

## Streszczenie w języku polskim.

Nowotwory płuc stanowią najczęstszą przyczynę zgonu z powodu chorób nowotworowych w Polsce niezależnie od płci. Wśród przyczyn zachorowania na nowotwory płuc najważniejszym i najlepiej udowodnionym czynnikiem ryzyka jest czynne palenie tytoniu. Wśród pozostałych czynników ryzyka należy wymienić bierne palenie tytoniu, narażenie na substancje szkodliwe (azbest, ołów, kadm, arsen, nikiel), a także ekspozycję na promieniowanie jonizujące.

W klasyfikacji nowotworów płuc wyróżnia się dwa zasadnicze typy raków płuc: rak drobnokomórkowy (SCLC) oraz raki niedrobnokomórkowe (NSCLC), w obrębie których dodatkowo wyodrębnia się podtypy histologiczne: rak gruczołowy (AC), rak płaskonabłonkowy (SCC) i rak wielkokomórkowy (LCC).

Testyna ulega ekspresji w komórkach wszystkich prawidłowych tkanek człowieka. Liczne przeprowadzone dotychczas badania wskazują na supresorową funkcję białka testyny, związaną z wieloma różnymi mechanizmami wewnątrzkomórkowymi. Białko to lokalizuje się w cytoplazmie komórkowej, gdzie za pośrednictwem licznych białek pełni rolę w adhezji komórek do macierzy pozakomórkowej oraz w oddziaływaniach międzykomórkowych, a także wpływa na procesy apoptozy. Wykazano obniżony poziom ekspresji testyny w rakach gruczołu piersiowego, raku jelita grubego, rakach endometrium, rakach nosogardła, nowotworach głowy i szyi, raku żołądka, ostrej białaczce limfoblastycznej z komórek B (ALL B-cell) oraz glejakach. W przypadku NSCLC dostępne są ograniczone dane uzyskane z wykorzystaniem linii komórkowych, jednak brak jest szczegółowych badań przeprowadzonych na materiale klinicznym

W analizie postanowiono dodatkowo uwzględnić poziom ekspresji surwiwiny (jako inhibitora apoptozy), białka Ki-67 (służącego do oceny indeksu proliferacyjnego) oraz kaspazy-3 (pozwalającej na ocenę nasilenia procesów apoptozy).

Celem moich badań była ocena poziomu ekspresji *TES* na poziomie białka (z zastosowaniem metod immunohistochemicznej oraz Western blot) oraz mRNA (metoda RT-PCR) w NSCLC, a także ocena korelacji ekspresji testyny z pozostałymi badanymi białkami oraz danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów. Do przeprowadzenia analizy statystycznej użyto oprogramowania Statistica oraz programu GraphPad Prism 5.0.

Badania przeprowadzono na materiale stanowiącym 203 przypadki NSCLC (83 przypadki SCC, 120 przypadków AC) i uzyskanym od pacjentów operowanych z powodu

NSCLC w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej przy Dolnośląskim Centrum Chorób Płuc we Wrocławiu. Do badań wykorzystano również linie komórkowe NSCLC oraz fibroblastów ludzkich. Materiał kontrolny stanowiły prawidłowe tkanki z marginesu cięcia chirurgicznego.

Z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej wykazano jądrową ekspresję TES w NSCLC. Analiza wyników uzyskanych z zastosowaniem metody immunohistochemicznej wykazała, iż w grupie pacjentów z NSCLC typu SCC wysoki poziom ekspresji testyny wiązał się z większą średnicą guza oraz wyższym stadium zaawansowania choroby nowotworowej. W grupie pacjentów z NSCLC typu AC, poza większą średnicą guza, nie wykazano innych zależności z danymi kliniczno-patologicznymi. Analiza krzywej przeżycia pacjentów z NSCLC, w zależności od poziomu ekspresji testyny w komórkach nowotworowych, nie wykazała istotnych różnic niezależnie od podtypu histologicznego. Analiza poziomu badanego białka z wykorzystaniem metody WB wskazywała na wyższy poziom testyny w NSCLC w porównaniu z kontrolą, jednak tylko w odniesieniu do SCC wartość była istotna statystycznie. Nie wykazano istotnego związku poziomu *TES* mRNA z danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów.

Jądrowa ekspresja surwiwiny wiązała się z wyższym stadium zaawansowania choroby nowotworowej, większą średnicą guza oraz istotnie częstszym zajęciem węzłów chłonnych. Ponadto analiza krzywej przeżycia wskazywała na gorsze rokowanie w tej grupie chorych.

Nie zaobserwowano istotnych zależności między nasileniem ekspresji kaspazy-3 oraz białka Ki-67 w komórkach nowotworowych NSCLC, również analiza krzywej przeżycia pacjentów nie wykazała istotnych różnic w zależności od poziomu ich ekspresji.

Uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej rezultaty są zaskakujące w świetle posiadanych informacji dotyczących roli testyny jako białka supresorowego. Prezentowane dane stoją w opozycji do danych literaturowych i sugerują, iż funkcja testyny w NSCLC może być zupełnie odmienna, a jej wysoki poziom ekspresji może być czynnikiem niekorzystnego rokowania i wiązać się z wyższym zaawansowaniem choroby nowotworowej. Dane te jednoznacznie dowodzą, iż konieczne są dalsze badania dotyczące roli testyny w NSCLC.

## **Streszczenie w języku angielskim.**

### **„Testin expression in non-small cell lung carcinoma”**

Lung tumors are the most common cause of death due to cancer in Poland regardless of gender. Among the causes of lung tumors, active smoking is the most important and well-established risk factor. Other risk factors include passive smoking, exposure to harmful substances (asbestos, lead, cadmium, arsenic, nickel), as well as exposure to ionizing radiation.

There are two main types of lung cancers: small cell lung carcinoma (SCLC) and non-small cell lung carcinoma (NSCLC), which further includes histological subtypes such as adenocarcinoma (AC), squamous cell carcinoma (SCC), and large cell carcinoma (LCC).

Testin (TES) is expressed in cells of all normal human tissues. Numerous studies conducted so far indicate a suppressor function of TES, associated with many different intracellular mechanisms. This protein is located in the cytoplasm, where it plays a role in cell adhesion to the extracellular matrix and in intercellular interactions, as well as affects apoptosis processes. A decreased level of TES expression has been demonstrated in breast gland cancer, colorectal cancer, endometrial cancer, nasopharyngeal cancer, head and neck tumors, stomach cancer, acute B-cell lymphoblastic leukemia (ALL B-cell) and gliomas. Limited data obtained from cell lines are available for NSCLC, however, there is a lack of detailed studies conducted on clinical material.

In addition, the study also considered the expression level of survivin (as an apoptosis inhibitor), Ki-67 protein (used to assess the proliferation index), and caspase-3 (allowing the assessment of the intensity of apoptosis processes).

The aim of the study was to evaluate the expression level of *TES* at the protein level (using immunohistochemical and Western blot methods) and mRNA (RT-PCR method) in NSCLC, as well as to assess the correlation of testin expression with other tested proteins and clinical-pathological data of patients. Statistica software and GraphPad Prism 5.0 were used for statistical analysis.

The study was conducted on material consisting of 203 cases of NSCLC (83 cases of SCC, 120 cases of AC) obtained from patients operated on due to NSCLC in the Chest Surgery Clinic at the Lower Silesian Centre for Pulmonary Diseases in Wrocław. NSCLC cell lines and human fibroblasts were also used for the study. Normal tissue from the surgical margin was used as control material.

Using confocal microscopy, nuclear expression of *TES* was shown in NSCLC. Analysis of the results obtained using IHC showed that in the group of patients with SCC-type NSCLC, a high level of testin expression was associated with a larger tumor diameter and a higher stage of cancer. In the group of patients with AC-type NSCLC, apart from a larger tumor diameter, no other clinical-pathological correlations were observed. Survival curve analysis of NSCLC patients, based on the level of testin expression in tumor cells, did not show significant differences regardless of the histological subtype. Analysis of the level of the tested protein using WB method indicated a higher level of testin in NSCLC compared to the control, but only in relation to SCC was the value statistically significant. There was no significant correlation between *TES* mRNA level and clinical-pathological data of patients.

Nuclear expression of survivin was associated with a higher stage of cancer, larger tumor diameter, and significantly more frequent lymph node involvement. Furthermore, survival curve analysis indicated worse prognosis in this group of patients.

There were no significant correlations between the intensity of caspase-3 and Ki-67 protein expression in NSCLC tumor cells. Additionally, survival curve analysis did not show significant differences based on their expression levels.

The results obtained in this dissertation are surprising in light of the existing information on the role of testin as a tumor suppressor protein. The presented data contradict the literature and suggest that the function of testin in NSCLC may be completely different, and its high level of expression may be a factor of unfavorable prognosis and associated with more advanced cancer. These data clearly demonstrate the need for further studies on the role of testin in NSCLC.