

A. Czekierdowski, S. Czekierdowska,
W. Bednarek, J. Daniłoś, D. Morawska

I Katedra i Klinika Ginekologii
Onkologicznej i Ginekologii UM
w Lublinie

Address for correspondence/
Adres do korespondencji:

I Katedra i Klinika Ginekologii
Onkologicznej i Ginekologii UM
w Lublinie

ul. Staszica 16, 20-081 Lublin

tel./fax: 81-53-206-08

e-mail: a.czekierdowski@am.lublin.pl

Received: 31.05.2010

Accepted: 08.06.2010

Published: 10.06.2010

Id-2 protein expression and microvessel density assessment in various types of malignant ovarian tumors

Ocena ekspresji białek Id2 i gęstości mikronaczyń w różnych typach złośliwych nowotworów jajnika

Original article/Artykuł oryginalny

Summary

Background. Recent data indicate that inhibitors of DNA binding/inhibitors of differentiation (Id) protein family (Id-1, -2, -3 and -4) proteins may play a significant role in the progression, neoangiogenesis control and metastases formation of various types of malignancies, including ovarian cancer

Aims. Our aim was to assess if the expression of Id2 proteins is associated with selected clinical features and microvessel density in women with malignant ovarian tumors.

Material and methods. The study group included 56 women operated because of ovarian cancer. The findings were correlated with the tumor type, histological grading and tumor FIGO stage. Tumor Id2 protein expression was assessed by immunohistochemistry and microvessel density was examined as CD-34 expression.

Results. The mean age of the patients was $57 \pm 12,8$ (SD) years and 37 (66,1%) of women in this group were postmenopausal. Histological examination revealed that there 27 were serous ovarian cancers (n=27), 12 mucinous cancers, 4 endometrioid cancers and 13 other malignant tumors. Expression of Id2 protein estimated semiquantitatively (as 1 to 9 points) was found in 52 cases. Id2 protein was found in both nuclei and cytoplasm of cancer cells, however, some staining was seen in pericytes adjacent to tumor microcapillary lumen. Patients menopausal status had no influence on the intensity of protein staining. Low FIGO stage (I and II) tumors had medium or high Id2 expression. Microvessel density, but not Id2 expression was significantly correlated with tumor histological type ($p=0,008$) with the lowest values found in serous tumors and the highest values found in mucinous cancers. A significant correlation between Id2 expression and MVD was found ($R=0,38$; $p=0,003$). The median of MVD was almost twice lower in a group of cancers with low when compared to high Id2 protein expression.

Conclusions. Our results indicate that Id2 protein with microvessel density assessment may be used as additional prognostic factors in women with various types of malignant ovarian tumors.

Key words: ovarian cancer, Id2 protein, CD34, microvessel density

Streszczenie

Wprowadzenie. Białka z grupy Id (Id1, Id2, Id3, Id4) odgrywają istotną rolę w procesie wzrostu różnych nowotworów oraz mają wpływ na angiogenezę w guzach złośliwych.

Cel pracy. Celem pracy było zbadanie czy ekspresja białka Id2 oceniana immunohistochemicznie w guzach złośliwych jajnika może mieć związek z gęstością mikronaczyń nowotworowych ocenianych przy pomocy markera CD34.

Material i metody. W grupie 56 zbadanych guzów złośliwych stwierdzono ekspresję Id2 w 52 przypadkach. W grupie kobiet przed menopauzą ekspresja białka Id2 była wyższa w porównaniu z grupą kobiet po menopauzie, jednak status menopauzalny nie miał istotnego wpływu na intensywność ekspresji Id2. Gęstość mikronaczyń różniła się istotnie w zależności od rodzaju histologicznego guza ($p=0,008$). Najniższe wartości MVD stwierdzono w guzach surowiczych, a najwyższe w guzach śluzowych. W przypadkach potwierdzonej ekspresji białka Id2 nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w różnych typach histologicznych nowotworów złośliwych ($p=0,58$). Stwierdzono istotne statystycznie zależności między gęstością mikronaczyń a ekspresją białka Id2 ($R=0,38$; $p=0,003$). W grupie o słabej ekspresji białka Id2 stwierdzono, że mediana gęstości mikronaczyń jest prawie dwukrotnie niższa w porównaniu z grupą o wysokiej ekspresji Id2.

Wyniki. Wyniki omawianych badań wskazują, że ocena ekspresji Id2 może stanowić dodatkowy parametr prognostyczny charakteryzujący różne typy złośliwych guzów jajnika.

Słowa kluczowe: rak jajnika, białko Id2, CD34, mikroangiogeneza

STATISTIC STATYSTYKA

Word count Liczba słów 2752/2604

Tables Tabele 1

Figures Ryciny 6

References Piśmiennictwo 25

INTRODUCTION

Ovarian cancer, due to long and asymptomatic development and very often advanced clinical stage at diagnosis, is one of genitourinary tract neoplasms in females related to the poorest prognosis. Malignant tumor development usually begins from genetic changes found in ovarian surface epithelium. The reasons of such changes development are barely known. However, it is a well known fact that in the majority of ovarian cancer cases we can observe oncogenes activation with simultaneous inactivation of tumor suppressors. HLH (Helix-Loop-Helix) transcription factors family members exert essential functions in various regulatory mechanisms [1,2]. These proteins play pivotal role in regulation of such processes as expression of many important genes, cell cycle control and cell differentiation [3]. Highly conservative HLH region found in these proteins is responsible for homo- and heterodimerization that is indispensable for DNA binding and transcription regulation. The members of HLH proteins subfamily called Id (Inhibitor of differentiation/DNA synthesis) lack basic region and hence are not able to bind DNA. Nevertheless, the proteins are able to bind to HLH transcription factors. Id-HLH heterodimers serve as negative regulators of transcription factors [4]. The majority of HLH proteins stimulate gene expression. On the other hand, Id proteins inhibit gene expression and prevent HLH transcription factors from DNA binding. Up to now four proteins of Id family were described: Id1, Id2, Id3 and Id4. *Id* genes are expressed mainly in embryonic cells and in differentiating cells [5,6].

The latest studies show that Id proteins are important factors influencing early stage of carcinogenesis in liver cells, endometrial epithelial cells and uterine cervix epithelial cells. Moreover, some studies demonstrate that increased *Id* genes expression in malignant tumors can be a marker of aggressive phenotype of the cancer, poor prognosis and increased angiogenic potential of the tumor. The described lesions were found in various malignant tumors such as pancreatic cancer, glioma, colon cancer and myeloma [6,7,8,9].

So far little is known about the role of Id genes expression disturbances in patients with ovarian cancer. Id2 protein serves as a tumor suppressor that inhibits expression of proteins related to cell proliferation such as p16 and p21 and hence acts as an antagonist of Id1 protein [6].

In physiologic conditions, Id2 protein is responsible for cell differentiation control and is especially important during embryo- and organogenesis. The protein is also regulated by androgens during spermatogenesis [10]. Abnormal Id2 expression leads to excessive and uncontrolled proliferation of cells. Id2 inhibits signaling pathways of Rb protein that is a major cell cycle controlling factor [1]. Rb signaling pathway suppression is characteristic for carcinogenesis and was observed in the majority of malignant tumors [2,11]. The results of our study

WSTĘP

Rak jajnika ze względu na długotrwały i bezobjawowy rozwój oraz najczęściej rozpoznanie choroby w zaawansowanym stadium klinicznym jest jednym z najgorzej rokujących nowotworów narządów płciowych u kobiet. Nowotwór złośliwy najczęściej rozwija się na podłożu zmian genetycznych w komórkach nabłonka powierzchniowego jajnika. Przyczyny powstawania tych zmian są słabo poznane. Wiadomo jednak, że w większości przypadków raka jajnika można zaobserwować aktywację onkogenów z jednoczesną inaktywacją genów supresorowych. Wśród różnych mechanizmów regulacyjnych istotną funkcję pełnią czynniki transkrypcyjne należące do rodziny białek HLH („Helix-Loop-Helix”) [1,2]. Białka te odgrywają istotną rolę w procesach odpowiedzialnych za ekspresję szeregu ważnych genów, kontrolę cyklu komórkowego oraz w różnicowaniu komórek [3]. Wysoce konserwatywny region HLH tych białek pośredniczy przede wszystkim w procesie homo- i heterodimeryzacji, który jest niezbędny dla wiązania się DNA i regulacji jego transkrypcji. Białka podrodziny HLH określane jako białka „Id” (od „Inhibitor of differentiation/DNA synthesis”) wykazują brak regionu łączącego i w związku z tym nie posiadają zdolności wiązania z DNA. Mogą się natomiast łączyć z czynnikami transkrypcyjnymi HLH. Powstające heterodimery Id-HLH pełnią funkcję negatywnych regulatorów czynników transkrypcyjnych [4]. Podczas gdy większość białek HLH wpływa stymulująco na ekspresję genów, białka Id działają hamująco, co uniemożliwia wiązanie DNA z czynnikami transkrypcyjnymi HLH. Jak dotąd opisano cztery białka tej grupy określane jako Id1, Id2, Id3 oraz Id4. Geny *Id* wykazują ekspresję przede wszystkim w komórkach w czasie rozwoju embrionalnego oraz w komórkach podlegających różnicowaniu. [5,6]

Najnowsze doniesienia wskazują, że białka Id są istotnymi czynnikami mającymi wpływ na wczesną fazę transformacji nowotworowej między innymi komórek wątroby, komórek nabłonka błony śluzowej endometrium oraz szyjki macicy. Wyniki szeregu badań wskazują ponadto, że stwierdzenie zwiększonej ekspresji genów *Id* w nowotworach złośliwych może być markerem bardziej agresywnego fenotypu nowotworu, co związane jest z gorszym rokowaniem oraz ze zwiększonym potencjałem angiogennym guza. Opisywane zmiany potwierdzono między innymi w takich nowotworach złośliwych jak: rak trzustki, glejaki, raki jelita grubego i szpiczaki [6,7,8,9].

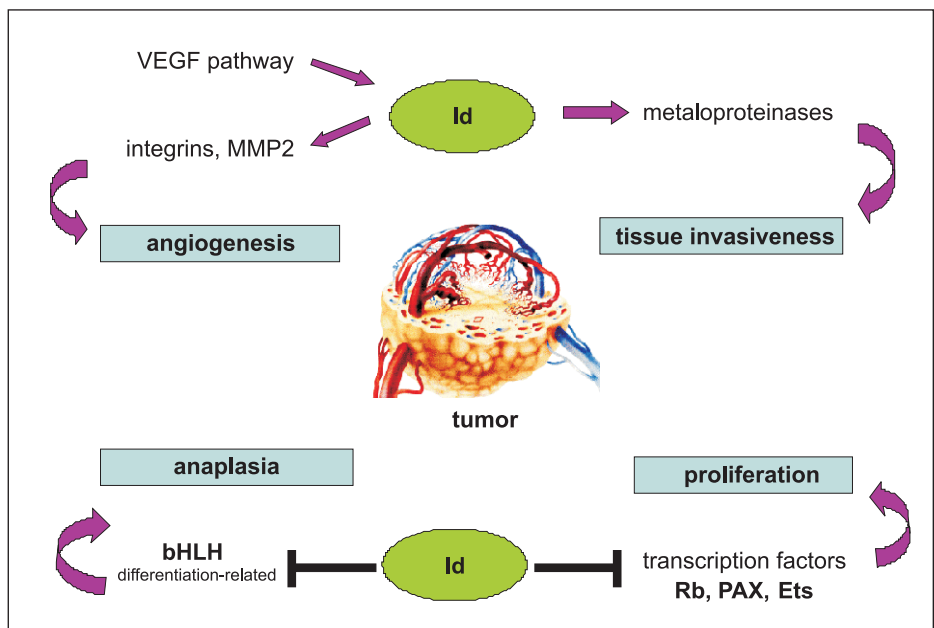
Jak dotąd niewiele wiadomo na temat znaczenia zaburzonej ekspresji genów Id u chorych na raka jajnika. Białko z rodziny Id określane jako Id2 pełni funkcję czynnika supresorowego, który blokuje ekspresję białek związanych z proliferacją jak p16, p21 i jest w związku z tym swoistym antagonistą białka Id1 [6].

W warunkach fizjologicznych białko Id2 odpowiedzialne jest za kontrolę procesów różnicowania komórek, co ma szczególne znaczenie podczas embrio- i organogenezy. Białko to podlega również regulacji androgennej w procesie spermatogenezy [10]. Nieprawidłowa ekspre-

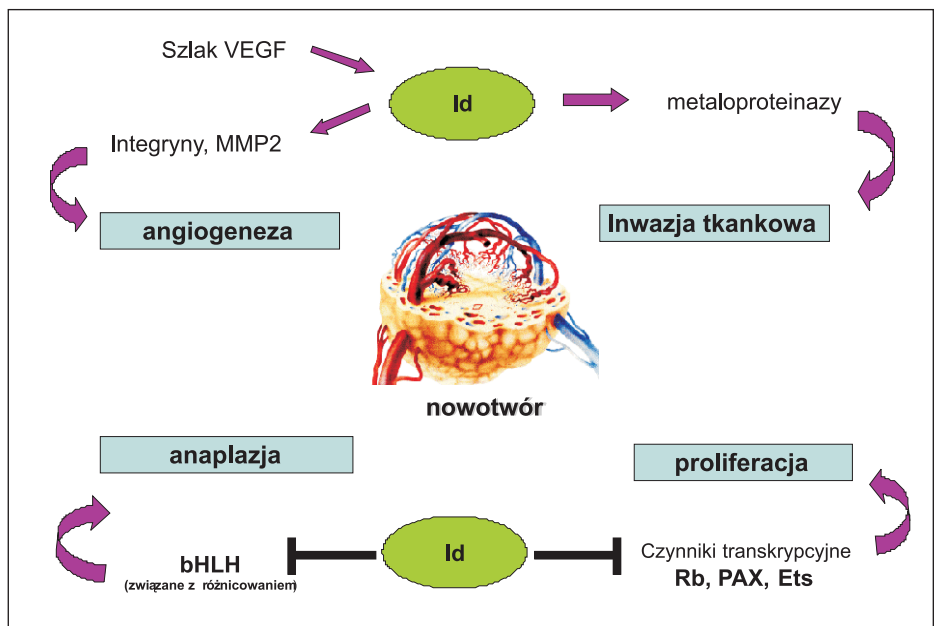
suggest that up-regulation of Id1 and Id2 proteins is often observed in ovarian cancer and is not related to histological type of the tumor [12,13]. Lack of differences of Id2 expression in various stages of the disease suggests that Id2 expression changes develop at the very early phase of carcinogenesis [13].

sja Id2 prowadzi do nadmiernej i niekontrolowanej proliferacji komórek. Białko to ma wpływ hamujący szlaki związane z białkiem Rb jednym z istotnych czynników kontrolujących cykl komórkowy [1]. Supresja szlaku związanego z białkiem Rb jest charakterystyczna dla karcinogenezy, zjawisko to potwierdzono w większości nowotworów złośliwych [2, 11]. Uzyskane przez nas wyniki badań wstępnych sugerują, że zwiększona ekspresja białek Id1 i Id2 często towarzyszy rozrostom nowotworowym jajnika i nie jest zależna od rodzaju histologicznego guza złośliwego [12,13]. Brak istotnych różnic w zależności od stopnia zaawansowania choroby sugeruje, że zaburzenia związane z ekspresją białek Id2 prawdopodobnie pojawiają się na bardzo wczesnym etapie procesu karcinogenezy [13].

Fig. 1. Interactions of Id proteins as factors that are able to control four major processes involved in carcinogenesis (uncontrolled proliferation, anaplasia, neoangiogenesis and tissue invasiveness)



Ryc. 1. Schemat interakcji białek Id jako czynników kontrolujących cztery najważniejsze procesy związane z transformacją nowotworową to znaczy: niekontrolowana proliferacja, anaplazja, neoangiogeneza i inwazja tkankowa.



Lyden et al. [9] in a model of transgenic mice with Id gene defect have shown that these proteins play a crucial role in tumor angiogenesis. However, the correlation between Id proteins and serum markers of angiogenesis as well as microvessels density (analyzed using immunochemistry methods) is still not examined. Many authors suggested that angiogenesis marker can serve as an additional prognostic factor in rapidly growing malignant tumors [21,22]. Quantitative microvessel density analysis (MVD) is the most commonly applied method for angiogenesis evaluation [14,15]. MVD value can be used as an additional parameter for overall survival estimation in patients with various types of malignant tumors and to predict individual response to chemotherapy [16]. Regulatory signaling pathways related to Id proteins are able to control various processes important for carcinogenesis and angiogenesis (Fig. 1). The aim of our study was to analyze the relationship between Id2 expression and microvessel density and selected clinical and histological features of ovarian cancer patients.

MATERIAL AND METHODS

The study included 56 women surgically treated for malignant ovarian tumors in I Oncologic Gynecology and Gynecology Ward, Medical University of Lublin between 2006 and 2008. Each patient was analyzed according to age and menopausal status. The analysis considered histological type, histological grading and FIGO staging. Menopausal status of the patients was defined as patient's age at one year after the last menstrual bleeding or, in women with the history of hysterectomy, completion of 50 years of age. Histological analysis and immunohistochemistry was performed in samples taken from central, representative part of the tumor without areas of necrosis and tumor infiltration of other organs. Immunohistochemistry was performed on formalin fixed, paraffin embedded tissue sections (5 μ m thick). After deparaffination and hydration of tissue samples in alcohol series the samples were incubated in citrate buffer (0.01 M; pH 6.0) in water bath for 30 minutes in 95-97°C to expose antigenic determinant. Endogenous peroxidase activity was inhibited using 3% solution of hydrogen peroxide for 20 minutes in room temperature. The slides were washed 3 times for 5 minutes in TBS buffer and next incubated with primary antibody against Id2 (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluted 1:100, overnight in 4°C and against CD34 (Dako, Cytomation) diluted 1:100, for 1 hour in room temperature. In the next step we used streptavidin/biotin complex labeled secondary antibody conjugated with peroxidase (LSAB2/HRP kit; DAKO, Denmark). Peroxidase was detected using a chromogen - a solution of 3,3-diaminobenzidine tetrachloride (DAB) (DAKO Denmark). In addition to that, the slides were stained with Mayer's hematoxylin. Identically prepared tumor slides without incubation with antibodies served as a negative control. In accordance with manufacturer's recommendations, normal testis samples

Lyden i wsp. [9] w badaniach nad rolą białek Id wykonanych na transgenicznym myszach z defektem genu Id stwierdzili, że białka te pełnią krytyczną rolę w powstawaniu naczyń w guzach. Nie zbadano jednak dotychczas możliwego związku białek Id z surowiczymi markerami angiogenezy oraz gęstością mikronaczyń ocenianą immunohistochemicznie. W szeregu prac zasugerowano, że markery te mogą być dodatkowym czynnikiem prognostycznym w przypadku szybko rosnących guzów złośliwych [21,22]. Najczęściej stosowaną metodą oceny angiogenezy jest ilościowe badanie gęstości mikronaczyń (MVD) [14, 15]. MVD może być wykorzystywana jako dodatkowy parametr prognozowania długości przeżycia chorych na różne rodzaje nowotworów złośliwych oraz w prognozowaniu indywidualnej odpowiedzi na chemioterapię [16]. Szlaki regulatorowe związane z białkami Id kontrolują szereg procesów istotnych dla kancerogenezy i angiogenezy (Ryc.1). Celem pracy była ocena zależności pomiędzy ekspresją białka Id2 i gęstością mikronaczyń a wybranymi cechami klinicznymi i histologicznymi nowotworów złośliwych jajnika u kobiet.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto grupę 56 kobiet, które były leczone operacyjnie z powodu guzów złośliwych jajnika w I Klinice Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie w latach od 2006 do 2008 roku. U każdej pacjentki odnotowano wiek oraz jej status menopauzalny. W analizie uwzględniono typ histologiczny i stopień zróżnicowania histologicznego guza, stadium zaawansowania klinicznego wg FIGO. Status menopauzalny pacjentek zdefiniowano jako wiek, w którym upłynął minimum rok od ostatniego krwawienia albo u kobiet po wcześniejszym usunięciu macicy, ukończone 50 lat życia. Materiał do badań histologicznych i immunohistochemicznych pobrano z centralnej reprezentatywnej części zmiany z pominięciem obszarów martwiczych oraz obszarów naciekania sąsiednich narządów. Badania immunohistochemiczne wykonano na skrawkach parafinowych o grubości 5 mm utrwalonych w formalinie. Po odparafinowaniu i uwodnieniu materiału tkankowego w szeregu alkoholowym zastosowano procedurę odsłonięcia determinanty antygenowej wykorzystując inkubację preparatów w buforze cytrynianowym (0,01 M; pH 6,0) w łaźni wodnej przez 30 min w temp. 95-97°C Aktywność endogennej peroksydazy blokowano 3% roztworem nadtlenu wodoru przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Preparaty płukano każdorazowo 3x5min w buforze TBS, a następnie inkubowano z przeciwciałem pierwotnym skierowanym przeciwko badanemu antygenowi Id2 (Santa Cruz Biotechnology, USA) w rozcieńczeniu 1:100 przez noc w temp. 4°C oraz przeciwko antygenowi CD34 (Dako, Cytomation) 1:100 przez 60 min; w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie zastosowano przeciwciało wtórne z kompleksem streptawidyna/biotyna skoniugowanym z peroksydazą (LSAB2/HRP kit; DAKO, Dania). Peroksydazę wykry-

with confirmed Id2 expression, served as a positive control for Id2 staining. Histological analysis of tumor samples was performed on Olympus CX41 microscope equipped with DP12 digital camera. Microscopic images were analyzed and archived using DP-Soft software (Olympus, Japan).

wano przy użyciu chromogenu roztworu czterochlorku 3'-3-diaminobenzzydyny (DAB) (DAKO Dania). Preparaty zostały dodatkowo wybarwione hematoksyliną Mayer'a. Kontrolę negatywną stanowiły identycznie przygotowane preparaty guzów, ale bez zastosowania przeciwciał. W kontroli pozytywnej markera Id2 wykorzystano wg zaleceń producenta fragmenty prawidłowego jądra męskiego, gdzie potwierdzono ekspresję białka Id2.

Tab. 1. Id2 expression and microvessel density (MVD-CD34) in ovarian cancer samples according to menopausal status, clinical staging according to FIGO, histological grading and histological type of the cancer

	n	Id2 expression (range)	P	MVD-CD34 (range)	P
Menopausal status					
Before MNP	19	6 (5-8)	Z= -1,08 p=0,27	24,1 (11,8-35,7)	Z=1,55 p=0,11
After MNP	37	5 (3-7)		29,7 (21,9-39,8)	
Histological grading					
G1	6	8 (4-8)	H=2,41 p=0,29	31,9 (24,9-41,5)	H=1,54 p=0,46
G2	25	5 (0-7)		22,8 (12,4-36,2)	
G3	25	5 (3-7)		29,2 (22,8-39,8)	
FIGO staging					
I(15)+II(3)	18	6 (4-8)	Z=1,28 p=0,19	31,8 (22,8-39,8)	Z=0,96 p=0,33
III(34)+ IV(4)	38	5 (3-7)		26,2 (15,6-36,2)	
Histological type					
Serous	27	5 (0-8)	H=1,93 p=0,58	21,9 (13-34,1)	H=11,78 p=0,008
Mucinous	12	6 (5-7)		38,6 (31,2-48,2)	
Endometrioid	4	5 (4,7)		28,5 (24,3-34,3)	
other	13	5 (5-6)		28,8 (12,4-37-8)	

MNP – menopause

MVD-CD34 – microvessel density assessed as CD34 antigen expression

Tab. 1. Ekspresja białka Id2 oraz gęstość mikronaczyń (MVD-CD34) w nowotworach złośliwych jajnika w zależności od statusu menopauzalnego, stopnia zaawansowania klinicznego wg FIGO, oraz stopnia zróżnicowania histologicznego i podziału histologicznego

	n	Ekspresja Id2 (zakres)	P	MVD-CD34 (zakres)	P
Status menopauzalny					
Przed MNP	19	6 (5-8)	Z= -1,08 p=0,27	24,1 (11,8-35,7)	Z=1,55 p=0,11
Po MNP	37	5 (3-7)		29,7 (21,9-39,8)	
Stopień zróżnicowania histologicznego					
G1	6	8 (4-8)	H=2,41 p=0,29	31,9 (24,9-41,5)	H=1,54 p=0,46
G2	25	5 (0-7)		22,8 (12,4-36,2)	
G3	25	5 (3-7)		29,2 (22,8-39,8)	
Stopień zaawansowania klinicznego wg FIGO					
I(15)+II(3)	18	6 (4-8)	Z=1,28 p=0,19	31,8 (22,8-39,8)	Z=0,96 p=0,33
III(34)+ IV(4)	38	5 (3-7)		26,2 (15,6-36,2)	
Typ histologiczny					
Surowicze	27	5 (0-8)	H=1,93 p=0,58	21,9 (13-34,1)	H=11,78 p=0,008
Śluzowe	12	6 (5-7)		38,6 (31,2-48,2)	
Endometrioidalne	4	5 (4,7)		28,5 (24,3-34,3)	
pozostałe	13	5 (5-6)		28,8 (12,4-37-8)	

MNP – menopauza

MVD-CD34 – gęstość mikronaczyń oceniana jako ekspresja antygenu CD34

Semi-quantitative assessment of Id2 expression was performed according to the method published by Shindl et al. [18] modified to analyze the differences in localization of color reaction. We determined the percentage content of cancer cells expressing Id2 in comparison to all cells in the field of view. Additionally, we assessed the intensity of color reactions. If the expression was found in 1-10% of cells, the sample was given 1 point, in 11-30% of cells - 2 points, in 31-50% of cells - 3 point, in 51-80% of cells - 4 points and over 80% of cells - 5 points. Weak reaction was given 1 point, medium - 2 points and intense reaction - 3 points. Depending on the localization of Id2 expression in nuclear and/or cytoplasmic area, a positive reaction was given additional 1 or 2 points. Total number of points for each sample were ranging from 0 to 10 points. Depending on the number of points obtained during analysis, Id2 expression was considered as follows: 0-3 points as lack of expression or weak expression, 3.1-6.9 points as medium and more than 7 points as high.

Microvessels density was assessed using Weidner *et al.* method [14]. The method was used to detect regions of the preparation containing the highest number of stained microvessels (x40 and x100 magnification). Next, the selected regions were analyzed using x200 magnification to find capillaries. The analysis did not concern the vessels larger than 20 μm in diameter. In each tumor sample five selected regions containing the highest number of microvessels were analyzed. Mean values of the results obtained in subsequent measurements were counted and statistically analyzed. Each brown-stained cell or group of cells, separated from surrounding microvessels, tumor cells or other elements of connective tissue was counted as a separate microvessel. According to Weidner's suggestion the presence or absence of capillary lumen was not considered.

Statistical analysis was performed using Statistica v. 6.0 software (Statsoft, Poland). Because of abnormal distribution of the analyzed parameters, to assess statistical significance of the results we performed Mann-Whitney U test for two samples and ANOVA analysis using Kruskal method for more than two samples. The results were considered statistically significant for an α -level of 5% and p values below 0.05.

RESULTS

The examined group consisted of 56 patients with ovarian cancer between 27 and 80 years of age (mean 57.03 ± 12.8). In the studied group 19 women (33.9%) were in premenopausal age and 37 (66.1%) were after menopause. Mean age in premenopausal group was 43 ± 7.3 years whereas in postmenopausal group: 64.2 ± 8.2 years. The results of microvessels density (MVD-CD34) and Id2 expression are shown in Table 1. Because of sloping distribution of the analyzed parameters, the data

Do oceny preparatów histologicznych wykorzystano mikroskop Olympus CX41 z kamerą cyfrową DP12 zintegrowane z komputerem PC. Obraz mikroskopowy archiwizowano i analizowano przy użyciu programu DP-Soft firmy Olympus (Japonia).

Półilościowa ocena ekspresji białka Id2 została wykonana wg metody opisanej przez Schindl'a i wsp. [18], którą zmodyfikowano tak, aby uwzględnić różnice w lokalizacji odczynów barwnych. Określony został odsetkowy udział komórek nowotworowych, które wykazywały ekspresję Id2 w porównaniu z wszystkimi komórkami w polu widzenia. Oceniano także intensywność odczynów barwnych. Jeżeli ekspresję stwierdzono w 1-10% komórek to przyznawano 1 pkt, za 11-30% - 2 pkt, za 31-50% - 3 pkt, za 51-80% - 4 pkt, a powyżej 80% przyznawano 5 pkt. Słaby odczyn oceniano na 1 pkt, średni odczyn na 2pkt, intensywny na 3 pkt. W zależności od lokalizacji ekspresji Id2 w obszarze jądrowym i/lub cytoplazmatycznym za stwierdzenie dodatniego odczynu przyznawano odpowiednio dodatkowo 1 lub 2 pkt. Po zsumowaniu liczba punktów dla ocenianego przypadku wynosiła od 0 do 10. Zależnie od uzyskanej liczby punktów ekspresję białka Id2 oceniano jako: brak lub słabą (0-3 pkt), średnią (3,1-6,9 pkt), wysoką (powyżej 7 pkt).

Gęstość mikronaczyń oceniano w sposób podany przez Weidnera i wsp. [14]. Według tej metody w preparatach guzów lokalizowano regiony o największej liczbie wybarwionych mikronaczyń pod powiększeniem mikroskopu x40 i x100. Następnie w wybranych miejscach guza znajdowano kapilary przy powiększeniu mikroskopu x200. W ocenie tej nie były brane pod uwagę mikronaczynia o średnicy powyżej 20 μm . W każdym guzie oceniano pięć wybranych miejsc o największej liczbie mikronaczyń w badanej zmianie nowotworowej. Wyniki z kolejnych pięciu pomiarów uśredniono i poddawano analizie statystycznej. Jako odrębne pojedyncze mikronaczynie była traktowana każda wybarwiona na brązowo komórka lub grupa komórek śródbłonka, oddzielona od sąsiednich mikronaczyń, komórek guza oraz innych elementów tkanki łącznej. Zgodnie z propozycją Weidnera obecność lub brak światła w badanej kapilarze nie była brana pod uwagę.

Analizę statystyczną wykonano przy pomocy programu Statistica v.6.0 (Statsoft, Polska). Ze względu na brak zgodności z rozkładem normalnym do wykrycia istotności różnic między cechami niepowiązanymi dla dwóch grup użyto nieparametrycznego testu U Manna-Whitney'a oraz testu kolejności rang ANOVA wg Kruskala, w przypadku porównywania więcej niż dwóch grup. Przyjęto 5% błąd wnioskowania i związany z nim poziom istotności statystycznej $p < 0,05$ wskazujący na istnienie istotnych różnic bądź zależności.

WYNIKI

Badana grupa obejmowała 56 chorych z nowotworami złośliwymi jajnika w wieku od 27 do 80 lat (średnia $57,03 \pm 12,8$). W grupie tej 19 (33,9%) kobiet było przed

in the table were shown as median value (MD) and 25- and 75-percentile. Because of low number of patients with II and IV stage of ovarian cancer, to allow statistical analysis the patients were grouped as follows: I and II stage patients according to FIGO were analyzed as one group, while III and IV stage patients were analyzed as the other.

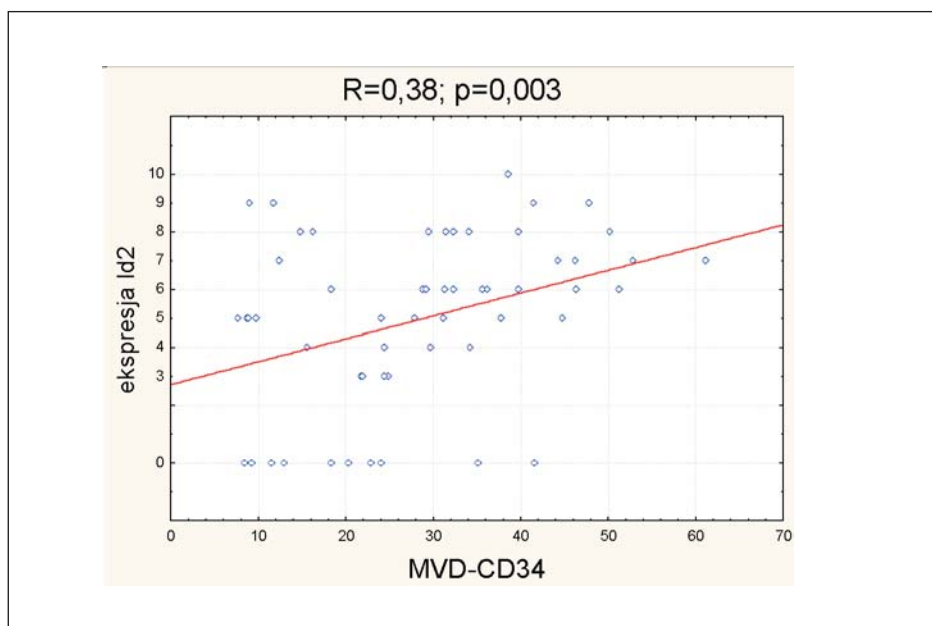
Median value of microvessels density assessed using CD34 marker in the examined group was 29 (range 7.6-61.2). Microvessels density analysis has shown statistically significant differences between CD34 expression in various histological subtypes of cancer ($H=11.7$ $p=0.008$). The lowest MVD values were found in serous tumors ($MD=21.9$). Median values for MVD-CD34 in endometrial tumors were a little higher ($MD=28.45$). The highest median values for microvessels density were observed in mucous tumors ($MD=38.6$). In the remaining group of malignant tumors median MVD-CD34 value was 28.8. The relationship between microvessel density and patients' age was statistically insignificant. In premenopausal women CD34 expression was lower in comparison to postmenopausal patients (24.1 vs. 29.7); however, the results did not achieve statistical significance. Differences between median values of MVD-CD34 depending on histological grading and FIGO staging were statistically insignificant.

menopauzą a 37 (66,1%) kobiet było po menopauzie. Średnia wieku w grupie przedmenopauzalnej wynosiła $43\pm 7,3$ lat, natomiast w grupie pomenopauzalnej $64,2\pm 8,2$ lat. Wszystkie wyniki oceny gęstości mikronaczyń (MVD-CD34) oraz ekspresji białka Id2 przedstawiono w tabeli I. Z uwagi na skośny rozkład wyników pomiaru badanej cechy dane w tabeli przedstawiono w postaci mediany (MD), oraz podania 25-go i 75-go percentyla. Ze względu na niewielką liczbę przypadków w II i IV stopniu zaawansowania klinicznego dla celów statystycznych połączono te guzy w grupy. Przypadki z I stopniem zaawansowania klinicznego wg FIGO połączono z grupą pacjentek w II stopniu zaawansowania. Analogicznie grupę kobiet w III stopniu zaawansowania klinicznego połączono z grupą kobiet w IV stopniu zaawansowania.

Mediana gęstości mikronaczyń oceniana przy wykorzystaniu markera CD34 w badanej grupie wynosiła 29 (zakres 7,6-61,2). Oceniając gęstość mikronaczyń stwierdzono występowanie istotnych statystycznie różnic w ekspresji CD34 w różnych typach histologicznych nowotworów złośliwych ($H=11,7$ $p=0,008$). Najniższe wartości MVD stwierdzono w guzach surowicznych ($MD=21,9$). Nieco wyższe wartości mediany MVD-CD34 obserwowano w guzach endometrialnych ($MD=28,45$). Najwyższą medianę gęstości mikronaczyń odnotowano w guzach śluzowych ($MD=38,6$). W grupie pozostałych guzów złośliwych mediana MVD-CD34 wynosiła 28,8. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności gęstości mikronaczyń od wieku pacjentek. W grupie kobiet przed menopauzą ekspresja CD34 była niższa w porównaniu do grupy kobiet po menopauzie (24,1 w porównaniu do 29,7), lecz różnica ta nie była statystycznie istotna. Nie wykazano występowania istotnych statystycznie różnic w wartościach median MVD-CD34 w zależności od stopnia zróżnicowania histologicznego i zaawansowania klinicznego wg FIGO.

Fig. 2. Relationship between microvessel densities identified using CD34 antigen and Id2 expression. MVD-CD34 – microvessel density assessed as CD34 antigen expression

Ryc. 2. Wykres zależności między gęstością mikronaczyń identyfikowanych za pomocą CD34 a ekspresją białka Id2. MVD-CD34 – gęstość mikronaczyń oceniana jako ekspresja antygenu CD34



Mean Id2 protein expression in the examined group represented as a point value was 5.5 (range 0-10). Differences between Id2 protein expression in various histological subtypes of cancer were statistically insignificant ($H=1.9$ $p=0.58$). In premenopausal women Id2 expression was higher than in postmenopausal patients. Nevertheless, menopausal status did not influence Id2 expression (point values 6 and 5 points respectively). Moreover, patients' age also did not significantly influence Id2 expression. Differences between Id2 expression

Średnia ekspresja białka Id2 oceniana punktowo w badanej grupie wynosiła 5,5 (zakres 0-10). Nie stwierdzono występowania istotnych statystycznie różnic w ekspresji białka Id2 w różnych typach histologicznych nowotworów złośliwych ($H=1,9$ $p=0,58$). W grupie kobiet przed menopauzą ekspresja białka Id2 była wyższa w porównaniu z grupą kobiet po menopauzie. Jednak status menopauzalny nie miał istotnego wpływu na intensywność ekspresji Id2 (wartości punktowe odpowiednio 6 pkt i 5 pkt). Wiek kobiet również nie miał istot-

Fig. 3. An example of low expression of Id2 protein in clinically advanced serous ovarian cancer (G2, FIGO IV), weak color reaction (brown-staining) localized mainly in cytoplasm of cancer cells, in some cells the reaction is visible in nuclei also; magnification 200x)

Ryc. 3. Przykład niskiej ekspresji białka Id2 w zaawansowanym klinicznie surowiczym raku jajnika (G2, st. IV wg FIGO), słabe odczyny barwne (zabarwienie brązowe) zlokalizowane w głównie cytoplazmie komórek nowotworowych, w części komórek reakcja widoczna również w jądrze komórkowym; (pow. 200x)

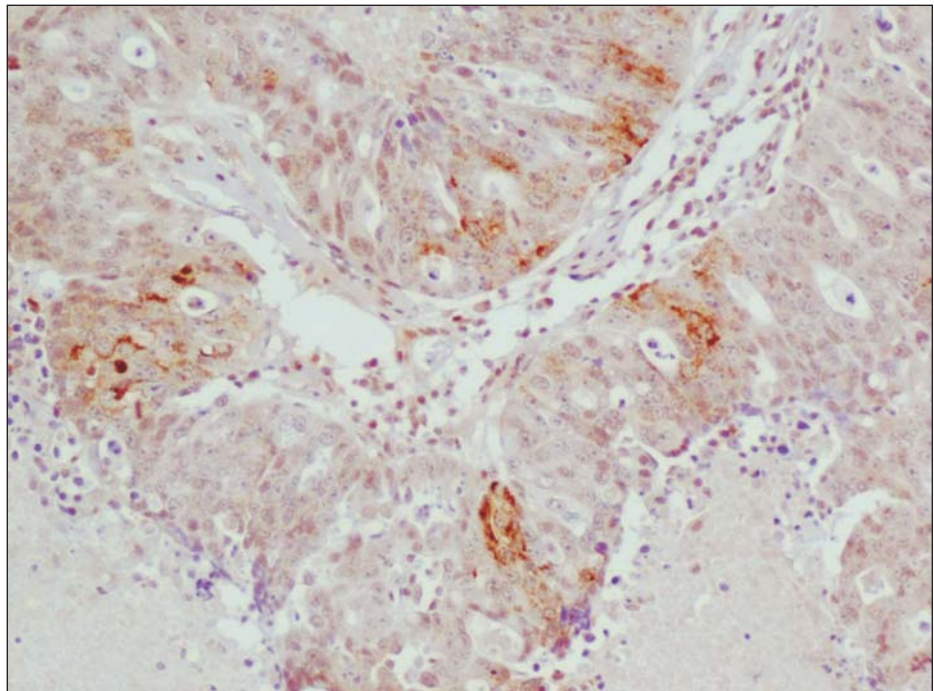
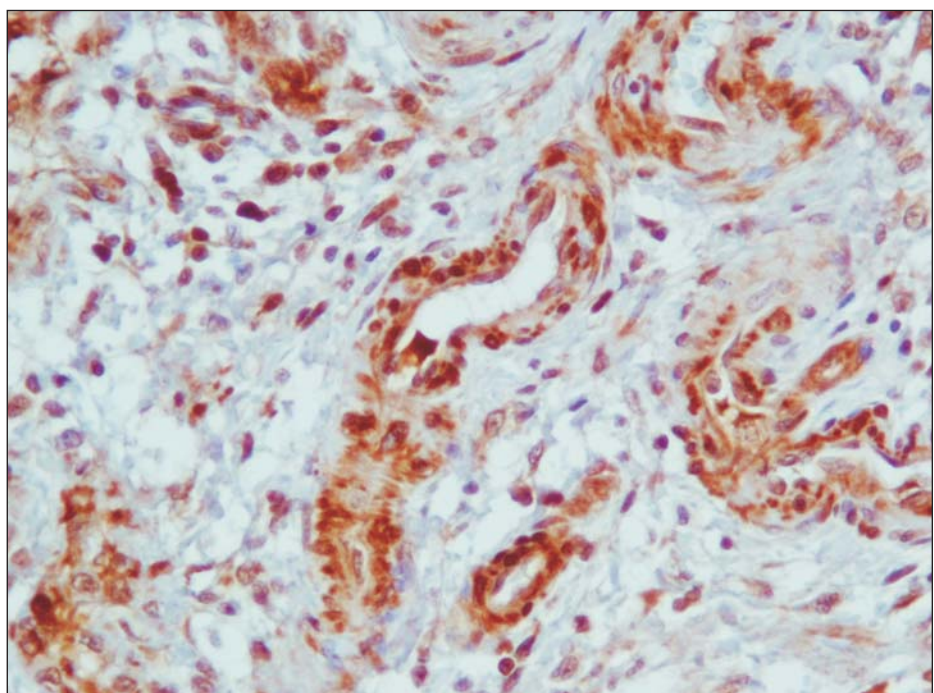


Fig. 4. Medium expression of Id2 in mucous ovarian cancer of borderline grading (G1, FIGO I) - strong color reaction (brown-staining) observed in both cytoplasm and nuclei in a part of cancer cells, magnification 200x

Ryc. 4. Średnia ekspresja Id-2 w raku śluzowym jajnika o granicznej złośliwości (G1, st. I wg FIGO) - silna reakcja barwna (zabarwienie brązowe) widoczna w cytoplazmie i jądrach części komórek nowotworowych; powiększenie 200x



depending on histological grading and FIGO staging were statistically insignificant. Lack of color reaction meaning no Id2 expression was observed in 4 cases. The color reactions of various intensities were observed in 52 cases. Low expression of Id2 protein (0-3 points) was found in 11 cases and the example of such staining is shown in Fig. 3. Medium expression of Id2 protein (3.1-6.9 points) was found in 23 cases and microscopic image of such example is shown in Fig. 4. High expression of Id2 protein (more than 7 points) was found in 18 cases and

nego wpływu na ekspresję białka Id2. Nie wykazano występowania istotnych statystycznie różnic w ekspresji Id2 w zależności od stopnia zróżnicowania histologicznego nowotworu oraz stopnia zaawansowania nowotworu. Brak obecności odczynów barwnych i ekspresji białka Id2 stwierdzono w 4 przypadkach. W 52 przypadkach zaobserwowano obecność odczynów barwnych o różnej intensywności. W 11 przypadkach stwierdzono słabą ekspresję białka Id2 (0-3 pkt), przykład takiej ekspresji przedstawia ryc. 3. W 23 przypadkach obserwowano

Fig. 5. High expression of Id2 (brown-stained) in serous ovarian cancer (G3, FIGO III); color reaction in the majority of cancer cells in both nucleus and cytoplasm, magnification 200x

Ryc. 5. Wysoka ekspresja Id2 (zabarwienie brązowe) w surowiczym raku jajnika (G3, st.wg FIGO III); reakcja barwna w większości komórek nowotworowych zarówno w jądrze i cytoplazmie; powiększenie 200x

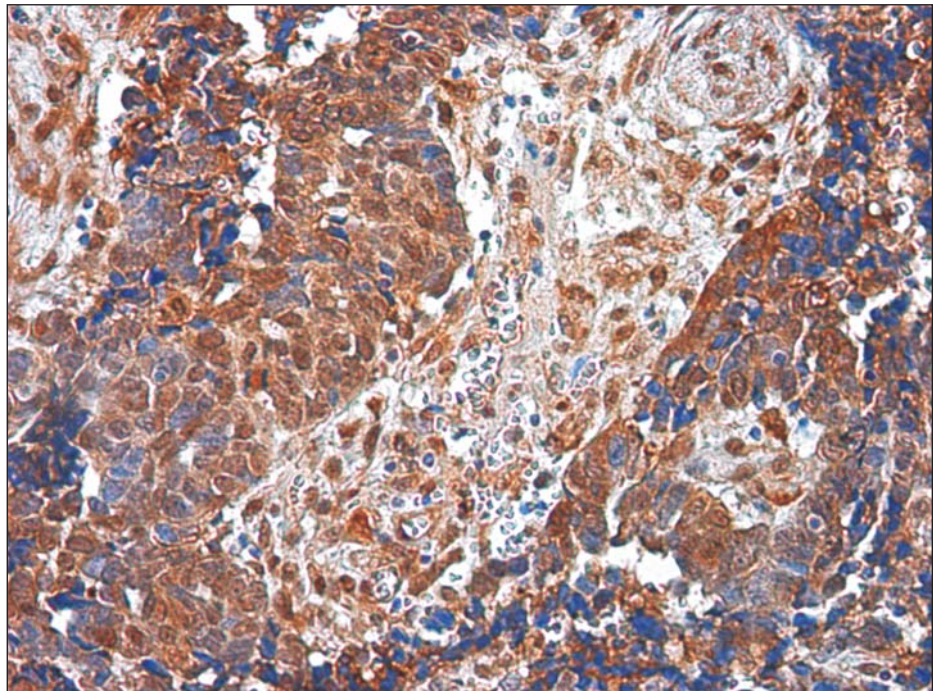
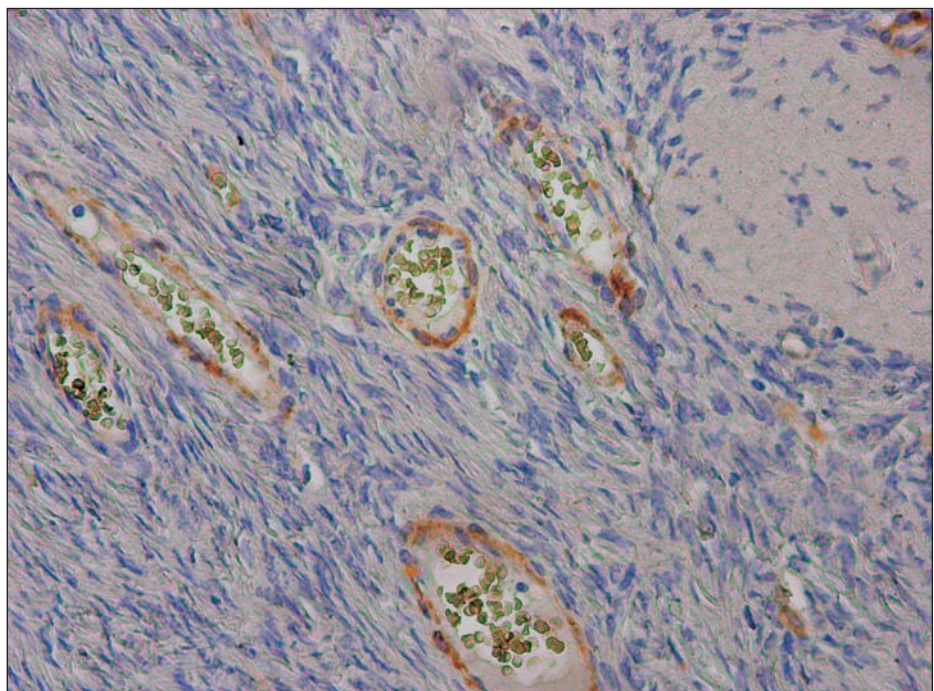


Fig. 6. An example of Id2 expression (brown-stained) around microvessels in serous cancer (G1, FIGO I)

Ryc. 6. Przykład ekspresji Id2 (zabarwienie brązowe) wokół mikronaczyń w raku surowiczym (G1, st.wg FIGO I)



the example of such expression is shown in Fig. 5. A typical example of Id2 expression around microvessels in serous cancer (G1, FIGO I) is shown in Fig. 6. Statistically significant relationship between microvessel density and Id2 protein expression was found ($R=0.38$ $p=0.003$) (Fig. 2). In a group characterized by low expression of Id2 (0-3 points) median value of microvessel density was MD=21.9 (range 13-24.5). In cases of medium expression of Id-2 (range 3.1-6.9 points) median value was assessed for MD=29.7 (range 18.4-36.2). In a group characterized by high expression of Id2 (more than 7 points) median value of microvessel density was MD=36.35 (16.2-46.2).

DISCUSSION

Id proteins exert important role in tumor biology. As oncoproteins, they inhibit apoptosis and cell differentiation as well as stimulate cell growth. Increased expression of Id can be observed in clinically advanced malignant tumors such as pancreatic cancer, gliomas, colon cancer, breast cancer and myelomas [2, 3, 17]. Recent studies concerning Id proteins suggest that they are involved in tumor angiogenesis as well as to influence tumor invasiveness [5]. In our study, we have assessed Id2 expression in relation to microvessels density and demonstrated that increased Id2 expression statistically significantly correlates with high microvessels density. Interestingly, the color reaction showing Id2 protein localization was observed not only in tumor cells but also in endotheliocyte surrounding cells (most probably pericytes). The mechanisms involved in Id2 protein activity in angiogenesis still need to be elucidated. Id2 proteins activity is opposite to Id1 function. Too high expression of Id2 protein leads to blockade of signaling pathway inhibiting Rb protein and indirectly increase expression of strong angiogenic factor - VEGF [11, 19]. The results obtained by our team suggest, that Id2 protein and its interactions with proangiogenic factors are involved in very early stages of tumorigenesis, as we did not find any statistically significant differences in Id2 expression between early and advanced stages of malignant tumors [13]. The latest studies show, that Id2 protein is involved not only in angiogenesis but also in lymphangiogenesis - the process related to increased invasiveness of the tumor. Stallone *et al.* [19] have assessed the influence of Id2 protein on lymphangiogenesis in Kaposi sarcomas and have demonstrated the relationship between increased expression of Id2 and expression of lymphatic vessels markers such as VEGF-3 and LYVE-1. Moreover, they also observed a mutual co-localization of the examined markers in sarcoma cells *in vitro*. The latest results suggest that Id2 protein is involved in alternative mechanisms of various malignant tumor vascularization. Sui *et al.* [20] have confirmed the observation that Id2 protein regulates molecular pathways involved in vascular mimicry, a process in which tumor cells, independently from endotheliocytes, form vessel-like structures. It en-

średnią ekspresję Id2 (3,1-6,9 pkt), a przykład przedstawia ryc. 4. W 18 przypadkach stwierdzono silną ekspresję białka Id2 (powyżej 7 pkt), przykład takiej ekspresji przedstawia ryc.5. Typowy przykład ekspresji Id2 zlokalizowanej wokół mikronaczyń w raku surowiczym G1 w I stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO przedstawia ryc.6. Stwierdzono istotne statystycznie zależności między gęstością mikronaczyń a ekspresją białka Id2 ($R=0,38$ $p=0,003$) (ryc. 2). W grupie o słabej ekspresji białka Id2 (0-3 pkt) mediana gęstości mikronaczyń wynosiła MD=21,9 (zakres: 13-24,5). W przypadku średniej ekspresji Id-2 (zakres: 3,1-6,9 pkt) mediana była równa MD=29,7 (zakres: 18,4-36,2). W grupie o silnej ekspresji białka Id-2 (powyżej 7 pkt) mediana gęstości mikronaczyń wynosiła MD=36,35 (16,2-46,2).

DYSKUSJA

Białka określane jako „Id” odgrywają ważną rolę w biologii nowotworów. Jako onkoproteiny hamują apoptozę komórek oraz ich różnicowanie, a także stymulują wzrost komórek. Zwiększona ekspresja Id występuje w zaawansowanych klinicznie nowotworach złośliwych takich jak: rak trzustki, glejaki, rak jelita grubego, sutka oraz szpiczaki [2,3,17]. Dotychczasowe badania nad białkami Id sugerują, że mogą mieć one istotny wpływ na procesy powstawania nowych naczyń w rozrostach nowotworowych angiogenezy oraz wpływać na zdolności inwazyjne guza [5]. Oceniając ekspresję białka Id2 w odniesieniu do gęstości mikronaczyń stwierdziliśmy, że zwiększonej ekspresji białka towarzyszy również wysoka gęstość mikronaczyń, a zależność pomiędzy tymi zmiennymi okazała się statystycznie istotna. Co ciekawe, odczyny barwne wskazujące na lokalizację białka Id2 obserwowano nie tylko w komórkach nowotworowych, ale również w komórkach towarzyszących bezpośrednio endotelocytom, będących najprawdopodobniej pericytami. Jak dotąd niewiele wiadomo na temat mechanizmów związanych z rolą białka Id2 w procesach angiogennych. Białka Id2 charakteryzują się działaniem opozycyjnym w stosunku do białek Id1. Zbyt wysoka ekspresja Id2 prowadzi między innymi do zablokowania szlaku, który hamuje ekspresję białka Rb, co pośrednio zwiększa ekspresję silnego czynnika angiogenego jakim jest VEGF [11, 19]. Uzyskane przez nas wyniki sugerują, że pojawienie się Id2 i jego interakcje z czynnikami proangiogennymi mają prawdopodobnie miejsce na bardzo wczesnych etapach transformacji nowotworowej, gdyż nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji Id2 w nisko i wysoko zaawansowanych guzach złośliwych [13]. Najnowsze wyniki badań sugerują udział białka Id2 nie tylko w powstawaniu naczyń nowotworowych, lecz również w limfangiogenezie, procesem związanym ze wzrostem zdolności inwazyjnych nowotworu. Stallone i wsp. [19] oceniali wpływ białka Id2 na limfangiogenezę w mięsakach Kaposiego i wykazali zależność pomiędzy zwiększoną ekspresją Id2, a markerami naczyń limfatycznych VEGF-3 i LYVE-1. Zaobserwowano również wzajemną ko-lokalizację badanych markerów w komórkach mięsa-

ables nutrients, oxygen and waste product transport. Western blotting analysis has shown significant changes in Id2 and VE-cadherin expression. VE-cadherin serves as a marker of vascular mimicry in melanoma cells of both low and high aggressiveness. The cited authors demonstrated that transient inhibition of Id2 expression using small interfering RNA decrease VE-cadherin expression and block the development of vascular mimicry in aggressive melanoma cells. Independently, the authors have observed some changes in cell stability and demonstrated that the transfected cells are characterized by higher migration potential [20]. The described studies show that Id2 serves as a regulator of VE-cadherin expression and is able to influence vessel-like capillary structures.

The results of a few new studies demonstrate that Id1, Id2 and Id3 proteins are able to significantly influence early stages of carcinogenesis in cases of breast cancer, liver cancer and cervical cancer [21,22,23]. Recently, the authors indicated that Id proteins can be considered potential tumor markers. So far relatively little information concerning the role of Id genes expression disturbance and its role in patients with ovarian cancer was published. Small number of *in vitro* studies on ovarian cancer cell lines concern mainly Id1 proteins. One of the latest studies by Maw *et al.* [24] assessed microvessels density (MVD) and Id1 protein expression as well as mRNA for Id1, Id2 and Id3 in ovarian cancer samples. The obtained results were correlated with clinical features of the tumor and with overall survival rate of the patients. The authors have observed, that both mRNA level and MVD assessed as CD34 and VIII factor expression strongly correlate with up-regulation of Id1 protein. Moreover, high expression of Id1 was related to shorter overall survival of the patients.

Other authors demonstrated the relationship between increased expression of Id1 and tumor grading, staging and patients overall survival rate [18]. Our study did not reveal such relationship for Id2 protein; however, it can be caused by relatively low number of studied tumors.

Uncontrolled activity of Id proteins in malignant tumors influences end stage of cell differentiation, induces angiogenesis and affects tumor invasiveness. Hence, Id proteins can be potentially used as a target for therapeutic intervention that influence various aspects of carcinogenesis and tumor progression. The example of such approach is presented in the study of Mern *et al.* The authors have demonstrated that Id1 and Id3 expression inhibition decreased development of breast cancer metastases to the lungs [25]. Excessive expression of these proteins in breast cancer correlates with poor prognosis. Peptide aptamer Id1/3-PA7 introduced to cancer cells inhibited E47 protein sequestration induced by Id1 and Id3 and increased CDKN1A and CDKN1B kinase inhibitor expression and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage. In consequence, the changes lead to inhibition of cell cycle progression and apoptosis of breast cancer cell lines (MCF7 and MDA-MB-231). The au-

ka w hodowli *in vitro*. Najnowsze wyniki badań sugerują udział białka Id2 w alternatywnych mechanizmach powstawania unaczynienia różnych nowotworów złośliwych. Badania Sui i wsp. [20] potwierdziły istotną rolę białka Id2 w regulowaniu szlaków związanych z mimikrą naczyniową w której komórki nowotworowe, niezależnie od endoteliocytów, tworzą kanały naczyniopodobne. Umożliwia to transport substancji odżywczych, tlenu i produktów przemiany materii. Analiza metodą Western Blot wykazała istotne zmiany w ekspresji Id2 i VE-cadheryny, która jest markerem mimikry naczyniowej w słabo i wysoce agresywnych komórkach czerniaka *in vitro*. Cytowani autorzy stwierdzili, że przejściowa blokada ekspresji Id2 przy pomocy techniki wykorzystującej interferencyjne RNA hamuje ekspresję VE-cadheryny oraz blokuje mimikrę naczyniową w wysoce agresywnych komórkach czerniaka. Niezależnie od tego zaobserwowano zmiany w stabilności komórek, a komórki transfekowane charakteryzowały się wyższym potencjałem migracyjnym [20]. Badania te dowodzą, że Id2 jest regulatorem ekspresji VE-cadheryny i może wpływać na powstawanie naczyniopodobnej sieci kapilar.

Wyniki szeregu nowych badań wskazują, że białka Id1, Id2 i Id3 mogą znacząco wpływać na wczesne etapy karcinogenezy raka piersi, wątroby i raka szyjki [21, 22, 23]. Ostatnio zwrócono uwagę na rolę białek Id jako potencjalnych markerów nowotworowych. Do tej pory opublikowano relatywnie niewiele informacji na temat zaburzonej ekspresji genów Id i jej znaczenia u chorych na raka jajnika. Nieliczne badania prowadzone na liniach komórkowych nowotworów jajnika dotyczą przede wszystkim białek Id1. W jednym z najnowszych badań Maw i wsp. [24] oceniali gęstość mikronaczyń (MVD) i ekspresję białka Id1 oraz mRNA dla białek Id1, Id2 i Id3 w raku jajnika. Wyniki skorelowano z cechami klinicznymi nowotworu oraz długością przeżycia chorych. Autorzy stwierdzili, że zarówno poziom mRNA jak i MVD oceniana jako ekspresja CD34 i antygenu czynnika VIII były silnie skorelowane ze wzrostem ekspresji białka Id1. Co więcej, wysoki poziom ekspresji tego białka miał związek z krótszym okresem przeżycia chorych.

Wykazano pewne zależności między zwiększoną ekspresją Id1, a stopniem zróżnicowania guza oraz zależność pomiędzy ekspresją tego białka, a zaawansowaniem nowotworu i krótszym czasem przeżycia chorych [18]. W przypadku białka Id2 nie stwierdziliśmy takich zależności, może to jednak wynikać ze zbyt małej liczby badanych guzów.

Niekontrolowana aktywność białek Id w nowotworach złośliwych wpływa na końcowe etapy różnicowania komórek, indukuje angiogenezę i wpływa na procesy inwazyjne tkanek. Stąd też potencjalne wykorzystanie białek Id jako celu terapeutycznego może wpłynąć na szereg różnych aspektów transformacji nowotworowej i progresji choroby. Przykładem takich badań jest ostatnio opublikowana praca Mern i wsp. w której przedstawiono możliwości hamowania ekspresji Id1 i Id3 i blokowa-

thors suggested that Id1/3-PA7, a non-toxic peptide factor, is able to exert antiproliferative effects and induce apoptosis in breast cancer cells characterized by up-regulation of Id1 and Id3 proteins.

On the basis of presented results we suggest that Id2 proteins as potentially new tumor markers can be used to develop alternative methods of ovarian cancer treatment [2]. Our results suggest that Id2 expression assessment can become an additional prognostic factor useful to characterize various types of malignant ovarian tumors.

nia przerzutów do płuc w raku sutka [25]. Nadmierna ekspresja tych białek w raku sutka związana jest ze znacznie gorszym rokowaniem dla chorych. Aptamer peptydu Id1/3-PA7 dostarczony do komórek nowotworowych hamował między innymi sekwestrację białka E47 wywołaną przez Id1 i Id3 i zwiększał ekspresję inhibitora kinaz CDKN1A i CDKN1B z towarzyszącym rozpadem ADP-polimerazy rybozy (PARP). Zmiany te prowadziły w efekcie do zahamowania cyklu komórkowego oraz apoptozy komórek linii hodowlanych MCF7 i MDA-MB-231 raka piersi. Autorzy zasugerowali, że nietoksyczny czynnik peptydowy jakim jest Id1/3-PA7 może wywoływać efekty antyproliferacyjne i apoptozę w komórkach raka piersi, w których wykryto zwiększoną ekspresję białek Id1 i Id3.

Na podstawie przedstawionych wyników badań sądzimy, że białka Id2 jako potencjalne nowe markery nowotworowe mogą być wykorzystane w opracowaniu alternatywnych sposobów leczenia chorych na nowotwory jajnika [2]. Wyniki badań własnych pozwalają też sugerować, że ocena ekspresji Id2 może stanowić dodatkowy parametr prognostyczny przydatny w charakterystyce różnych typów złośliwych guzów jajnika u kobiet.

References/Piśmiennictwo:

1. **Iavarone A, Garg P, Lasorella A, [et al.]** The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 1994, 8, 1270-1284
2. **Iavarone A, Lasorella A.** ID proteins as targets in cancer and tools in neurobiology. *Trends Mol Med.* 2006, 12, 588-94.
3. **Lasorella A, Takuma U, Iavarone A.** Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene* 2001, 20, 8326-8333
4. **Norton JD, Deed RW, Craggs G, [et al.]** Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends Cell Biol* 1998, 8, 58-65
5. **Benezra R, Raffi S, Lyden D.** The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene.* 2001, 20, 8334-8441
6. **Chaudhary J, Schmidt M, Sadler-Riggelman I.** Negative acting HLH proteins Id 1, Id 2, Id 3, and Id 4 are expressed in prostate epithelial cells. *Prostate.* 2005, 64, 253-64
7. **Zhang X, Ling MT, Feng H, [et al.]** Id-1 stimulates cell proliferation through activation of EGFR in ovarian cancer cells. *Br J Cancer.* 2004, 91, 2042-7.
8. **Ling MT, Lau TC, Zhou C, [et al.]** Overexpression of Id-1 in prostate cancer cells promotes angiogenesis through the activation of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Carcinogenesis.* 2005, 26, 1668-1676.
9. **Lyden D, Young AZ, Zagzag D, [et al.]** Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature.* 1999, 401, 670-677.
10. **Lasorella A, Iavarone A, Israel MA.** Id2 specifically alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins. *Mol Cell Biol.* 1996, 16, 2570-2578.
11. **Lasorella A, Rothschild G, Yokota Y, [et al.]** Id2 mediates tumor initiation, proliferation, and angiogenesis in Rb mutant mice. *Mol Cell Biol.* 2005, 25, 3563-74.
12. **Czekierdowski A, Czekierdowska S, Daniłoś J. [i wsp.]** Ekspresja białek Id1, epidermalnego czynnika wzrostu EGF i jego receptora EGF-R w nowotworach złośliwych jajnika. *Przegl.Menop.* 2010 (w druku)
13. **Czekierdowska S, Czekierdowski A, Kotarski J.** Ekspresja białek Id2 w nowotworach złośliwych jajnika. *Przegląd Menop.* 2009, 41, 20-25
14. **Weidner N, Semple JP, Welch WR [et al.].** Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991, 324, 1-8
15. **Bamberger ES, Perrett CW.** Angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *J Clin Pathol* 2002, 55, 348-359
16. **Gasparini G, Bonoldi E, Viale G, [et al.].** Prognostic and predictive value of tumour angiogenesis in ovarian carcinomas. *Int J Cancer.* 1996, 69, 205-211
17. **Yang HY, Liu HL, Ke J. [et al.].** Expression and prognostic value of Id protein family in human breast carcinoma. *Oncol Rep.* 2010;23:321-8.
18. **Schindl M, Schoppmann SF, Strobel T, [et al.]** Level of Id-1 protein expression correlates with poor differentiation, enhanced malignant potential, and more aggressive clinical behavior of epithelial ovarian tumors. *Clin Cancer Res.* 2003, 9, 779-85.
19. **Stallone G, Infante B, Pontrelli P [et al.].** ID2-VEGF-related pathways in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma: a link disrupted by rapamycin. *Am J Transplant.* 2009, 9, 558-66.
20. **Su F, Li B, Wang J, [et al.]** Molecular regulation of vasculogenic mimicry in human uveal melanoma cells: role of helix-loop-helix Id2 (inhibitor of DNA binding 2). *Clin Exp Ophthalmol.* 2009, 247, 411-9.

21. **Stighall M, Manetopoulos C, Axelson H, [et al].** High ID2 protein expression correlates with a favourable prognosis in patients with primary breast cancer and reduces cellular invasiveness of breast cancer cells. *Int J Cancer*. 2005, 115, 403-11.
22. **Tsunedomi R, Iizuka N, Tamesa T, [et al.]** Decreased Id2 promotes metastatic potentials of hepatocellular carcinoma by altering secretion of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*. 2008, 14, 1025-1031
23. **Schindl M, Oberhuber G, Obermair A, [et al.]** Overexpression of Id-1 protein is a marker for unfavorable prognosis in early-stage cervical cancer. *Cancer Res* 2001, 61, 5703–5706
24. **Maw MK, Fujimoto J, Tamaya T.** Overexpression of inhibitor of DNA-binding (ID)-1 protein related to angiogenesis in tumor advancement of ovarian cancers. *BMC Cancer*. 2009; 9: 430-436.
25. **Mern DS, Hoppe-Seyler K, Hoppe-Seyler F [et al.]** Id1 and Id3 by a specific peptide aptamer induces E-box promoter activity, cell cycle arrest, and apoptosis in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Feb 27. [Epub ahead of print]