

Magdalena Myga-Nowak<sup>1</sup>, Joanna Pacholska-Bogalska<sup>2</sup>,  
Wojciech Kwaśniewski<sup>3</sup>, Jan Kotarski<sup>3</sup>, Anna Kwaśniewska<sup>4</sup>,  
Anna Goździcka-Józefiak<sup>2</sup>

Received: 09.06.2011

Accepted: 20.06.2011

Published: 31.07.2011

## Ekspresja receptorów kwasu retinowego (RARs i RXRs) w tkankach raka szyjki macicy HPV(+)

The expression of RARs and RXRs in cervical cancer tissues HPV(+)

Экспрессия рецепторов ретиноевой кислоты (РАРС и РИКСРС) в тканях рака шейки матки (ВПЧ+)

<sup>1</sup> Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie

<sup>2</sup> Zakład Wirusologii Molekularnej Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

<sup>3</sup> Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

<sup>4</sup> Klinika Położnictwa i Patologii Ciąży Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Correspondence to: Anna Kwaśniewska, Klinika Położnictwa i Patologii Ciąży Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Staszica 16, 20-081 Lublin, e-mail: anna.kwasniewska@am.lublin.pl

Source of financing: Department own sources

### Streszczenie

**Wprowadzenie:** Retinoidy są ważnymi czynnikami biorącymi udział w regulacji różnicowania i proliferacji komórek nabłonkowych, a także odgrywają ważną rolę w ich chemioprotekcyjnej i nowotworzeniu. Retinoidy wywierają swój efekt biologiczny poprzez receptory jądrowe RAR i RXR. **Cel pracy:** Celem przeprowadzonych badań była analiza stężenia retinolu w surowicy krwi kobiet z rakiem szyjki macicy oraz ocena ekspresji mRNA RAR i RXR w komórkach raka szyjki macicy zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV) typu 16. i 18. **Materiał i metoda:** Materiał badany obejmował 42 skrawki pooperacyjne tkanek raka płaskonabłonkowego, 7 skrawków gruczolakoraka szyjki macicy, a także 26 skrawków raka przedinwazyjnego. U osób, od których pochodziły skrawki tkanek, oceniono surowiczy poziom retinolu, a w tkankach ekspresję receptorów retinoidowych na poziomie mRNA i obecność sekwencji genomu HPV z zastosowaniem technik PCR. **Wyniki i wnioski:** Średnia zawartość retinolu w surowicy krwi pacjentek z rakiem szyjki macicy z towarzyszącym zakażeniem wirusem HPV typu 16. i 18. była niższa niż w grupie kontrolnej, ale nie znamienne statystycznie. Poziom RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  oraz ekspresja mRNA dla RXR $\beta$  były znacznie niższe w grupie badanej – u pacjentek z rakiem przedinwazyjnym (CIS), z rakiem płaskonabłonkowym i z gruczolakorakiem szyjki macicy, w porównaniu z kobietami z grupy kontrolnej. W przypadku raka płaskonabłonkowego i raka przedinwazyjnego stwierdzono zmniejszenie ekspresji RAR $\alpha$  mniej więcej o 75%, RAR $\beta$  o 90%, a RXR $\beta$  odpowiednio o 70% i 83% w porównaniu z komórkami tkanek kontrolnych. W przypadku gruczolakoraków ekspresja RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  i RXR $\gamma$  była na poziomie takim jak w tkankach grupy kontrolnej.

**Słowa kluczowe:** rak szyjki macicy, retinol, receptor kwasu retinowego (RAR, RXR), ekspresja

### Summary

**Introduction:** Retinoids are essential for the maintenance of epithelial differentiation and play a fundamental role in chemoprevention of epithelial carcinogenesis. Retinoids exert their biological functions through nuclear receptors, retinoic acid receptor (RAR) and retinoid X receptor (RXR). The present study made an effort to analyze serum blood concentration of retinoids in women with cervical cancer as well as to assess an expression of RARs and RXRs in post-operative cervical cancer tissues HPV 16/18 positive. **Material and methods:** The study material included tissue samples of 42 squamous cell carcinoma, 7 samples of adenocarcinoma cervix uteri and 26 samples carcinoma *in situ*. The assessment of serum level of retinol, expression of retinoid receptors and presence of HPV's genome was performed.

**Results and conclusions:** The mean retinol content in blood serum of patients with cervical cancer associated with HPV infection type 16 and/or 18 was lower than in controls. The level of RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  and RXR $\beta$  mRNA expression was significantly decreased in the study group of women with CIS, squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cervix to compare morphologically to the control women. In squamous cell carcinoma and carcinoma *in situ* were found to exhibit a decreased expression of RAR $\alpha$  by about 75%, RAR $\beta$  by 90%, RXR $\beta$  by 70% and 83% respectively compared to the control tissues. Among adenocarcinomas RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RXR $\beta$  were expressed in 10%. In the study cancer tissues RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  and RXR $\gamma$  were expressed on the same level as in the control tissues.

**Key words:** cervical cancer, retinoid, retinoic acid receptor A, retinoic acid receptor X

## Содержание

**Введение:** Ретиноиды являются существенным фактором принимающим участие в регулировании дифференциации и пролиферации эпителиальных клеток. Играют также важную роль в их химиопрофилактике и новообразовании. Ретиноиды оказывают свое биологическое влияние посредством ядерных рецепторов РАР и РИКСР. **Цель работы:** Цель проводимых исследований состояла в том, чтобы сделать анализ концентрации ретинола в сыворотке крови женщин с раком шейки матки и оценить экспрессию мРНА РАР и РИКСР в клетках рака шейки матки зараженных вирусом человеческого папиллома (ВПЧ) типа 16 и 18. **Материал и метод:** Исследуемый материал включал 42 послеоперационных отрезка тканей плоскоэпителиального рака, 7 отрезков аденокарцинома шейки матки, а также 26 отрезков доинвазивного рака. У больных, от которых были взяты отрезки тканей, оценивался сывороточный уровень ретинола, а в тканях экспрессия ретиноидных рецепторов на уровне мРНА и наличие секвенции генома ВПЧ при применении техники начальной химиотерапии и радиотерапии (сокр. название на английском языке – ПЦР). **Результаты и выводы:** Среднее содержание ретинола в сыворотке крови пациенток с раком шейки матки при сопутствующем заражении вирусом ВПЧ типа 16 и 18 было меньше чем в контрольной группе, но не значительно статистически. Уровень РАР альфа, РАР бета и экспрессия мРНА для РИКСР бета были значительно меньше в исследуемой группе пациенток с доинвазивным раком (сокр. название на английском языке – КИС), с плоскоэпителиальным раком и с аденокарциномой шейки матки в сравнении с женщинами контрольной группы. В случае рака плоскоэпителиального и рака доинвазивного отмечено уменьшение экспрессии РАР альфа приблизительно на 75%, РАР бета на 90%, а РИКСР бета соответственно на 70% и 83% в сравнении с клетками контрольных тканей. В случае аденокарцинома экспрессия РАР альфа, РАР бета и РИКСР гамма была на уровне отмеченным в тканях контрольной группы.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, ретинол, рецептор ретиноевой кислоты (РАР, РИКСР), экспрессия

## WSTĘP

Choć wirus brodawczaka ludzkiego typu 16./18. (HPV 16/18) jest kluczowym czynnikiem w etiopatogenezie raka szyjki macicy<sup>(1)</sup>, wiele badań klinicznych i epidemiologicznych sugeruje, że także inne czynniki odgrywają istotną rolę w rozwoju tej choroby. Wirus zakaża komórki warstwy podstawnej nabłonka, ale jego pełny cykl rozwojowy zachodzi w warstwach powierzchniowych nabłonka wielowarstwowego. Ekspresja wirusowych genów ściśle zależy od zróżnicowania komórek nabłonkowych. Wczesna faza ekspresji wirusowych genów jest inicjowana w komórkach niezróżnicowanych lub niskozróżnicowanych, podczas gdy ekspresja genów późnych ma miejsce w komórkach w pełni zróżnicowanych keratynocytów<sup>(2)</sup>.

Retinoidy mają zasadnicze znaczenie dla prawidłowego przebiegu procesów różnicowania nabłonka, a także pełnią ważną funkcję w chemioprowalacji nowotworzenia komórek nabłonkowych<sup>(3)</sup>. Retinoidy odgrywają istotną rolę w wytwarzaniu zrębu nowotworu, progresji raka i jego inwazji, wpływają na ekspresję metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP)<sup>(4)</sup>, czynnika wzrostu nowotworu (TGF $\beta$ ) oraz kinazy zależnej od cyklin p16 i p21, odpowiedzialnej za regulację

## INTRODUCTION

Human papillomavirus type 16/18 (HPV 16/18) is a key factor in cervical carcinogenesis<sup>(1)</sup>. However, many clinical and epidemiological studies suggest that in addition to HPV, other factors or cofactors also play an important role in the development of cervical cancer. The virus infects basal layer of epithelium, but the productive stage of viral life cycle occurs in suprabasal, more apical, layers. HPV preferably infects the proliferating cells that will differentiate when they move upwards in the epithelium. The viral gene expression is tightly coupled to the cellular differentiation program with early gene expression being initiated in non- or low-differentiated cells, whereas late gene expression in more differentiated cells<sup>(2)</sup>.

Retinoids are essential for the maintenance of epithelial differentiation and play a fundamental role in chemoprevention of epithelial carcinogenesis<sup>(3)</sup>. Retinoids also play a central role in the production of tumor stroma, cancer progression and invasion through their ability to regulate an expression of matrix metalloproteinases<sup>(4)</sup>, transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ), cyclin-depending kinase p16 or p21, responsible for cell cycle regulation<sup>(5)</sup>. Epidemiological evidence indicated an inverse

cyklu komórkowego<sup>(5)</sup>. Wyniki badań epidemiologicznych wskazują na odwrotną zależność między częstością rozwoju raka w różnych miejscach organizmu a stężeniem retinoidów w osoczu<sup>(6,7)</sup>. Stwierdzono, że retinoidy modulują szereg różnych procesów komórkowych, między innymi proliferację, różnicowanie, homeostazę, transformację nowotworową i apoptozę<sup>(8)</sup>. Retinoidy wywierają też efekt farmakologiczny, przywracając prawidłową regulację różnicowania i wzrostu komórek w niektórych liniach komórek przednowotworowych i nowotworowych, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*<sup>(3)</sup>.

Jednak skuteczność tych związków zależy od obecności receptorów kwasu retinowego, a także innych czynników i kofaktorów, wchodzących w interakcje z receptorami retinoidowymi. Retinoidy realizują swoje funkcje biologiczne poprzez receptory jądrowe: receptory kwasu retinowego (RAR) i receptor retinowy X (RXR)<sup>(9)</sup>. Istnieje wiele izoform tych receptorów, wskutek odmiennego wykorzystania różnych miejsc promotorowych i dojrzewania transkryptów<sup>(10)</sup>. Podtypy  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  receptorów RAR i RXR różnią się domenami na końcach cząsteczek: aminowym i karboksylowym. Trzy typy receptorów RAR mają silne powinowactwo do wszystkich izomerów trans i 9-cis kwasu retinowego. Z drugiej strony trzy typy receptorów RXR wykazują wyjątkowo silne powinowactwo jedynie do izomerów 9-cis<sup>(11)</sup>. Receptory jądrowe aktywowane przez ligandy wiążą się ze swoistymi elementami sekwencji zlokalizowanymi w rejonach promotorów genów wrażliwych na kwas retinowy i indukują ich transkrypcję<sup>(12)</sup>. Receptory RAR tworzą heterodimery z receptorami RXR, podczas gdy receptory RXR heterodimeryzują z innymi receptorami jądrowymi, m.in. z receptorami dla hormonów tarczycy (TR), receptorami dla witaminy D (VDR) i z receptorem aktywowanym przez czynnik proliferacji peroksysomów (PPAR $\gamma$ ). Heterodimerizacja receptorów odgrywa ważną rolę w regulacji szlaków sygnałowych zależnych od receptorów jądrowych. Stwierdzono ścisły związek między ekspresją określonych receptorów retinowych a odpowiedzią kliniczną na podanie retinoidów<sup>(13)</sup>. Sygnalizacja zależna od retinoidów często ulega zaburzeniu we wczesnej fazie transformacji nowotworowej, co sugeruje, że może to być jeden z czynników warunkujących rozwój nowotworu<sup>(14)</sup>.

W pracy przedstawiono wyniki analizy stężenia retinolu w surowicy krwi kobiet z rakiem szyjki macicy, a także ocenę ekspresji mRNA receptorów RAR i RXR w próbkach operacyjnych raka szyjki macicy HPV 16/18-pozytywnych.

## MATERIAŁ I METODY

### MATERIAŁ

Materiał użyty w badaniu został pobrany pooperacyjnie od pacjentek operowanych z powodu raka szyjki macicy (wynik badania histopatologicznego: rak płaskonabłonkowy i gruczolak szyjki macicy) oraz mięśniaka macicy (wynik badania histopatologicznego: mięśniak gładkokomórkowy macicy). Wszystkie pacjentki były leczone chirurgicznie w Klinice

relationship between cancer incidence at various sites and serum retinoids level<sup>(6,7)</sup>. Retinoids have been shown to modulate a wide variety of cellular processes, including proliferation, differentiation, homeostasis, malignant transformation, and apoptosis<sup>(8)</sup>. Retinoids also act pharmacologically to restore regulation of differentiation and growth in certain premalignant and malignant cells *in vitro* and *in vivo*<sup>(3)</sup>.

However, the efficiency of these compounds depends on retinoic acid receptors and other factors and cofactors interacting with retinoid receptors. Retinoids exert their biological functions through nuclear receptors, retinoic acid receptor (RAR) and retinoid X receptor (RXR)<sup>(9)</sup>. Multiple receptor isoforms exist through the alternative usage of splice sites and promoters<sup>(10)</sup>. The  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subtypes of the RARs and RXRs have distinct and conserved amino- and carboxy-terminal domains. The three RAR types have a strong affinity for all-trans and 9-cis isomers of retinoic acid. The three RXR types, on the other hand, have demonstrated an exceptionally strong specificity for the 9-cis isomers only<sup>(11)</sup>. These ligand-activated nuclear receptors induce the transcription of target genes by binding to retinoid acid responsive elements in the promoter regions<sup>(12)</sup>. RARs heterodimerized with RXRs, while RXRs heterodimerized with other nuclear receptors, including the thyroid hormone receptors (TR), vitamin D receptors (VDR) and peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ). Heterodimerization represents an important level of regulation for nuclear receptor-dependent signaling pathways. A tight relationship was observed between the expression of specific retinoid receptors and retinoid clinical responses<sup>(13)</sup>. Retinoid signaling is often compromised early in carcinogenesis, which suggests that a reduction in retinoid signaling may be required for tumor development<sup>(14)</sup>.

The present study made an effort to analyze serum blood concentration of retinoids in women with cervical cancer as well as to assess an expression of RARs and RXRs in postoperative cervical cancer tissues HPV 16/18 positive.

## MATERIAL AND METHODS

### MATERIAL

The study material was obtained from patients that underwent surgeries due to: i/ cervical carcinoma (histopathologic finding: squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix uteri) and ii/ uterine myoma (histopathologic finding: leiomyoma uteri). All patients were surgically treated in the Department of Oncologic Gynecology and Gynecology of Medical University of Lublin. The weight of tissue sections was 0.03-0.4 g. The Ethical Committee of the Medical University of Lublin approved the study.

The study material included tissue samples of 42 squamous cell carcinoma, 7 samples of adenocarcinoma cervix uteri and 26 samples carcinoma *in situ* (CIS). An average age of patients was 44.3 ( $\pm$ 20.5) years. The control group consisted of regular uterine cervix tissue obtained from 21 women, average age 46.94 ( $\pm$ 6.12) years, who underwent surgery due to uterine

Onkologii Ginekologicznej i Ginekologii. Waga preparatów tkankowych wynosiła od 0,03 do 0,4 g. Na prowadzenie badań otrzymano zgodę Komitetu Etycznego przy Uniwersytecie Medycznym.

Materiał do badań obejmował 42 skrawki tkanek raków płaskonabłonkowych i 7 skrawków gruczolakoraka szyjki macicy, a także 26 skrawków raka przedinwazyjnego (CIS). Średni wiek pacjentek wynosił 44,3 roku ( $\pm 20,5$  roku). Grupę kontrolną stanowiły skrawki prawidłowej tkanki szyjki macicy, uzyskanej od 21 kobiet ze średnią wieku 46,94 roku ( $\pm 6,12$  roku), operowanych z powodu mięśniaków macicy. Pacjentki podzielono na grupy na podstawie ocenianych parametrów histopatologicznych i klinicznych.

Rozpoznanie raka szyjki macicy dokonano w oparciu o kryteria określone przez Światową Organizację Zdrowia (WHO)<sup>(15)</sup>.

Jeżeli chodzi o histopatologiczny typ guza, w grupie pacjentek z rakiem płaskonabłonkowym było 30 przypadków raka rogowaciejącego i 12 przypadków raka nierogowaciejącego. W grupie 7 pacjentek z gruczolakorakiem szyjki macicy stwierdzono 5 przypadków raka śluzowatego i 2 przypadki raka endometrioidalnego. W zależności od stopnia zróżnicowania komórek nowotworowych chore podzielono na następujące grupy: raka wysoko zróżnicowanego (G1; 8 przypadków raka płaskonabłonkowego i 3 przypadki gruczolakoraka), raka średnio zróżnicowanego (G2; 14 przypadków raka płaskonabłonkowego i 2 przypadki gruczolakoraka) oraz raka słabo zróżnicowanego (G3; 20 przypadków raka płaskonabłonkowego i 2 przypadki gruczolakoraka). Zgodnie z klasyfikacją kliniczną FIGO 26 pacjentek było w stadium 0, 45 pacjentek – w stadium I i 4 – w stadium IIA.

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w średnim wieku kobiet operowanych z powodu raka płaskonabłonkowego i gruczolakoraka szyjki macicy w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio  $44,3 \pm 25,5$  i  $46,94 \pm 6,12$  roku).

## METODYKA

### Ocena poziomu retinolu

Przed zabiegiem pacjentkom pobierano próbkę krwi z żyły odłokciowej w celu oceny osoczowego poziomu retinolu. Próbkę umieszczano w lodzie, mieszało z EDTA, odbiałczano przez dodanie kwasu sulfosalicylowego i odwirowywano przez 20 minut. Próbkę odbiałczanego osocza przechowywano w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  do czasu analizy. Poziom retinolu mierzono metodą wysokowydajnej chromatografii płynnej (HPLC), to znaczy chromatografii z odwróceniem fazy. Oznaczenia retinolu dokonano techniką zaproponowaną przez Catignani<sup>(16)</sup> na kolumnie Ultrasphere ODS ( $250 \times 4,6$  mm) w mieszaninie metanolu z wodą (95:5 v/v) przy przepływie 2,5 ml/min.

### Izolacja DNA

Do izolacji DNA wykorzystano zestaw QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) zgodnie z instrukcją producenta. Genomowy DNA był użyty jako matryca w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) ze swoistymi starterami o sekwencji komplementarnej

myomas. The patients were divided into groups with respect to the evaluated histopathologic or clinical parameters.

The histopathologic criteria formulated by the World Health Organization (WHO) were used to establish the diagnosis of cervical carcinoma<sup>(15)</sup>.

As far as the histopathologic type is concerned, in the group of patients with squamous cell carcinoma there were 30 cases of keratinizing type and 12 cases of non-keratinizing type. In the group of 7 patients with adenocarcinoma of the cervix, there were 5 cases of mucinosum type and 2 cases of endometrioid type. According to the degree of differentiation the neoplastic cells, the following groups of patients were distinguished: with well differentiated (G1) carcinomas (8 squamous cell carcinomas and 3 adenocarcinomas), with moderately differentiated (G2) carcinomas (14 squamous cell carcinomas and 2 adenocarcinomas), and with poorly differentiated (G3) (20 squamous cell carcinomas and 2 adenocarcinomas). According to the FIGO clinical staging, 26 patients were classified as 0, 45 patients were classified as I and 4 as IIA stage.

There were no significant differences in the mean age of women who underwent surgery due to squamous cell carcinoma and adenocarcinoma if compared to the control women ( $44.3 \pm 25.5$  vs.  $46.94 \pm 6.12$ ).

## METHODS

### Retinoids level

Before surgery the patients had a sample of their blood drawn from the basilica vein in order to evaluate the serum level of retinol. The samples were placed on ice, mixed with EDTA, deproteinized by adding sulfosalicylic acid and centrifuged for 20 minutes. The samples of deproteinized plasma were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until analysis. Retinol was analyzed by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method, i.e., reverse-phase HPLC. The chromatograms of retinol were developed according to the method of Catignani<sup>(16)</sup> on Ultrasphere ODS column ( $250 \times 4.6$  mm) in methanol: water system (95:5 v/v) at a flow of 2.5 ml/min.

### DNA isolation

For DNA isolation QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) was used according to the manufacturer's specifications. Genomic DNA was used for amplification by PCR (polymerase chain reaction) with specific two primers pair complementary to the HPV's genome: universal for 33 types of HPV viruses MY09 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3' and MY11 5'-GCMCAGGGWCATAAAYATGG-3'; for HPV 16 – E7/16A 5'-ATAATATAAGGGTTCGGTGG-3' and E7/16B 5'-CATTTTCGTTCTCGTCATCTG-3'; for HPV 18 – ME18A 5'-CACGGCGACCCTACAAGCTACCTG-3' and ME18B 5'-TGCAGCACGAATTGGCACTGGCCTC-3'.

The PCR reactions were performed in total volume 20  $\mu\text{l}$ . The final mixture contained 1  $\mu\text{M}$  primers, 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 1  $\times$  PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.8 at  $25^{\circ}\text{C}$ , 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100) and 1 U/25  $\mu\text{l}$  mixture of Taq polymerase (Finnzymes).



do genomu HPV: uniwersalnego dla 33 typów wirusów HPV MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGACT-3') oraz MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAAYATGG-3'); dla HPV 16 – E7/15A (5'-ATAATATAAGGGGTTCGGTGG-3') i E7/16B (5'-CATTTTCGTTCTCGTCATCTG-3'), dla HPV 18 – ME18A (5'-CACGGCGACCCTACAAGCTACCTG-3') i ME18B (5'-TGCAGCACGAATTGGCACTGGCCTC-3').

Reakcję PCR przeprowadzono w mieszaninie o objętości całkowitej 20  $\mu$ l. Końcowy roztwór zawierał 1  $\mu$ M starterów, 200  $\mu$ M DTP, 1  $\times$  bufor PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 w temperaturze 25°C, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0,1% Tryton X-100) i 1 jednostkę polimerazy Taq (Finnzymes).

Próby DNBA powielano (amplifikowano) w 35 cyklach reakcji. Każdy cykl składał się z następujących etapów: denaturacja w temperaturze 95°C przez 1 minutę (w pierwszym cyklu przez 90 sekund), denaturacja w temperaturze 50°C dla par starterów MY09/11, w temperaturze 59°C dla par starterów E7/16A-E7/16B i w temperaturze 55°C dla par starterów ME18A/B z wydłużeniem czasu ogrzewania w temperaturze 72°C przez 1 minutę. Reakcję przeprowadzano w termocyklerze (Biometra). Produkty amplifikacji rozdzielano w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny i analizowano w świetle UV.

#### Izolacja RNA

Badane tkanki (rak szyjki macicy, H-SIL i grupa kontrolna), uzyskane podczas planowych operacji ginekologicznych, były natychmiast umieszczane w odczynniku stabilizującym RNA i TM TNA (Qiagen). Cały RNA był izolowany ze skrawków tkanek z użyciem zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen) zgodnie z instrukcją producenta.

#### Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Do prób RNA dodawano DNazę I (Promega), a 1  $\mu$ g RNA (z każdej próbki) był poddawany odwrotnej transkrypcji z użyciem zestawu SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen). Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzano z wykorzystaniem urządzenia LightCycler Real-Time Detection System (Roche Diagnostics) i SYBR-Green I jako barwnika znakującego. Docelowy cDNA był oceniany ilościowo metodą względnej kwantyfikacji. Ilość transkryptów receptora RA w każdej próbce standaryzowano względem ekspresji mRNA dla dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanu (GAPDH) albo polimerazy RNA II (Pol II). Reakcje PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzano w mieszaninie o objętości 20  $\mu$ l. cDNA (2  $\mu$ l) dodawano do 18  $\mu$ l mieszaniny LC-FastStart DNA Master SYBR-Green I, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> i starterów przedstawionych w tabeli 1.

#### Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej i przedstawione w tabelach korelacji. Obliczono wskaźniki strukturalne, średnią arytmetyczną i średni błąd dla parametrów mierzalnych z wykorzystaniem programu Statistica 6.0. Za statystycznie znamienne uznano wartości p poniżej 0,05.

The samples were amplified for 35 cycles. Each cycle consisted of the following steps: denaturation at 95°C for 1 min. (first cycle for 90 sec.), annealing at temperature 50°C for primer pairs MY09/11, 59°C for primer pairs E7/16A-E7/16B and 55°C for primer pairs ME18A/B and extension at 72°C for 1 min. Reaction was performed in a DNA thermal cycler (Biometra). Products of amplification were analyzed in 2% agarose gel with addition of ethidium bromide in UV transilluminator.

#### RNA isolation

The studied tissues (cervical carcinoma, H-SIL and control), collected during planned gynecologic operations, were immediately placed in RNA and later TM RNA Stabilization Reagent (Qiagen). Total RNA was isolated from tissue samples using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's specifications.

#### Real-time PCR

RNA samples were treated with DNase I (Promega), and 1  $\mu$ g RNA (of each sample) was reverse transcribed with SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen) into cDNA using -dT primers. Real-time PCR was performed in a LightCycler Real-Time Detection System (Roche Diagnostics) using SYBR-Green I as the detection dye. Target cDNA was quantified using the relative quantification method. The quantity of the RA receptors transcripts in each sample standardized by either glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or RNA polymerase II (Pol II) transcript level. Real-time PCR reactions were performed in a total volume of 20  $\mu$ l. The cDNA (2  $\mu$ l) was added to an 18  $\mu$ l mixture of LC-FastStart DNA Master SYBR-Green I, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> and the primers, which are presented in table 1.

#### Statistical analysis

The results were statistically analyzed and summarized in correlational tables, calculating the structural indexes, arithmetic means and mean errors for measurable features, using Statistica 6.0 software. P value less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### PRESENCE OF HPV

In DNA samples isolated from the cervical cells, HPV 16/18 DNA was detected in carcinoma *in situ* in 92.3%, in squamous cell carcinoma in 97.6%, in adenocarcinoma in 100% and in 4.7% of the control group (table 2).

### PRESENCE OF RETINOL SERUM

In blood serum of the study group of women the retinol level was analyzed. The mean retinol content in blood serum of patients with cervical cancer associated with HPV infection type 16 and/or 18 was lower (1.768  $\mu$ mol/l *ca in situ*, 1.742  $\mu$ mol/l

Nazwa startera <i>Primer's name</i>	Sekwencja startera <i>Primer sequences</i>	Wielkość produktu <i>Product size</i>
RARa1 RARa2	CCCTACGCTTCTTCTCC AACTGCTGCTCTGGGTCTC	136 bp
RARb1 RARb2	AAACCTGCTCTGCTGCC TCTCGGTGACAAGTAAATC	125 bp
RARg1 RARg2	CGGGGCATCAGCACTAAGG TAGAGGCATTGGGGTGGG	160 bp
RXRa1 RXRa2	GACCTGACCTACCTGCC TCCACCTCATTCTGTTCCG	167 bp
RXRb1 RXRb2	TGCCGCTATCAGAAGTGCC CCTCAACGCCCTGGTCCAC	184 bp
RXRg1 RXRg2	CAAGAGGACGATAAGGAAGG ACTCTCAGCTCGCTCTCGG	178 bp

Tabela 1. Startery stosowane w reakcjach PCR w czasie rzeczywistym  
Table 1. Real time PCR primers

## WYNIKI

### IDENTYFIKACJA DNA HPV

W próbkach DNA izolowanych z komórek szyjki macicy DNA wirusa HPV 16/18 stwierdzono w 92,3% komórek raka przedinwazyjnego, w 97,6% komórek raka płaskonabłonkowego, 100% komórek gruczolakoraka i w 4,7% komórek z grupy kontrolnej (tabela 2).

### STĘŻENIE RETINOLU W SUROWICY KRWI KOBIET

W surowicy badanych kobiet oznaczano stężenie retinolu. Średnie stężenie retinolu w surowicy pacjentek z rakiem szyjki macicy

squamous cell cervical cancer, 1.732  $\mu\text{mol/l}$  adenocarcinoma of cervix) than in controls (2.058  $\mu\text{mol/l}$ ) but the difference was not statistically significant (table 3).

### LEVEL OF RETINOID RECEPTORS

In total RNA isolated from tissues samples the level of mRNA for retinoid receptors (RARs and RXRs) in study tissues was determined by real-time PCR. The results are present on fig. 1. The level of RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  and RXR $\beta$  mRNA expression was significantly decreased in the study group of women with CIS, squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cervix to compare morphologically to the control women. In squamous cell carcinoma and carcinoma *in situ* were found to exhibit a decreased expression of RAR $\alpha$  by about 75%, RAR $\beta$  by 90%,

	n	HPV (33 type)	HPV 16/18
Grupa kontrolna <i>Control group</i>	21	1 (4,7%)	1 (4,7%)
Rak przedinwazyjny ( <i>carcinoma in situ</i> ) <i>Carcinoma in situ</i>	26	24 (92,3%)	24 (92,3)
Rak płaskonabłonkowy ( <i>squamous cell carcinoma</i> ) <i>Squamous cell carcinoma</i>	42	41(97,6%)	41 (97,6%)
Gruczolakorak ( <i>adenocarcinoma</i> ) <i>Adenocarcinoma</i>	7	7 (100%)	7 (100%)

Tabela 2. Identyfikacja DNA wirusa HPV w badanym materiale  
Table 2. Identification of HPV DNA in study samples

	n	Średnia arytmetyczna Arithmetic mean	Błąd średniej Mean error	Istotność różnic p value
<b>Grupa kontrolna HPV(-)</b> Control HPV(-)	20	2,058	0,312	
<b>Rak przedinwazyjny (CIS) HPV(+)</b> CIS HPV(+)	24	1,768	0,115	ns <sup>a</sup>
<b>Rak płaskonabłonkowy HPV(+)</b> Squamous cell cancer (SCC) HPV(+)	41	1,742	0,296	ns <sup>b,c</sup>
<b>Guzolokorak HPV(+)</b> Adenocarcinoma (ACC) HPV(+)	7	1,732	0,231	ns <sup>d,e,f</sup>

ns – różnica nieznamienista; n – liczba badanych pacjentek; <sup>a</sup> – w porównaniu raka przedinwazyjnego (CIS) HPV(+) z grupą kontrolną HPV(-); <sup>b</sup> – w porównaniu raka płaskonabłonkowego HPV(+) z grupą kontrolną HPV(-); <sup>c</sup> – w porównaniu raka płaskonabłonkowego HPV(+) z rakiem przedinwazyjnym (CIS) HPV(+); <sup>d</sup> – w porównaniu guzolokoraka HPV(+) z grupą kontrolną HPV(-) i osobami z rakiem przedinwazyjnym (CIS) HPV(+); <sup>e</sup> – w porównaniu guzolokoraka HPV(+) z rakiem przedinwazyjnym (CIS) HPV(+); <sup>f</sup> – w porównaniu guzolokoraka HPV(+) z rakiem płaskonabłonkowym HPV(+).  
p – statistical significance; ns – no statistical significance; n – quantity of patients; <sup>a</sup> – in relation CIS HPV(+) to a control group HPV(-); <sup>b</sup> – in relation SCC HPV(+) to a control group HPV(-); <sup>c</sup> – in relation SCC HPV(+) to a CIS HPV(+) group; <sup>d</sup> – in relation ACC HPV(+) to a control group HPV(-); <sup>e</sup> – in relation ACC HPV(+) to CIS HPV(+) group; <sup>f</sup> – in relation ACC HPV(+) to SCC HPV(+) group.

Tabela 3. Stężenie retinolu ( $\mu\text{mol/l}$ ) w surowicy krwi kobiet z grupy kontrolnej – HPV(-) i u kobiet z rakiem szyjki macicy zakażonych wirusem – HPV(+)  
Table 3. Retinol levels ( $\mu\text{mol/l}$ ) in blood serum of the women of control – HPV(-) and study group – HPV(+)

zakażonych HPV typu 16. lub/i 18. było niższe (1,768  $\mu\text{mol/l}$  w przypadku raka przedinwazyjnego, 1,742  $\mu\text{mol/l}$  w przypadku raka płaskonabłonkowego i 1,732  $\mu\text{mol/l}$  w przypadku guzolokoraka szyjki macicy) niż w grupie kontrolnej (2,058  $\mu\text{mol/l}$ ), ale stwierdzona różnica nie była statystycznie znamienista (tabela 3).

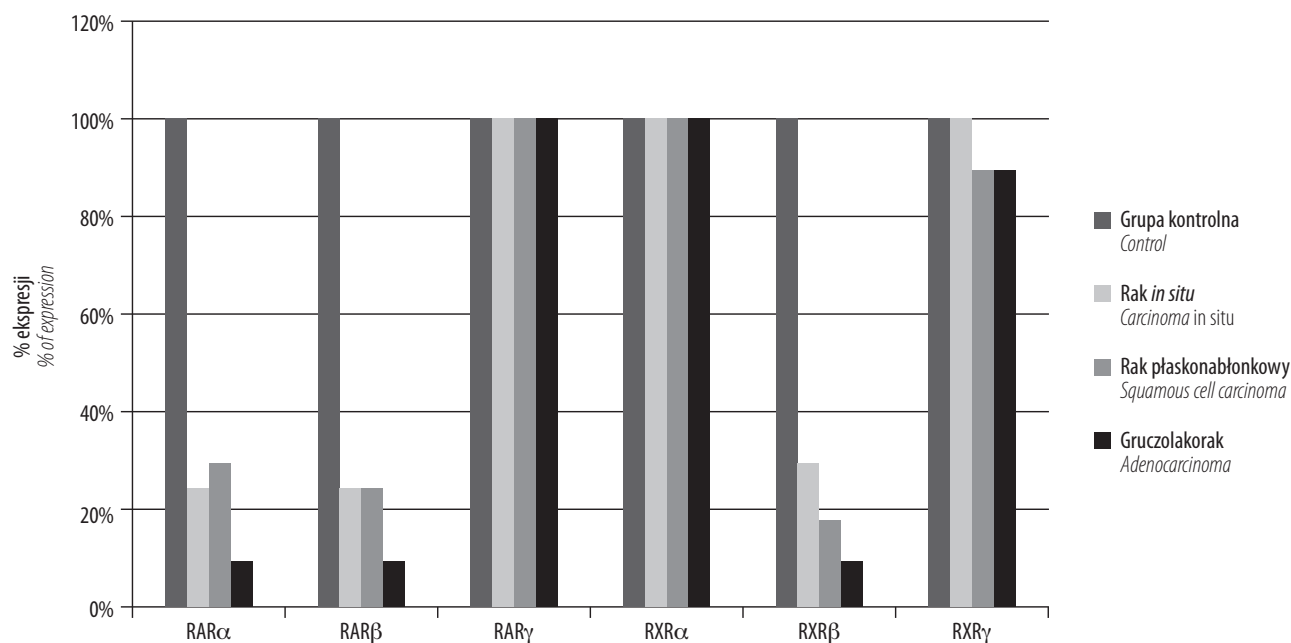
### ILOŚĆ RECEPTORÓW RETINOIDOWYCH

W RNA całkowitym izolowanym z badanych tkanek poziom mRNA dla receptorów retinoidowych (RAR i RXR) określono, stosując reakcję PCR w czasie rzeczywistym. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 1.

RXR $\beta$  by 70% and 83% respectively compared to the control tissue. Among adenocarcinomas RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RXR $\beta$  was expressed in 10%. In the study cancer tissues RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  and RXR $\gamma$  was expressed on the same level as in the control tissues.

### DISCUSSION

HPV is a key factor in cervical cancer development, but the progression of HPV associated cervical precancerous lesions depends on many other factors such as oncogene expression, immune system, antiviral factors, dietary antiviral factors as retinoids.



Rys. 1. Ekspresja mRNA dla receptorów retinoidowych w komórkach nowotworowych i nienowotworowych  
Fig. 1. Expression of mRNA of retinoid receptors in tumor and non-tumor cells

Poziom ekspresji mRNA dla RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  i RXR $\beta$  był znacznie niższy w badanej grupie kobiet z rakiem przedinwazyjnym, z rakiem płaskonabłonkowym i z gruczolakorakiem szyjki macicy w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej. W przypadku raka płaskonabłonkowego i raka przedinwazyjnego stwierdzono obniżenie ekspresji RAR $\alpha$  o około 75%, RAR $\beta$  o 90% i RXR $\beta$  odpowiednio o 70% i 83% w porównaniu z tkankami kontrolnymi. W przypadku gruczolakoraka ekspresję RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  i RXR $\beta$  stwierdzono w 10% prób. W obecnym badaniu ekspresja RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  i RXR $\gamma$  była na takim samym poziomie jak w tkankach kontrolnych.

## OMÓWIENIE

Wirus HPV stanowi kluczowy czynnik w rozwoju raka szyjki macicy, ale progresja zmian przedrakowych w obrębie szyjki macicy związanych z zakażeniem HPV zależy od wielu innych czynników, na przykład ekspresji onkogenów, sprawności układu odpornościowego, a także czynników przeciwwirusowych zawartych w pożywieniu, takich jak retinoidy.

Mimo wieloletniego stosowania retinoidów w medycynie ich mechanizm działania w zapobieganiu rozwojowi raka szyjki macicy nadal pozostaje niejasny. W odróżnieniu od innych cząsteczek przekazywanych retinoidy nie są czynnikami endogennymi, ale pochodnymi prekursorów witaminy A zawartych w pożywieniu<sup>(17)</sup>. Obserwowane działania toksyczne retinoidów mogą wynikać z interakcji metabolitów ich nieprawidłowego transportu lub transdukcji sygnału<sup>(5,18)</sup>.

Receptory kwasu retinowego to zależne od ligandów czynniki transkrypcyjne, należące do rodziny receptorów jądrowych. Retinoidy wywierają swoje działanie biologiczne poprzez receptory jądrowe RAR i RXR<sup>(9)</sup>. Kluczową rolę odgrywa w nich RAR $\beta$ , pośrednicząc w działaniu przeciwnowotworowym retinoidów w wielu komórkach nowotworowych różnych typów (płuc, głowy i szyi). Brak ekspresji RAR $\beta$  stwierdzono w komórkach nowotworowych licznych linii<sup>(19)</sup>. Zmiany przednowotworowe w obrębie jamy ustnej również korelowały z niskim poziomem komórkowym retinoidów. Zeng i wsp.<sup>(20)</sup> stwierdzili, że gen kodujący RAR $\beta$  wiąże receptory retinoidowe i zapobiega wzrostowi komórek nowotworowych. Retinoidy takie jak atRA skutecznie indukują ekspresję RAR $\beta$ , która hamuje proliferację. W promotorze genu RAR $\beta$  występuje element wiążący receptory retinoidowe  $\beta$ RARE. Z  $\beta$ RARE wiążą się zarówno heterodimery RXR/RAR, jak i RXR/nur77. Heterodimerizacja receptorów jądrowych ma wpływ na regulację szlaków sygnałowych zależnych od tych czynników.

Różny poziom ekspresji wszystkich badanych receptorów retinoidowych stwierdzono w badanych zmianach nowotworowych szyjki macicy. W stanach przedrakowych i w komórkach raka ekspresja wszystkich receptorów była obniżona, z wyjątkiem RXR $\gamma$  w raku przedinwazyjnym i w gruczolakoraku – była na tym samym poziomie jak w grupie kontrolnej. Obniżona ekspresja mRNA dla RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  i RXR $\gamma$  korelowała z rozwojem raka szyjki macicy. Sugeruje to, że zaburzona ekspresja receptorów retinoidowych może przyczyniać się do rozwoju raka szyjki macicy.

Despite the use of retinoids in the clinic for many years, their mode of action in the prevention of cervical cancer is still unclear. Retinoids, unlike other signalling molecules, are not strictly endogenous but they are derived from dietary sources of vitamin A or its precursors<sup>(17)</sup>. Some of their toxic effects may be related to the interaction with the retinoid metabolisms, transport or signal transduction<sup>(5,18)</sup>.

Retinoic acid receptors are ligand-dependending transcription factors which are member of the nuclear receptor family. Retinoids exert their biological functions through nuclear receptors, retinoic acid receptor (RAR) and retinoid X receptor (RXR)<sup>(9)</sup>. RAR $\beta$  has a key role in mediating the anticancer effect of retinoids in many different types of cancer cells (lung, head and neck). The loss of RAR $\beta$  expression has been observed in many cancer cell lines<sup>(19)</sup>. Premalignant oral lesions have also been correlated with a low cellular level of retinoids. Zeng et al.<sup>(20)</sup> found that a gene RAR $\beta$  that binds vitamin A acts to prevent cancer cell growth. The retinoids such as atRA effectively induce RAR $\beta$  expression. RAR $\beta$  expression can mediate the growth of inhibitory effect of retinoids and is regulated by  $\beta$ RARE in RAR $\beta$  promoter. The  $\beta$ RARE binds both RXR/RAR and RXR/nur77 heterodimers. Heterodimerization regulates nuclear receptor-dependent signaling pathways.

All the studied receptors were expressed in cervical cancer lesion on a different level.

In cervical precancerous and cancer cell expression all of the receptors were decreased, but for RXR $\gamma$  in carcinoma *in situ* and adenocarcinoma remained on the same level as control. The diminished RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , and RXR $\gamma$  mRNA expression was related to the development of cervical carcinoma. This suggests that the altered retinoids receptor expression may contribute to cervical cancer development.

## CONCLUSIONS

1. The mean retinol content in blood serum of patients with cervical cancer associated with HPV infection type 16 and/or 18 was lower than in controls.
2. The level of RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  and RXR $\beta$  mRNA expression was significantly decreased in the study group of women with CIS, squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cervix to compare morphologically to the control women.
3. In squamous cell carcinoma and carcinoma *in situ* were found to exhibit a decreased expression of RAR $\alpha$  by about 75%, RAR $\beta$  by 90%, RXR $\beta$  by 70% and 83% respectively compared to the control tissues.
4. Among adenocarcinomas RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RXR $\beta$  were expressed in 10%.
5. In the study cancer tissues RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  and RXR $\gamma$  were expressed on the same level as in the control tissues.



## WNIOSKI

1. Średnia zawartość retinolu w surowicy krwi pacjentek z rakiem szyjki macicy związanym z zakażeniem wirusem HPV typu 16. i/lub 18. była nieznacznie niższa niż w grupie kontrolnej.
2. Poziom ekspresji mRNA dla RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  i RXR $\beta$  był znacznie obniżony w badanej grupie kobiet z rakiem przedinwazyjnym szyjki macicy, z rakiem płaskonabłonkowym i z gruczolakorakiem szyjki w porównaniu z grupą kontrolną.
3. W przypadku raka płaskonabłonkowego i raka przedinwazyjnego odnotowano obniżenie ekspresji RAR $\alpha$  w porównaniu z tkankami kontrolnymi.
4. W przypadku gruczolakoraka ekspresję RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  i RXR $\beta$  stwierdzono w około 10% w porównaniu z grupą kontrolną.
5. W badanych tkankach raka ekspresja RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  i RXR $\gamma$  była na podobnym poziomie co w tkankach kontrolnych.

PIŚMIENNICTWO:  
BIBLIOGRAPHY:

1. National Cancer Institute, Women's Health Report, Fiscal Years 2001.
2. Hansen C.N., Nielsen L., Norrild B.: Activities of E7 promoters in the human papillomavirus type 16 genome during cell differentiation. *Virus Res.* 2010; 150: 3 4-42.
3. Hansen L.A., Sigman C.C., Andreola F. i wsp.: Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1271-1279.
4. Park E.Y., Wilder E.T., Lane M.A.: Retinol inhibits the invasion of retinoic acid-resistant colon cancer cells in vitro and decreases matrix metalloproteinase mRNA, protein, and activity levels. *Nutr. Cancer* 2007; 57: 66-77.
5. Clarke N., Germain P., Altucci L. i wsp.: Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* 2004; 6: 1-23.
6. Liang D., Lin J., Grossman H.B. i wsp.: Plasma vitamins E and A and risk of bladder cancer: a case-control analysis. *Cancer Causes Control* 2008; 19: 981-992.
7. Yuan J.M., Gao Y.T., Ong C.N. i wsp.: Prediagnostic level of serum retinol in relation to reduced risk of hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006; 98: 482-490.
8. Clifford J.L., Sabichi A.L., Zou C. i wsp.: Effects of novel phenylretinamides on cell growth and apoptosis in bladder cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2001; 10: 391-395.
9. Okuno M., Kojima S., Matsushima-Nishiwaki R. i wsp.: Retinoids in cancer chemoprevention. *Curr. Cancer Drug Targets* 2004; 4: 285-298.
10. Freemantle S.J., Spinella M.J., Dmitrovsky E.: Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7305-7315.
11. Bogos K., Renyi-Vamos F., Kovacs G. i wsp.: Role of retinoic receptors in lung carcinogenesis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2008; 27: 18.
12. Pavan B., Biondi C., Dalpiaz A.: Nuclear retinoic acid receptor beta as a tool in chemoprevention trials. *Curr. Med. Chem.* 2006; 13: 3553-3563.
13. Dragnev K.H., Rigas J.R., Dmitrovsky E.: The retinoids and cancer prevention mechanisms. *Oncologist* 2000; 5: 361-368.
14. Tang X.H., Gudas L.J.: Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 2010; 1: 337-345.
15. WHO. *Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice.* WHO, Geneva, Switzerland 2006.
16. Catignani G.L.: An HPLC method for the simultaneous determination of retinol and alpha-tocopherol in plasma or serum. *Methods Enzymol.* 1986; 123: 215-219.
17. Thanopoulou E., Baltayiannis N., Lykogianni V.: Nutritional aspects regarding lung cancer chemoprevention. *J. BUON* 2006; 11: 7-20.
18. Evans T.R., Kaye S.B.: Retinoids: present role and future potential. *Br. J. Cancer* 1999; 80: 1-8.
19. Alvarez S., Germain P., Alvarez R. i wsp.: Structure, function and modulation of retinoic acid receptor beta, a tumor suppressor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39: 1406-1415.
20. Zeng Q., Smith D.C., Suscovich T.J. i wsp.: Determination of intermediate biomarker expression levels by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in oral mucosa of cancer patients treated with liarozole. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 2245-2251.

**Szanowni Prenumeratory!**

Uprzejmie przypominamy, że zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dn. 6 października 2004 roku w sprawie sposobów dopełnienia obowiązku doskonalenia zawodowego lekarzy i lekarzy dentyistów prenumerata czasopisma „**Current Gynecologic Oncology**”

– indeksowanego w Index Copernicus – umożliwi doliczenie 5 punktów edukacyjnych do ewidencji doskonalenia zawodowego.

Podstawą weryfikacji jest dowód opłacenia prenumeraty lub zaświadczenie wydane przez Wydawcę.