizawa T, Furukawa T, Haraguchi M, [et al.]. Thymidine phosphorylase activity associated with platelet-derived endothelial cell growth factor. *J Biochem*. 1993, 114, 9-14.
- Moghaddam A, Bicknell R. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in *Escherichia coli* and confirmation of its thymidine phosphorylase activity. *Biochemistry*. 1992, 31, 12141-12146.
- Usuki K, Gonez L, Wernstedt C, [et al.]. Structural properties of 3.0 kb and 3.2 kb transcripts encoding platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in A431 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1994, 1222, 411-414.
- Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, [et al.]. Angiogenic activity of enzyme. *Nature*. 1994, 368, 198.
- Yoshimura A, Kuwazuru Y, Furukawa T, [et al.]. Purification and tissue distribution of human thymidine phosphorylase; high expression in lymphocytes, reticulocytes and tumors. *Biochim Biophys Acta*. 1990, 1034, 107-113.
- Takebayashi Y, Yamada K, Miyadera K, [et al.]. The activity and expression of thymidine phosphorylase in human solid tumours. *Eur J Cancer*. 1996, 32A, 1227-1232.
- Kubiak R, Miszczak-Zaborska E, Jesionek-Kupnicka D, [et al.]. The activity of thymidine phosphorylase correlates with tumor size and lymph nodes status in breast carcinoma. *Z Naturforsch C*. 1999, 54, 1096-1102.
- Miszczak-Zaborska E, Wójcik-Krowiranda K, Kubiak R, [et al.]. The activity of thymidine phosphorylase as a new ovarian tumor marker. *Gynecol Oncol*. 2004, 94, 86-92.
- Watanabe Y, Nakai H, Ueda H, [et al.]. Platelet-derived endothelial cell growth factor predicts of progression and recurrence in primary epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett*. 2003, 200, 173-176.
- Miszczak-Zaborska E, Greger J, Wozniak K, [et al.]. The activity of thymidine phosphorylase in the uterine myomas and the myometrium in perimenopausal women. *Z Naturforsch C*. 1997, 52, 850-854.
- Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis M, [et al.]. Thymidine phosphorylase expression in endometrial carcinomas. *Clin Exp Metastasis*. 1999, 17, 445-450.
- Takahashi Y, Bucana C, Liu W, [et al.]. Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: Role of infiltrating cells. *J Natl Cancer Inst*. 1996, 88, 1146-1151.
- Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, [et al.]. Thymidine phosphorylase expression in tumor-infiltrating macrophages may be correlated with poor prognosis in uterine endometrial cancer. *Hum Pathol*. 2002, 33, 1105-1113.
- Saeki T, Takashima S, Hosokawa S, [et al.]. Differential expression of platelet-derived endothelial cell growth factor (thymidine phosphorylase) in nonpolypoid and polypoid lesions of the colon. *Int J Oncol*. 1996, 8, 1105-1111.
- Maeda K, Chung Y, Ogawa Y, [et al.]. Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression associated with hepatic metastasis in gastric carcinoma. *Br J Cancer*. 1996, 73, 884-888.
- Finnis C, Dodsworth N, Pollitt C, [et al.]. Thymidine phosphorylase activity of platelet-derived endothelial cell growth factor is responsible for endothelial cell mitogenicity. *Eur J Biochem*. 1993, 212, 201-210.
- Brown N, Jones A, Fujiyama C, [et al.]. Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes secretion of angiogenic factors. *Cancer Res*. 2000, 60, 6298-6302.
- Toi M, Atiqur Rahman M, Bando H, [et al.]. Thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial-cell growth factor) in cancer biology and treatment. *Lancet Oncol*. 2005, 6, 158-166.
- Ciccolini J, Evrard A, Cuq P. Thymidine phosphorylase and fluoropyrimidines efficacy: a Jekyll and Hyde story. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2004, 4, 71-81.
- Fujiwaki R, Hata K, Iida K, [et al.]. Immunohistochemical expression of thymidine phosphorylase in human endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 1998, 68, 247-252.
- Fujimoto J, Toyoki H, Jahan I, [et al.]. Sex steroid-dependent angiogenesis in uterine endometrial cancers. *J Steroid Biochem. Mol Biol*. 2005, 93, 161-165.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Anal Biochem*. 1976, 72, 248-254.
- Suzuki M, Usui N, Furugen Y, [et al.]. Pyrimidine nucleoside phosphorylase activity in normal tissues of the uterus and ovary and in benign and malignant lesions of these organs. *Int J Clin Oncol*. 2001, 6, 19-24.
- Schwartz E, Baptiste N, Wadler S, [et al.]. Thymidine phosphorylase mediates the sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil. *J Biol Chem*. 1995, 270, 19073-19077.
- Tominaga T, Toi M, Ohashi Y, [et al.]. Prognostic and predictive value of thymidine phosphorylase activity in early-stage breast cancer patients. *Clin Breast Cancer*. 2002, 3, 55-64.
- Nakashima M, Nakano T, Ametani Y, [et al.]. Expression of thymidine phosphorylase as an effect prediction factor for uterine cervical squamous cell carcinoma after radiotherapy: an immunohistochemical study. *Int J Gynecol Cancer*. 2006, 16, 1309-1313.
- Fujimoto J, Ichigo S, Sakaguchi H, [et al.]. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and its mRNA in uterine endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*. 1998, 4, 509-513.
- Zhang L, Mackenzie I, Rees M, [et al.]. Regulation of the expression of the angiogenic enzyme platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in endometrial isolates by ovarian steroids and cytokines. *Endocrinology*. 1997, 138, 4921-4930.
- Abbas M, Evans J, Sykes P, [et al.]. Modulation of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in normal human endometrial stromal cells. *Fertil Steril*. 2004, 82, Suppl 3, 1048-1053.
- Akiyama S. Molecular basis for resistance to anticancer agents and reversal of the resistance. *Hum Cell*. 1993, 6, 1-6.
- Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, [et al.]. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature*. 1989, 338, 557-562.
- Salvesen H, Iversen O, Akslen L. Independent prognostic importance of microvessel density in endometrial carcinoma. *Br J Cancer*. 1998, 77, 1140-1144.
- Wagatsuma S, Konno R, Sato S, [et al.]. Tumor angiogenesis, hepatocyte growth factor, and c-Met expression in endometrial carcinoma. *Cancer*. 1998, 82, 520-530.
- Kaku T, Kamura T, Kinukawa N, [et al.]. Angiogenesis in endometrial carcinoma. *Cancer*. 1997, 80, 741-747.
- Matsumura M, Chiba Y, Lu C, [et al.]. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression correlated with tumor angiogenesis and macrophage infiltration in colorectal cancer. *Cancer Lett*. 1998, 128, 55-63.
- Yonenaga F, Takasaki T, Ohi Y, [et al.]. The expression of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor is correlated to angiogenesis in breast cancer. *Pathol Int*. 1998, 48, 850-856.
- Volm M, Mattern J, Koomagi R. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in non-small cell lung carcinomas: relationship to various biological factors. *Int J Oncol*. 1998, 13, 975-979.
- Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, [et al.]. Tumor angiogenesis and expression of thymidine phosphorylase/platelet derived endothelial cell growth factor in human gastric carcinoma. *Cancer Lett*. 1996, 108, 281-290.
- Fox S, Westwood M, Moghaddam A, [et al.]. The angiogenic factor platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase is up-regulated in breast cancer epithelium and endothelium. *Br J Cancer*. 1996, 73, 275-280.
- Gasparini G, Harris A. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol*. 1995, 13, 765-782.
- Mazurek A, Kuc P, Terlikowski S, [et al.]. Evaluation of tumor angiogenesis and thymidine phosphorylase tissue expression in patients with endometrial cancer. *Neoplasma*. 2006, 53, 242-246.