

Stanisław Chrapusta, Bożena Konopka, Zygmunt Paszko,
Halina Padzik

OZNACZANIE RECEPTORA ESTROGENÓW
W NOWOTWOROWYCH I PRAWIDŁOWYCH TKANKACH LUDZKICH
— PORÓWNANIE WYNIKÓW METODY IMMUNOENZYMATYCZNEJ
I RADIOLIGANDOWEJ*

Z Samodzielnej Pracowni Endokrynologii Onkologicznej
Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. Z. Paszko
Dyrektor: prof. dr hab. J. Steffen

Porównano wyniki oznaczeń receptora estrogenów (ER) w cytozolach i ekstraktach z jądrowej frakcji homogenatów raków sutka, prawidłowej mięśniówki i mięśniaków macicy kobiet otrzymane metodą radioligandową (RLA, technika węglowo-dekstranowa) i immunoenzymatyczną (EIA, technika warstwowa z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych). Wykazano istnienie umiarkowanej ($r \approx 0,6$) korelacji między wynikami oznaczeń metodą RLA i EIA w cytozolach z raków sutka i mięśniaków macicy i silnej ($r \approx 0,9$) korelacji między wynikami analogicznych oznaczeń ER w cytozolach z prawidłowej mięśniówki macicy i ekstraktach jądrowych z badanych tkanek. Stwierdzono, że ocena stanu receptorowego raków sutka na podstawie wyników oznaczeń ER metodą RLA — w świetle przjętych uprzednio kryteriów praktyczno-klinicznych w 3/4 przypadków pokrywa się z oceną dokonaną na podstawie wyników oznaczeń ER metodą EIA.

Oznaczanie białek receptorowych dla hormonów steroidowych (SR) znalazło trwałe praktyczne zastosowanie w diagnostyce, planowaniu leczenia i prognozowaniu przebiegu choroby w przypadku raka sutka (7, 13). Do oznaczania SR stosowano do niedawna wyłącznie metodę radioligandową (RLA), opartą na pomiarze ilości swoiście wiązanego, radioaktywnego hormonu. Metoda ta cechuje się dobrą powtarzalnością i dość dużą czułością, stwarza jednak szereg problemów wynikających m.in. z konieczności odróżnienia wiązania hormonu z SR od wiązania z innymi, niereceptorowymi białkami swoiście wiążącymi hormony steroidowe (np. transkortyną lub globuliną wiążącą hormony płciowe), blokowania miejsc receptorowych przez endogenne steroidy i labilności białek receptorowych.

W ostatnich latach, dzięki zastosowaniu hybrydyzacji komórkowej, szeregu ośrodkom udało się otrzymać monoklonalne przeciwciała przeciwko różnym białkom receptorowym, w tym również przeciwko receptorowi estrogenów (ER). Na ich bazie opracowano metodę immunoenzymatycznego oznaczania ER (ER-EIA), którą wprowadza się obecnie do diagnostyki klinicznej jako wygodniejszą w wykonaniu, nie wymagającą dysponowania pracownią izotopową, zapewniającą pełną standaryzację postępowania i czulszą niż metoda RLA. Istnieją jednak pew-

* Pracę przedstawiono na konferencji pt. „Kliniczne zastosowanie badań nad receptorami hormonów steroidowych”, Warszawa, 1—2 czerwca 1987 r.

ne rozbieżności co do zgodności wyników otrzymywanych tymi metodami; współczynnik korelacji jest oceniany przez różnych autorów na 0,75—1,0, a stosunek ilościowych oznaczeń ER-EIA/ER-RLA — na 1—2 (8, 10, 15).

Celem obecnej pracy było porównanie na własnym materiale wyników oznaczeń ER-EIA (przy użyciu zestawu handlowego) z wynikami rutynowo stosowanego (dla potrzeb klinicznych) wariantu metody RLA, ustalenie korelacji między nimi i — ewentualnie — określenia przyczyn różnic między wynikami tych metod.

MATERIAŁ I METODY

Materiał kliniczny stanowiły raki sutka (68 przypadków) oraz prawidłowa mięśniówka (24 przypadki) i mięśniaki (31 guzów) macicy kobiet. Tkanki te przechowywano przez okres do kilku miesięcy w ciekłym azocie. Metody przygotowania cytozoli i ekstraktów solnych (0,6 M KCl) z jądrowej frakcji homogenatów tkankowych oraz szczegółowy opis sposobu oznaczania ER metodą RLA (technika węglowo-dekstranowa) podano wcześniej (2). Do preparatyki cytozolu zamiast stosowanego zwykle buforu TEDG (2), użyto w obecnej pracy buforu o składzie podanym w instrukcji załączonej do zestawu do immunoenzymatycznego oznaczania ER (ER-EIA Monoclonal Diagnostic Kit, prod. Abbott Laboratories). Cytozole i ekstrakty jądrowe przechowywano przed oznaczeniem przez 2—3 dni w temp. -70°C . Oznaczenia EIA wykonano według instrukcji załączonej do handlowego zestawu ER-EIA. Białko (w cytozolach i ekstraktach jądrowych) oznaczano metodą Lowry'ego (11).

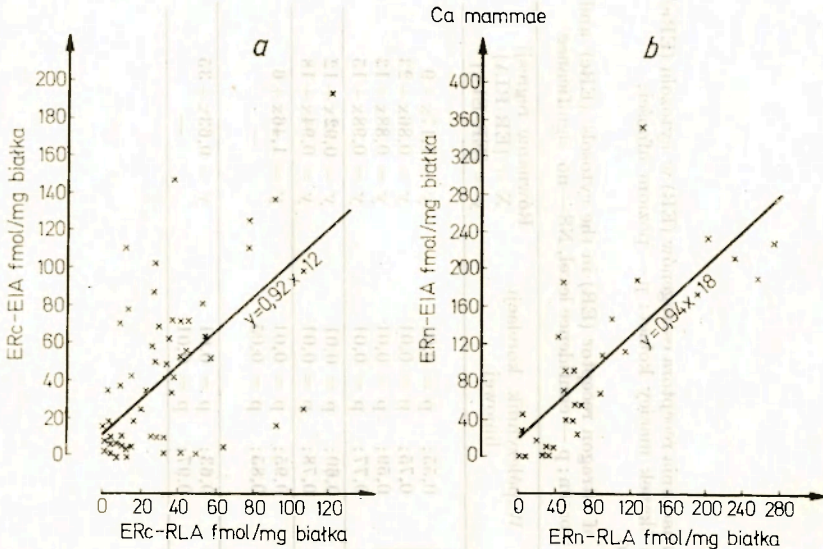
WYNIKI

1. Rak sutka

Wyniki immunoenzymatycznych oznaczeń ER w cytozolach (ERc) były z reguły (w 66% przypadków) większe niż wyniki oznaczeń RLA. W przypadku oznaczeń ER w ekstraktach jądrowych (ERn) prawidłowości takiej nie było (ryc. 1a, b). Średnie zawartości ERc—EIA i ERn—EIA dla całej badanej grupy raków sutka były większe niż odpowiednie wartości otrzymane metodą RLA, ale różnice te nie osiągały znamienności statystycznej (test „t” Studenta) (tab. I). Nachylenie linii regresji $[\text{ER-EIA}] = f[\text{ER-RLA}]$ zarówno dla oznaczeń ERc, jak i ERn tylko nieznacznie różniło się od 1,0 (tab. I). Zarówno w przypadku oznaczeń ERc, jak i ERn między wynikami metody EIA i RLA istniała statystycznie wysokoznamienna ($p = 0,01$) korelacja liniowa, ale dla oznaczeń ERn była ona silniejsza ($r \approx 0,8$) niż dla oznaczeń ERc ($r \approx 0,6$).

Średnie zawartości ERc i ERn w rakach kobiet do 50 roku życia były mniejsze niż odpowiednie wartości dla grupy kobiet starszych, zarówno w przypadku metody EIA, jak i RLA, ale różnica ta osiągała znamienność statystyczną tylko dla oznaczeń ERc—RLA. Natomiast nachylenie linii regresji (EIA vs. RLA) dla oznaczeń ERc u kobiet po 50 r.ż. było wyraźnie większe, a dla oznaczeń ERn — nieco mniejsze, niż odpowiednie wartości kobiet młodszych (tab. I).

W grupie 19 raków, w których wynik oznaczenia ERc—RLA mieścił się w granicach 0—5 fmoli/mg białka cytozolu (tzw. guzy receptoroujemne) tylko w 1 przypadku (5%) wynik oznaczenia ERc—EIA był wyraźnie do-



Ryc. 1. Porównanie wyników immunoenzymatycznej (EIA) i radioligandowej (RLA) metody oznaczania receptora estrogenów w cytozolach (ERc, ryc. 1a) i ekstraktach jądrowych (ERn, ryc. 1b) z raków sutka kobiet. Liniją ciągłą zaznaczono przebieg linii regresji.

Fig. 1. Comparison of results of immunoenzymatic (EIA) and radioligand (RLA) of the estrogen receptor in cytosols (ERC, fig. 1a) and nuclear extracts (ERN, fig. 1b) from breast cancers of women. Continuous line denotes regression line.

datni (powyżej 20 fmoli/mg białka). Natomiast w grupie 22 guzów, w których wynik oznaczenia ERc-EIA nie przekraczał 5 fmoli/mg białka, wykryto znaczną ilość ERc metodą RLA w 4 przypadkach (17%) (ryc. 1a.) Wśród 33 raków, które w metodzie RLA dawały wynik zdecydowanie dodatni, w 24 (73%) ocena ta została potwierdzona metodą EIA, a w 4 przypadkach (12%) wynik ERc-EIA był ujemny (0—5 fmoli/mg białka). Natomiast z 31 raków sutka, w których wynik ERc-EIA był zdecydowanie dodatni (kryterium jak wyżej), 24 (77%) uzyskało taką samą ocenę na podstawie oznaczenia ERc-RLA, a ocenę „receptoroujemny” — tylko 1 nowotwór (3%) (ryc. 1a).

2. Prawidłowa mięśniówka i mięśniaki macicy

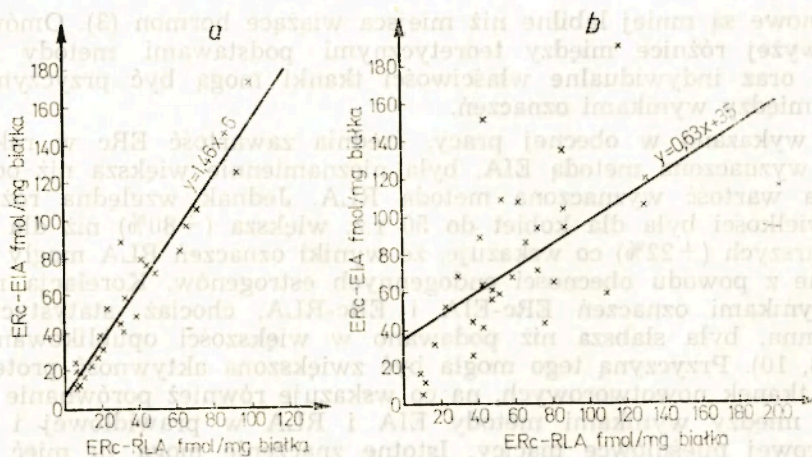
Wyniki oznaczeń ERc-EIA w prawidłowej mięśniówce dobrze korelowały z wynikami oznaczeń ERc-RLA, były jednak w każdym przypadku — większe (średnio 1,5-krotnie) (ryc. 2a), a różnica między średnimi z oznaczeń EIA i RLA była statystycznie istotna (tab. I). W przypadku oznaczeń ERc w mięśniakach korelacja między wynikami EIA i RLA była również statystycznie istotna, ale znacznie słabsza, a różnica średnich zawartości ERc-EIA i ERc-RLA nie osiągała znaczącości (tab. I, ryc. 2b). Wyniki oznaczeń ERn w nielicznych analizowanych pod tym względem próbkach prawidłowej i nowotworowej mięśniówki wykazywały podobną wysoką korelację międzymetodyczną, przy czym średnia z oznaczeń EIA była nieznamienne większa od odpowiadającej wartości wyznaczonej metodą RLA (tab. II).

Tabela I. Zestawienie wyników immunocytycznej (EIA) i radioligandowej (RLA) metody oznaczania receptora estrogenów (ER) w cytozolu (ERc) i ekstraktach jądrowych (ERn) z raków sutki oraz prawidłowych i nowotworowych tkanek macicy kobiet; p — poziom ufności;

NS — różnica statystycznie nieznamienne

Table 1. Results of immunocytochemical (EIA) and radioligand (RLA) methods of determination of estrogen receptor (ER) in the cytosols (ERc) and nuclear extracts (ERn) from breast cancers and normal and neoplastic tissues of the uterus of women; p — confidence level, NS — no significance

Rodzaj tkanki	Wiek pacjentek	Forma receptora (liczba oznaczeń)	Średnia zawartość receptora białka		EIA	Współczynnik korelacji liniowej	Równanie regresji	
			RLA	SD			X = [ER-RIA]	Y = [ER-EIA]
Rak sutki	29—50	ERc (30)	15 ± 16	27 ± 34	NS	0,55; p = 0,01	Y = 1,17x + 9	
		ERn (16)	53 ± 65					
	51—78	ERc (38)	35 ± 32	43 ± 47	NS	0,75; p = 0,01	Y = 0,86x + 23	
		ERn (29)	89 ± 76					
Prawidłowa mięśniówka macicy	29—78	ERc (68)	26 ± 28	36 ± 42	NS	0,60; p = 0,01	Y = 0,92x + 12	
		ERn (30)	77 ± 74					
	32—64	ERc (24)	35 ± 26	58 ± 40	p = 0,01	0,78; p = 0,01	Y = 0,94x + 18	
		ERn (5)	40 ± 17					
Mięśniaki macicy	32—64	ERc (31)	64 ± 42	76 ± 42	NS	0,95; p = 0,01	Y = 1,46x + 6	
		ERn (4)	63 ± 36					
				108 ± 94		0,85; p = 0,05		
						0,63; p = 0,01	Y = 0,63x + 35	
						0,97; p = 0,01	—	



Ryc. 2. Porównanie wyników immunoenzymatycznej (EIA) i radioligandowej (RLA) metody oznaczania receptora estrogenów w cytosolach z prawidłowych mięśniówek macicy (a) i mięśniaków macicy kobiet (b). Linia ciągłą zaznaczono przebieg linii regresji.

Fig. 2. Comparison of results of immunoenzymatic (EIA) and radioligand (RLA) methods of determination of estrogen receptor in cytosols from normal myometrium (a) and uterine myomas of women (b). Continuous line denotes the course of regression line.

DYSKUSJA

Zdolność ER do swoistego wiązania estrogenów wynika z istnienia w cząsteczce receptora swoistej domeny wiążącej (6, 9). Domena ta może wiązać estrogen także w izolacji od reszty cząsteczki (16), natomiast jej uszkodzenie prowadzi na ogół do utraty tej zdolności (9). Nowotwory tkanek docelowych dla estrogenów mogą zawierać zwiększone — w porównaniu z tkanką prawidłową — ilości proteaz, których działanie może powodować uszkodzenie ER (4, 12). Białko receptorowe może również tracić zdolność wiązania estrogenów wskutek defosforylacji (1). W obu przypadkach oznaczenie ER metodą RLA staje się niemożliwe. Wynik oznaczenia ER metodą RLA może również ulec zniżeniu wskutek obecności endogennych estrogenów, które blokują miejsca wiążące (15). Wykonanie oznaczeń ER metodą RLA w podwyższonej temperaturze (metodą wymiany) pozwala oznaczyć także ER związane z endogennym hormonem, ale zwiększa ryzyko jego enzymatycznej degradacji.

Metoda immunoenzymatyczna pozwala ominąć niektóre problemy związane z metodą RLA, ale niesie ze sobą inne. W metodzie EIA wykorzystuje się technikę warstwową („sandwich”), tj. używa się 2 przeciwciał, skierowanych przeciwko różnym determinantom antygenowym ER. Jeden z nich położony jest w obrębie domeny wiążącej estrogen, drugi — poza nią (6). Mogą one być obecne także w uszkodzonej cząsteczce receptora, niezdolnej do swoistego wiązania estrogenu, ale dla oznaczenia ER metodą EIA w technice warstwowej oba te determinanty muszą być zachowane i dostępne dla przeciwciał, natomiast endogenne estrogeny nie mają wpływu na wynik oznaczenia. Determinanty

antygenowe są mniej labilne niż miejsca wiążące hormon (3). Omówione powyżej różnice między teoretycznymi podstawami metody EIA i RLA oraz indywidualne właściwości tkanki mogą być przyczynami różnic między wynikami oznaczeń.

Jak wykazano w obecnej pracy, średnia zawartość ERc w rakach sutka, wyznaczona metodą EIA, była nieznamiennie większa niż odpowiednia wartość wyznaczona metodą RLA. Jednak względna różnica tych wielkości była dla kobiet do 50 r.ż. większa (+80%) niż dla kobiet starszych (+22%) co wskazuje, że wyniki oznaczeń RLA mogły być zaniżone z powodu obecności endogennych estrogenów. Korelacja między wynikami oznaczeń ERc-EIA i ERc-RLA, chociaż statystycznie znamienne, była słabsza niż podawano w większości opublikowanych prac (8, 10). Przyczyną tego mogła być zwiększona aktywność proteolityczna tkanek nowotworowych, na co wskazuje również porównanie korelacji między wynikami metody EIA i RLA w prawidłowej i nowotworowej mięśniówce macicy. Istotne znaczenie mogą tu mieć nawet drobne, międzylaboratoryjne różnice w sposobie przygotowania ekstraktów tkankowych oraz różnice w jakości odczynników. Zwraca natomiast uwagę fakt, że korelacja między oznaczeniami ERn-EIA i ERn-RLA była wysoka dla wszystkich badanych tkanek. Wynika to prawdopodobnie stąd, że procedura przygotowania ekstraktów z jądrowej frakcji homogenatów tkankowych powoduje usunięcie większości proteaz (5).

Analiza wyników oznaczeń ERc w rakach sutka według przyjętych wcześniej (14) praktyczno-klinicznych kryteriów oceny stanu receptorowego tych nowotworów (podział na guzy receptoroujemne i receptorododatnie z wyodrębnieniem grupy pośredniej) wskazuje, że zgodność wyników oznaczeń EIA i RLA jest dobra. Ostateczne potwierdzenie tej oceny może jednak przynieść jedynie analiza wyników oznaczeń w świetle wyników endokrynnnej terapii chorych na raka sutka.

C. Храпуста, Б. Конопка, З. Пашко, Х. Падзик

ОБОЗНАЧЕНИЕ РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРОГЕНОВ В ОПУХОЛЯХ И ПРАВИЛЬНЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ТКАНЯХ — СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИММУНОЭНЗИМАТИЧЕСКОГО И РАДИОЛИГАНДОВОГО МЕТОДА

Резюме

Сопоставлено результаты обозначений рецептора эстрогенов (ER) в цитозолях и экстрактах ядерной фракции гомогенизированных опухолей молочной железы, правильного миометрия и миомах матки женщин, полученных радиолигандовым методом (RLA, угельно-декстрановая техника) и иммуноэнзиматическим методом (EIA, слоистая техника с применением моноклональных антител). Доказано умерную ($r \approx 0,6$) корреляцию между результатами обозначений методом RLA и EIA в цитозолях из опухолей молочной железы и миом матки, и большую ($r \approx 0,9$) корреляцию между результатами аналогичных обозначений ER в цитозолях из правильного миометрия и ядерных экстрактах из исследованных тканей.

Констатировано, что оценка рецепторного состояния опухолей молочной железы на основании результатов обозначений ER методом RLA, согласно с прежде принятыми практическими и клиническими критериями, в $3/4$ случаев сходна с оценкой проведенной на основании результатов обозначений ER методом EIA.

S. Chrapusta, B. Konopka, Z. Paszko, H. Padzik

DETERMINATION OF ESTROGEN RECEPTOR ASSAY IN NEOPLASTIC AND NORMAL HUMAN TISSUES — A COMPARISON OF RESULTS OF IMMUNOENZYMATIC AND RADIOLIGAND ASSAYS

Summary

Results of determination of the estrogen receptor (ER) in cytosols and in extracts from nuclear fractions of homogenates of breast cancers, normal myometrium and uterine myomas of women, obtained using radioligand method (RLA, charcoal-dextran technique) and immunoenzymatic method (EIA, stratification technique with monoclonal antibodies) are compared.

A moderate ($r \approx 0.6$) correlation between results of RLA and EIA in cytosols from breast cancers and uterine myomas, and marked ($r \approx 0.9$) correlation between results of analogous determinations of ER in cytosols from normal myometrium and in nuclear extracts from examined tissues is shown. It has been found that the evaluation of receptor state of breast cancer in connection with results of RLA method in the light of previously precised clinico-practical criterions is in 3/4 of cases concordant with evaluation based upon the connection with results of EIA method.

PIŚMIENICTWO

1. Auricchio F., Migliaccio A., Castoria G., Rotondi A., DiDomenico M., Pagano P.: Activation-inactivation of hormone binding sites of the oestradiol 17β -receptor is a multiregulated process. *J. Steroid Biochem.* 1986, 24, 39. — 2. Chrapusta S., Sieński W., Konopka B., Paszko Z., Szamborski J.: Stężenia receptorów estrogenów i progestagenów w mięśniakach macic kobiet podczas cyklu miesięczkowego. *Nowotwory* 1987, 1988, 38, 23. — 3. DeSombre E. R., Greene G. L., King W. J., Jensen E. V.: Estrogen receptors, antibodies, and hormone dependent cancer. *W: Hormones and Cancer*, wyd. Alan R. Liss, Inc., New York 1984, 1. — 4. Garola R. E., McGuire W. L.: Estrogen receptor and proteolytic activity in human breast cancer nuclei. *Cancer Res.* 1977, 37, 3329. — 5. Geier A., Cocos M., Ginzburg R., Haimsohn M., Lunenfeld B.: Estradiol binding to nuclear receptors in human breast cancer tissue (MCF-7 cell line) and in dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1979, 49, 34. — 6. Greene G. L., Sobel N. B., King W. J., Jensen E. V.: Immunochemical studies of estrogen receptors. *J. Steroid Biochem.* 1984, 20, 51. — 7. Howat J. M. T., Harris M., Swindell R., Barnes D. M.: The effect of estrogen and progesterone receptors on recurrence and survival in patients with carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer* 1985, 5, 263. — 8. Jordan V. C., Jacobson H. I., Keenan E. J.: Determination of estrogen receptor in breast cancer using monoclonal antibody technology: results of a multicenter study in the United States. *Cancer Res.* 1986, 46, 4237s. — 9. Kumar V., Green S., Staub A., Chambon P.: Localization of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *EMBO J.* 1986, 5, 2231. — 10. Leclercq G., Bojar H., Goussard J., Nicholson R. I., Pichon M., Piffanelli A., Pousette A., Thorpe S., Lonsdorfer M.: Abbott monoclonal enzyme immunoassay measurement of estrogen receptors in human breast cancer: a European multicenter study. *Cancer Res.* 1986, 46, 4233s.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265. — 12. Maeda K., Tsuzimura T., Nomura Y., Sato B., Matsumoto K.: Partial characterization of protease (s) in human breast cancer cytosols that can degrade estrogen and progesterone receptors selectively. *Cancer Res.* 1984, 44, 996. — 13. Paszko Z., Padzik H., Pieńkowska F., Chrapusta S., Konopka B., Peczek D.: Receptory hormonów steroidowych; występowanie w rakach sutka kobiet; przydatność do doboru chorych do endokrynnej terapii i prognozowania tempa rozwoju choroby. *Pol. Tyg. Lek.* 1983, 38, 677. — 14. Pieńkowska F., Paszko Z., Padzik H., Dziadek T.: Porównanie skutków endokrynnej terapii u kobiet chorych na raka sutka z obecnością receptora estrogenowego w tkance nowotworowej. *Nowotwory* 1980; 30, 25. — 15. Pousette A., Gustafsson S. A., Thornblad A. M., Nordgren A., Sallstrom J., Lindgren A., Sautelin P., Gustafsson J. A.: Quantitation of estrogen receptor in seventy five specimens of breast cancer: comparison between

an immunoassay (Abbott ER-EIA Monoclonal) and a (³H)-estradiol binding assay based on isoelectric focusing in polyacrylamide gel. *Cancer Res.* 1986, 42, 4308s. — 16. *Rusconi S., Yamamoto K. R.*: Functional dissection of the hormone and DNA binding activities of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1987, 5, 1309.

Adres autora; Samodzielna Pracownia Endokrynologii Onkologicznej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, 00-973, ul. Wawelska 15.

Praca wpłynęła do redakcji: 1987. 12.19

KOMUNIKAT

Rada ds. AIDS przy Ministrze Zdrowia i Opieki Społecznej uprzejmie informuje, że dla określenia choroby AIDS została ustalona polska nazwa „Nabyty Zespół Upośledzenia Odporności” i żadna inna nazwa nie powinna być używana.

W podpisie Sekretarza Rady ds. AIDS
Jan Suchowiak