

# **Rola ekspresji testyny w niedrobnokomórkowych rakach płuc**

**Maciej Ornat**

Katedra Morfologii i Embriologii Człowieka

Zakład Histologii i Embriologii

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Promotor: **prof. dr hab. Piotr Dzięgiel**

Wrocław, 2023r.

Badania finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) w ramach grantu naukowego Diamentowy Grant 2017 o numerze 0121/DIA/2017/46 realizowanego na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Niniejszą rozprawę doktorską dedykuję mojej ukochanej żonie  
oraz rodzicom, którzy zawsze we mnie wierzą i wspierają w dążeniu  
do celu.

Chciałbym podziękować za pomoc i nieocenione wsparcie  
wszystkim pracownikom Zakładu Histologii i Embriologii  
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu,  
a w szczególności mojemu promotorowi.

# 1. Spis treści

2.	Wstęp.....	8
2.1.	Białko testyna – charakterystyka i rola. ....	8
2.1.	Białko surwiwina – charakterystyka i rola. ....	11
2.1.	Białko Ki-67 – charakterystyka i rola. ....	13
2.2.	Ocena nasilenia procesu apoptozy w NSCLC.....	14
2.3.	Nowotwory płuc (ze szczególnym uwzględnieniem NSCLC).....	17
3.	Uzasadnienie podjęcia tematu. ....	23
4.	Cele pracy.....	24
5.	Materiały i metody. ....	25
5.1.	Hodowla linii komórkowych.....	27
5.2.	Mikromacierze tkankowe (TMA).....	27
5.3.	Reakcja immunohistochemiczna (IHC). ....	28
5.4.	Izolacja białka.....	30
5.5.	Reakcja Western blot (WB).....	31
5.6.	Mikrodysekcja laserowa.....	32
5.7.	Izolacja całkowitego RNA. ....	33
5.8.	Reakcje odwrotnej transkrypcji.....	34
5.9.	Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym. ....	35
5.10.	Ocena indeksu apoptotycznego (AI).....	36
5.11.	Analiza statystyczna.....	36
6.	Wyniki przeprowadzonych badań. ....	38
6.1.	Ekspresja testyny w niedrobnokomórkowych rakach płuc z uwzględnieniem danych kliniczno-patologicznych pacjentów.....	39
6.2.	Ekspresja surwiwiny w niedrobnokomórkowych rakach płuc z uwzględnieniem danych kliniczno-patologicznych pacjentów.....	46

6.3. Ekspresja Ki-67 w niedrobnokomórkowych rakach płuc z uwzględnieniem danych kliniczno-patologicznych pacjentów. ....	53
6.4. Ekspresja kaspazy-3 w niedrobnokomórkowych rakach płuc z uwzględnieniem danych kliniczno-patologicznych pacjentów. ....	57
6.5. Ocena ekspresji testyny w niedrobnokomórkowych rakach płuc z wykorzystaniem badań molekularnych: RQ-PCR, WB. ....	62
6.6. Ocena wzajemnej korelacji ekspresji badanych białek w niedrobnokomórkowych rakach płuc. ....	65
6.6.1. Korelacja ekspresji testyny i Ki-67. ....	66
6.6.2. Korelacja ekspresji testyny i kaspazy-3. ....	67
6.6.3. Korelacja ekspresji testyny i surwiwiny. ....	68
6.7. Analiza przeżycia pacjentów w zależności od poziomu ekspresji poszczególnych białek. ....	70
6.7.1. Analiza przeżycia pacjentów w zależności od poziomu ekspresji testyny. ....	70
6.7.2. Analiza przeżycia pacjentów w zależności od poziomu ekspresji surwiwiny. ....	73
6.7.3. Analiza przeżycia pacjentów w zależności od poziomu ekspresji Ki-67. ....	75
6.7.4. Analiza przeżycia pacjentów w zależności od poziomu ekspresji kaspazy-3. ....	76
7. Omówienie wyników i dyskusja. ....	78
8. Silne i słabe strony przeprowadzonych badań. ....	91
9. Wnioski. ....	92
10. Bibliografia. ....	93
11. Streszczenie w języku polskim. ....	108
12. Streszczenie w języku angielskim. ....	110

Zastosowane skróty:

- AC (ang. *adenocarcinoma*) – rak gruczołowy, tutaj w domyślnym znaczeniu niedrobnokomórkowego raka płuc typu gruczołowego
- AI (ang. *apoptotic index*) – indeks apoptotyczny
- ALL B-cell – ostra białaczka limfoblastyczna z komórek B
- ANOVA (ang. *analysis of variance*) – test statystyczny analizy wariancji
- CD (ang. *cluster of differentiation*) – antygeny różnicowania komórkowego, np. CD34 itp.
- cm – jednostka: centymetr
- DN (ang. *dominant-negative*) - genetyka: mutacja genu skutkująca kodowaniem białka o antagonistycznym działaniu wobec białka typu dzikiego (niezmienionego)
- DNA - kwas deoksyrybonukleinowy
- EGFR (ang. *epithelial growth factor receptor*) - receptor ludzkiego czynnika wzrostu naskórka
- gen *TES* – gen kodujący białko testynę
- GOF (ang. *gain-of-function*) - genetyka: mutacja genu skutkująca nabyciem nowej funkcji przez kodowane przez ten gen białko
- GS (ang. *Gleason Score*) – skala Gleasona (służąca do oceny mikroskopowej raka gruczołu krokowego)
- HIV (ang. *human immunodeficiency virus*) - ludzki wirus niedoboru odporności
- IAP (ang. *inhibitor of apoptosis protein*) - białka, będące inhibitorami apoptozy
- IQR - zakres międzykwartyłowy
- kDa – jednostka: kilodaltony
- Ki-67 – antygen Ki-67, białko Ki-67
- Klasyfikacja TNM – klasyfikacja służąca ocenie stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu. T (ang. *tumor* – wielkość guza pierwotnego), N (ang. *nodules* – przerzuty w węzłach chłonnych), M (ang. *metastases* – przerzuty odległe/narządowe)
- LOF (ang. *loss-of-function*) – genetyka: mutacja genu skutkująca utratą fizjologicznie pełnionej funkcji przez kodowane przez ten gen białko
- Metoda IHC (ang. *immunohistochemistry*) – metoda immunohistochemiczna
- Metoda WB – Western blot (także: immunoblotting)
- Metoda PCR (ang. *polymerase chain reaction, PCR*) – metoda łańcuchowa reakcji polimerazy

- Metoda RQ-PCR (ang. *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*) - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy DNA w czasie rzeczywistym
- mM – jednostka: milimol
- MNiSW - Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego
- mRNA (ang. *messenger ribonucleic acid*) – informacyjny, matrycowy RNA, rodzaj kwasu rybonukleinowego
- msc. – jednostka czasu: miesiąc
- no. (ang. *number*) – liczebność, np. liczebność grupy, ilość przypadków
- NS (ang. *not significant*) – brak istotności statystycznej ( $p > 0,05$ )
- NSCLC (ang. *non-small cell carcinoma*) – niedrobnokomórkowy rak płuc
- OR (ang. *odds ratio*) – iloraz szans
- OS (ang. *overall survival*) – całkowity czas przeżycia
- PBS - buforowana fosforanem sól fizjologiczna
- PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) - jądrowy antygen komórek proliferujących
- PI (ang. *proliferation index, PI*) – indeks proliferacyjny
- PFS (ang. *progression-free survival time*)
- skala IRS - półilościowa skala wg Remmele uwzględniająca natężenie reakcji barwnej
- skala pH - ilościowa skala kwasowości i zasadowości roztworów wodnych związków chemicznych
- SCC (ang. *squamous cell carcinoma*) – rak płaskonabłonkowy, tutaj w domyślnym znaczeniu niedrobnokomórkowego raka płuc typu płaskonabłonkowego
- SCLC (ang. *small cell lung carcinoma*) – drobnokomórkowy rak płuc
- TES – białko testyna
- Test ELISA - test immunoenzymatyczny ELISA
- TNBC (ang. *triple negative breast cancer*) –rak gruczołu piersiowego potrójnie negatywny

## 2. Wstęp.

### 2.1. Białko testyna – charakterystyka i rola.

Testyna (TES) jest produktem białkowym ekspresji genu *TES* zlokalizowanego na chromosomie 7. i występuje w komórkach wszystkich prawidłowych tkanek człowieka [1]. Lokalizuje się w cytoplazmie, gdzie za pośrednictwem innych białek pełni m.in. rolę łącznika komórek z macierzą pozakomórkową oraz w oddziaływaniach międzykomórkowych. Testyna wchodzi w interakcje z innymi białkami jak np.: zyksyną, która może modulować organizację cytoszkieletu oraz wpływać na transdukcję sygnału wewnątrzkomórkowego, stymulowanego procesami adhezji komórkowej [2], białkiem MENA (ang. *Mammalian-enabled protein*), zaangażowanym w procesy nukleacji oraz polimeryzacji aktyny [3], czy taliną, koncentrującą się zwłaszcza w pobliżu obszarów błony komórkowej związanych z interakcjami komórki z macierzą pozakomórkową [4–6]. TES wchodzi ponadto w interakcje z różnymi białkami cytoszkieletu, m.in. z aktyną – podstawową strukturą szkieletu komórki eukariotycznej, biorącą udział w utrzymywaniu kształtu oraz mobilności komórki [7]. Nadekspresja genu *TES* skutkuje wzrostem adhezji komórkowej, a w efekcie zmniejszonym potencjałem komórek do migracji [8].

Białko TES składa się z 421 aminokwasów i zawiera w swojej strukturze na C-końcu 3 domeny o typie palców cynkowych, oddzielonych 2-aminokwasowymi fragmentami hydrofobowymi (tzw. domeny LIM), które pełnią rolę we wzajemnych oddziaływaniach pomiędzy białkami, niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania wielu procesów komórkowych [1, 9, 10].

Stwierdzono, iż gen *TES* kodujący białko testynę zlokalizowany jest w regionie q31.2, będącym regionem „łamliwym” chromosomu 7 (FRA7G), w którym częstość mutacji jest szczególnie nasiloną. Pierwotnie zaobserwowano, iż utrata heterozygotyczności w obrębie FRA7G związana była z licznymi chorobami nowotworowymi, co nasuwało podejrzenie, iż w regionie tym zlokalizowane może być białko supresorowe [11]. Zsekwencjonowanie tego regionu z wykorzystaniem chromosomów bakteryjnych (ang. BAC) pozwoliło na opisanie genu homologicznego do mysiego genu *testyny* [1].

Przeprowadzono liczne badania na materiale uzyskanym od pacjentów z różnymi chorobami nowotworowymi, w wyniku czego wykazano obniżony poziom ekspresji testyny w rakach gruczołu piersiowego, raku jelita grubego (RJG), raku szyjki



macicy, rakach endometrium, rakach nosogardła, nowotworach głowy i szyi, raku żołądka, w ostrej białaczce limfoblastycznej z komórek B (ALL B-cell) oraz w glejakach [6, 8, 12–19].

Do utraty lub zmniejszenia ekspresji testyny dochodzić może na różne sposoby. Najczęściej związane jest to z hipermetylacją promotora genu *TES*, co zostało wykazane w materiale raka endometrium przy zastosowaniu zmodyfikowanej reakcji PCR pozwalającej ocenić poziom metylacji DNA [14]. Za potwierdzeniem powyższej tezy przemawia ponadto szczegółowa analiza przeprowadzona przy użyciu 30 różnych nowotworowych linii komórkowych (nowotwory pęcherza moczowego, gruczołu piersiowego, jajnika, trzustki, prostaty, szyjki macicy oraz nowotwory neuroendokrynne i kostniakomięsaki), która wykazała, iż we wszystkich analizowanych przypadkach obecny jest znaczący poziom metylacji wysp CpG na końcu 5' genu *TES* [20]. Kolejnym argumentem przemawiającym za rolą metylacji promotora genu *TES* w patogenezie nowotworów jest stwierdzenie reekspresji testyny po zastosowaniu leku hamującego metylotransferazę DNA (decytabina) na liniach komórkowych ALL B-cell [8]. Warto zaznaczyć, iż poza samym stwierdzeniem metylacji promotora genu *TES*, znaczenie ma także poziom jej nasilenia, co wykazano w badaniach na materiale pooperacyjnym pacjentów z glejakami, u których wykazano istotne różnice w zależności od stopnia złośliwości nowotworu [15]. Wydaje się, iż metylacja promotora omawianego genu ma istotne znaczenie w patogenezie nowotworów, za czym przemawia fakt, iż gen ten jest jednym z najczęściej ulegających metylacji genów w ostrej białaczce limfoblastycznej i ma to miejsce w niemal 80% przypadków ALL [12].

Liczne przeprowadzone dotychczas badania wskazują na supresorową funkcję białka testyny, związaną z wieloma różnymi mechanizmami wewnątrzkomórkowymi. Nadekspresja genu *TES* związana była z zahamowaniem cyklu komórkowego w stadium G1 mitozy oraz obniżeniem poziomu metaloproteiny 2 (MMP2) wykazanym z zastosowaniem metody ELISA [21]. Reekspresja genu *TES* w komórkach ALL B-cell, uzyskana przy wykorzystaniu specjalnie skonstruowanych plazmidów, wiązała się z zahamowaniem cyklu komórkowego w fazie G2/M (punkt kontrolny G2/M), co było niezależne od aktywności białka supresorowego TP53 [8]. Nadekspresja genu *TES* w liniach komórkowych niedrobnokomórkowych raków płuc (NSCLC) wiązała się z istotnym zahamowaniem proliferacji komórek nowotworowych

oraz zdolności do inwazji. Jednak dokładny mechanizm supresorowego działania testyny w NSCLC nadal pozostaje niejasny [22].

Wpływ testyny na rozwój i przebieg choroby nowotworowej zależy nie tylko od wpływu na proliferację i różnicowanie komórek nowotworowych, ale także od regulacji procesów apoptozy. Grupa badaczy zajmująca się wpływem ekspresji *TES* na przebieg raka nosogardła wykazała, iż na skutek zwiększenia jej ekspresji poprzez transfekcję genu *TES* przy pomocy specjalnie skonstruowanych plazmidów, dochodzi do nasilenia procesów apoptotycznych w liniach komórkowych tego nowotworu [16]. Potwierdzeniem wpływu testyny na procesy apoptozy w komórkach nowotworowych jest wzrost jej poziomu wykazany w liniach komórkowych ALL B-cell po reekspresji *TES*. Kolejnym dowodem (w powyższym doświadczeniu) jest wykazanie, z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, zwiększonej ilości komórek wykazujących pozytywną ekspresję aneksyny V, co dowodzi, iż testyna nasila śmierć komórek na drodze procesu apoptozy [8]. Nadekspresja *testyny* w komórkach raka jelita grubego, w badaniach przeprowadzonych *in vivo* na myszach, wiązała się z obniżeniem poziomów białek antyapoptotycznych (Bcl-2, surwiwina) oraz podwyższeniem poziomu czynników proapoptotycznych (TP53, Puma, Bax). Ponadto analiza uzyskanych rezultatów wykazała, iż nadekspresja testyny ma prawdopodobnie związek z aktywacją szlaku kinazy p38-MAPK, należącej do grupy kinaz aktywowanych mitogenami i nasilającej procesy apoptozy [6, 23]. Także badania przeprowadzone na liniach komórkowych NSCLC wykazały, iż nadekspresja genu *TES* wiązała się z istotnym nasileniem procesów apoptozy w komórkach nowotworowych, co zostało wykazane przy użyciu cytometrii przepływowej z wykorzystaniem oceny poziomu aneksyny V w komórkach nowotworowych [22].

Opisano dotychczas kilka wariantów transkrypcyjnych dla genu *TES*, skutkujących ekspresją różnych izoform białka testyny. W przeciwieństwie do białka TP53 czy surwiwiny, brakuje danych wskazujących na zmienioną funkcję izoform testyny i ich rolę w indukowaniu oraz promowaniu procesu transformacji nowotworowej [24].

## 2.1. Białko surwiwina – charakterystyka i rola.

Surwiwina należy do grupy białek, będących inhibitorami apoptozy (ang. *inhibitor of apoptosis protein* – IAP). Zbudowana jest ze 142 aminokwasów, a jej masa wynosi 16,3 kD. Zlokalizowana jest w regionie telomerowym chromosomu 17 [25].

Ekspresja omawianego białka zachodzi w fazie G2/M cyklu komórkowego, pełni ono swoje funkcje oddziałując między innymi z mikrotubulami wrzeciona kariokinetycznego [26]. Ekspresja surwiwiny w fazie G2/M jest dziesięciokrotnie wyższa w porównaniu z fazą G2 oraz fazą S [27]. Jej obecność jest istotna dla prawidłowej segregacji chromosomów podczas podziału komórkowego [28]. Efekt antyapoptotyczny surwiwiny związany jest prawdopodobnie z oddziaływaniem omawianego białka na kaspazę-9, należącą do kaskady kaspaz, będącą kluczowym elementem programowanej śmierci komórki [29]. Spośród grupy białek będących inhibitorami apoptozy ekspresja surwiwiny jest niemal najsilniej hamowana w przypadku prawidłowych tkanek [30]. Jej ekspresja w zdrowych, nienowotworowych komórkach, jest obserwowana wyjątkowo i dotyczy sporadycznych przypadków – stwierdzana jest podczas rozwoju płodowego, gdzie prawdopodobnie zaangażowana jest w utrzymanie homeostazy i różnicowanie komórek [31], a także w szybko dzielących się komórkach ludzkiego organizmu, takich jak: komórki macierzyste szpiku kostnego CD34+, komórki warstwy podstawnej naskórka oraz tymocyty [25, 32, 33]. Nasilenie ekspresji zachodzi natomiast powszechnie w komórkach wielu różnych typów nowotworów człowieka [34].

Opisano różne izoformy surwiwiny w komórkach nowotworowych jako efekt alternatywnego składania pre-mRNA. Formy te różniły się zarówno wzorcem ekspresji, jak i lokalizacją komórkową w porównaniu do prawidłowego białka. Izofорма surwiwiny oznaczona jako  $\Delta$ Ex3 stwierdzana była głównie w jądrze komórkowym, podczas gdy izofорма 2B zaobserwowana została w cytoplazmie [35]. Wykazano także związek między występowaniem alternatywnego składania pre-mRNA dla surwiwiny a aktywnością choroby nowotworowej. Obecność formy  $\Delta$ Ex3 była niekorzystnym czynnikiem prognostycznym [36]. Uważa się, że forma ta ma działanie anty-apoptotyczne, podczas gdy forma 2B wykazuje działanie pro-apoptotyczne [37]. Przeprowadzono wiele badań dotyczących zróżnicowanej ekspresji surwiwiny w komórkach nowotworowych, w zależności od typu nowotworu, izoformy tego białka, a także lokalizacji jego występowania [38–56]. Wnioski płynące z licznych, powyżej

zacytowanych prac, nie są jednoznaczne. Część autorów sugeruje, iż model ekspresji surwiwiny – cytoplazmatyczny lub jądrowy jest kluczowy i może być istotnym czynnikiem prognostycznym, przy czym zdecydowana większość cytowanych prac wskazuje, iż to raczej obecność jądrowej ekspresji surwiwiny może mieć znaczenie prognostyczne. Więcej wątpliwości nasuwa jednak ocena, czy jądrowa ekspresja surwiwiny jest korzystnym czy niekorzystnym czynnikiem rokowniczym, gdyż istnieją w tej kwestii znaczne rozbieżności wyników przeprowadzonych badań i wniosków z nich płynących. Pewnym wydaje się natomiast być fakt, iż zróżnicowana funkcja surwiwiny w zależności od obecności konkretnej izoformy tego białka, może przekładać się na zróżnicowaną skuteczność leczenia przeciwnowotworowego u pacjentów z różnymi rodzajami nowotworów. Analizując polimorfizm genu kodującego surwiwinę wykazano, iż jego duże zróżnicowanie wiąże się z gorszym rokowaniem oraz krótszym czasem przeżycia pacjentów z NSCLC. Ponadto postawiono hipotezę, iż zwiększony polimorfizm genu dla surwiwiny może przekładać się na zwiększone ryzyko rozwoju nowotworów płuc [57].

Najnowsze badania wykazują także, iż pewne czynniki transkrypcyjne, między innymi białko TP53, mogą mieć wpływ na regulację ekspresji surwiwiny w różnych typach nowotworów [58, 59].

Uważa się, że zwiększona ekspresja surwiwiny w komórkach nowotworowych może być jednym z ważniejszych czynników odpowiedzialnych za zmniejszenie skuteczności chemioterapii w trakcie leczenia przeciwnowotworowego [60]. Wielu badaczy dopatruje się szansy na poprawę skuteczności leczenia przeciwnowotworowego poprzez zwiększenie wrażliwości komórek nowotworowych na stosowaną terapię, afekt ten miałby zostać uzyskany poprzez obniżenie ekspresji surwiwiny. Przedstawione powyżej, w znacznym uproszczeniu, podstawy teoretyczne doprowadziły do podjęcia przez liczne firmy farmaceutyczne próby stworzenia leków bazujące na technologii antysensownej, których działanie polegać miałyby na hamowaniu syntezy omawianego białka, a przez to na uwrażliwieniu komórek nowotworowych na stosowaną chemioterapię i radioterapię [61, 62]. Zahamowanie ekspresji surwiwiny z wykorzystaniem modeli zwierzęcych oraz specjalnie skonstruowanych wektorów wirusowych potwierdziło, iż wraz z zahamowaniem ekspresji omawianego białka, dochodzi do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych w NSCLC, zmniejszenia ich potencjału do tworzenia przerzutów oraz nasilenia procesów apoptozy w eksperymentach *in vitro* [63].

## 2.1. Białko Ki-67 – charakterystyka i rola.

Białko Ki-67, kodowane przez gen *MKI67*, nazywane jest również antygenem Ki-67, ponieważ pierwotnie zostało opisane przy użyciu przeciwciała oznaczonego jako Ki-67 [64]. Jego ekspresja obserwowana jest we wszystkich aktywnych fazach cyklu komórkowego (G1, S, G2, mitoz), natomiast nie jest stwierdzana w fazie G0, co czyni to białko idealnym markerem proliferacji komórkowej [65-66]. Ki-67 charakteryzuje się zmiennym wzorcem ekspresji w jądrze komórkowym w zależności od fazy cyklu komórkowego, co ma związek ze zmianą stopnia fosforylacji omawianego białka, a w efekcie zmianą jego funkcji oraz struktury przestrzennej w nukleoplazmie [66–69]. W trakcie mitozy białko Ki-67 jest fundamentalnym składnikiem warstwy perichromosomalnej na powierzchni chromosomów. Zapobiega nadmiernej agregacji chromosomów w trakcie mitozy, a jego brak skutkuje asymetrycznym podziałem jądra komórkowego i dysproporcją w obrębie jąder potomnych na biegunach dzielącej się komórki [70–72].

Nasilenie jego ekspresji wykorzystywane jest jako narzędzie prognostyczne w diagnostyce różnych chorób nowotworowych i określane jest mianem indeksu proliferacyjnego (ang. *proliferation index, PI*) [73, 74]. Na podstawie przeprowadzonej przez Xie i wsp. metaanalizy wykazano, iż w przypadku raka nerki (ang. *renal cell carcinoma, RCC*) silna ekspresja Ki-67 w komórkach nowotworowych koreluje z gorszym rokowaniem oraz wiąże się z wyższym stopniem zaawansowania nowotworu [75]. Również w przypadku nowotworów gruczołu piersiowego, na podstawie przeprowadzonych licznych badań, wykorzystuje się badanie poziomu ekspresji Ki-67 jako czynnika prognostycznego [76–79]. W grupie pacjentów z czerniakiem (ang. *melanoma*), rakami płaskonabłonkowymi okolicy głowy i szyi (ang. *head and neck squamous cell carcinomas*) oraz nowotworami podścieliskowymi przewodu pokarmowego wysoki poziom ekspresji Ki-67 również okazał się być niekorzystnym czynnikiem prognostycznym [80–82]. W grupie chorych z nowotworami trzustki wysoki indeks proliferacyjny wiązał się z istotnie krótszym czasem przeżycia wolnym od progresji [83]. W przypadku pacjentów z rakiem gruczołu krokowego wysoki poziom ekspresji Ki-67 wiązał się z wyższym stopniem zaawansowania nowotworu [84]. Istnieją doniesienia wskazujące na przydatności oceny poziomu ekspresji Ki-67 w ocenie prawdopodobieństwa wznowy biochemicznej raka gruczołu krokowego,

co miałyby pomóc w wyborze odpowiedniej terapii adjuwantowej oraz kwalifikacji pacjentów do ścisłego nadzoru onkologicznego [85–87].

W odniesieniu do NSCLC wykazano, iż silna ekspresja antygenu Ki-67 w komórkach nowotworowych związana była z niekorzystnym rokowaniem, krótszym czasem przeżycia wolnego od choroby oraz krótszym czasem przeżycia wolnego od wznowy po zabiegu resekcji guza [88–93].

Biorąc pod uwagę całokształt danych dotyczących przydatności oceny poziomu ekspresji Ki-67 w komórkach nowotworowych różnych typów nowotworów, można uznać omawiane białko za bardzo przydatne narzędzie służące do oceny stopnia nasilenia proliferacji komórkowej. W przypadku NSCLC, w związku z jednoznacznymi wnioskami płynącymi z cytowanych powyżej prac badawczych, analiza indeksu proliferacyjnego przy użyciu Ki-67 wydaje się być uzasadniona i pomocna w prognozowaniu przebiegu choroby nowotworowej.

## **2.2. Ocena nasilenia procesu apoptozy w NSCLC.**

Apoptoza nazywana jest również programowaną śmiercią komórki, ponieważ w odróżnieniu od nekrozy, stanowi proces regulowany, ściśle kontrolowany przez liczne mechanizmy komórkowe oraz samoograniczający się. Z apoptozą związane są charakterystyczne zmiany, jakie zachodzą w wyglądzie komórki. Dochodzi w nich do odwodnienia cytoplazmy, kondensacji chromatyny i fragmentacji jądra komórkowego. Materiał genetyczny (DNA) cięty jest wybiórczo i w kontrolowany sposób. Organelle komórkowe są zachowane, a kształt komórki ulega zmianie [94]. Apoptoza jest procesem, który jest kluczowy dla prawidłowego rozwoju organizmów wielokomórkowych i pozwala między innymi na usuwanie komórek, które utraciły możliwość pełnienia swojej funkcji, zostały uszkodzone w nieodwracalny sposób lub nastąpiły istotne mutacje ich materiału genetycznego [95]. Proces ten pozwala w kontrolowany sposób regulować ilość komórek oraz umożliwia właściwy rozwój tkanek, narządów i całego organizmu. Apoptoza zaangażowana jest również w różne procesy patologiczne, w których obok nekrozy, bierze udział w eliminowaniu komórek. Z takim stanem mamy do czynienia w ostrym zawale mięśnia sercowego, gdy dochodzi do obumierania niedokrwionych kardiomiocytów [96], a także u pacjentów zakażonych wirusem HIV, u których obserwujemy apoptozę limfocytów T CD4+ [97]. Kolejnymi schorzeniami, w których nasilenie procesów apoptozy ma kluczowe znaczenie,

są choroby nowotworowe. W ich przebiegu możemy obserwować zarówno nasilenie procesów apoptozy jak i zahamowanie. Wiele grup badawczych próbowało wykazać związek między przebiegiem choroby nowotworowej a nasileniem tych procesów [98–103] Prowadzono liczne badania dotyczące mediatorów procesu apoptotycznego jak i czynników regulatorowych, zarówno stymulujących, jak i hamujących procesy programowanej śmierci komórkowej. Jednym z parametrów ocenianych w materiale klinicznym, uzyskanym od pacjentów z chorobami nowotworowymi, jest tzw. indeks apoptotyczny (ang. *apoptotic index*, AI). Wskaźnik ten odzwierciedla odsetek komórek nowotworowych, będących w trakcie apoptozy. Oceniany on jest na materiale uzyskanym zwykle w wyniku resekcji zmiany nowotworowej. Analizę indeksu apoptotycznego można przeprowadzić na różne sposoby [104]:

- A. z zastosowaniem mikroskopii świetlnej, bazując na charakterystycznych zmianach morfologicznych komórek ulegających apoptozie,
- B. z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej, pozwalającej na uwidocznienie zmian jakie zachodzą w obrębie komórek ulegających apoptozie. Oceniana jest między innymi kondensacja chromatyny w okolicy błony jądrowej oraz fragmentacja jądra komórkowego,
- C. z wykorzystaniem elektroforezy DNA w żelu agarozowym, co pozwala na uwidocznienie sekwencyjnej degradacji DNA oraz wykazanie obecności fragmentów DNA wielkości około 300 tys. par zasad. Na skutek sekwencyjnej degradacji materiału genetycznego podczas procesu apoptozy uzyskuje się „obraz drabiny” podczas elektroforezy DNA w żelu agarozowym,
- D. z wykorzystaniem cytometrii przepływowej pozwalającej na dokładną ilościową ocenę komórek apoptotycznych. Metoda bazuje na wykorzystaniu specyficznych dla DNA fluorochromów, które pozwalają na analizę degradacji DNA w komórkach nowotworowych przepływających przez cytometr – każda komórka analizowana jest osobno,
- E. z wykorzystaniem reakcji TUNEL, która bazuje na zjawisku łączenia się specyficznych znaczników (biotynylowana trójfosforodeoksyurydyna łącznie z terminalną deoksynukleotydylotransferazą TDT) z 3' hydroksylowymi końcami pękniętych fragmentów DNA. Ocena następnie odbywa się zwykle przy użyciu mikroskopii świetlnej lub fluorescencyjnej oraz ocenie nasilenia reakcji barwnej,

F. z wykorzystaniem metody immunohistochemicznej (IHC), która bazuje na ocenie komórek apoptotycznych z wykorzystaniem specyficznej reakcji przeciwciał skierowanych przeciwko różnym substratom/białkom. W tym celu wykorzystywane są zwykle białka, o których wiadomo, iż zaangażowane są w proces programowanej śmierci komórki. Najczęściej w tym celu wykorzystuje się specyficzne reakcje przeciwciał z takimi substratami jak: kaspaza-3, białko TP53 oraz aneksyna V [104].

Analiza indeksu apoptotycznego w zmianach przednowotworowych oraz raku płaskonabłonkowym jamy ustnej, wykazała stopniowy wzrost nasilenia procesów apoptozy z najniższym ich wskaźnikiem w obrębie zdrowej śluzówki jamy ustnej i najwyższym w złośliwych zmianach nowotworowych. Na podstawie uzyskanych rezultatów zasugerowano, iż wzrost indeksu apoptotycznego może świadczyć o wyższym potencjale danej zmiany do transformacji nowotworowej lub może być wykorzystane jako potencjalny czynnik prognostyczny [105].

W przypadku NSCLC, ocena indeksu apoptotycznego jako potencjalnego czynnika prognostycznego jest trudna do postawienia jednoznacznych wniosków. Tanaka i wsp. na podstawie przeprowadzonych badań wysunęli tezę, iż zarówno niski jak i wysoki indeks apoptotyczny może stanowić korzystny czynnik prognostyczny. Postawili również hipotezę, iż guzy z niskim AI charakteryzują się jednocześnie niskim indeksem proliferacyjnym, co korzystnie wpływa na rokowanie. Z kolei w przypadku guzów intensywnie proliferujących rokowanie jest gorsze, jednak nasiloną apoptozą (wysoki AI) jest czynnikiem istotnie wpływającym na poprawę rokowania [98]. Ten sam zespół badaczy wykazał jednak, iż do nasilenia procesów apoptozy przy zwiększonej proliferacji komórkowej dochodzi tylko w sytuacji, gdy zachowane są prawidłowo działające mechanizmy indukujące apoptozę [99].

Z kolei grupa badaczy w zespole Törmänen i wsp. wykazała, iż zwiększony indeks apoptotyczny stanowi niekorzystny czynnik prognostyczny w NSCLC [106]. Również Langendijk i wsp. prowadząc badania w grupie pacjentów z nieoperacyjnymi NSCLC w stadium III zaawansowania klinicznego, poddanych radioterapii wykazali, iż podwyższony indeks apoptotyczny wiązał się z krótszym czasem przeżycia oraz większą częstością występowania przerzutów odległych w analizowanej grupie chorych [100].

Z kolei Hanaoka i wsp. nie stwierdzili związku pomiędzy nasileniem indeksu apoptotycznego a danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów [107]. Również grupa



badaczy z zespołu Dworakowska i wsp. wykazała, iż indeks apoptotyczny jako niezależny czynnik, nie ma wartości prognostycznej niezależnie od poziomu nasilenia apoptozy. Dopiero wspólne zestawienie bardzo wysokiego AI oraz nasilonej ekspresji jądrowego antygenu komórek proliferujących (ang. *proliferating cell nuclear antygen* – PCNA) wiązało się z istotnie krótszym czasem całkowitego przeżycia w porównaniu z pozostałą grupą chorych [101].

Przedstawione powyżej dane dowodzą, iż istnieją duże rozbieżności dotyczące oceny przydatności indeksu apoptotycznego jako czynnika prognostycznego w NSCLC, wskazujące na AI jako zarówno korzystny, neutralny jak i niekorzystny czynnik rokowniczy. Dowodzi to istotnemu zróżnicowaniu biologii komórki nowotworowej w NSCLC lub roli innych czynników wpływających w istotny sposób na rokowanie i przeżycie pacjentów z nowotworami płuc. Przykładem mogą być przytoczone powyżej badania przeprowadzone przez Tanaka i wsp., w których dowodzili, iż obecność sprawnie funkcjonujących mechanizmów indukujących procesy apoptozy przy zwiększonej proliferacji komórkowej wpływa na poprawę rokowania w tej grupie pacjentów.

### **2.3. Nowotwory płuc (ze szczególnym uwzględnieniem NSCLC).**

Klasyfikacja nowotworów płuc jest następująca [108]:

1. Raki niedrobnokomórkowe płuc:
  - a) rak gruczołowy,
  - b) rak płaskonabłonkowy,
  - c) rak wielkokomórkowy.
2. Rak drobnokomórkowy płuc
3. Rzadkie nowotwory płuc:
  - a) rak gruczołowo-nabłonkowy (mieszany),
  - b) rak mięsakowy,
  - c) nowotwory typu śliniankowego,
  - d) rakowiak,
  - e) guzy z komórek mezenchymalnych,
  - f) guzy zarodkowe.

Nowotwory płuc stanowią najczęstszą przyczynę zgonów z powodu chorób nowotworowych w Polsce niezależnie od płci. Obserwacje epidemiologiczne

prorowadzone w Polsce wskazują na stopniowy spadek zachorowalności na raka płuc w grupie mężczyzn w ostatniej dekadzie oraz stały, utrzymujący się wzrost zachorowalności na nowotwory płuc w grupie kobiet [109]. W skali ogólnoswiatowej obserwuje się wzrost częstości zachorowania na nowotwory płuc, aczkolwiek w krajach rozwiniętych, dzięki skutecznej polityce antynikotynowej, trend ten został nie tyle zahamowany, co nawet odwrócony [110]. 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 [111]. W ostatniej dekadzie obserwuje się niepokojący wzrost liczby zachorowań na nowotwory płuc u osób nigdy niepalących papierosy [112]. Odsetek osób niebędących palaczami w grupie pacjentów z nowotworami płuc wykazuje duże zróżnicowanie geograficzne. W niektórych rejonach Południowej Azji odsetek ten w grupie kobiet sięgać może nawet 83% [113], [114], podczas gdy w Stanach Zjednoczonych odsetek ten wynosi zaledwie około 15% [115, 116].

We wczesnej fazie raka płuc przebieg najczęściej jest bezobjawowy, co skutkuje późnym rozpoznaniem choroby oraz przekłada się na niekorzystne rokowanie. Jednym z najczęstszych objawów choroby, lecz bardzo niespecyficznym, jest przewlekły kaszel lub zmiana jego dotychczasowego charakteru, zwłaszcza u palaczy. Wśród pozostałych objawów należy wymienić: duszność, ból w klatce piersiowej, osłabienie i ubytek masy ciała, nawracające zapalenia płuc, zespół żyły głównej górnej, objawy miejscowej destrukcji struktur klatki piersiowej, objawy wynikające z obecności przerzutów w innych narządach oraz zespoły paraneoplastyczne [108].

Nowotwory płuc charakteryzują się złym rokowaniem oraz niską 5-letnią przeżywalnością. W przypadku NSCLC w stadium miejscowego zaawansowania, 5-letnia przeżywalność wynosi ok. 50%, natomiast w przypadku choroby uogólnionej (z obecnością przerzutów w momencie rozpoznania) zaledwie 2%. Z kolei w przypadku raka drobnokomórkowego płuc przeżywalność 5-letnia w stadium miejscowego zaawansowania wynosi 10-13%, natomiast w przypadku choroby uogólnionej zaledwie 1-2% [117]. 5-letnia przeżywalność pacjentów poddanych doszczętnej resekcji raka niedrobnokomórkowego płuc w stadium zaawansowania klinicznego I, II oraz IIIa jest lepsza i wynosi odpowiednio 60-80%, 40-50% oraz 15-25% [108].

Tabela 1. Klasyfikacja TNM stopnia zaawansowania niedrobnokomórkowych raków płuc (rewizja 8. z 2017 r.) [108].

Klasyfikacja TNM (rewizja 8. z 2017 r.) w NSCLC	
guz pierwotny (T)	
Tx	guz rozpoznawany na podstawie stwierdzenia komórek nowotworowych w popłuczynach oskrzelowych, ale niewidoczny radiologicznie lub bronchoskopowo
T0	nie ma cech guza pierwotnego
Tis	rak przedinwazyjny ( <i>in situ</i> )
T1	guz o największym wymiarze $\leq 3$ cm, otoczony mięszem płucnym lub opłucną trzewną, w badaniu bronchoskopowym nie nacieka oskrzela głównego <sup>a</sup>
T1(mi)	gruczołakorak minimalnie inwazyjny <sup>b</sup>
T1a	guz o największym wymiarze $\leq 1$ cm <sup>a</sup>
T1b	guz o największym wymiarze $> 1$ cm, ale $\leq 2$ cm <sup>a</sup>
T1c	guz o największym wymiarze $> 2$ cm, ale $\leq 3$ cm <sup>a</sup>
T2	guz o największym wymiarze $> 3$ cm, ale $\leq 5$ cm lub o $\geq 1$ z następujących cech: – naciekający główne oskrzele, ale nie dochodzący do rozwidlenia tchawicy – naciekający opłucną trzewną – guz powodujący niedodmę lub obturacyjne zapalenie płuca sięgające okolicy wnęki, obejmujące część płuca lub całe płuco
T2a	guz o największym wymiarze $> 3$ cm, ale $\leq 4$ cm
T2b	guz o największym wymiarze $> 4$ cm, ale $\leq 5$ cm
T3	guz o największym wymiarze $> 5$ cm, ale $\leq 7$ cm lub o $\geq 1$ z następujących cech: – bezpośrednio naciekający opłucną ścienną, ścianę klatki piersiowej (w tym guz szczytu płuca), nerw przeponowy lub osierdzie – guz z odrębnymi ogniskami raka w obrębie tego samego płata płuca
T4	guz o największym wymiarze $> 7$ cm lub o $\geq 1$ z następujących cech: – naciekający przeponę, śródpiersie, serce, duże naczynia, tchawicę, nerw krtaniowy wsteczny, przełyk, rozwidlenie tchawicy lub trzon kręgu – guz z odrębnymi ogniskami raka w obrębie innego płata tego samego płuca

---

**przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych (N)**

---

Nx	nie można ocenić regionalnych węzłów chłonnych
N0	nie stwierdza się przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych
N1	przerzuty w węzłach przyoskrzelowych lub węzłach wnątkowych po stronie guza lub ich bezpośrednie naciekanie
N2	przerzuty w węzłach śródpiersiowych po stronie guza i/lub w węzłach pod ostrogą główną
N3	przerzuty w przeciwległych węzłach wnątkowych lub śródpiersiowych przerzuty w węzłach nadobojczykowych

---

**przerzuty odległe (M)**

---

Mx	nie można ocenić obecności przerzutów odległych
M0	nie stwierdza się przerzutów odległych
M1a	odrębne ognisko lub ogniska raka w drugim płucu – ogniska raka w opłucnej lub w osierdziu lub wysięk nowotworowy w jamie opłucnej lub jamie osierdza <sup>c</sup>
M1b	pojedyncze przerzuty odległe (poza klatką piersiową) <sup>d</sup>
M1c	mnogie przerzuty odległe (poza klatką piersiową) w jednym lub wielu narządach

---

<sup>a</sup> Rzadkie, powierzchownie rozprzestrzeniające się guzy o dowolnym wymiarze z naciekiem ograniczonym do ściany oskrzela (również oskrzela głównego) są także klasyfikowane jako T1a.

<sup>b</sup> Pojedynczy gruczolakorak  $\leq 3$  cm, głównie tapetujący przegrody międzypęcherzykowe, z naciekiem  $\leq 5$  mm w jednym z ognisk.

<sup>c</sup> Zazwyczaj płyn w jamie opłucnej lub jamie osierdza w przebiegu raka płuca ma charakter nowotworowy. U niewielkiej części chorych badania mikroskopowe płynu z jamy opłucnej lub jamy osierdza nie wykazują obecności komórek nowotworu, płyn nie zawiera krwi i nie ma charakteru wysięku. Jeśli nie ma przesłanek klinicznych do wiązania wysięku z nowotworem, obecności płynu w jamie opłucnej lub jamie osierdza, nie należy brać pod uwagę w klasyfikacji zaawansowania nowotworu.

<sup>d</sup> Dotyczy także pojedynczego, odległego (nieregionalnego) węzła chłonnego.

---

Leczenie NSCLC uzależnione jest ściśle od stopnia zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej [Tabela 1] oraz dodatkowych czynników, wśród których najważniejszym jest stan sprawności chorego oraz ocena czynnościowa wydolności układu oddechowego i układu krążenia. Pacjenci w stopniu I oraz II zaawansowania klinicznego powinni być pierwotnie leczeni chirurgicznie metodą otwartą lub wideoskopową (ang. *video assisted thoracic surgery* – VATS). Metodą z wyboru jest całkowita radykalna resekcja zmiany w granicach anatomicznych (lobektomia) z usunięciem węzłów chłonnych wnęki i śródpiersia. Resekcje o mniejszej rozległości (segmentektomia) wykonywane są sporadycznie i dotyczą zmian o średnicy <2 cm (cecha T1a w klasyfikacji TNM). Niektórych pacjentów, zwłaszcza w przypadku wątpliwości co do doszczętności wykonanego zabiegu, kwalifikuje się do radioterapii adjuwantowej (uzupełniającej). Z kolei w stopniach IB – IIIA zaawansowania klinicznego, uzupełniająca chemioterapia uważana jest za standard postępowania (chemioterapia adjuwantowa). Stopień III zaawansowania klinicznego stanowi wyjątkowo zróżnicowaną grupę chorych – należą tutaj pacjenci w stadium IIIA, spośród których większość powinna być kwalifikowana do pierwotnego leczenia operacyjnego, oraz pacjenci w stadium IIIB, którzy do radykalnej resekcji kwalifikowani są wyjątkowo. Należy podkreślić, iż stopień zajęcia węzłów chłonnych jest bardzo ważnym kryterium decydującym o wyborze strategii postępowania – cecha N2 w klasyfikacji TNM w zasadzie dyskwalifikuje pacjentów od radykalnego leczenia chirurgicznego (poza tak zwanym zajęciem węzłów chłonnych w minimalnym stopniu, w którym stwierdza się obecność przerzutów do pojedynczych węzłów w obrębie jednej ich grupy, bez naciekania torebki). W grupie pacjentów z zajęciem węzłów chłonnych (cecha N2) stosuje się radykalną radioterapię w połączeniu z chemioterapią lub resekcją chirurgiczną z chemioterapią neoadjuwantową. Dawniej postępowanie w przypadku NSCLC w stadium zaawansowania klinicznego IIIB obejmowało wyłącznie radykalną radioterapię. Obecnie uważa się, iż zastosowanie chemioterapii przed naświetlaniem pozwala na zwiększenie skuteczności leczenia oraz odsetka pozytywnych odpowiedzi. Stadium IV zaawansowania klinicznego wiąże się z bardzo niekorzystnym rokowaniem, a leczenie ma charakter niemal wyłącznie paliatywny. Sprowadza się do zastosowania paliatywnej radioterapii, ewentualnie samego leczenia objawowego. W grupie pacjentów z NSCLC w wysokich stadiach zaawansowania klinicznego stosuje się również leki skierowane przeciwko swoistym celom molekularnym w komórkach nowotworowych. Jeden z przykładów stanowią inhibitory kinaz tyrozynowych

receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epithelial growth factor receptor* – EGFR). Wykorzystywane są one wyłącznie u pacjentów, u których potwierdzona została mutacja genu *EGFR* w komórkach guza. Zwykle dotyczy to pacjentów z AC (10-15% pacjentów z tym typem histologicznym NSCLC), ponieważ w SCC mutacja ta stwierdzana jest sporadycznie [108, 118, 119]. Kolejny przykład stanowią inhibitory kinaz tyrozynowych ALK/ROS1 (ALK ang. *anaplastic lymphoma kinase* – kinaza chłoniaka anaplastycznego; ROS1 – receptor kinazy tyrozynowej kodowany przez gen *ROS1*). Mutacje genu *ALK* (najczęściej prowadzące do powstania genu fuzyjnego *ALK-EML4*) oraz genu *ROS1* (najczęściej prowadzące do powstania genu fuzyjnego *CD74-ROS1*) skutkują syntezą zmienionych strukturalnie białek, sprzyjających niekontrolowanej proliferacji komórek nowotworowych NSCLC. Strukturalne podobieństwo obu białek pozwala na zastosowanie celowanej terapii jaką jest wykorzystanie kryzotylibu, będącego selektywnym drobnocząsteczkowym inhibitorem receptora kinaz tyrozynowych ALK oraz ROS1 [120–122]. Rearanżacja genu *ROS1* dotyczy ok. 2% chorych z podtypem gruczołowym NSCLC [123]. Kolejnym mechanizmem molekularnym, wykorzystywanym w celowanej terapii NSCLC, jest oddziaływanie przy użyciu swoistych przeciwciał na interakcje między receptorem programowanej śmierci (PD-1) a jego ligandem (PD-L1). Zablockowanie szlaku sygnałowego PD1/PD-L1 zapobiega dezaktywacji cytotoksycznych limfocytów efektorowych, skutkującej upośledzeniem przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej organizmu [124-25]. Wśród grupy kinaz tyrozynowych, mających znaczenie w patogenezie chorób nowotworowych płuc, wymienić należy również białko B-Raf. Kodowane jest ono przez gen *BRAF* i uczestniczy w wewnątrzkomórkowych szlakach sygnałowych. Nowotwory płuc, w których stwierdzone są mutacje genu *BRAF*, charakteryzują się mniejszą skutecznością stosowanej chemioterapii oraz bardziej agresywnym przebiegiem choroby. Stanowi to powód rosnącego zainteresowania inhibitorami B-Raf w terapii przeciwnowotworowej pacjentów z NSCLC [126–128].

W świetle zaprezentowanych danych dotyczących rokowania oraz leczenia pacjentów z NSCLC, jednoznacznie widać jak ważna jest wczesna diagnostyka oraz nieustanne poszukiwanie nowych metod leczenia i prowadzenie badań nad etiopatogenezą tej grupy chorób.

### 3. Uzasadnienie podjęcia tematu.

Powyżej przytoczono liczne badania przeprowadzone z wykorzystaniem zarówno nowotworowych linii komórkowych, jak i materiału klinicznego uzyskanego od pacjentów z różnymi typami nowotworów. Wskazują one jednoznacznie na potencjalną rolę białka testyny w patogenezie różnych typów nowotworów. Obserwacje poczynione przez wiele niezależnych zespołów badawczych wydają się dostatecznie uzasadniać decyzję o zaplanowaniu i wykonaniu szczegółowych badań dotyczących udziału testyny w procesach nowotworowych. Wskazuje się na jej rozmaite funkcje supresorowe, począwszy od wpływu na procesy proliferacji komórkowej i cykl podziału komórkowego, a skończywszy na roli odgrywanej w procesach apoptozy i związku z kinazą p38-MAPK, zaangażowaną w procesy programowanej śmierci komórki, czy czynnikami proapoptotycznymi takimi jak TP53, Puma oraz Bax. Dotychczas nie przeprowadzono szczegółowych badań dotyczących poziomu ekspresji testyny w NSCLC z wykorzystaniem materiału klinicznego uzyskanego w wyniku zabiegu resekcji guza. Dostępne są wyłącznie badania przeprowadzone z wykorzystaniem linii komórkowych NSCLC.

W świetle przytoczonych powyżej danych, podjęcie trudu celem zbadania roli testyny w NSCLC wydaje się być zasadne. Choroby nowotworowe, a zwłaszcza nowotwory płuc, stanowią na przestrzeni ostatnich dekad coraz większy problem zdrowotny, a każda próba bardziej szczegółowego poznania patogenetyki chorób nowotworowych daje szansę na zwiększenie efektywności leczenia oraz pozwala postawić kolejny krok w poszukiwaniu coraz skuteczniejszych metod terapeutycznych. Kolejnym argumentem, dodatkowo podkreślającym wartość naukową niniejszej rozprawy, jest fakt przeprowadzenia badań z wykorzystaniem materiału klinicznego pozyskanego od pacjentów z NSCLC w wyniku zastosowanego leczenia operacyjnego.

#### **4. Cele pracy.**

1. Ocena lokalizacji ekspresji testyny w komórkach niedrobnokomórkowych raków płuc.
2. Ocena nasilenia ekspresji testyny, surwiwiny oraz Ki-67 w niedrobnokomórkowych rakach płuc.
3. Ocena związku pomiędzy poziomem ekspresji wyżej wymienionych białek a danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów z uwzględnieniem analizy przeżycia.
4. Ocena indeksu apoptotycznego w niedrobnokomórkowych rakach płuc (ocenanego przy pomocy analizy ekspresji kaspazy-3) oraz jego korelacja z danymi kliniczno-patologicznymi oraz poziomem ekspresji badanych białek.



## 5. Materiały i metody.

Materiał do przeprowadzenia badań stanowiły łącznie 203 przypadki NSCLC (typ płaskonabłonkowy: 83 przypadki, typ gruczołowy: 120 przypadków). Kontrolę stanowił materiał uzyskany z marginesu cięcia chirurgicznego. Badania uzyskały pozytywną opinię komisji bioetycznej działającej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, nr opinii KB-115/2017 (w załączeniu). Wykorzystano różne metody badawcze (szczegółowo opisane w kolejnych podrozdziałach):

1. metodę immunohistochemiczną - reakcje przeprowadzono na wszystkich badanych przypadkach NSCLC oraz na materiale kontrolnym,
2. metodę Western blot - reakcje przeprowadzono na łącznie 30 przypadkach NSCLC (15 przypadków AC oraz 15 przypadków SCC) oraz na materiale kontrolnym,
3. metodę łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) na materiale uzyskanym z wykorzystaniem mikrodysekcji laserowej - reakcje przeprowadzono na łącznie 36 przypadkach NSCLC (18 przypadków AC oraz 18 przypadków SCC) oraz na materiale kontrolnym,
4. mikroskopię konfokalną celem oceny lokalizacji ekspresji testyny z wykorzystaniem linii komórkowych NSCLC oraz fibroblastów ludzkich.

Do przeprowadzenia analizy wykorzystano materiał kliniczny uzyskany od pacjentów operowanych z powodu niedrobnokomórkowych raków płuc w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej przy Dolnośląskim Centrum Chorób Płuc we Wrocławiu. Dokładna charakterystyka grupy badawczej została przedstawiona w Tabeli 2.

Tabela 2. Opis grupy badawczej z uwzględnieniem danych kliniczno-patologicznych pacjentów oraz typu histologicznego NSCLC.

Parametr Typ histologiczny	NSCLC	
	SCC	AC
Liczebność grupy	83	120
Płeć, no. (%)		
Mężczyzna	53 (64)	64 (53)
Kobieta	30 (36)	56 (47)
Wiek w momencie zachorowania (mediana, zakres)	66 (52-82)	66 (50-84)
Stadium zaawansowania nowotworu, no. (%)		
I	34 (41)	50 (42)
II	36 (43)	31 (26)
III	11 (13)	30 (25)
brak danych	2 (3)	9 (7)
Cecha T w klasyfikacji TNM, no. (%)		
1	18 (22)	40 (33)
2	53 (64)	60 (50)
3	10 (12)	9 (7,5)
4	1 (1)	2 (2)
brak danych	1 (1)	9 (7,5)
Zajęcie węzłów chłonnych (cecha N), no. (%)		
0	55 (66)	65 (54)
1	17 (20)	20 (17)
2	10 (12)	27 (23)
brak danych	1 (2)	8 (6)
Stopień złośliwości histologicznej G, no. (%)		
1	0 (0)	2 (2)
2	73 (88)	58 (48)
3	10 (12)	60 (50)
Średnica guza [cm] (mediana, zakres)	4 (1,5-9)	3.5 (1-11)
Czas przeżycia [msc.] (mediana, zakres)	33 (1-81)	26 (0-77)
Silna ekspresja Ki-67, no. (%)	40 (48)	21 (17,5)

## 5.1. Hodowla linii komórkowych.

Linie komórkowe fibroblastów ludzkich (IMR-90) oraz raków płuc płaskonabłonkowego (NCI-H1703, NCI-H522) i gruczołowego (A549) hodowano w standardowych warunkach (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Hodowlę linii komórkowej IMR-90 prowadzono w medium hodowlanym Minimum Essential Medium (MEM)(Lonza, Bazylea, Szwajcaria), wzbogaconym o 10% surowicy bydlęcej. Do hodowli linii komórkowych NCI-H1703 oraz NCI-H55 wykorzystano medium hodowlane RPMI-1640 (Lonza, Bazylea, Szwajcaria), z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej. Natomiast do hodowli linii komórkowej A549 użyto medium F-12K (Thermo Fischer Scientific, Waltham Massachusetts, USA), suplementowanego 10% surowicy bydlęcej.

W celu zebrania osadów z badanych linii, komórki poddano działaniu trypsyny, następnie odwirowano oraz zawieszono w roztworze PBS. W kolejnym etapie ponownie odwirowano komórki, a uzyskany osad zamrożono w temperaturze -80°C do dalszych badań. Uzyskany w powyższy sposób materiał komórkowy wykorzystano do oceny poziomu *TES* mRNA metodą RQ-PCR oraz celem oceny lokalizacji ekspresji testyny z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej.

## 5.2. Mikromacierze tkankowe (TMA).

Pierwszym etapem, poprzedzającym przeprowadzenie właściwych reakcji immunohistochemicznych (IHC), było przygotowanie mikromacierzy tkankowych (ang. *tissue microarrays* – TMAs) z zastosowaniem urządzenia TMA Grand Master (3D Histech, Węgry). W tym celu na bloczek parafinowy, z którego utworzona miała zostać mikromacierz, przeniesiono właściwe rdzenie tkankowe średnicy 1,5 mm każdy. Rdzenie uzyskano przy użyciu igły, pobierając każdorazowo materiał z pojedynczych bloczków parafinowych reprezentujących analizowane przypadki NSCLC. Celem utworzenia TMA z każdego badanego bloczka pobrano łącznie 3 reprezentatywne próbki. Uzyskaną w ten sposób macierz pocięto mikrotomem na skrawki grubości 4 µm celem przygotowania preparatu, który kolejno wybarwiono metodą hematoksylina-eozyna i zeskanowano przy użyciu skanera mikromacierzy Pannoramic MIDI (3D Histech, Węgry).

### 5.3. Reakcja immunohistochemiczna (IHC).

Na przygotowanych mikromacierzach NSCLC wykonano reakcje IHC w aparacie Autostainer Link48 (Dako, Dania) przy użyciu systemu do wizualizacji EnVision™ FLEX+, High pH, Link (Dako, Dania). Do przeprowadzenia reakcji wykorzystano następujące przeciwciała:

- królicze monoklonalne anty-Testin (nr kat. NBP1-87987, Novus Biologicals, USA) w rozcieńczeniu 1:600,
- mysie monoklonalne anty-Ki-67 (nr kat. IR626, Dako, Dania) *ready-to-use*,
- mysie monoklonalne anty-Survivin (M3624, Dako, Dania) w rozcieńczeniu 1:100,
- mysie monoklonalne anty-Caspase-3 (nr kat. #9661S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) w rozcieńczeniu 1:400.

Reakcje IHC przeprowadzono według następującej procedury:

1. Deparafinizacja, nawodnienie i odsłonięcie epitopów w buforze EnVision Flex High pH (dla testyny, surwiwiny i kaspazy-3) oraz buforze EnVision Flex Low pH (dla Ki-67) – temp. 97 °C, 20 minut.
2. Studzenie w buforze płuczącym EnVision Flex Wash Buffer – 3 minuty.
3. Blokowanie aktywności endogennej peroksydazy poprzez inkubację w roztworze nadtlenu wodoru (EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent) – 5 minut.
4. Przepłukanie w buforze płuczącym EnVision Flex Wash Buffer (PBS z 0,05% Tween).
5. Inkubacja z przeciwciałem pierwszorzędowym – 20 minut.
6. Przepłukanie w buforze płuczącym EnVision Flex Wash Buffer (PBS z 0,05% Tween).
7. Inkubacja z przeciwciałami drugorzędowymi znakowanymi peroksydazą chrzanową (EnVision™ FLEX/HRP) – 20 minut.
8. Przepłukanie w buforze płuczącym EnVision Flex Wash Buffer (PBS z 0,05% Tween).
9. Inkubacja z substratem dla peroksydazy chrzanowej (EnVision™ FLEX DAB + Chromogen) – 10 minut.
10. Przepłukanie w buforze płuczącym EnVision Flex Wash Buffer (PBS z 0,05% Tween).

11. Inkubacja w buforze płuczącym EnVision Flex Wash Buffer (PBS z 0,05% Tween) – 5 minut.
12. Barwienie kontrastujące hematoksyliną (EnVision™ FLEX Hematoxylin) – 5 minut.
13. Przepłukanie w wodzie destylowanej.
14. Odwodnienie w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu (70%, 96%, alkohol absolutny) oraz ksylenie – 5 minut na każdy z etapów.
15. Zamknięcie preparatów szkiełkami nakrywkowymi (Dako, Dania) w Dako Mounting Medium (Dako, Dania) w aparacie Coverslipper (Dako, Dania).

W zależności od lokalizacji badanych antygenów zastosowano odmienne metody oceny nasilenia reakcji barwnej. Ocenę nasilenia reakcji cytoplazmatycznej dla testyny oraz reakcji jądrowo-cytoplazmatycznej dla surwiwiny przeprowadzono z zastosowaniem półilościowej skali wg Remmele i Stegner (IRS) uwzględniającej natężenie reakcji barwnej (A), jak i odsetek komórek pozytywnych (B) [129]. Ostateczny wynik stanowił iloczyn obu tych wartości ( $IRS = A \times B$ ) (Tabela 3). W zależności od uzyskanego wyniku w skali IRS przyjęto poziom ekspresji badanego antygeny jako: 0 – brak ekspresji; 1-2 – słaba ekspresja; 3-4 – umiarkowanie silna ekspresja; 6-12 – silna ekspresja.

Tabela 3. Skala oceny preparatów immunohistochemicznych z zastosowaniem metody Remmele i Stegner.

Liczba punktów	Intensywność reakcji barwnej	Odsetek komórek wykazujących reakcję (x %)
0	brak reakcji	0%
1	słaba reakcja	$x \leq 10\%$
2	umiarkowana reakcja	$10 < x \leq 50 \%$
3	silna reakcja	$50 < x \leq 80 \%$
4		$x > 80\%$

Niezależnie od oceny mikroskopowej, przeprowadzono równolegle komputerową analizę obrazu z uzyskanych preparatów przy użyciu oprogramowania analitycznego Quant Center firmy 3D Histech (3D Histech, Węgry). Program przy użyciu odpowiednich algorytmów dokonał oceny nasilenia reakcji barwnej (uzyskanej przy użyciu metody IHC) z zastosowaniem skali H-score. Oprogramowanie w pierwszym etapie dokonało oceny nasilenia reakcji barwnej w 4-stopniowej skali od 0 (brak reakcji) do 3+ (reakcja silna), następnie uwzględniając odsetek komórek o danym stopniu intensywności reakcji barwnej dokonało obliczeń według wzoru:

$$\text{H-score} = [1 \times (\% \text{ kom. o intensywności } 1+) + 2 \times (\% \text{ kom. o intensywności } 2+) + 3 \times (\% \text{ kom. o intensywności } 3+)]$$

Wynik przedstawiany w skali H-score jest wynikiem ilościowym i mieści się w zakresie: 0 – 300.

Jądrową ekspresję białka Ki-67 oceniano jako odsetek jąder komórkowych wykazujących pozytywną ekspresję badanego antygenu w stosunku do wszystkich komórek nowotworowych według skali: [0]:  $x \leq 5\%$  [1]:  $5\% < x \leq 25\%$ , [2]:  $25\% < x \leq 50\%$ , [3]:  $x > 50\%$ .

Wszystkie preparaty zostały ocenione z wykorzystaniem mikroskopu OLYMPUS BX-41 (Olympus, Japonia) pod powiększeniem 200x. Dokumentację fotograficzną wykonano stosując program Case Viewer (3D Histech, Węgry).

#### **5.4. Izolacja białka.**

Mrożone w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$  wycinki NSCLC inkubowano w buforze T-PER (Thermo Fisher Scientific, USA) z dodatkiem 0,2M PMSF oraz inhibitorów proteaz (Sigma Aldrich, USA) przez 30 minut. Materiał komórkowy z linii raków płuc (NCI-H1703, NCI-H522 oraz A549) trawiono w ProteoExtract Subcellular Proteome Kit (Calbiochem, USA) z dodatkiem 0,2M PMSF oraz inhibitorów proteaz (Sigma Aldrich, USA).

Następnie po zakończonej inkubacji uzyskane lizaty odwirowano z szybkością  $\geq 12\,000$  obr./min w czasie 15 minut w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ , po czym za pomocą zestawu Pierce BCA Protein Assai Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) przy zastosowaniu aparatu do oceny spektrofotometrycznej NanoDrop1000 (NanoDrop Technologies, USA) oznaczono poziom białka w uzyskanym lizacie.

## 5.5. Reakcja Western blot (WB).

W celu rozdzielenia białek wyizolowanych z badanych próbek wykorzystano metodę elektroforezy w obecności SDS (SDS-PAGE) według ich wielkości w kilodaltonach (kDa). Uzyskane na drodze elektroforezy żełe następnie użyto do transferu białek na membranę w systemie półsuchym.

Elektroforeza została wykonana według następującej procedury:

1. Przygotowanie 10% żelu poliakrylamidowego.
2. Nałożenie na żel próbek zawierających 30 µg wyizolowanych białek, zawieszonych w buforze próbkowym GLB (wg. Laemmli i wsp. [130]).
3. Podłączenie aparatu i prowadzenie rozdziału przez 15 minut przy napięciu 120V, a następnie przez 45 minut przy napięciu 140V.

Transfer białek w systemie półsuchym przeprowadzono w buforze do transferu (20% metanol; 48 mM TRIS; 39 mM glicyna; 0,1% SDS) na wykonane z fluorku poliwinylidenu (PVDF) membrany Immobilon-P (Merck, Niemcy). Transfer prowadzono przy napięciu 30V przez 30 minut w temperaturze 4°C, używając aparatu do transferu XCell SureLock™ (Thermo Fisher Scientific, USA).

Kolejnymi etapami było zablokowanie niespecyficzných miejsc wiązania oraz przeprowadzenie inkubacji ze specyficznymi przeciwciałami poliklonalnymi anti-*TES* (nr katalogowy: NBP1-87987, NovusBiologicals, USA).

Blokowanie membran i znakowanie specyficznymi przeciwciałami zostało przeprowadzone zgodnie z opisaną poniżej procedurą:

1. Płukanie w wodzie destylowanej.
2. Inkubacja przy użyciu roztworu blokującego (4% albumina bydlęca; 0.2 M Tris; 1.5 M NaCl; 0,1% Tween-20.) – 1 godzina, temperatura pokojowa.
3. Przepłukanie roztworem TBS-Tween (0.2 M Tris; 1.5 M NaCl; 0,1% Tween-20) – 3-krotnie po 10 minut.
4. Inkubacja w roztworze króliczych przeciwciał anti-*TES* (nr katalogowy: NBP1-87987, NovusBiologicals, USA) w rozcieńczeniu 1:500 w buforze (1% albumina bydlęca; 0.2 M Tris; 1.5 M NaCl; 0,1% Tween-20) – 24 godziny, 4°C.
5. Przepłukanie roztworem TBS-Tween – 3-krotnie po 10 minut.
6. Inkubacja w roztworze przeciwciała drugorzędowego oślego anti-króliczego (711-035-152; Jackson ImmunoResearch, USA), skoniugowanego

z peroksydazą chrzanową, w rozcieńczeniu 1:3000 w buforze (1% albumina bydlęca; 0.2 M Tris; 1.5 M NaCl; 0,1% Tween-20) – 1 godzina, temperatura pokojowa.

7. Przepłukanie roztworem TBS-Tween – 3-krotnie po 10 minut.
8. Inkubacja z substratem dla peroksydazy chrzanowej Luminata Classico (Merck) – 1 minuta.
9. Odsączenie membrany.
10. Detekcja chemiluminescencji w aparacie ChemiDoc (Bio-Rad, USA).

W celu oceny gęstości optycznej prążków obecnych na membranie wykorzystano program Image Lab™ 6.0.1 (Bio-Rad, USA). Ilość testyny była standaryzowana w stosunku do całkowitej ilości białka w każdej ścieżce na membranie, oznaczonej z wykorzystaniem gotowych zestawów TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit (Bio-Rad), zgodnie z instrukcjami producenta.

## **5.6. Mikrodysekcja laserowa.**

Wykorzystując zamrożony w ciekłym azocie i przechowywany w temp. -80°C materiał badawczy, uzyskany od pacjentów z NSCLC, przeprowadzono mikrodysekcję laserową z wykorzystaniem systemu MMI CellCut Plus (MMI, Glattbrugg, Szwajcaria). Przy użyciu kriostatu Leica CM1950 (Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy) uzyskano cienkie skrawki o grubości 8 µm, które kolejno umieszczono na ramkach pokrytych specjalną membraną PET (MMI, Glattbrugg, Szwajcaria). Preparaty następnie utrwalono w 100% izopropanolu i barwiono hematoksyliną i eozyną przy użyciu H&E Staining Kit Plus (MMI, Glattbrugg, Szwajcaria). W kolejnym etapie, wykorzystując mikroskopię świetlną wyznaczono obszar, który poddany został cięciu z wykorzystaniem stałej wiązki lasera padającej od dołu na membranę. Uzyskany w powyższy sposób materiał zebrano przy użyciu 500 µl probówki z adhezyjnym wieczkiem (MMI, Glattbrugg, Szwajcaria), do której na koniec dodano 50-100 µl buforu lizującego RLT (Qiagen, Hilden, Niemcy) i przechowywano w temperaturze -80°C do momentu izolacji RNA.



## 5.7. Izolacja całkowitego RNA.

Izolacja całkowitego RNA z próbek po mikrodysekcji laserowej została przeprowadzona z wykorzystaniem zestawu RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) zgodnie z następującą procedurą:

1. Przeniesienie lizatu badanej próbki do nowej 1,5 ml probówki i uzupełnienie objętości buforem RLT do 350  $\mu$ l.
2. Dokładne wymieszanie próbki przy użyciu mieszadła typu vortex przez 30 s.
3. Dodanie 350  $\mu$ l 70% roztworu etanolu i dokładne wymieszanie próbki przez pipetowanie.
4. Przeniesienie próbki na kolumnkę zawierającą złożę do oczyszczania kwasów nukleinowych, umieszczoną w 2 ml probówce. Odwirowanie kolumnki z prędkością  $\geq 8000$  g przez 15 s i usunięcie supernatantu.
5. Dodanie 700  $\mu$ l buforu RW1 na kolumnkę w celu przemycia membrany. Odwirowanie kolumnki z prędkością  $\geq 8000$  g przez 15 s i usunięcie supernatantu.
6. Przeniesienie kolumnki do nowej 2 ml probówki. Dodanie 500  $\mu$ l buforu RPE na kolumnkę w celu przemycia membrany. Odwirowanie kolumnki z prędkością  $\geq 8000$  g przez 15 s i usunięcie supernatantu.
7. Dodanie 500  $\mu$ l 80% roztworu etanolu na kolumnkę w celu przemycia membrany. Odwirowanie kolumnki z prędkością  $\geq 8000$  g przez 2 min i usunięcie supernatantu.
8. Przeniesienie kolumnki do nowej 2 ml probówki. Odwirowanie kolumnki z otwartym wieczkiem przy maksymalnych obrotach przez 5 min w celu osuszenia membrany.
9. Przeniesienie kolumnki do nowej 1,5 ml probówki. Naniesienie bezpośrednio na membranę 14  $\mu$ l wody wolnej od RNaz. Elucja RNA poprzez odwirowanie kolumnki przy maksymalnych obrotach przez 1 min.

Próbki RNA przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 5.8. Reakcje odwrotnej transkrypcji.

Wykorzystując wyizolowane RNA przeprowadzono następnie reakcje odwrotnej transkrypcji wykorzystując zestaw QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Niemcy). Dokładny skład i proporcje 20  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej zostały przedstawione w Tabeli 4.

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystanej w reakcji odwrotnej transkrypcji.

Składniki	Objętość
Mieszanina do eliminacji genomowego DNA – etap 1	
Bufor do eliminacji genomowego DNA (stężony 7-krotnie, gDNA Wipeout Buffer)	2 $\mu$ l
Wyizolowane RNA	zmienna objętość (10 pg - 1 $\mu$ g RNA)
Woda wolna od RNaz	do całkowitej objętości 14 $\mu$ l
Pozostałe składniki dodawane na kolejnych etapach w reakcji odwrotnej transkrypcji – etap 2	
Odwrotna transkryptaza (Quantiscript Reverse Transcriptase, zawierająca inhibitor RNaz)	1 $\mu$ l
Bufor reakcyjny (stężony 5-krotnie, Quantiscript RT Buffer)	4 $\mu$ l
Primery oligo-dT (RT Primer Mix)	1 $\mu$ l

Szczegółowy opis reakcji odwrotnej transkrypcji można podzielić na 2 zasadnicze etapy. Pierwszy etap polegał na przygotowaniu mieszaniny do eliminacji genomowego DNA (proporcje oraz składniki podane w tabeli 4), którą następnie inkubowano w czasie 2 minut w temperaturze 42 °C, po czym natychmiast umieszczono w lodzie. Drugi etap rozpoczęto od przygotowania i połączenia pozostałych składników w osobnej probówce (proporcje oraz składniki podane w tabeli 4), do której następnie dodano mieszaninę uzyskaną w poprzednim etapie. Całość inkubowano w czasie 15 minut w temperaturze 42 °C. Kolejno inaktywowano termicznie odwrotną transkryptazę poprzez ogrzanie próbek w czasie 3 minut w temperaturze 95°C. Uzyskane cDNA przechowywano w temperaturze -20 °C do czasu wykonania reakcji PCR.

## 5.9. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym.

Badanie poziomu ekspresji genu *TES* metodą Real-Time PCR przeprowadzono przy użyciu aparatu 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) wykorzystując zestaw primerów dla genu *TES* (TES Hs00210319\_m1) oraz dla genu kodującego  $\beta$ -aktynę jako genu referencyjnego (ACTB Hs99999903\_m1). Do przeprowadzenia reakcji wykorzystano sondy TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) znakowane fluorescencyjnym barwnikiem FAM oraz bufor reakcyjny TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Dokładny skład i proporcje 10  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej zostały przedstawione w Tabeli 5.

Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystanej w reakcji *real-time* PCR.

Składniki	Objętość
cDNA	0,5 $\mu$ l
Zestaw primerów i sondy typu TaqMan	0,5 $\mu$ l
Bufor <i>master mix</i>	5 $\mu$ l
Woda	4 $\mu$ l

Reakcja została przeprowadzona według następującej procedury:

1. Aktywacja polimerazy w temperaturze 50°C – czas 2 minuty.
2. Wstępna denaturacja w temperaturze 94°C – czas 10 minut.
3. 40 kolejnych cykli reakcji, z których każdy składał się z następujących faz:
  - A. Denaturacja w temperaturze 94°C – czas 15 sekund.
  - B. Przyłączenie starterów i sondy.
  - C. Synteza w temperaturze 94°C – czas 1 minuta.

Względną ekspresję badanego markera obliczono przy użyciu metody  $\Delta\Delta C_t$ . Wynik normalizowano w oparciu o ekspresję genu referencyjnego, za który posłużył gen kodujący  $\beta$ -aktynę (gen *ACTB*).

## 5.10. Ocena indeksu apoptotycznego (AI).

Pośrednią ocenę indeksu apoptotycznego przeprowadzono przy zastosowaniu mikroskopii świetlnej oceniając odsetek komórek nowotworowych z dodatnią jądrową ekspresją kaspazy-3 (przeprowadzono ocenę łącznie na 201 przypadkach NSCLC). Reakcja immunohistochemiczna została przeprowadzona zgodnie z opisem metody przedstawionym powyżej w odpowiednim podrozdziale. Obliczeń dokonano oceniając każdorazowo 3 reprezentatywne obszary (tzw. spoty) osobno dla każdego analizowanego przypadku, następnie obliczając średnią z tak uzyskanych liczb. Kontrolę stanowiły prawidłowe tkanki z marginesu cięcia chirurgicznego, gdzie analizę poziomu ekspresji kaspazy-3 przeprowadzono w analogiczny sposób.

Wszystkie preparaty zostały ocenione z wykorzystaniem mikroskopu OLYMPUS BX-41 (Olympus, Japonia) pod powiększeniem 200x. Dokumentację fotograficzną wykonano stosując program Case Viewer (3D Histech, Węgry).

## 5.11. Analiza statystyczna

Do przeprowadzenia analizy statystycznej użyto oprogramowania Statistica firmy StatSoft oraz programu GraphPad Prism. Bazy danych przygotowano przy użyciu oprogramowania Microsoft Excel 2010. Rozkład zmiennych testowano przy wykorzystaniu testu Shapiro-Wilka'a. Do porównania dwóch grup zmiennych niezależnych użyto testu t-Studenta dla zmiennych mających rozkład normalny, natomiast testu U Manna-Whitney'a dla pozostałych zmiennych. Do porównania wielu grup zmiennych mających rozkład normalny użyto testu ANOVA z testem *post hoc* (przy spełnionym założeniu jednorodności wariancji testem *post hoc* był test Tukey'a, natomiast przy niespełnionym założeniu test Dunnetta). Do porównania wielu grup zmiennych niemających rozkładu normalnego zastosowano test Kruskala-Wallisa z testem Dunna jako testem *post hoc*. W przypadku testowania dwóch grup zmiennych zależnych zastosowano test Wilcoxon'a dla par obserwacji. Analizę korelacji przeprowadzono przy użyciu testu korelacji rang Spearman'a. Zależność pomiędzy ekspresją badanych białek oraz danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów analizowano używając tablic wielodzzielczych oraz testu  $\chi^2$  (chi-kwadrat). W przypadku, gdy w jakiegokolwiek z analizowanych celek tabeli krzyżowej wartość oczekiwana była mniejsza niż 5, stosowano testu  $\chi^2$  (chi-kwadrat) z poprawką Yatesa. Podczas analizy krzywych przeżyć Kaplan-Meier'a wykorzystano test Gehana-

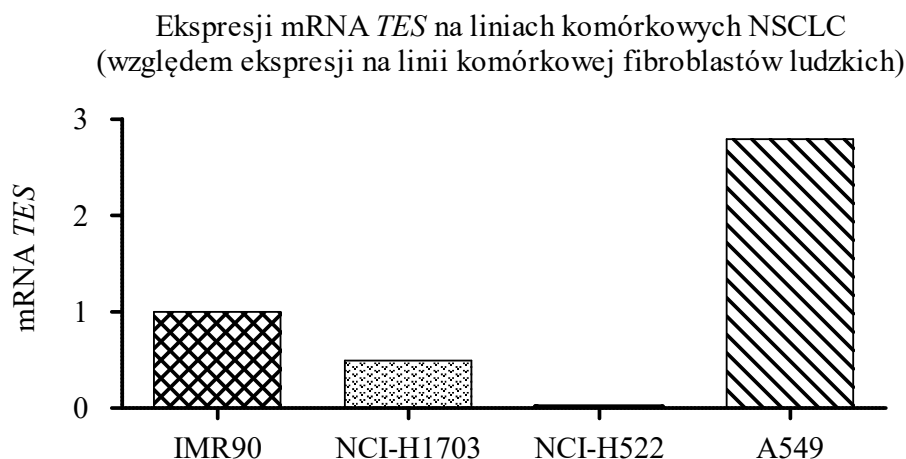
Breslowa-Wilcoxon'a. Za poziom istotności przyjęto wartość  $p < 0.05$ , dla dwustronnego testowania hipotezy. Opracowując wykresy pudełkowe (tzw. wykresy „ramka-wąsy”) w zależności od rozkładu przyjęto następujące założenia prezentowania danych:

1. dla rozkładu normalnego: pudełko – średnia, wąs – odchylenie standardowe,
2. przy braku rozkładu normalnego: pudełko – mediana, wąs – zakres międzykwartyłowy (IQR) (prezentujący wielkość rozrzutu pomiędzy pierwszym a trzecim kwartylem).

W trakcie opracowywania uzyskanych wyników, w przypadku wartości *TES* mRNA, w związku z niespełnieniem założeń rozkładu normalnego i trudnościami w dalszej analizie, dane poddano transformacji z zastosowaniem transformacji mocy Boxa-Coxa. W pierwszym kroku wykonano symulację poszukiwania optymalnego współczynnika  $\lambda$ , w kolejnym kroku dane poddano przekształceniu zgodnie z wzorem (A) zaprezentowanym poniżej. Ponownie przeprowadzono analizę rozkładu uzyskanych danych.

$$(A) \quad Y^{(\lambda)}(X) = \begin{cases} \frac{X^\lambda - 1}{\lambda} & \text{dla } \lambda \neq 0 \\ \ln(X) & \text{dla } \lambda = 0 \end{cases}$$

## 6. Wyniki przeprowadzonych badań.

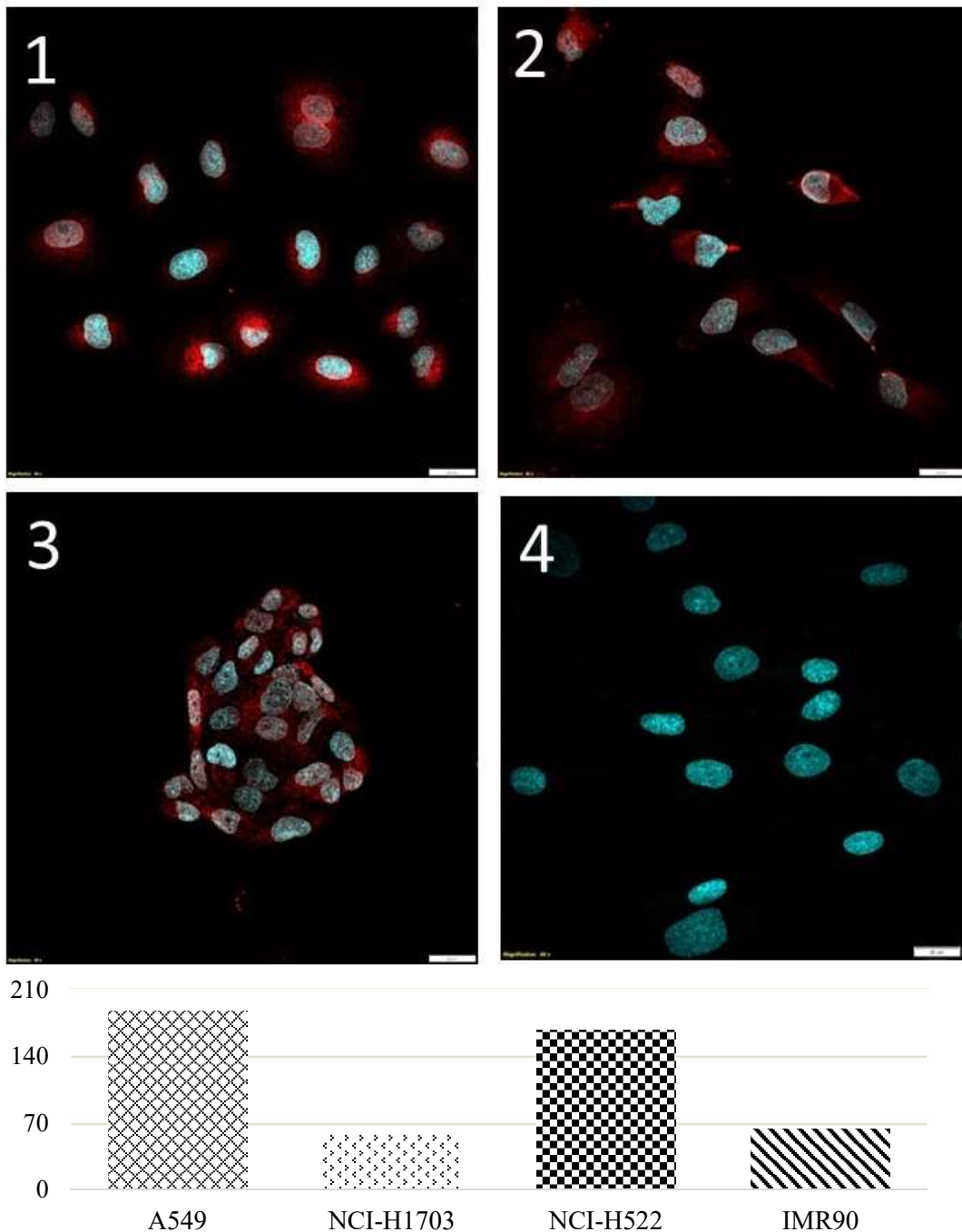


Wykres 1. Wykres przedstawiający względną ekspresję mRNA *TES* na liniach komórkowych NSCLC (SCC: linia NCI-H1703 oraz NCI-H522, AC: linia A549) w odniesieniu do jej ekspresji na linii komórkowej fibroblastów ludzkich (IMR-90). Reakcja RQ-PCR przeprowadzona 3 krotnie na każdej z linii komórkowych.

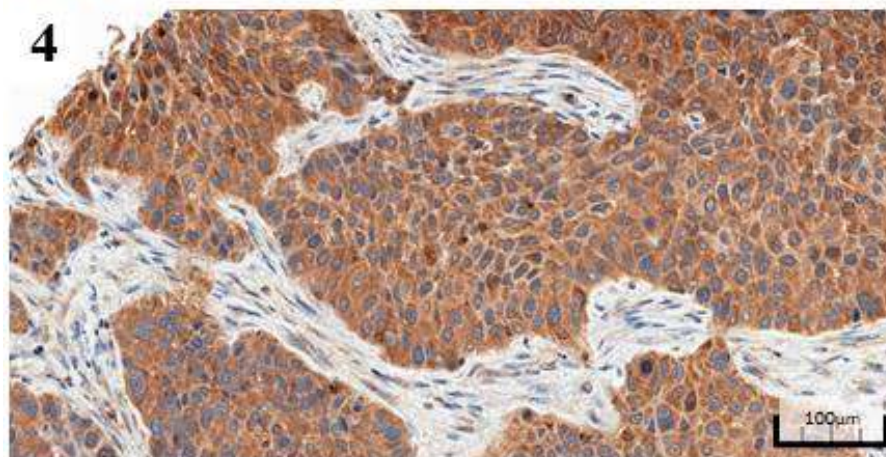
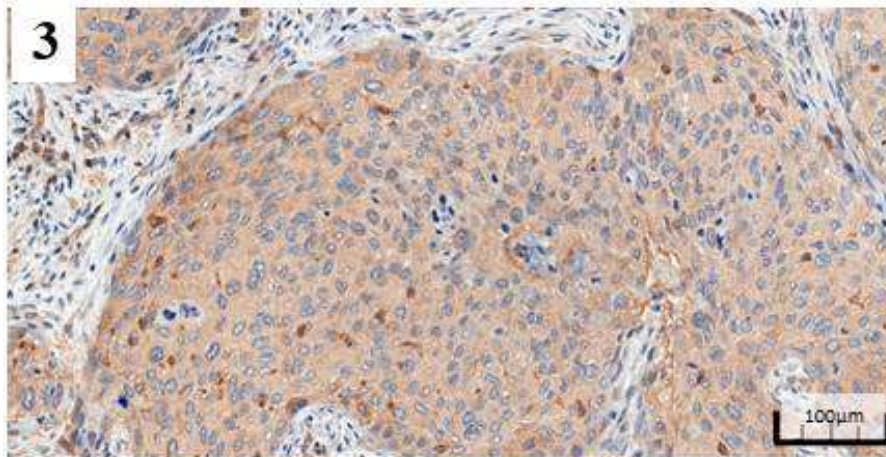
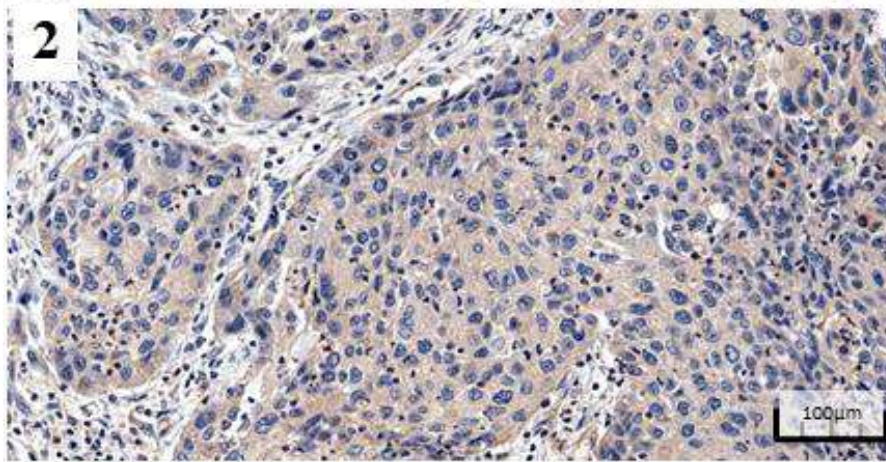
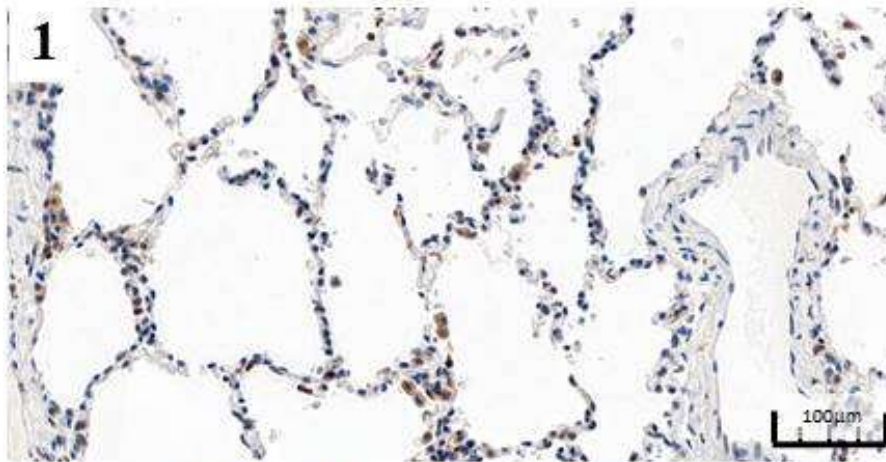
Przeprowadzona wstępna analiza poziomu *TES* mRNA, z wykorzystaniem linii komórkowej fibroblastów ludzkich (IMR-90), linii komórkowych NSCLC typu SCC (NCI-H1703, NCI-H522) oraz AC (A549), dostarczyła sprzecznych wniosków. W odniesieniu do linii komórkowych SCC, zgodnie z założeniami, zaobserwowano niższy poziom ekspresji mRNA *TES* w porównaniu z linią komórkową fibroblastów ludzkich, stanowiącą kontrolę. Z kolei w przypadku linii komórkowych AC poziom ekspresji mRNA *TES* był wyższy w porównaniu z kontrolą [Wykres 1]. Rezultat ten stoi w opozycji do założeń teoretycznych zaprezentowanych powyżej, zakładających obniżenie ekspresji testyny w komórkach nowotworowych. Dalsza, szczegółowa analiza przedstawiona poniżej jest próbą dostarczenia bardziej precyzyjnej odpowiedzi na temat ekspresji testyny w NSCLC.

Nasilenie ekspresji testyny, surwiwiny, antygenu Ki-67 oraz ekspresja kaspazy-3 nie miały rozkładu normalnego, stąd zastosowano w analizie testy nieparametryczne ( $p < 0,05$ ).

### 6.1. Ekspresja testyny w niedrobnokomórkowych rakach płuc z uwzględnieniem danych kliniczno-patologicznych pacjentów.

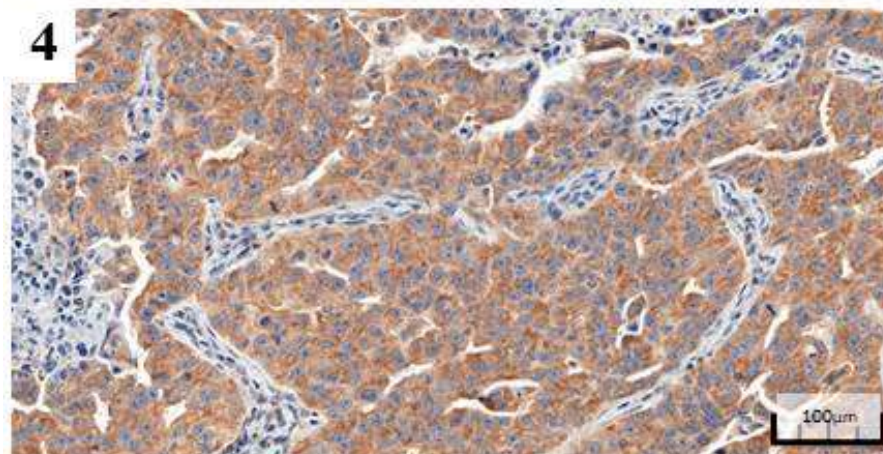
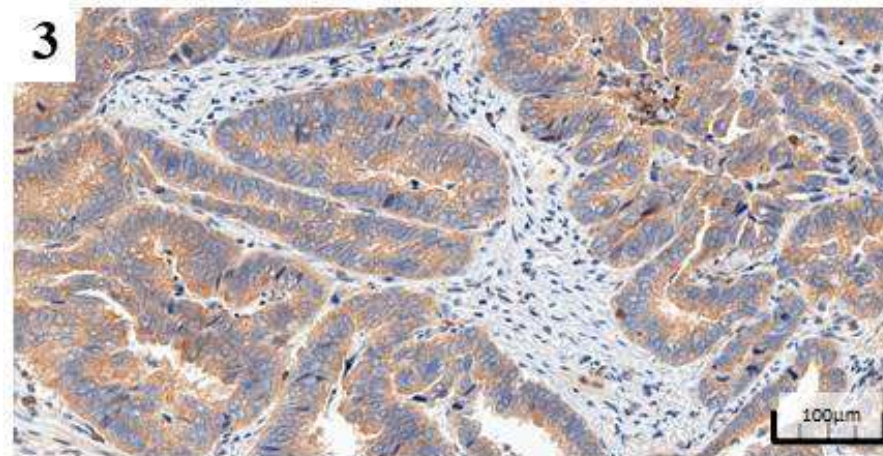
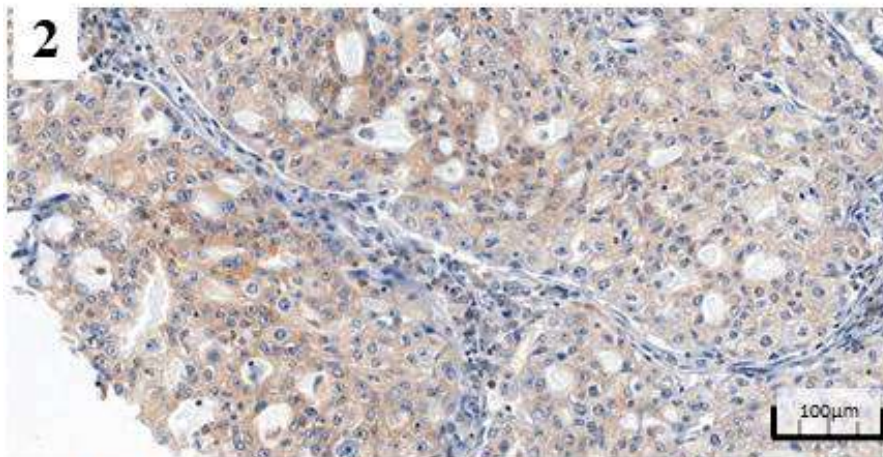
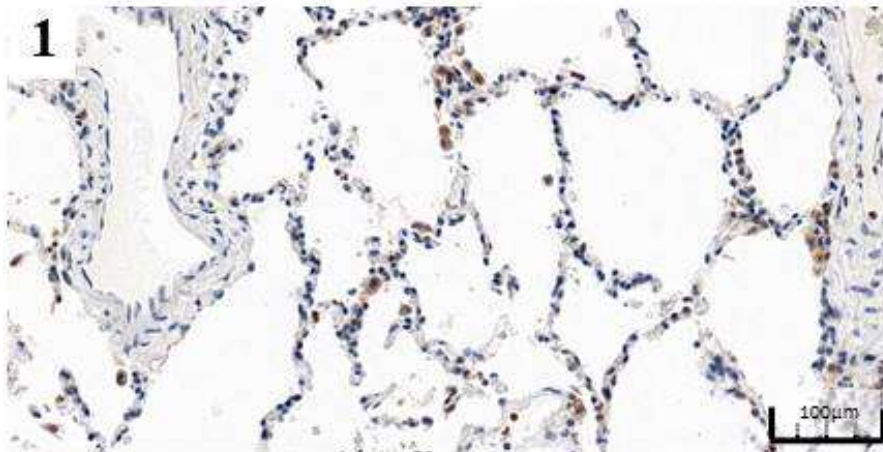


Rycina 1. Cytoplazmatyczna lokalizacja ekspresji testyny w mikroskopii konfokalnej z zastosowaniem linii komórkowych: 1 – linia komórkowa AC: A549, 2 – linia komórkowa SCC: NCI-H1703, 3 – linia komórkowa SCC: NCI-H522, 4 – linia komórkowa fibroblastów ludzkich: IMR90. Testyna – kolor czerwony. Wykres przedstawiający ilościową ocenę intensywności fluorescencji (*Gray Intensity Value*).



Rycina 2. Fotografie przedstawiające nasilenie ekspresji testyny w prawidłowych tkankach z marginesu cięcia chirurgicznego (1) oraz kolejno przypadki prezentujące niską (2), umiarkowaną (3) oraz silną (4) ekspresję testyny w płaskonabłonkowym podtypie histologicznym NSCLC. Powiększenie 200x.

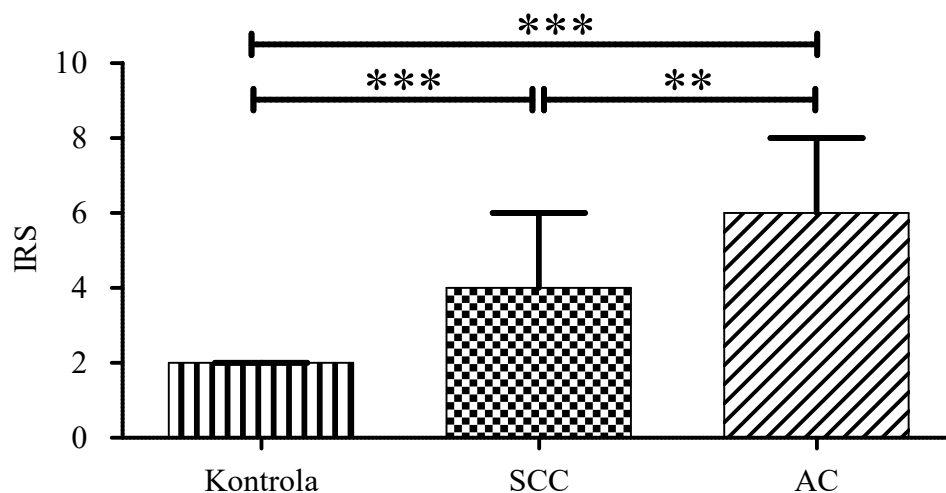




Rycina 3. Fotografie przedstawiające nasilenie ekspresji testyny w prawidłowych tkankach z marginesu cięcia chirurgicznego (1) oraz kolejno przypadki prezentujące niską (2), umiarkowaną (3) oraz silną (4) ekspresję testyny w gruczołowym podtypie histologicznym NSCLC. Powiększenie 200x.

Analiza z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej, wykonana przy użyciu linii komórkowych NSCLC, dostarczyła informacji o cytoplazmatycznej lokalizacji ekspresji testyny w komórkach nowotworowych. Analiza ekspresji testyny na podstawie oceny intensywności fluorescencji (*Gray Intensity Value*) wykazała wyraźnie wyższą cytoplazmatyczną ekspresję badanego białka na liniach komórkowych NSCLC – A549 (AC) oraz NCI-H522 (SCC), jednak w przypadku linii NCI-H1703 (SCC) jego ekspresja była porównywalna z fibroblastami ludzkimi (IMR90)[Rycina 1].

Porównanie poziomu ekspresji testyny w zależności od typu histologicznego NSCLC - metoda IHC



Wykres 2. Poziom ekspresji testyny w komórkach nowotworowych w zależności od typu histologicznego NSCLC w odniesieniu do kontroli. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Analiza nasilenia ekspresji testyny w rakach niedrobnkomórkowych płuc wykazała istotnie wyższy jej poziom w porównaniu z grupą kontrolą, którą stanowiły prawidłowe tkanki z marginesu cięcia chirurgicznego ( $p < 0,001$ ). Ponadto, uwzględniając typ histologiczny nowotworu, ekspresja testyny była istotnie wyższa w AC w porównaniu z SCC ( $p < 0,01$ ) [Wykres 2]. W związku ze stwierdzanymi powyżej różnicami w ekspresji testyny w dalszej analizie postanowiono uwzględnić podział na typy histologiczne NSCLC.

Tabela 6. Zależności między nasileniem ekspresji testyny w raku płaskonabłonkowym płuc, a danymi kliniczno-patologicznymi oraz ekspresją innych badanych markerów.

Analizowany parametr	Ekspresja testyny w SCC		
	słaba i umiarkowana	silna	wartość p
Czas przeżycia [miesiące] (mediana, zakres)	37 (0,5-81)	26 (3-79)	p < 0,05
Wiek w momencie zachorowania [lata] (mediana, zakres)	67 (56-80)	64 (52-82)	NS
Średnica guza [cm] (mediana, zakres)	3,9 (1,5-9)	5,2 (2,5-8,5)	p < 0,05
Ekspresja kaspazy-3 [%] (mediana, zakres)	0,5 (0-3)	0,7 (0,2-4)	p < 0,05
Zajęcie węzłów chłonnych (cecha N1 lub N2), no. (%)	19 (35)	8 (32)	NS
Wielkość guza (cecha T3 lub T4) no. (%)	7 (13)	3 (12)	NS
Stopień złośliwości histologicznej G3 no. (%)	4 (7)	3 (12)	NS
Stadium zaawansowania choroby nowotworowej II lub III, no. (%)	27 (51)	19 (76)	p < 0,05 OR=3,05
Ki-67 – silna ekspresja no. (%)	23 (42)	15 (60)	NS

Poziom ekspresji testyny oraz surwiwiny oceniono przy pomocy skali IRS przyjmując nasilenie reakcji jako: 0 – brak reakcji [0]; 1-2 – słaba reakcja [1]; 3-4 – umiarkowanie silna reakcja [2], 6-12 – silna reakcja [3].

Przeprowadzono analizę porównawczą pacjentów z silną ekspresją testyny w porównaniu z pacjentami z niską i średnią ekspresją testyny w komórkach nowotworowych NSCLC. Uwzględniono podział w zależności od typu histologicznego nowotworu. W grupie chorych z SCC silna ekspresja testyny wiązała się z istotnie krótszym czasem przeżycia (p < 0,05), większą średnicą guza (p < 0,05) oraz większym nasileniem apoptozy (p < 0,05). Wykazano, iż u pacjentów z silną ekspresją testyny istotnie częściej stwierdza się zaawansowane stadium choroby nowotworowej

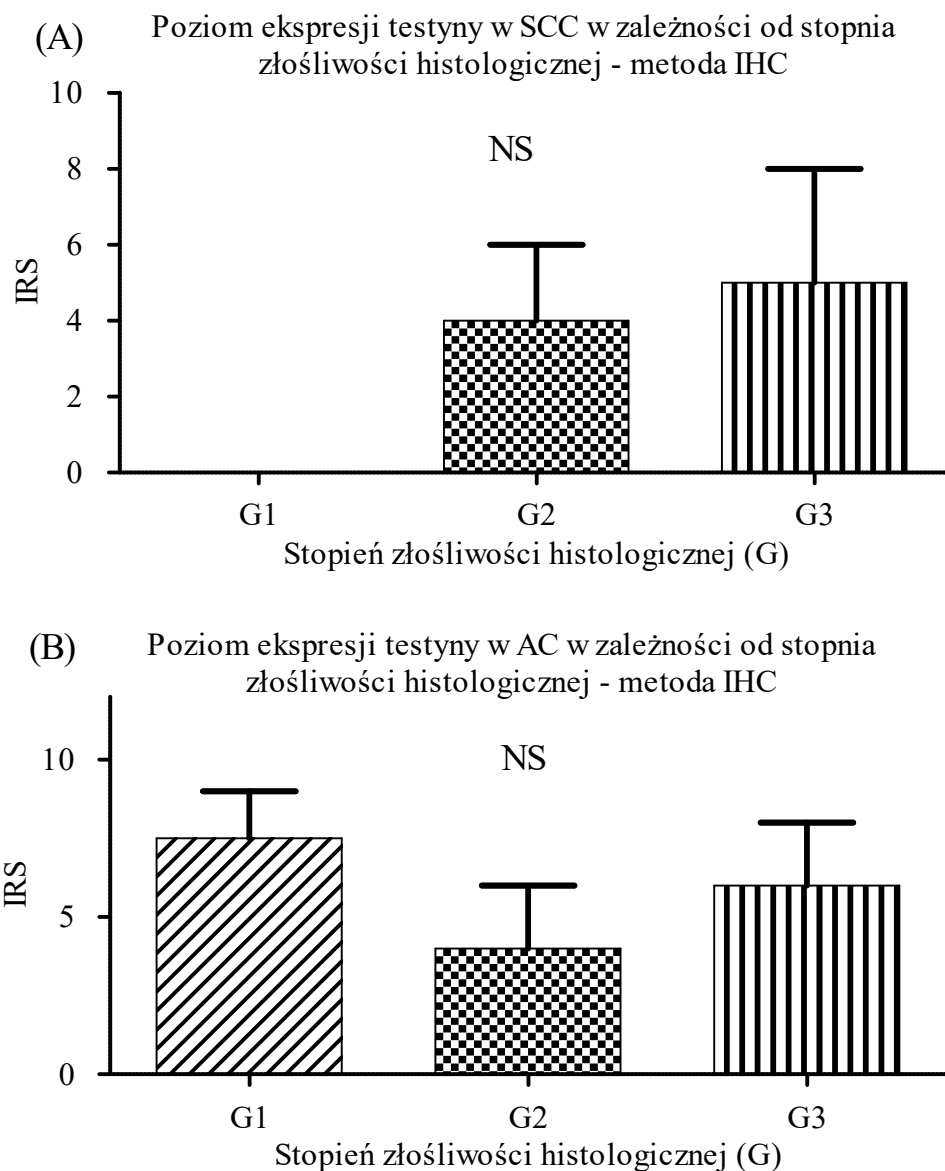
(stadium II lub III )( $p < 0,05$ , OR = 3,05). Nie wykazano związku między nasileniem ekspresji testyny a pozostałymi danymi kliniczno-patologicznymi [Tabela 6].

Tabela 7. Zależności między nasileniem ekspresji testyny w raku gruczołowym płuca, a danymi kliniczno-patologicznymi oraz ekspresją innych badanych markerów.

Analizowany parametr	Ekspresja testyny w AC		
	słaba i umiarkowana	silna	wartość p
Czas przeżycia [miesiące] (mediana, zakres)	25 (0-77)	27 (0-77)	NS
Wiek w momencie zachorowania [lata] (mediana, zakres)	65 (51-84)	66 (50-82)	NS
Średnica guza [cm] (mediana, zakres)	3,4 (1-9)	3,7 (1,5-11)	$p < 0,05$
Ekspresja kaspazy-3 [%] (mediana, zakres)	0,2 (0-6)	0,4 (0-3,5)	$p < 0,05$
Zajęcie węzłów chłonnych (cecha N1 lub N2), no. (%)	22 (47)	23 (39)	NS
Wielkość guza (cecha T3 lub T4) no. (%)	5 (11)	6 (10)	NS
Stopień złośliwości histologicznej G3 no. (%)	21 (43)	35 (55)	NS
Stadium zaawansowania choroby nowotworowej II lub III, no. (%)	26 (53)	32 (50)	NS
Ki-67 – silna ekspresja no. (%)	3 (6)	18 (28)	$p < 0,01$ OR=4,6

Poziom ekspresji testyny oraz przeżywalności oceniono przy pomocy skali IRS przyjmując nasilenie reakcji jako: 0 – brak reakcji [0]; 1-2 – słaba reakcja [1]; 3-4 – umiarkowanie silna reakcja [2], 6-12 – silna reakcja [3].

Z kolei w grupie chorych z AC wykazano, iż silna ekspresja testyny wiązała się z większym nasileniem apoptozy ( $p < 0,05$ ) oraz większą średnicą guza ( $p < 0,05$ ). Nie wykazano związku między nasileniem ekspresji testyny a pozostałymi analizowanymi parametrami oraz danymi kliniczno-patologicznymi [Tabela 7].

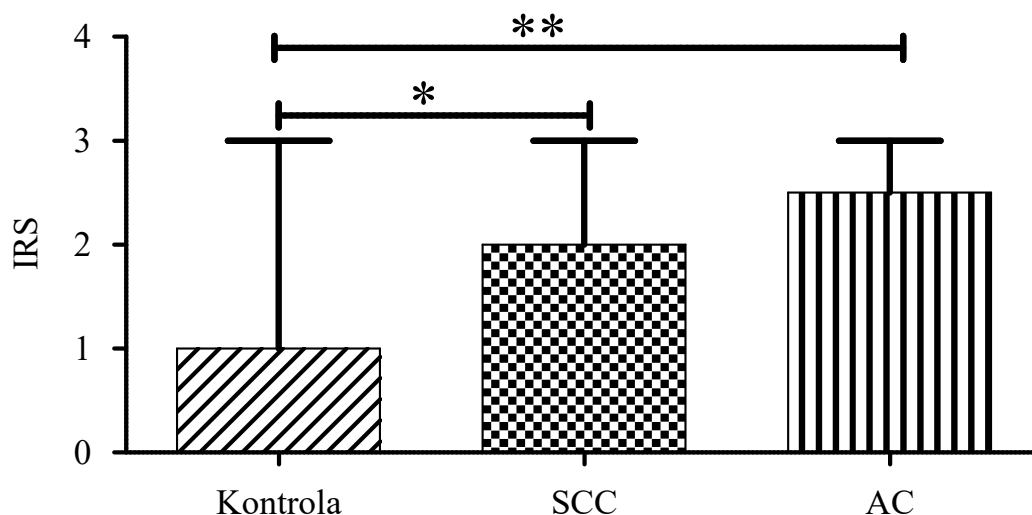


Wykres 3. Poziom ekspresji testyny w NSCLC typu SCC (A) oraz AC (B) w zależności od stopnia złośliwości histologicznej (G). NS – brak istotności statystycznej.

Niezależnie od typu histologicznego NSCLC nie wykazano różnicy w poziomie ekspresji testyny w zależności od stopnia złośliwości histologicznej (G) nowotworu [Wykres 3].

## 6.2. Ekspresja surwiwiny w niedrobnokomórkowych rakach płuc z uwzględnieniem danych kliniczno-patologicznych pacjentów.

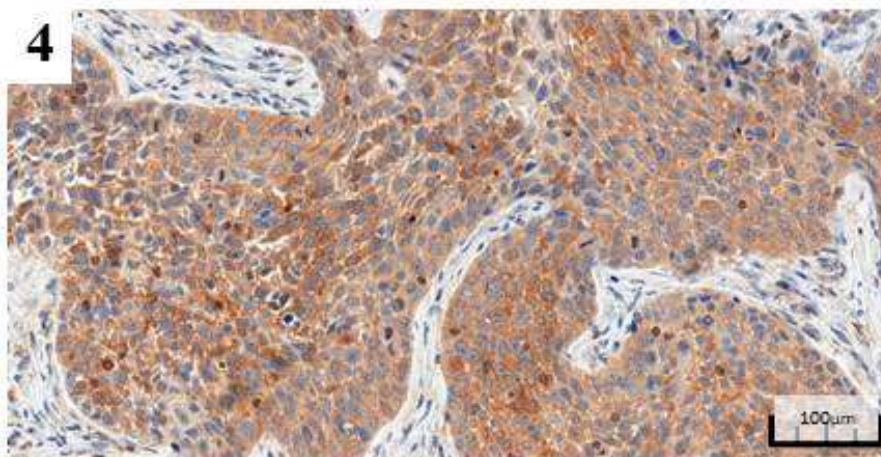
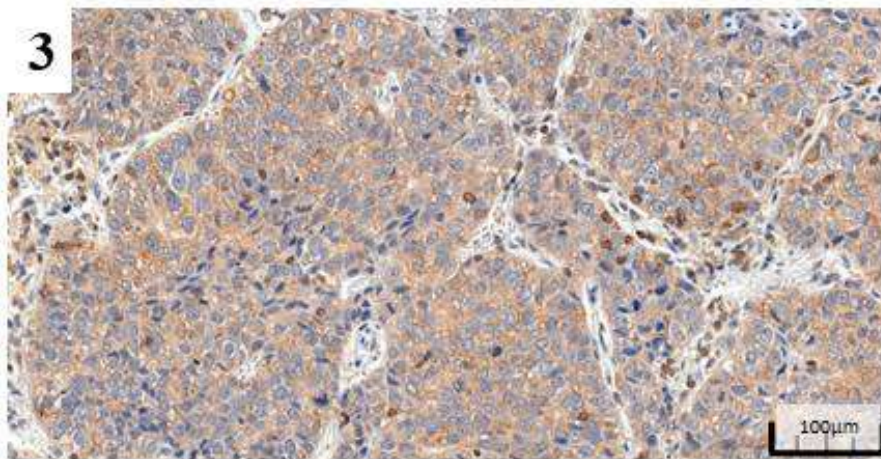
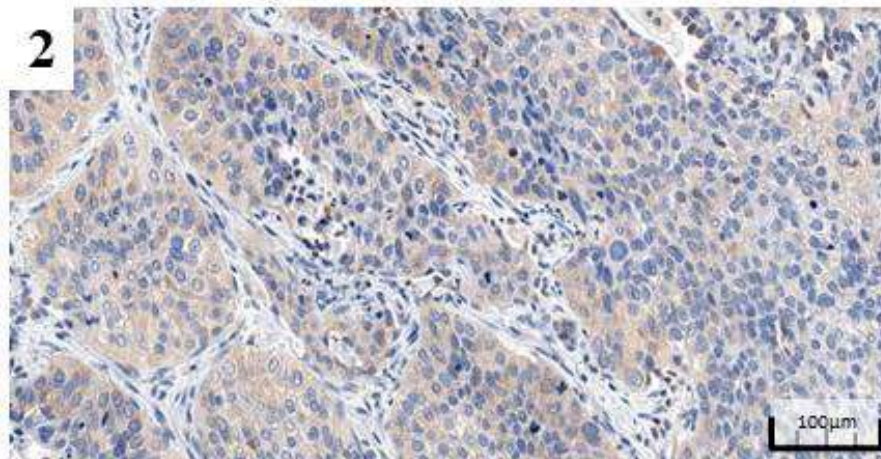
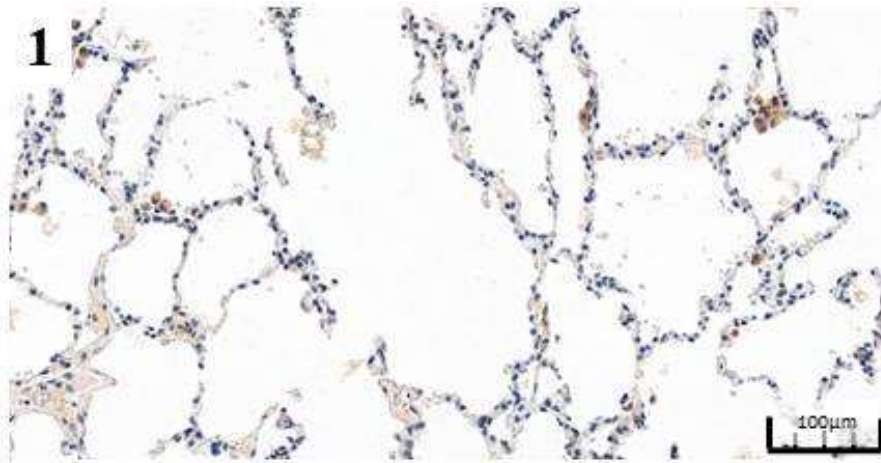
Ekspresja surwiwiny w NSCLC z uwzględnieniem typu histologicznego



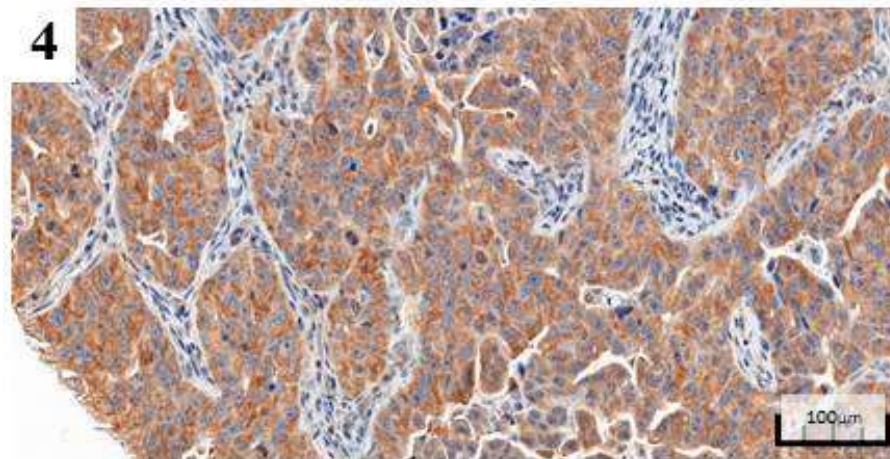
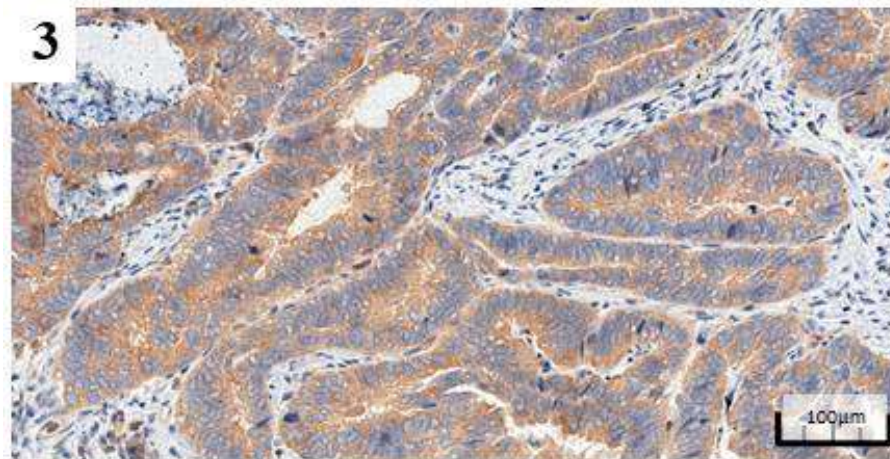
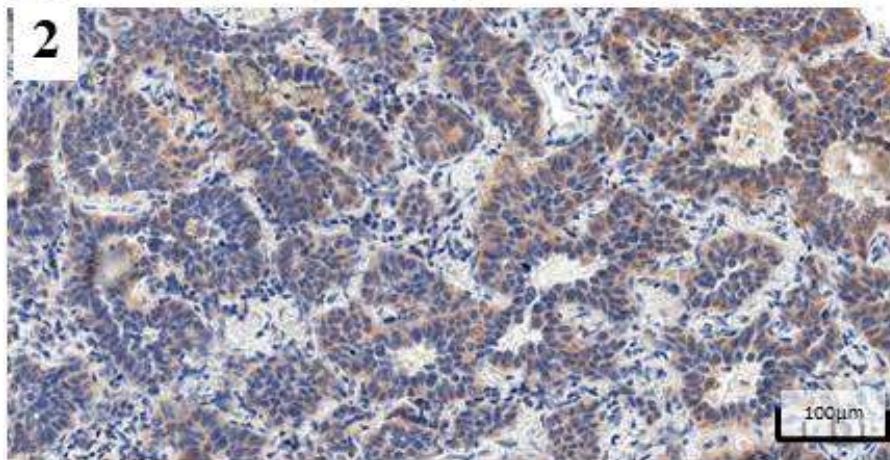
Wykres 4. Poziom ekspresji surwiwiny w komórkach nowotworowych z uwzględnieniem typu histologicznego NSCLC w odniesieniu do kontroli. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w ekspresji surwiwiny pomiędzy typami histologicznymi NSCLC, dlatego postanowiono analizować nasilenie jej ekspresji oraz dane kliniczno-patologiczne łącznie dla raka płaskonabłonkowego oraz gruczołowego. Analiza poziomu ekspresji surwiwiny w NSCLC typu AC i SCC w porównaniu z kontrolą, stanowiącą prawidłowe tkanki z marginesu cięcia chirurgicznego, wykazała istotnie wyższą ekspresję badanego białka w komórkach nowotworowych [Wykres 4].

Ze względu na niewielką ilość przypadków charakteryzujących się silną ekspresją surwiwiny w komórkach nowotworowych (zaledwie 2%) postanowiono w dalszej analizie przyjąć podział na grupę o słabej ekspresji badanego białka (lub jej braku) oraz pozostałą grupę pacjentów (z umiarkowaną lub silną ekspresją surwiwiny).



Rycina 4. Fotografie przedstawiające nasilenie ekspresji surwiwiny w prawidłowych tkankach z marginesu cięcia chirurgicznego (1) oraz kolejno przypadki prezentujące niską (2), umiarkowaną (3) oraz silną (4) ekspresję surwiwiny w płaskonabłonkowym podtypie histologicznym NSCLC. Powiększenie 200x.



Rycina 5. Fotografie przedstawiające nasilenie ekspresji surwiwiny w prawidłowych tkankach z marginesu cięcia chirurgicznego (1) oraz kolejno przypadki prezentujące niską (2), umiarkowaną (3) oraz silną (4) ekspresję surwiwiny w gruczołowym podtypie histologicznym NSCLC. Powiększenie 200x.



Tabela 8. Zależności między nasileniem ekspresji surwiwiny w NSCLC, a danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów.

Parametr	Ekspresja surwiwiny		
	Słaba	Umiarkowana lub silna	wartość p
Stadium zaawansowania choroby nowotworowej II lub III no. (%)	70 (55)	33 (56)	NS
Wiek w momencie zachorowania [lata] mediana (zakres)	66 (50-84)	66 (52-81)	NS
% martwicy mediana (zakres)	30 (0-80)	40 (10-80)	NS p=0.09
Średnica guza [cm] mediana (zakres)	3,5 (1-11)	4 (1,5-9)	NS p=0.08
Indeks apoptotyczny [%] mediana (zakres)	0,4 (0-6)	0,4 (0-4)	NS
Nikotynizm no. (%)	22 (20)	26 (46)	p<0.001 OR=3.4
Wielkość guza (cecha T3 lub T4) no. (%)	13 (10)	8 (14)	NS
Zajęcie węzłów chłonnych (cecha N1 lub N2), no. (%)	47 (36)	24 (43)	NS
Stopień złośliwości histologicznej G3 no. (%)	45 (34)	20 (34)	NS
Ki-67 – wysoka ekspresja no. (%)	36 (27)	22 (37)	NS

Analiza poziomu ekspresji surwiwiny w NSCLC, poza częstszym czynnym paleniem papierosów w grupie chorych z jej wysoką ekspresją ( $p < 0,001$ ), nie wykazała istotnych zależności z pozostałymi danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów. Obserwowano nieistotne statystycznie trendy dotyczące średnicy guza oraz obszaru martwicy [Tabela 8].

Opierając się na dostępnych danych literaturowych, zaprezentowanych we wstępie do niniejszej rozprawy doktorskiej, podkreślających zmienną funkcję survivali w zależności od lokalizacji jej ekspresji [35]–[37] oraz prowadząc własną analizę w grupie pacjentów z NSCLC, postanowiono wyodrębnić 2 zasadnicze grupy w zależności od obecności lub braku jej jądrowej ekspresji [Tabela 9]. Ponadto, w podgrupie z jądrową ekspresją survivali, przeprowadzono dodatkową analizę uwzględniającą nasilenie jej ekspresji w NSCLC [Tabela 10].

Tabela 9. Zależności między nasileniem ekspresji survivali w NSCLC, z podziałem na lokalizację jej ekspresji, a danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów.

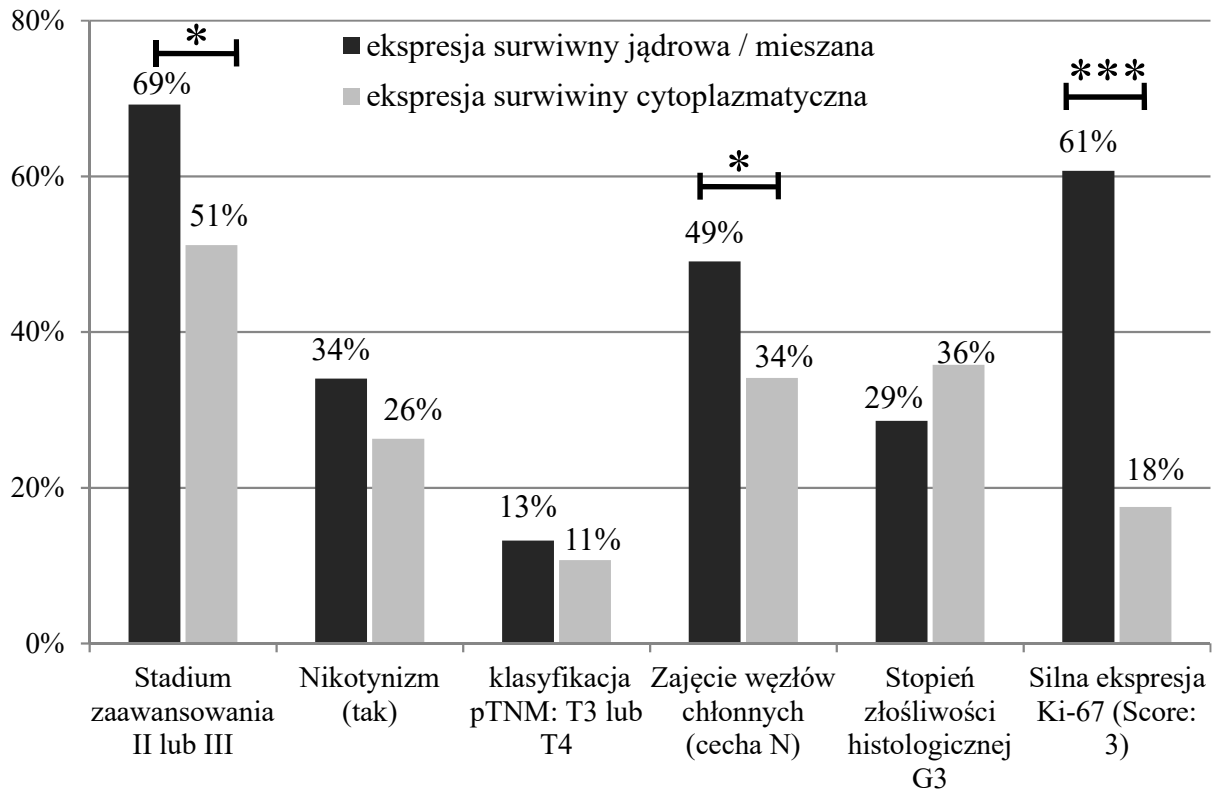
Analizowany parametr	Lokalizacja ekspresji survivali		wartość p
	cytoplazmatyczna	jądrowa/ mieszana	
Stadium zaawansowania choroby nowotworowej II lub III no. (%)	67 (51)	36 (69)	p < 0,05 OR=1,35
Wiek w momencie zachorowania [lata] mediana (zakres)	66 (51-84)	67 (52-81)	NS
% martwicy mediana (zakres)	30 (0-80)	50 (10-80)	p < 0,01
Średnica guza [cm] mediana (zakres)	3,5 (1,5-11)	4,15 (2,5-9)	p < 0,05
Indeks apoptotyczny [%] mediana (zakres)	0,35 (0-6,1)	0,58 (0-4,06)	p < 0,01
Nikotynizm no. (%)	31 (26)	17 (34)	NS
Wielkość guza (cecha T3 lub T4) no. (%)	14 (11)	7 (13)	NS
Zajęcie węzłów chłonnych (cecha N1 lub N2), no. (%)	45 (34)	26 (49)	p < 0,05 OR=2,93
Stopień złośliwości histologicznej G3 no. (%)	49 (36)	16 (29)	NS
Ki-67 – wysoka ekspresja no. (%)	24 (18)	34 (61)	p < 0,001 OR=3,47

Tabela 10. Zależności między nasileniem ekspresji surwiwiny w przypadkach NSCLC wykazujących jej jądrową ekspresję, a danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów.

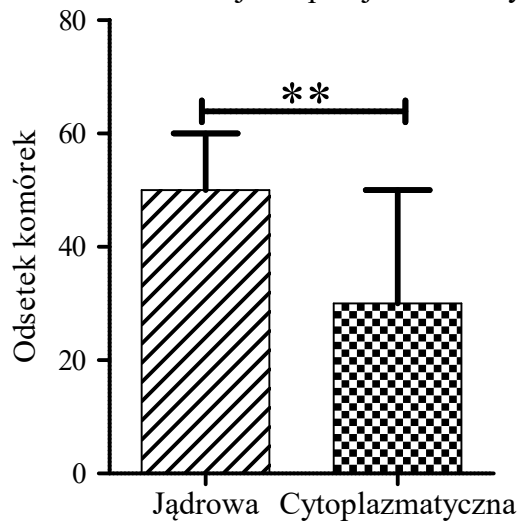
Analizowany parametr	Jądrowa ekspresja surwiwiny		wartość p
	słaba	umiarkowana i silna	
Stadium zaawansowania choroby nowotworowej II lub III, no. (%)	17 (61)	19 (79)	NS
Wiek w momencie zachorowania [lata] mediana (zakres)	67 (62-78)	65 (52-81)	NS
% martwicy mediana (zakres)	45 (1-80)	50 (10-80)	NS
Średnica guza [cm] mediana (zakres)	3,5 (1,5-8)	4,7 (2,5-9)	p < 0,05
Ekspresja kaspazy-3 [%] mediana (zakres)	0,58 (0-3,55)	0,63 (0-4,06)	NS
Nikotynizm no. (%)	5 (20)	12 (48)	p < 0,05 OR=2,4
Wielkość guza (cecha T3 lub T4) no. (%)	1(3)	6 (25)	p < 0,05 OR=7,25
Zajęcie węzłów chłonnych (cecha N1 lub N2), no. (%)	11 (38)	15 (63)	NS p=0,07
Stopień złośliwości histologicznej G3 no. (%)	7 (23)	9 (35)	NS
Ki-67 – silna ekspresja no. (%)	19 (63)	15 (58)	NS

Poziom ekspresji surwiwiny oceniono przy pomocy skali IRS przyjmując nasilenie reakcji jako: 0 – brak reakcji; 1-2 – słaba reakcja; 3-4 – umiarkowanie silna reakcja, 6-12 – silna reakcja.

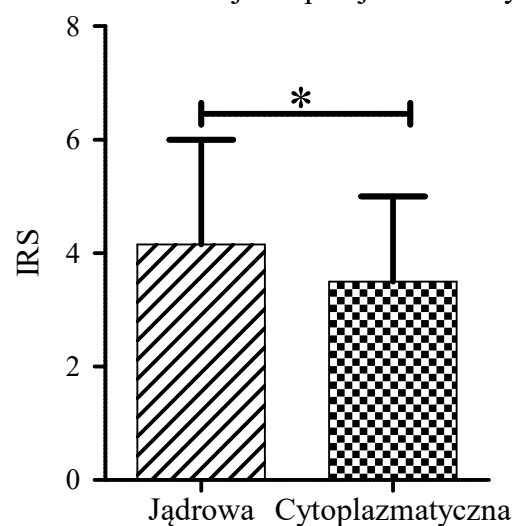
Odsetek przypadków spełniających podane kryteria - podział w zależności od lokalizacji ekspresji



Nasielenie nekrozy w zależności od lokalizacji ekspresji surwiwiny



Średnica guza w zależności od lokalizacji ekspresji surwiwiny

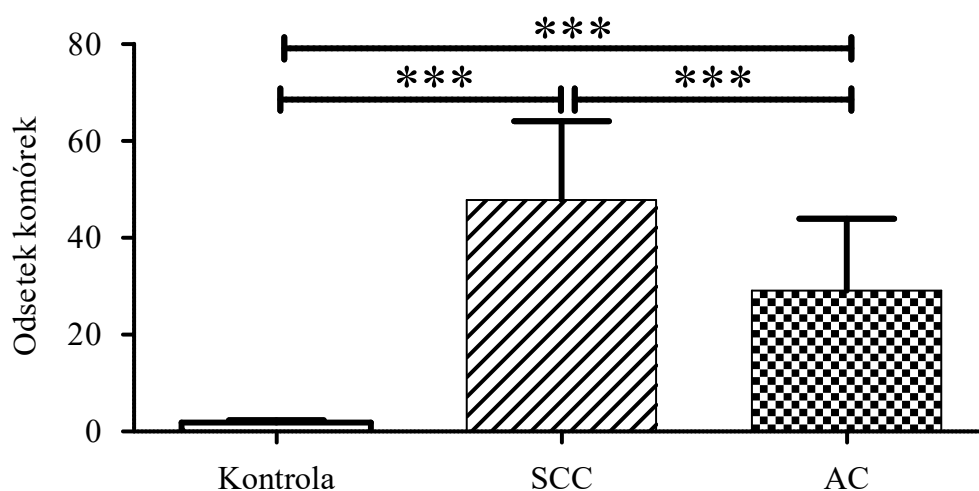


Wykres 5. Poziom ekspresji surwiwiny w komórkach nowotworowych NSCLC z uwzględnieniem jej lokalizacji (cytoplazmatyczna vs. jądrowa / jądrowo-cytoplazmatyczna). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

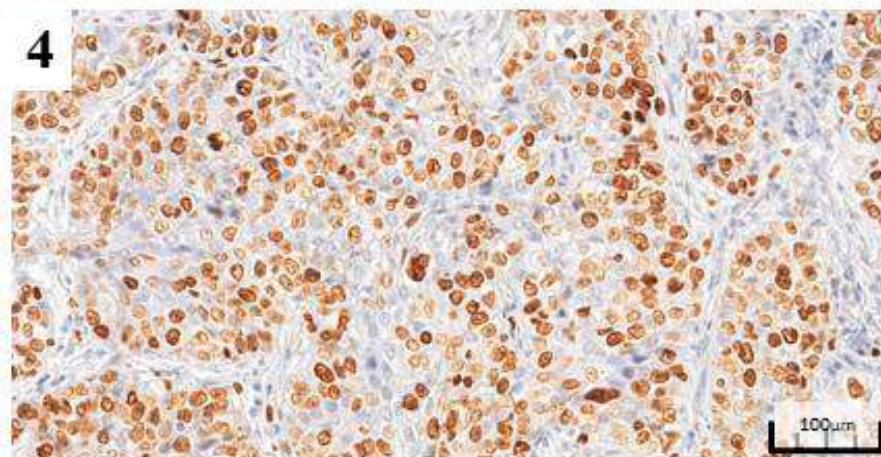
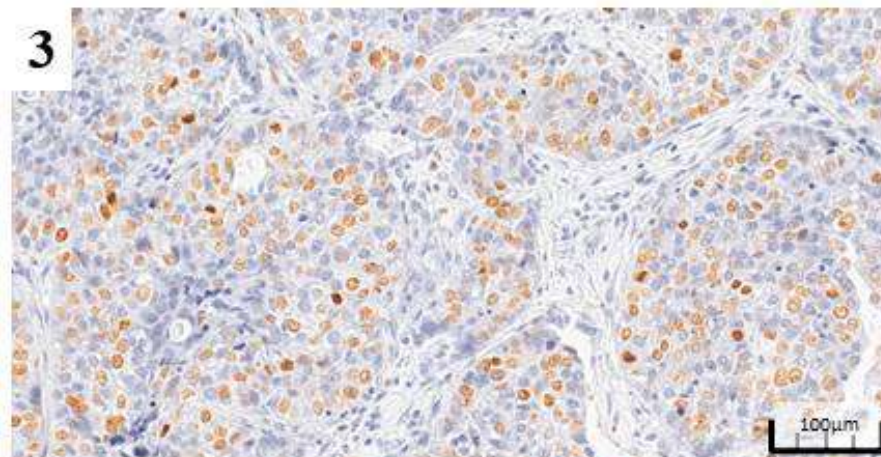
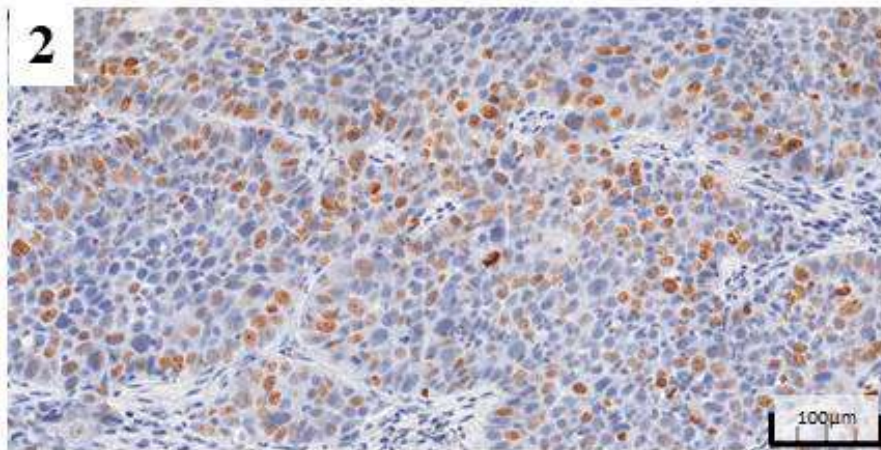
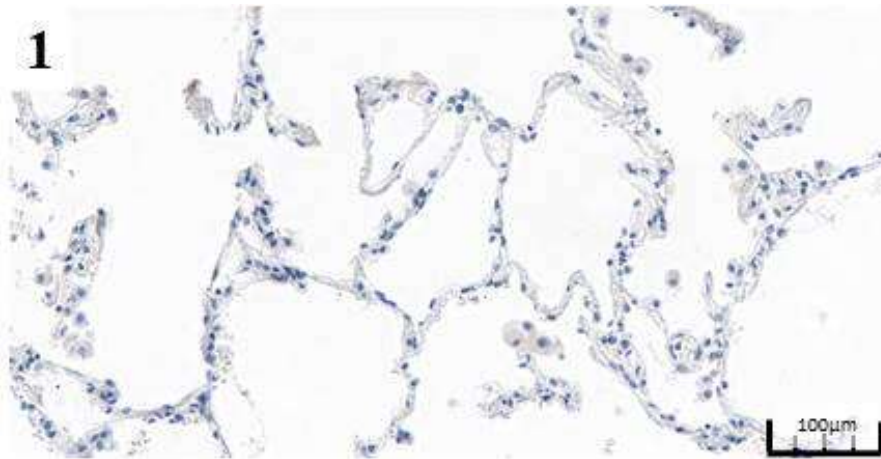
Zaobserwowano, iż obecność jądrowej ekspresji surwiwiny wiąże się z wyższym stadium zaawansowania choroby nowotworowej ( $p < 0,05$  OR=1,35), większym obszarem martwicy w obrębie guza ( $p < 0,01$ ), większą średnicą guza ( $p < 0,05$ ), częstszym zajęciem węzłów chłonnych ( $p < 0,05$  OR=2,93) oraz silniejszą ekspresją Ki-67 ( $p < 0,001$  OR=3,47)[Tabela 9][Wykres 5]). Zaobserwowano również, iż wraz ze wzrostem nasilenia ekspresji surwiwiny (w grupie pacjentów z jądrową jej ekspresją) istotnie częściej stwierdza się wyższą cechę pT w skali TNM ( $p < 0,05$  OR=7,25) oraz większą średnicę guza ( $p < 0,05$ ). Obserwowano również trend wskazujący na częstsze zajęcie węzłów chłonnych w tej grupie pacjentów [Tabela 10].

### 6.3. Ekspresja Ki-67 w niedrobnokomórkowych rakach płuc z uwzględnieniem danych kliniczno-patologicznych pacjentów.

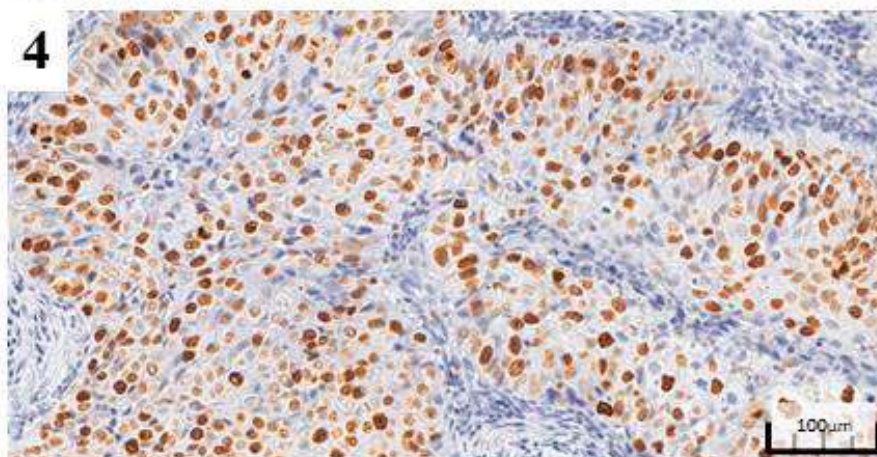
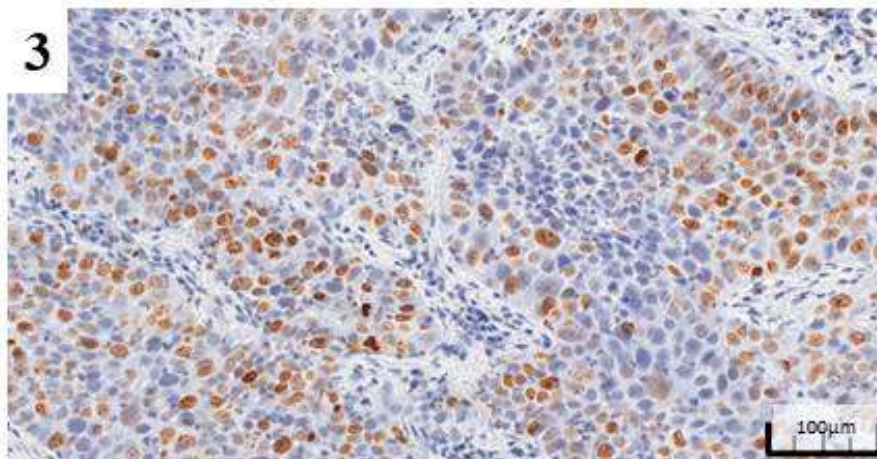
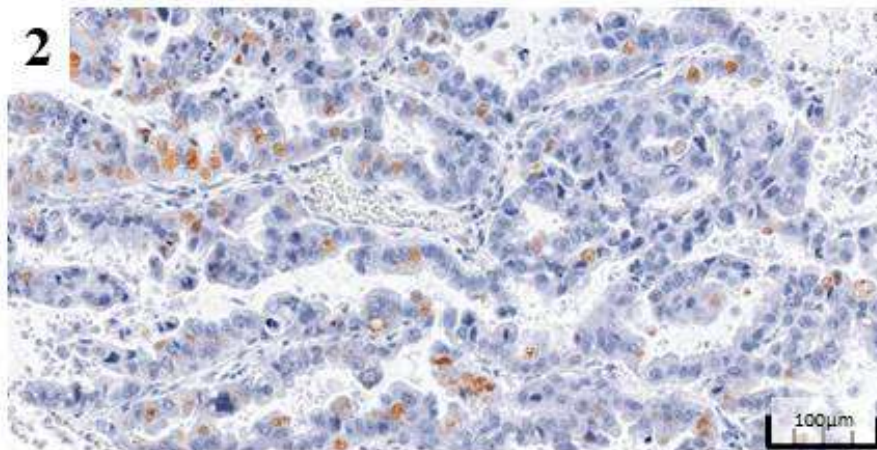
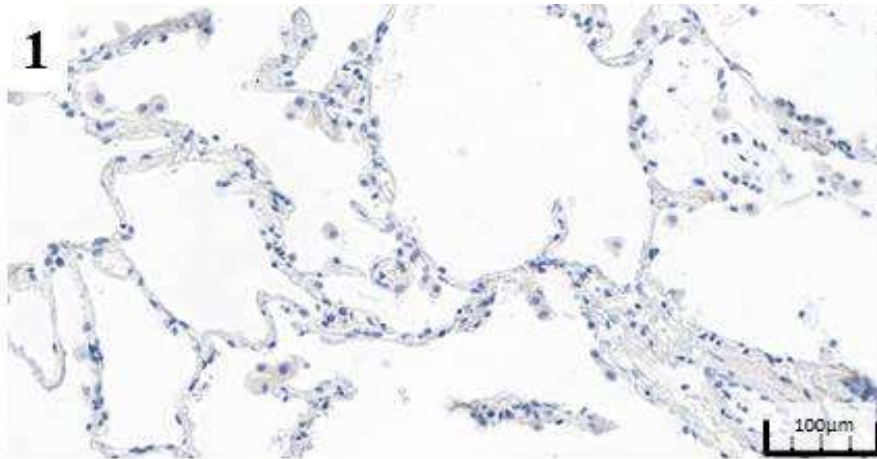
Nasilenie ekspresji Ki-67 w zależności od typu histologicznego NSCLC



Wykres 6. Porównanie poziomu ekspresji Ki-67 (ocenionej jako odsetek komórek z jego pozytywną ekspresją) w komórkach nowotworowych w zależności od typu histologicznego NSCLC w odniesieniu do kontroli. \*\*\*  $p < 0,001$ .



Rycina 6. Fotografie przedstawiające nasilenie ekspresji Ki-67 w prawidłowych tkankach z marginesu cięcia chirurgicznego (1) oraz kolejno przypadki z coraz wyższym odsetkiem komórek z dodatnią ekspresją Ki-67 (2,3,4) w płaskonabłonkowym podtypie histologicznym NSCLC.



Rycina 7. Fotografie przedstawiające nasilenie ekspresji Ki-67 w prawidłowych tkankach z marginesu cięcia chirurgicznego (1) oraz kolejno przypadki z coraz wyższym odsetkiem komórek z dodatnią ekspresją Ki-67 (2,3,4) w gruczołowym podtypie histologicznym NSCLC. Powiększenie 200x.

Tabela 11. Zależności między silną jądrową ekspresją Ki-67 (odsetek komórek z pozytywną ekspresją >50%) a danymi kliniczno-patologicznymi w SCC.

Parametr	Odsetek komórek z pozytywną ekspresją Ki-67 w SCC		wartość p
	≤50%	>50%	
Stadium zaawansowania choroby nowotworowej II lub III, no. (%)	21 (49)	26 (68)	NS
% martwicy mediana (zakres)	40 (0-80)	50 (10-80)	p < 0,01
Średnica guza [cm] mediana (zakres)	3,5 (1,5-8,5)	4,8 (2-9)	p < 0,01
Ekspresja kaspazy-3 [%] mediana (zakres)	0,5 (0-2)	0,6 (0,2-4)	p < 0,05
Wielkość guza (cecha T3 lub T4) no. (%)	5 (12)	6 (15)	NS
Zajęcie węzłów chłonnych (cecha N1 lub N2) no. (%)	12 (28)	15 (38)	NS
Stopień złośliwości histologicznej G3 no. (%)	6 (14)	4 (10)	NS

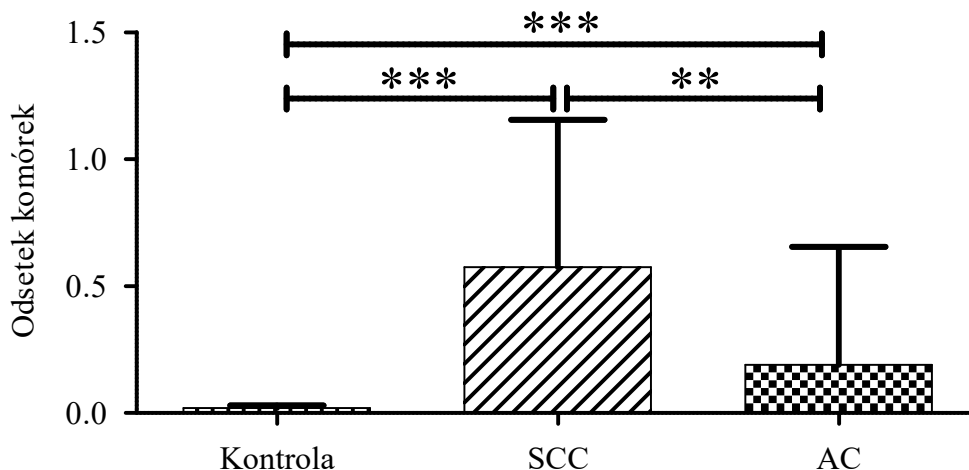
Tabela 12. Zależności między silną jądrową ekspresją Ki-67 (odsetek komórek z pozytywną ekspresją >50%) a danymi kliniczno-patologicznymi w AC.

Parametr	Odsetek komórek z pozytywną ekspresją Ki-67 w AC		wartość p
	≤50%	>50%	
Stadium zaawansowania choroby nowotworowej II lub III, no. (%)	49 (54)	12 (60)	NS
% martwicy mediana (zakres)	30 (0-60)	30 (10-80)	NS
Średnica guza [cm] mediana (zakres)	3,5 (1-11)	4,5 (1,5-8,2)	NS
Ekspresja kaspazy-3 [%] mediana (zakres)	0,2 (0-6)	0,9 (0-4)	p < 0,01
Wielkość guza (cecha T3 lub T4) no. (%)	9 (10)	2 (10)	NS
Zajęcie węzłów chłonnych (cecha N1 lub N2) no. (%)	38 (41)	9 (45)	NS
Stopień złośliwości histologicznej G3 no. (%)	48 (48)	12 (57)	NS



Wykazano wyższą ekspresję antygenu Ki-67 w NSCLC w porównaniu z grupą kontrolną, ponadto w SCC ekspresja Ki-67 była wyższa w porównaniu z AC ( $p < 0,001$ )[Wykres 6]. W celu przeprowadzenia dalszej analizy uzyskanych rezultatów postanowiono wyodrębnić grupę chorych z silną ekspresją antygenu Ki-67, gdzie za punkt odcięcia przyjęto stwierdzenie pozytywnej ekspresji Ki-67 w co najmniej połowie komórek nowotworowych z analizowanego obszaru (ekspresja Ki-67  $>50\%$ ). W grupie chorych z SCC silna ekspresja Ki-67 wiązała się z większym obszarem martwicy w obrębie guza ( $p < 0,01$ ), większą średnicą guza ( $p < 0,01$ ) oraz wyższym poziomem ekspresji kaspazy-3 ( $p < 0,05$ ). Nie wykazano związku między nasileniem ekspresji Ki-67 w SCC a pozostałymi danymi kliniczno-patologicznymi [Tabela 11]. W przypadku AC silna ekspresja Ki-67 wiązała się z wyższym poziomem ekspresji kaspazy-3 ( $p < 0,01$ ). Nie wykazano innych

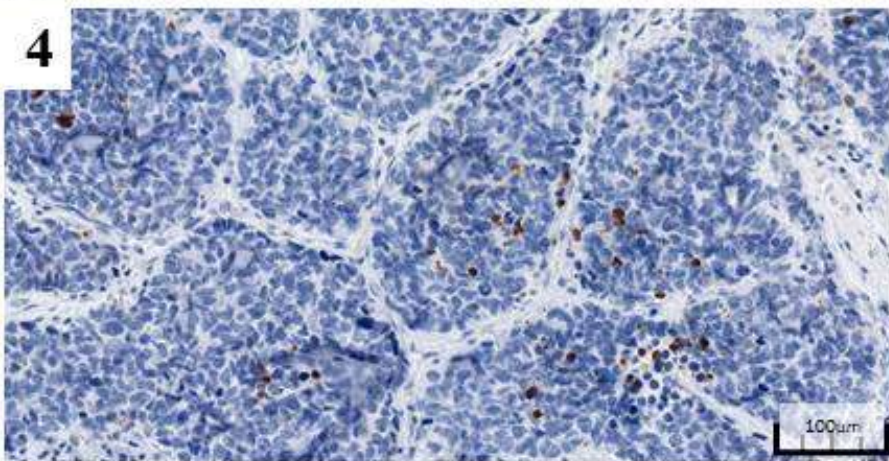
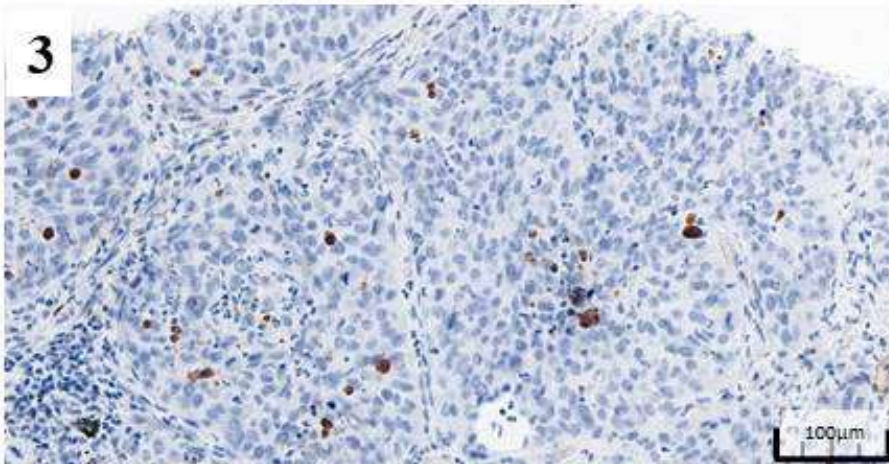
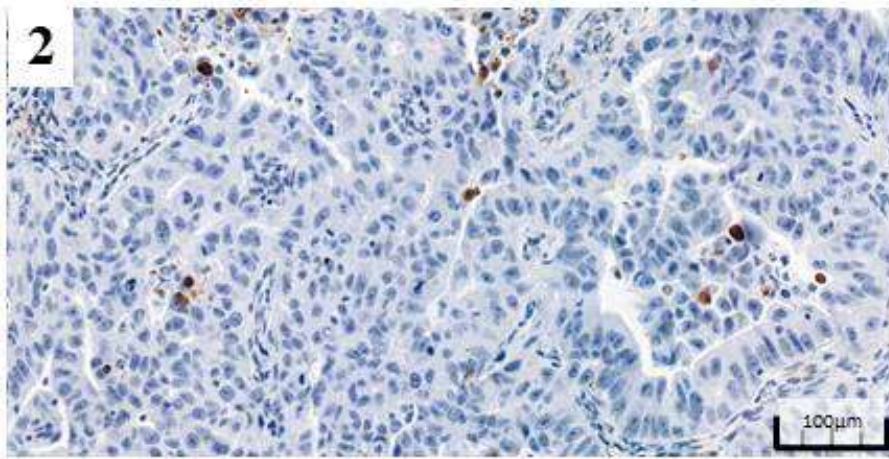
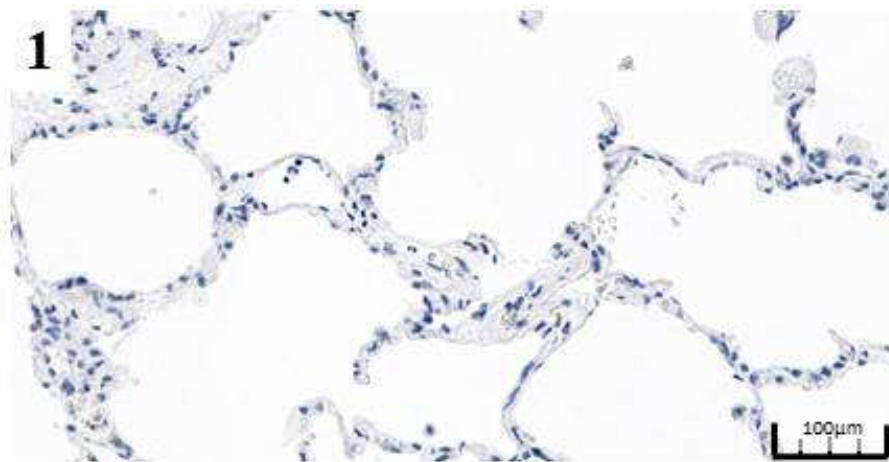
Nasilenie ekspresji kaspazy-3 w zależności od typu histologicznego NSCLC



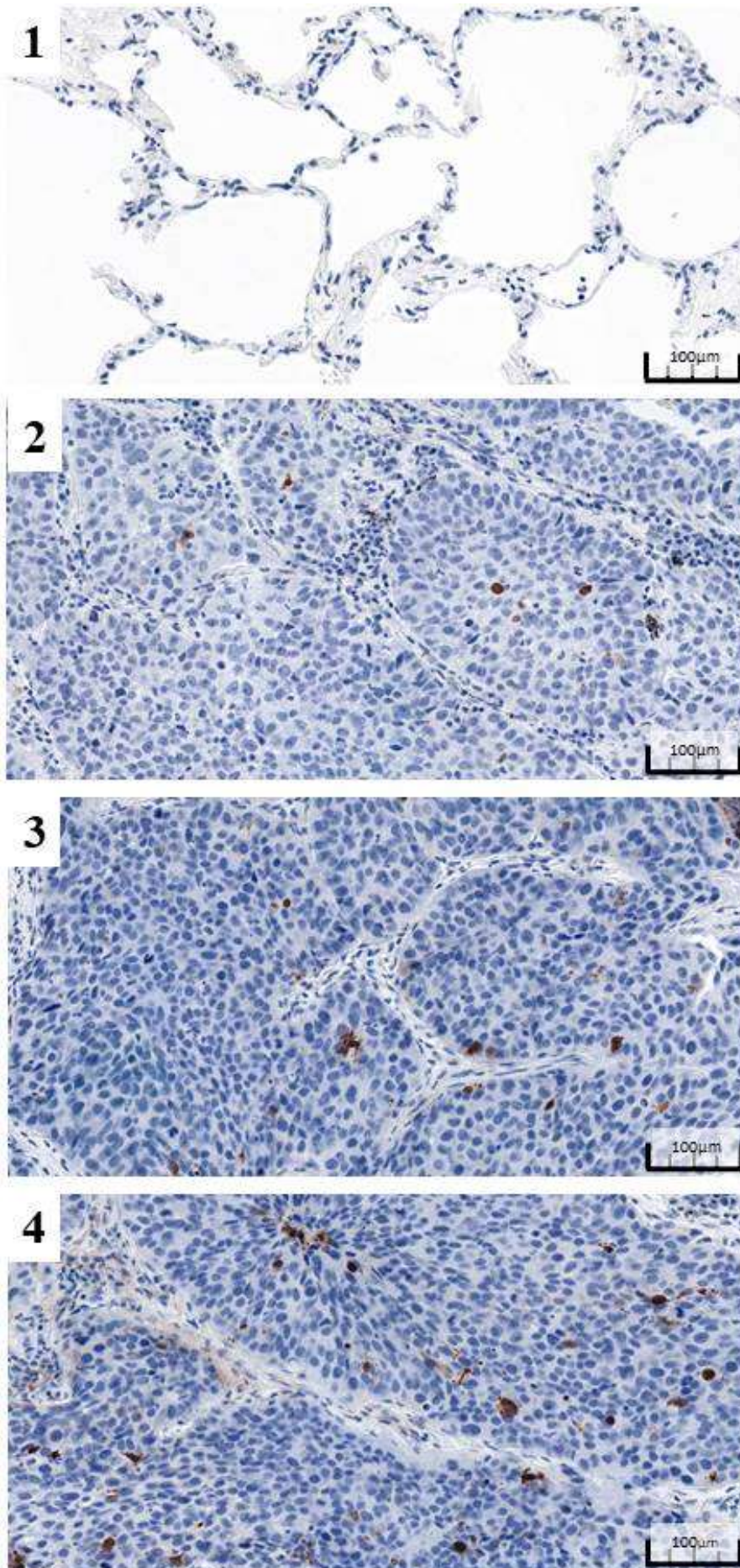
zależności z pozostałymi danymi kliniczno-patologicznymi [Tabela 12].

Wykres 7. Nasilenie ekspresji kaspazy-3 w komórkach nowotworowych w zależności od typu histologicznego NSCLC w odniesieniu do kontroli. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### **6.4. Ekspresja kaspazy-3 w niedrobnokomórkowych rakach płuc z uwzględnieniem danych kliniczno-patologicznych pacjentów.**



Rycina 8. Fotografie przedstawiające jądrową ekspresję kaspazy-3 w prawidłowych tkankach z marginesu cięcia chirurgicznego (1) oraz w gruczołowym (2-4) podtypie histologicznym NSCLC. Powiększenie 200x.



Rycina 9. Fotografie przedstawiające jądrową ekspresję kaspazy-3 w prawidłowych tkankach z marginesu cięcia chirurgicznego (1) oraz w płaskonabłonkowym (2-4) podtypie histologicznym NSCLC. Powiększenie 200x.

Tabela 13. Zależności między nasileniem ekspresji kaspazy-3, a danymi kliniczno-patologicznymi w grupie pacjentów z SCC. Punkt odcięcia stanowiła mediana wartości odsetka komórek z pozytywną jądrową ekspresją badanego białka (wartość: 0,5%).

Parametr	SCC		wartość p
	ekspresja < mediany	ekspresja > mediany	
Liczebność grupy	45	38	-
Stadium zaawansowania choroby nowotworowej II lub III, no. (%)	18 (40)	26 (68)	p<0,05
Wiek w momencie zachorowania [lata] mediana (zakres)	65 (56-82)	67 (58-80)	NS
Średnica guza [cm], mediana (zakres)	3,8 (1.5-9)	4,85 (2-8)	NS p=0,09
Wielkość guza (cecha T3 lub T4) no. (%)	2 (4)	5 (13)	NS
Zajęcie węzłów chłonnych (cecha N1 lub N2) no. (%)	9 (20)	14 (37)	NS p=0,09
Stopień złośliwości histologicznej G3 no. (%)	3 (7)	7 (18)	NS p=0,1
Ki-67 – silna ekspresja, no. (%)	17 (38)	21 (55)	NS p=0,11

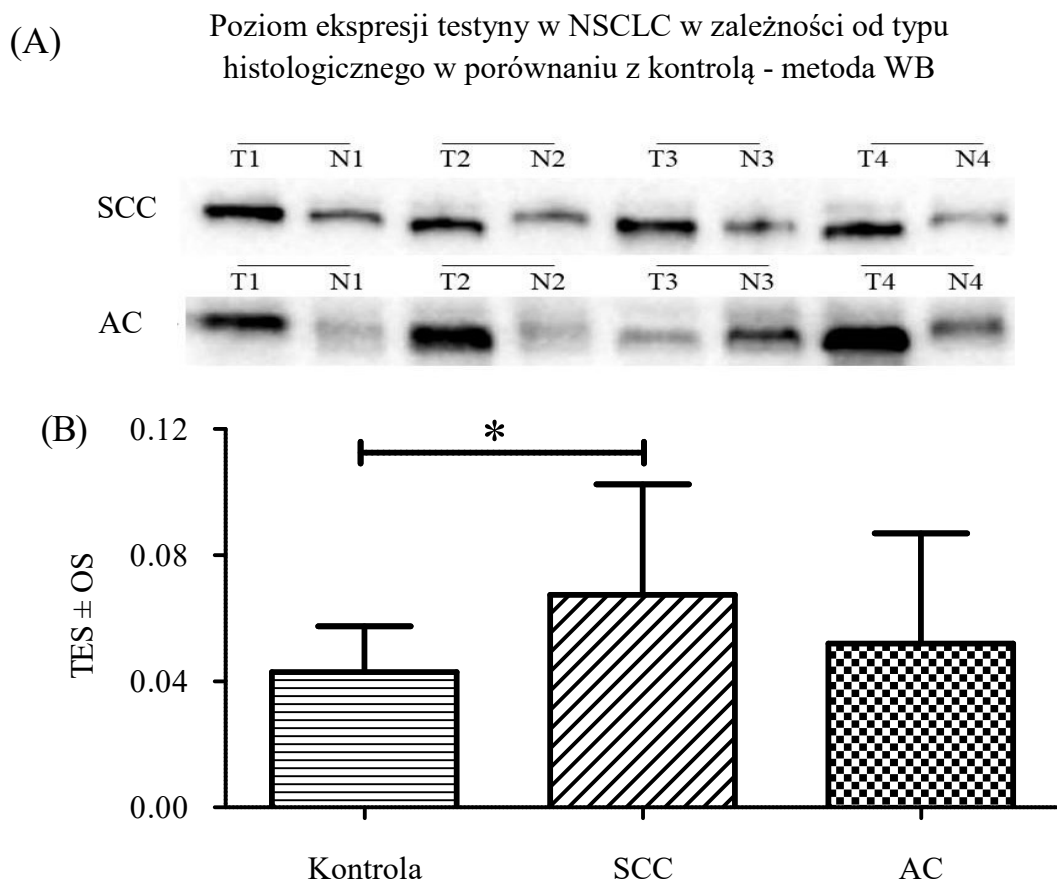
Tabela 14. Zależności między nasileniem ekspresji kaspazy-3, a danymi kliniczno-patologicznymi w grupie pacjentów z AC. Punkt odcięcia stanowiła mediana wartości odsetka komórek z pozytywną jądrową ekspresją badanego białka (wartość: 0,2%).

Parametr	AC		wartość p
	ekspresja < mediany	ekspresja > mediany	
Liczebność grupy	60	58	-
Stadium zaawansowania choroby nowotworowej II lub III, no. (%)	28 (47)	33 (57)	NS
Wiek w momencie zachorowania [lata] mediana (zakres)	66 (50-80)	66 (52-84)	NS
Średnica guza [cm], mediana (zakres)	2,9 (1-9)	3,7 (1,5-11)	p<0,05
Wielkość guza (cecha T3 lub T4) no. (%)	3 (5)	11 (18)	p<0,05
Zajęcie węzłów chłonnych (cecha N1 lub N2) no. (%)	24 (40)	23 (40)	NS
Stopień złośliwości histologicznej G3 no. (%)	32 (53)	32 (55)	NS
Ki-67 – silna ekspresja, no. (%)	6 (10)	12 (21)	NS p=0,11

Pośrednio, poprzez analizę poziomu ekspresji kaspazy-3 w komórkach nowotworowych, wykazano istotnie wyższe nasilenie procesu apoptozy w NSCLC w porównaniu z kontrolą, zarówno w przypadku AC jak i SCC ( $p < 0,001$ ). Ponadto wykazano istotnie wyższe nasilenie apoptozy w NSCLC typu SCC w porównaniu z AC ( $p < 0,01$ )[Wykres 7].

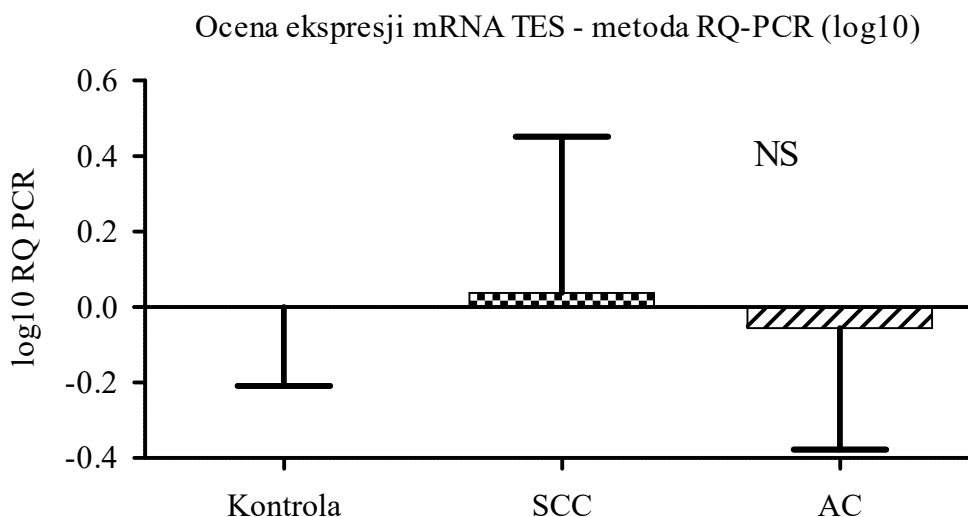
Punktem odniesienia dla analizy jakościowej była mediana wartości odsetka komórek z dodatnią jądrową ekspresją kaspazy-3. W przypadku SCC mediana wynosiła 0,5%, natomiast w przypadku AC – równa była 0,2%. W grupie chorych z SCC silna ekspresja badanego białka wiązała się z wyższym stadium zaawansowania choroby nowotworowej (stadium II lub III) ( $p < 0,05$ ). Ponadto w tej grupie pacjentów obserwowano trend wskazujący na większą średnicę guza, częstsze zajęcie węzłów chłonnych oraz wyższy stopień złośliwości histologicznej G (odpowiednio  $p = 0,09$ ,  $p = 0,09$  oraz  $p = 0,11$ )[Tabela 13]. W przypadku raka gruczołowego wysoki poziom ekspresji kaspazy-3 wiązał się z istotnie większą średnicą guza ( $p < 0,05$ ) oraz wyższą cechą T ( $p < 0,05$ ). Nie wykazano związku z pozostałymi danymi kliniczno-patologicznymi [Tabela 14]. Zarówno w przypadku raka płaskonabłonkowego jak i raka gruczołowego częściej obserwowano silną ekspresję Ki-67 w grupie z wysokim poziomem ekspresji kaspazy-3, jednak zależności pozostawały na granicy istotności statystycznej (w obu przypadkach  $p = 0,11$ )[Tabela 13 i 14].

## 6.5. Ocena ekspresji testyny w niedrobnokomórkowych rakach płuc z wykorzystaniem badań molekularnych: RQ-PCR, WB.



Wykres 8. Ekspresja testyny w komórkach nowotworowych NSCLC oceniana metodą WB. Poziom białka TES w 4 różnych parach przypadków dla NSCLC typu SCC oraz AC – guz (T) oraz prawidłowe tkanki z marginesu cięcia chirurgicznego (N) (A). Wyniki analizy poziomu TES w NSCLC w zależności od typu histologicznego (B). \* $p < 0,05$ .

Analiza poziomu testyny w komórkach nowotworowych NSCLC została przeprowadzona również z zastosowaniem metody Western blot. Wykazano istotnie statystycznie wyższy poziom badanego białka w komórkach nowotworowych SCC w porównaniu z kontrolą stanowiącą prawidłowe tkanki z marginesu cięcia chirurgicznego ( $p < 0,05$ ). Powyższej zależności nie wykazano w odniesieniu do raków gruczołowych płuc, jednak uwidocznił trend wskazujący na wyższy poziom ekspresji testyny w komórkach nowotworowych AC [Wykres 8].

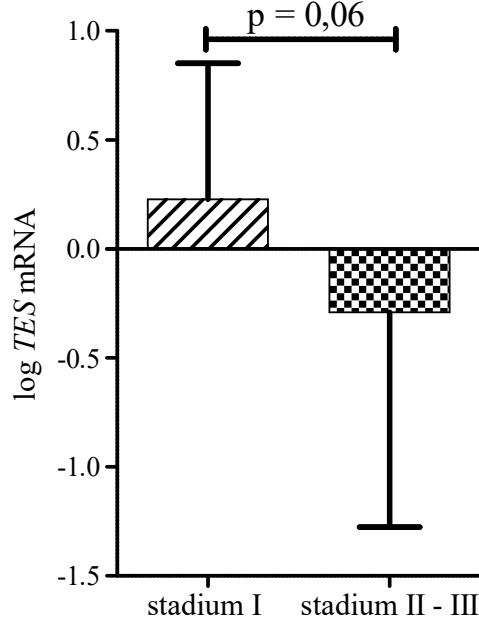


Wykres 9. Poziom ekspresji mRNA *TES* w komórkach nowotworowych NSCLC. Wyniki uzyskano z zastosowaniem metody RQ-PCR przy zastosowaniu mikrodysekcji laserowej. Materiał kontrolny stanowiły prawidłowe tkanki z marginesu cięcia chirurgicznego. Celem prezentacji graficznej dane przekształcono logarymicznie. NS – brak istotności statystycznej.

Analiza poziomu mRNA *TES* metodą RQ-PCR materiału uzyskanego przy pomocy mikrodysekcji laserowej nie wykazała istotnej różnicy między NSCLC a materiałem kontrolnym uzyskanym z marginesu cięcia chirurgicznego ( $p > 0.05$ ). Zaobserwowano trend świadczący o wyższym poziomie mRNA *TES* w NSCLC typu SCC, czego nie zaobserwowano w przypadku typu AC [Wykres 9].

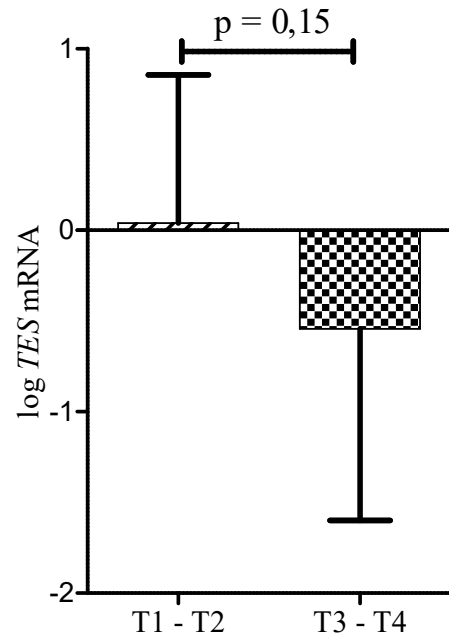
Analiza poziomu mRNA *TES* metodą RQ-PCR wykazała trend świadczący, iż pacjenci w wyższym stadium zaawansowania choroby nowotworowej (stadium II lub III), z wyższym stopniem złośliwości histologicznej (G) oraz większymi wymiarami guza (cecha pT) mają niższy poziom *TES* mRNA (wyniki na granicy istotności statystycznej, odpowiednio  $p = 0,06$ ,  $p = 0,15$ ,  $p = 0,15$ ). Analiza krzywej przeżycia z uwzględnieniem mediany jako punktu odcięcia wykazała, iż obniżony poziom *TES* mRNA jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w NSCLC ( $p < 0,05$ ) [Wykres 10].

(A) Poziom *TES* mRNA w zależności od stadium zaawansowania choroby nowotworowej



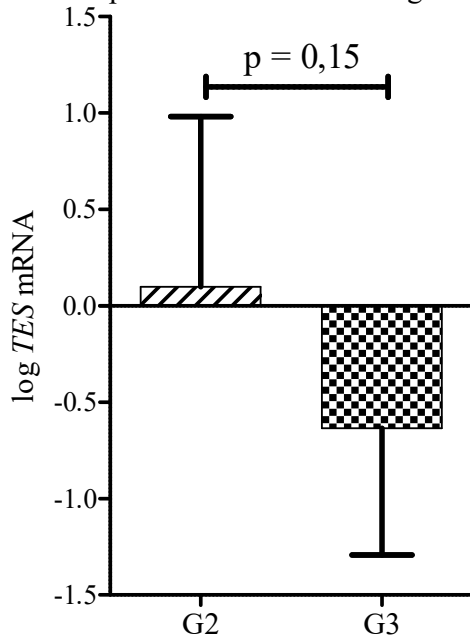
Stadium zaawansowania choroby nowotworowej

(B) Poziom *TES* mRNA w zależności od cechy pT w klasyfikacji TNM



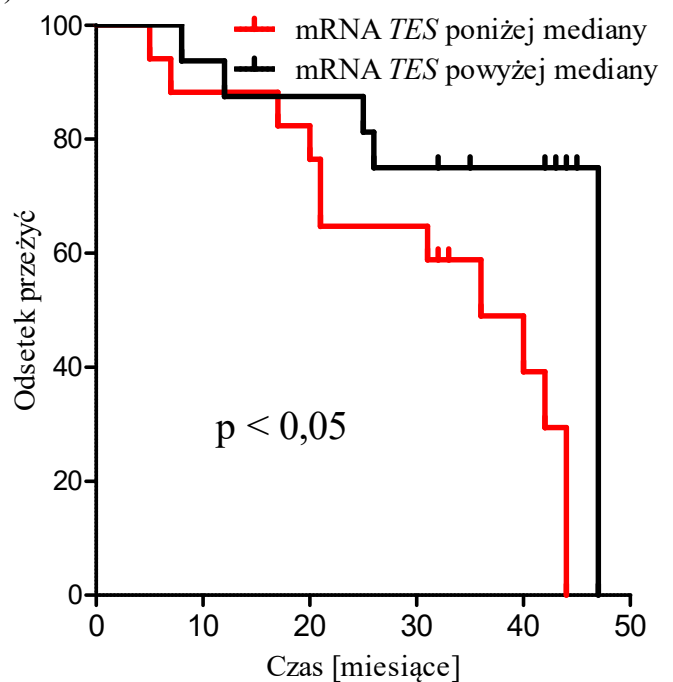
Cecha pT w klasyfikacji TNM

(C) Poziom *TES* mRNA w zależności od stopnia złośliwości histologicznej (G)



Stopień złośliwości histologicznej (G)

(D) Analiza przeżycia w zależności od poziomu *TES* mRNA

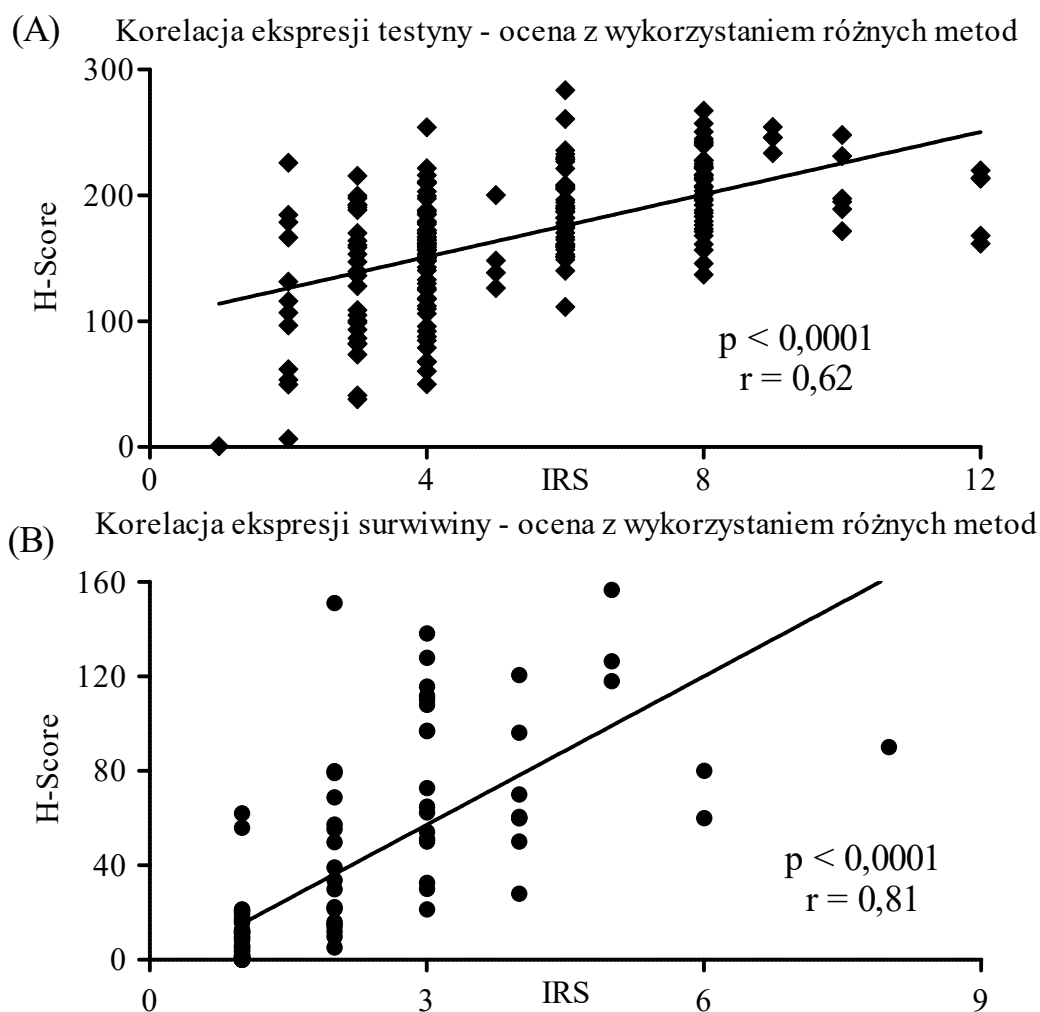


Wykres 10. Analiza poziomu *TES* mRNA w zależności od stadium zaawansowania choroby nowotworowej (A), cechy pT w klasyfikacji pTNM (B), stopnia złośliwości histologicznej G (C) oraz analiza przeżycia pacjentów w zależności od poziomu *TES* mRNA (D) (punkt odcięcia – mediana poziomu *TES* mRNA). Wartości *TES* mRNA przekształcone przy pomocy transformaty Boxa-Coxa celem uzyskania rozkładu normalnego (wartość Lambda: -0,08)(opis transformacji w sekcji: Analiza statystyczna).



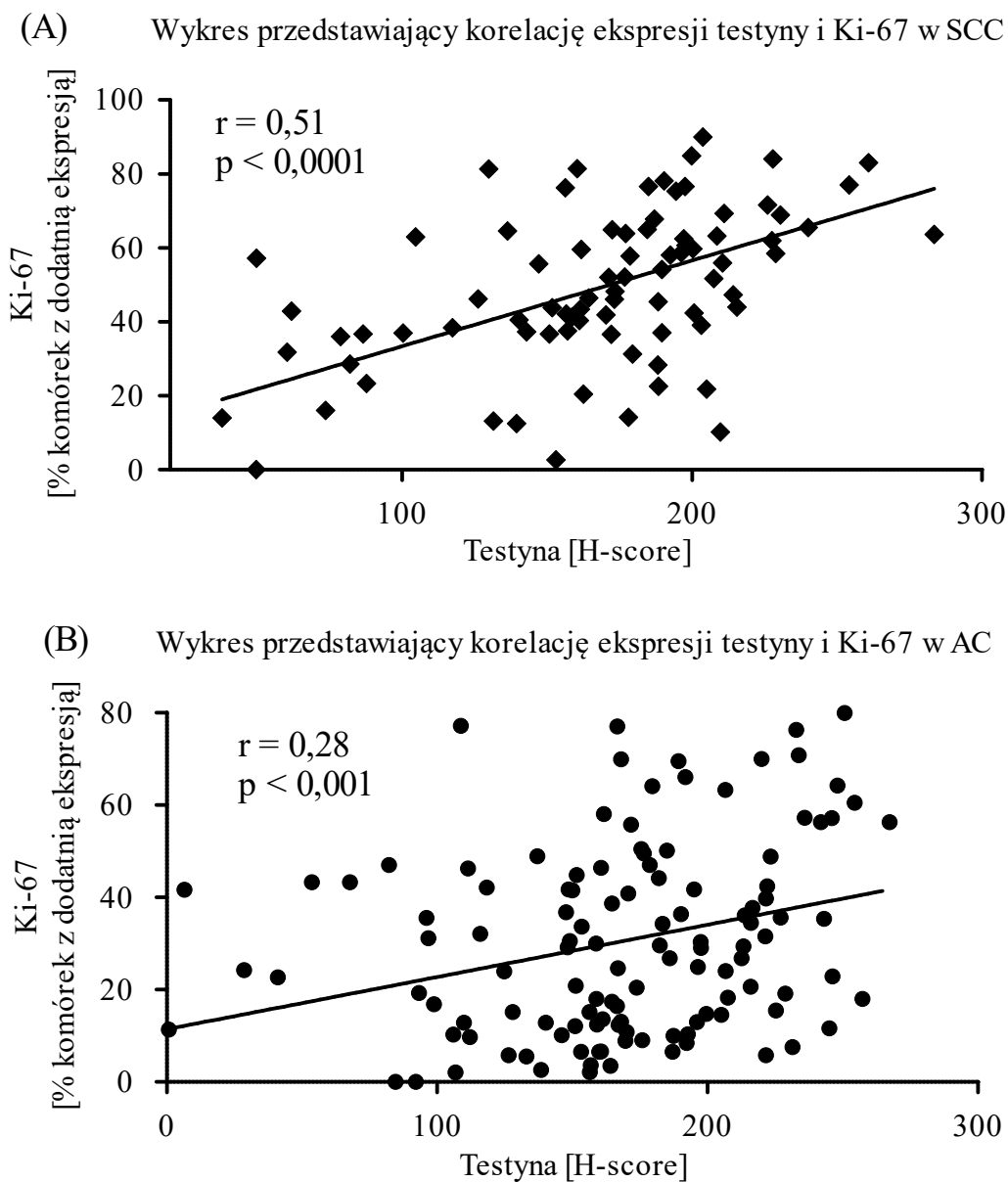
## 6.6. Ocena wzajemnej korelacji ekspresji badanych białek w niedrobnokomórkowych rakach płuc.

W niniejszej sekcji przedstawiono wyniki analizy wzajemnej korelacji poziomu ekspresji badanych białek. Celem uporządkowania treści rezultaty podzielono na odrębne podsekcje. Zwrócono ponadto uwagę na fakt, iż ocena korelacji z wykorzystaniem zmiennych półilościowych, jakimi są wyniki w skali IRS, niesie ze sobą potencjalnie wyższe prawdopodobieństwo popełnienia błędu w trakcie analizy statystycznej. W związku z powyższym w ocenie korelacji postanowiono posługiwać się zmiennymi ilościowymi w skali H-Score, uprzednio wykazując ich zgodność z wynikami uzyskanymi w skali IRS [Wykres 11]. Dla antygenu Ki-67 uwzględniono w analizie odsetek komórek z jego pozytywną ekspresją.



Wykres 11. Korelacja ekspresji testyny i surwiwiny ocenionych metodami IRS oraz H-Score. r – współczynnik korelacji.

### 6.6.1. Korelacja ekspresji testyny i Ki-67.

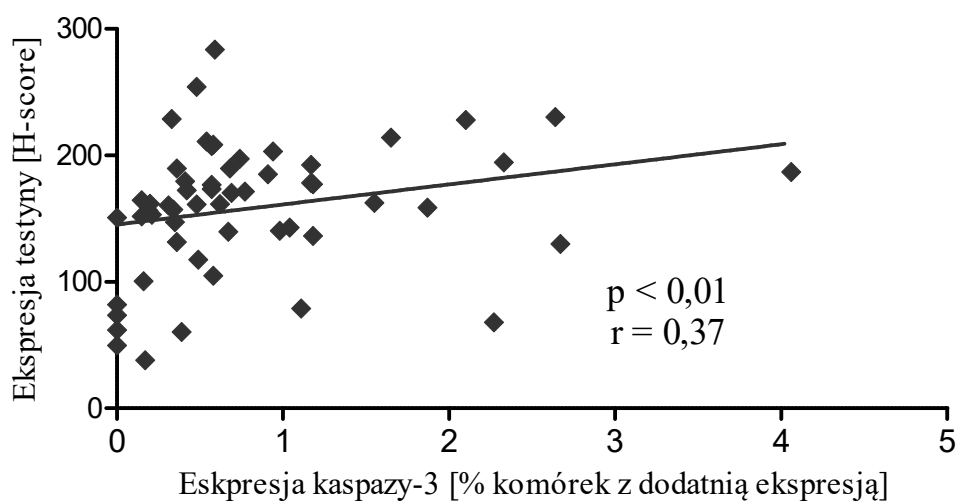


Wykres 12. Korelacja ekspresji testyny (zmierzonej w skali H-score) i Ki-67 (odsetek komórek z pozytywną jej ekspresją) w NSCLC typu SCC (A) oraz AC (B).  $r$  – współczynnik korelacji.

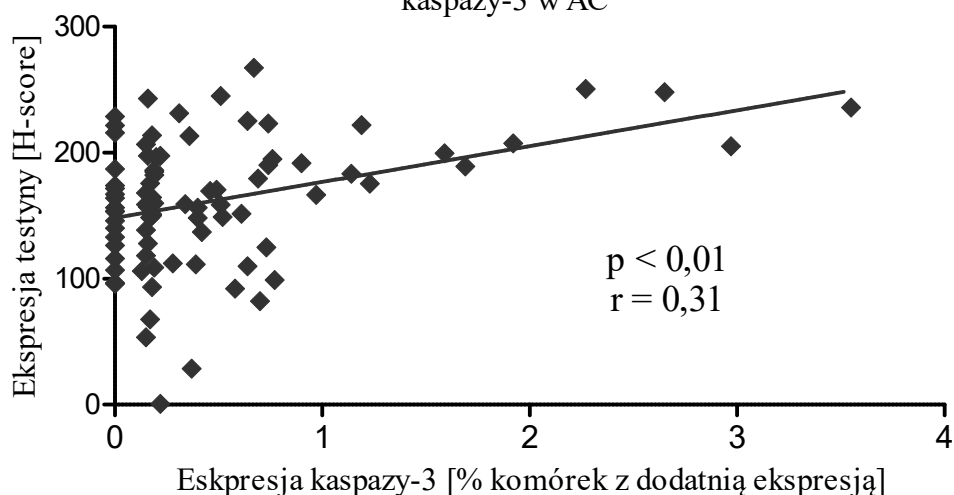
Wykazano istotną dodatnią korelację pomiędzy ekspresją testyny i białka Ki-67 w komórkach nowotworowych NSCLC, zarówno typu SCC jak i AC (odpowiednio:  $r = 0,51$ ;  $p < 0,0001$  oraz  $r = 0,28$ ;  $p < 0,001$ )[Wykres 12].

### 6.6.2. Korelacja ekspresji testyny i kaspazy-3.

(A) Wykres przedstawiający korelację ekspresji testyny i kaspazy-3 w SCC



(B) Wykres przedstawiający korelację ekspresji testyny i kaspazy-3 w AC

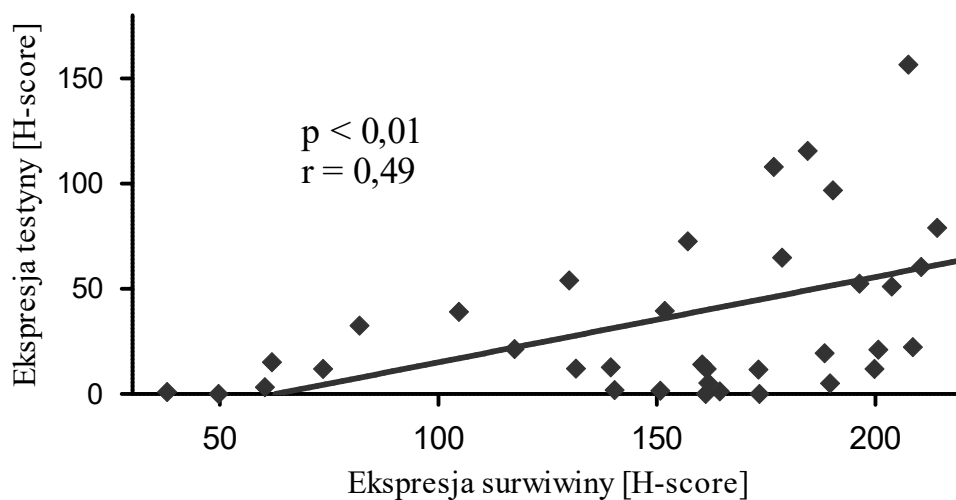


Wykres 13. Korelacja ekspresji testyny (zmierzonej w skali H-score) i ekspresji kaspazy-3 (ocenionej jako odsetek komórek wykazujących jej ekspresję) w NSCLC typu SCC (A) oraz AC (B).  $r$  – współczynnik korelacji.

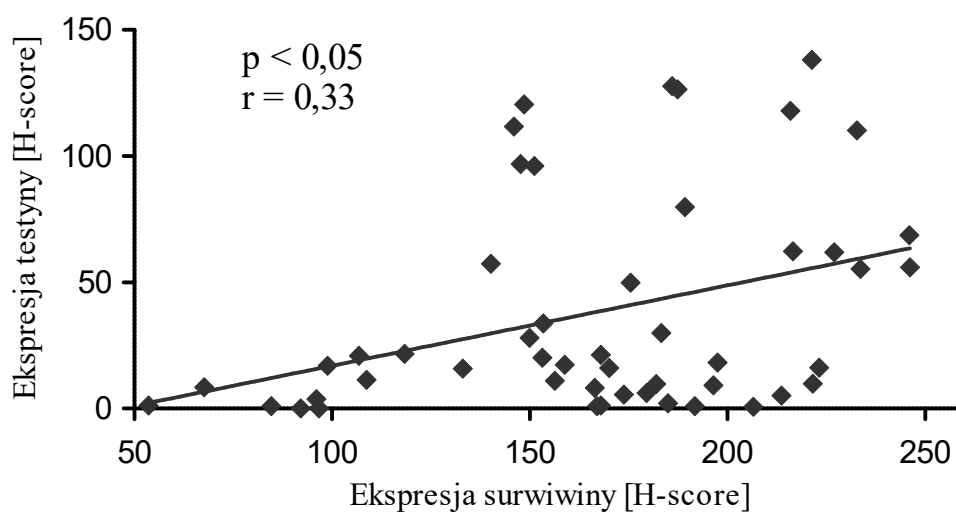
Zaobserwowano umiarkowaną dodatnią korelację poziomu ekspresji testyny i kaspazy-3 w komórkach nowotworowych NSCLC, zarówno w przypadku SCC jak i AC (odpowiednio:  $r = 0,37$ ;  $p < 0,01$  oraz  $r = 0,31$ ;  $p < 0,01$ )[Wykres 13].

### 6.6.3. Korelacja ekspresji testyny i przeżywalności.

(A) Wykres przedstawiający korelację ekspresji testyny i przeżywalności w SCC



(B) Wykres przedstawiający korelację ekspresji testyny i przeżywalności w AC



Wykres 14. Korelacja ekspresji testyny oraz przeżywalności zmierzonych w skali H-score w NSCLC typu SCC (A) oraz AC (B).  $r$  – współczynnik korelacji.

Wykazano umiarkowaną dodatnią korelację ekspresji testyny oraz przeżywalności w komórkach nowotworowych NSCLC, zarówno typu SCC jak i AC (odpowiednio:  $r = 0,49$ ;  $p < 0,01$  oraz  $r = 0,33$ ;  $p < 0,05$ ) [Wykres 14].

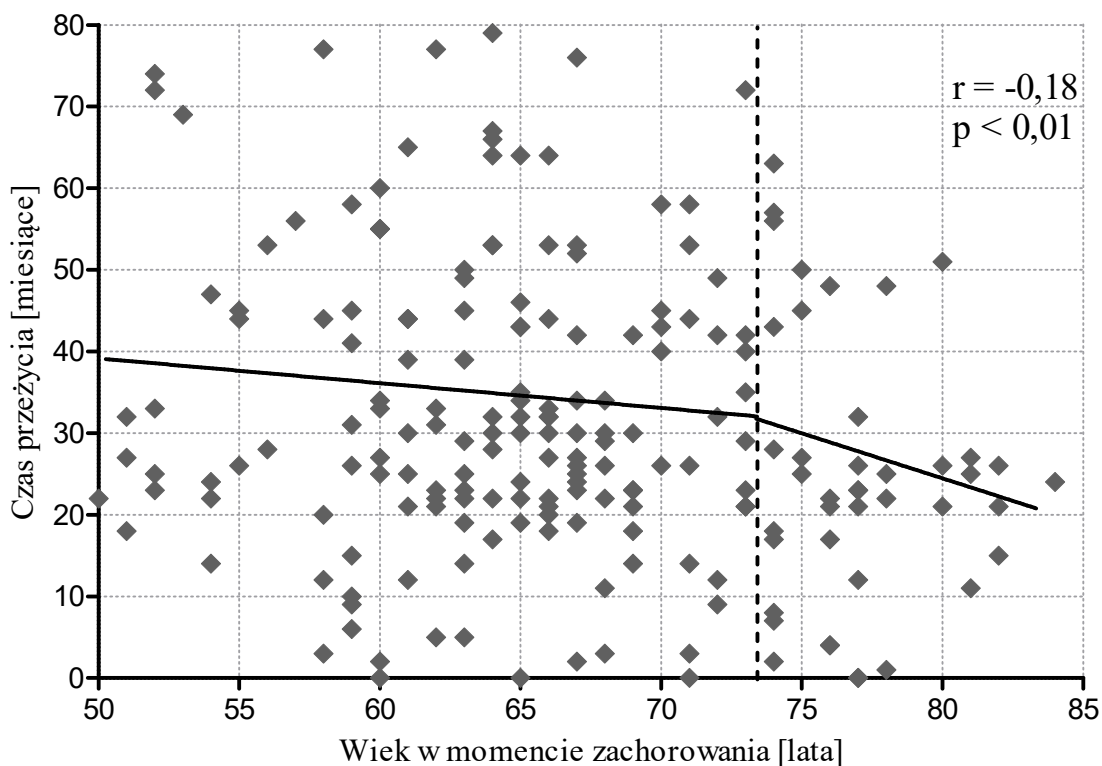
Ekspresja badanego białka	testyna	surwiwina	Ki-67	kaspaza-3	
testyna		0,33*	0,28***	0,31**	AC
surwiwina	0,49**		NS	NS	
Ki-67	0,51***	0,51***		0,42***	
kaspaza-3	0,37**	NS	0,37**		
SCC					

Tabela 15. Macierz korelacji poziomu ekspresji analizowanych białek w komórkach nowotworowych NSCLC z podziałem na podtypy histologiczne. Przedstawione wartości stanowią współczynnik korelacji „r” z następującym poziomem istotności: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . NS – brak istotności statystycznej.

Analiza wzajemnej korelacji ekspresji wszystkich badanych białek wykazała ponadto słabą dodatnią korelację poziomu ekspresji kaspazy-3 z Ki-67 oraz umiarkowaną dodatnią korelację poziomu ekspresji Ki-67 z surwiwiną w NSCLC typu SCC (odpowiednio:  $r = 0,37$ ;  $p < 0,01$  oraz  $r = 0,51$ ;  $p < 0,001$ ). W przypadku AC wykazano umiarkowaną dodatnią korelację poziomu ekspresji Ki-67 z kaspazą-3 ( $r = 0,42$ ;  $p < 0,001$ )[Tabela 15].

## 6.7. Analiza przeżycia pacjentów w zależności od poziomu ekspresji poszczególnych białek.

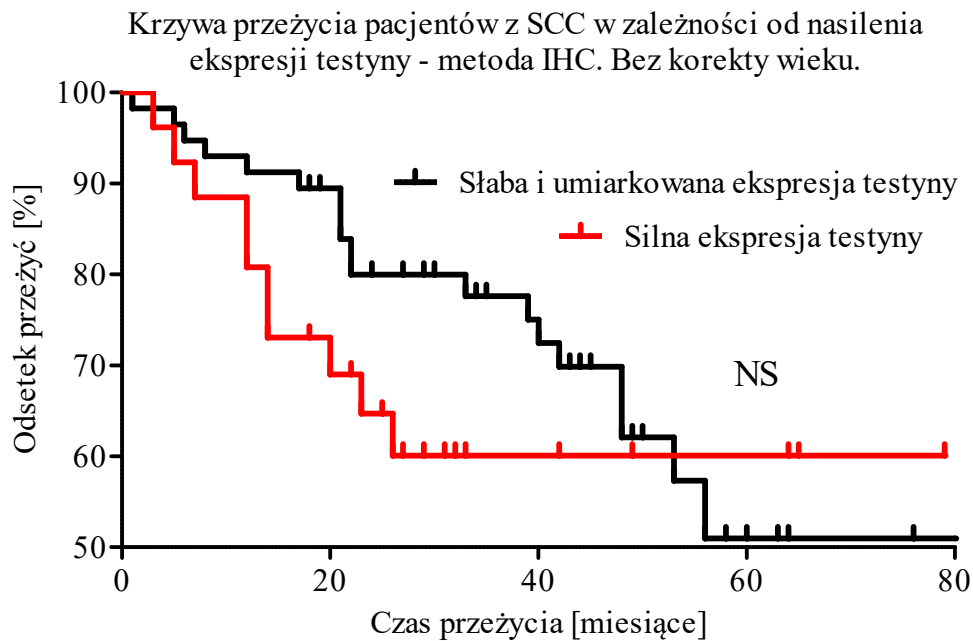
### 6.7.1. Analiza przeżycia pacjentów w zależności od poziomu ekspresji testyny.



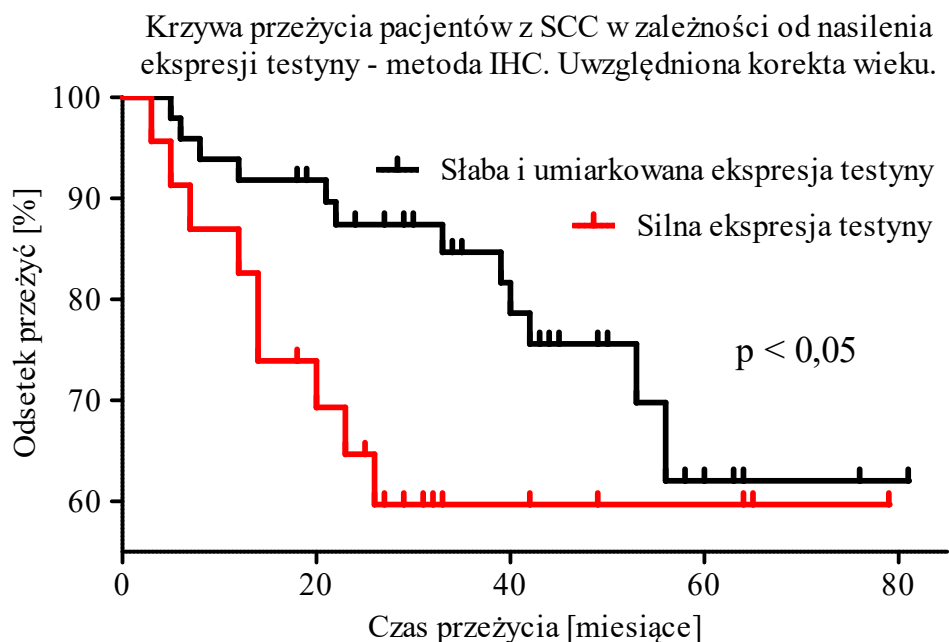
Wykres 15. Zależność między czasem przeżycia pacjentów a wiekiem w momencie zachorowania.  $r$  – współczynnik korelacji.

Przeprowadzona analiza czasu przeżycia pacjentów oraz wieku w momencie zachorowania wykazała, iż istnieje istotna statystycznie ujemna korelacja między wiekiem chorego w momencie rozpoznania raka płuca a czasem przeżycia. Zależność ta nie jest stała i największy wpływ wieku na czas przeżycia można zaobserwować w grupie pacjentów w wieku powyżej 74 lat [Wykres 15]. Z tego powodu, opracowując krzywe przeżycia, postanowiono dodatkowo przygotować analizy przeżycia uwzględniające wyłącznie grupę pacjentów, u których raka płuca rozpoznano w wieku poniżej 75 lat. Zrozumiałym jest fakt, iż w grupie pacjentów w zaawansowanym wieku rośnie prawdopodobieństwo zgonu z dowolnej przyczyny, co stanowi naturalne następstwo starzenia się organizmu. Kolejnym argumentem, uzasadniającym przeprowadzenie dodatkowej analizy, z przyjęciem wieku 75 lat

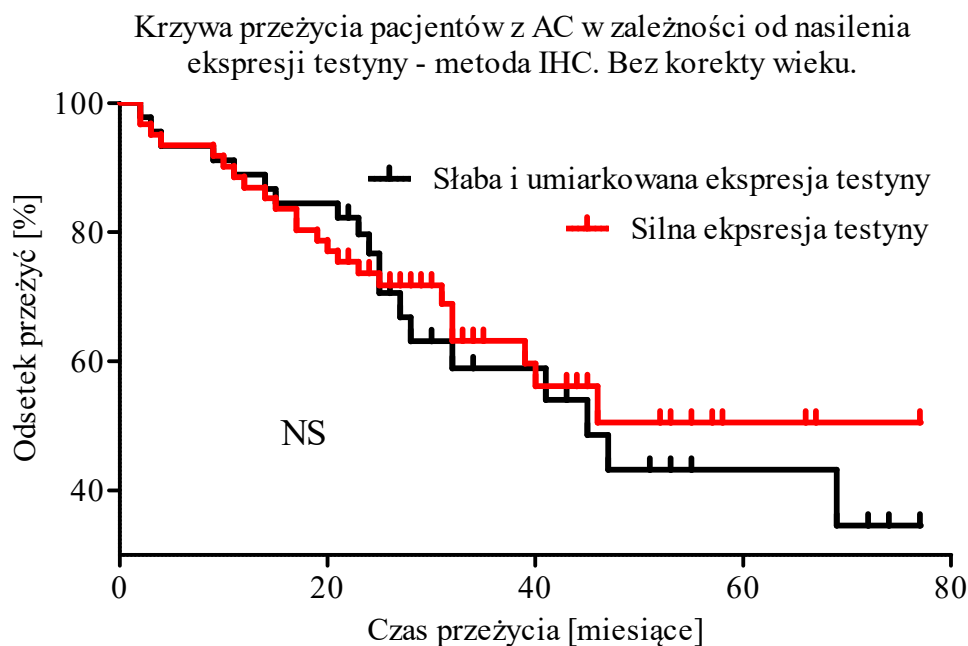
jako punktu odcięcia, jest odniesienie się do średniego czasu przeżycia Polaków, który wynosi obecnie ok. 77 lat [131].



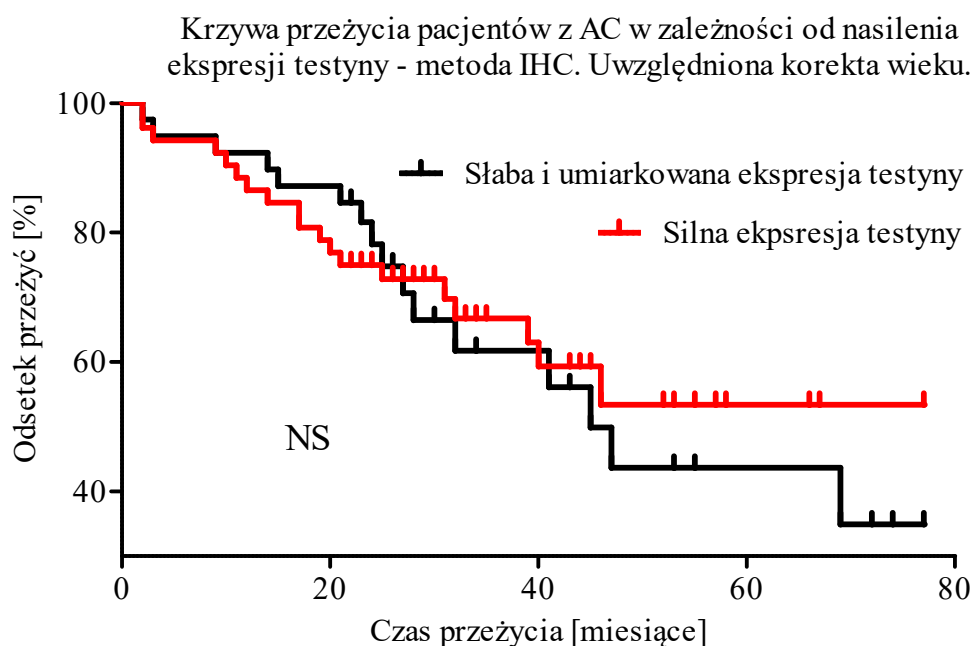
Wykres 16. Analiza przeżycia pacjentów z SCC bez względu na wiek w momencie zachorowania. NS – brak istotności statystycznej.



Wykres 17. Analiza przeżycia pacjentów z SCC z uwzględnieniem wieku w momencie zachorowania (punkt odcięcia: 75 lat).



Wykres 18. Analiza przeżycia pacjentów z AC bez względu na wiek w momencie zachorowania. NS – brak istotności statystycznej.



Wykres 19. Analiza przeżycia pacjentów z AC z uwzględnieniem wieku w momencie zachorowania (punkt odcięcia 75 lat). NS – brak istotności statystycznej.

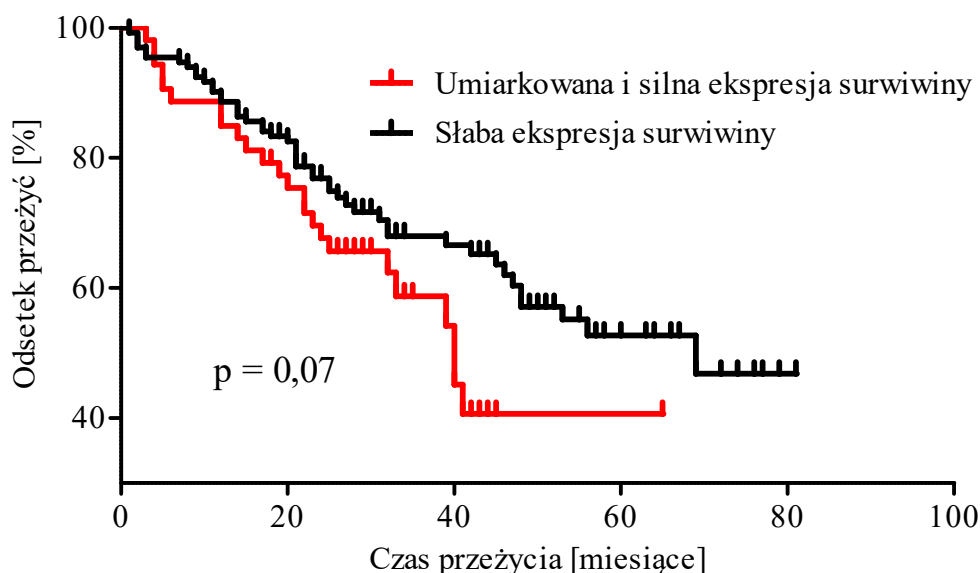
Analiza krzywej przeżycia pacjentów z NSCLC, w zależności od poziomu ekspresji testyny w komórkach nowotworowych, nie wykazała istotnych różnic niezależnie od podtypu histologicznego ( $p > 0,05$ )[Wykresy 16 i 17].



Przeprowadzona dodatkowa analiza krzywej przeżycia, uwzględniająca zaproponowaną powyżej korektę w zależności od wieku w momencie zachorowania, wykazała istotnie krótszy czas przeżycia w grupie pacjentów z SCC, którzy charakteryzowali się silną ekspresją testyny w komórkach nowotworowych w porównaniu z grupą o słabej i umiarkowanej jej ekspresji ( $p < 0,05$ )[Wykres 18]. Zależności takiej nie wykazano w przypadku AC ( $p > 0,05$ )[Wykres 19].

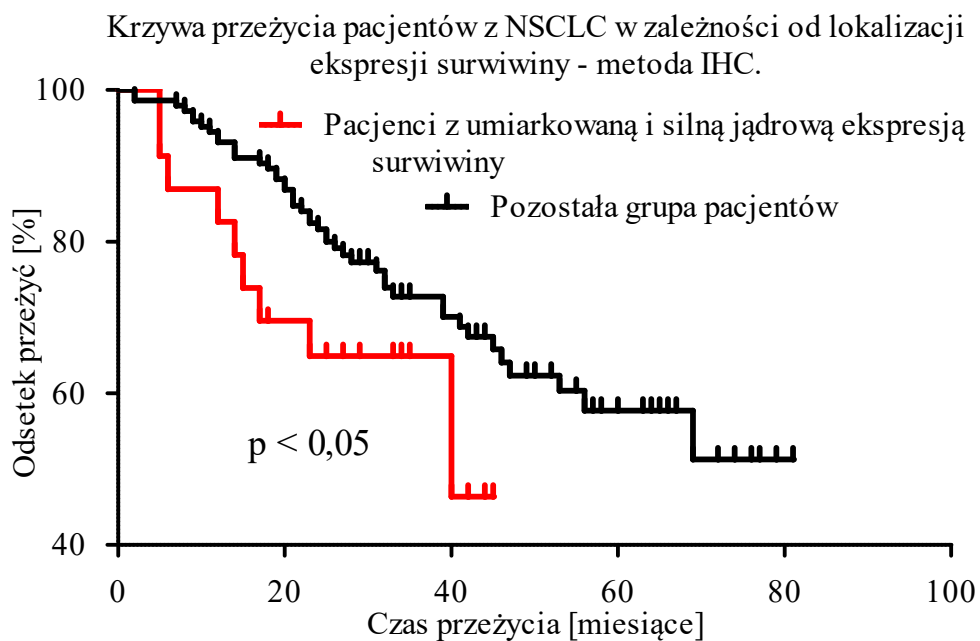
### 6.7.2. Analiza przeżycia pacjentów w zależności od poziomu ekspresji surwiwiny.

Krzywa przeżycia pacjentów z NSCLC w zależności od nasilenia ekspresji surwiwiny - metoda IHC.



Wykres 20. Analiza przeżycia pacjentów z NSCLC z umiarkowaną lub silną ekspresją surwiwiny.

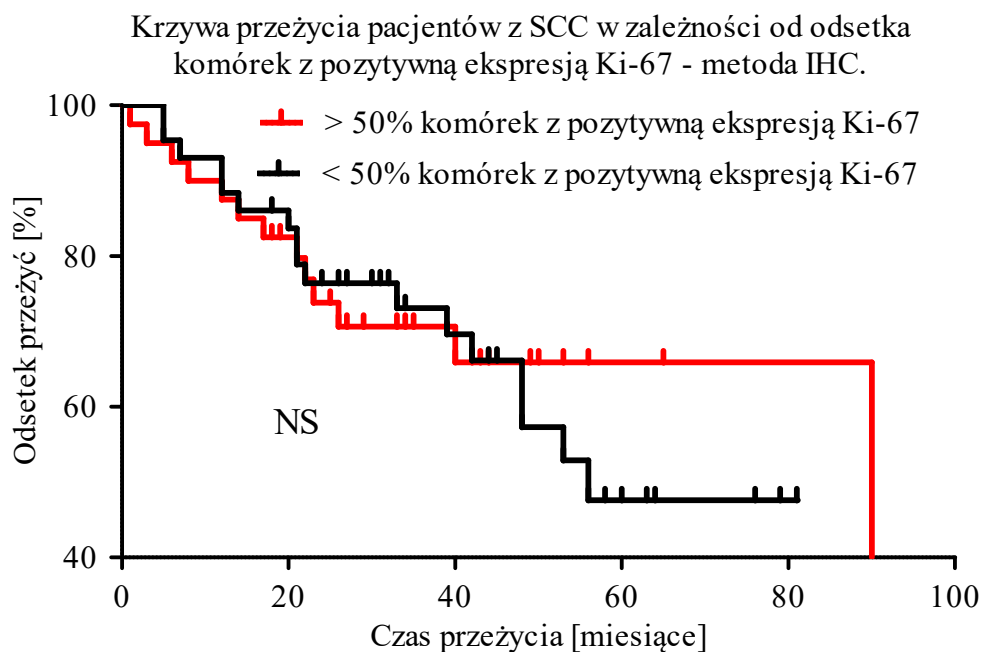
Analiza krzywej przeżycia pacjentów, uwzględniająca poziom ekspresji surwiwiny w komórkach nowotworowych NSCLC, może wskazywać na niekorzystne rokowanie w grupie pacjentów z umiarkowaną lub silną jej ekspresją w porównaniu z pozostałą grupą chorych (wykazano trend na granicy istotności z  $p = 0,07$ ) [Wykres 20].



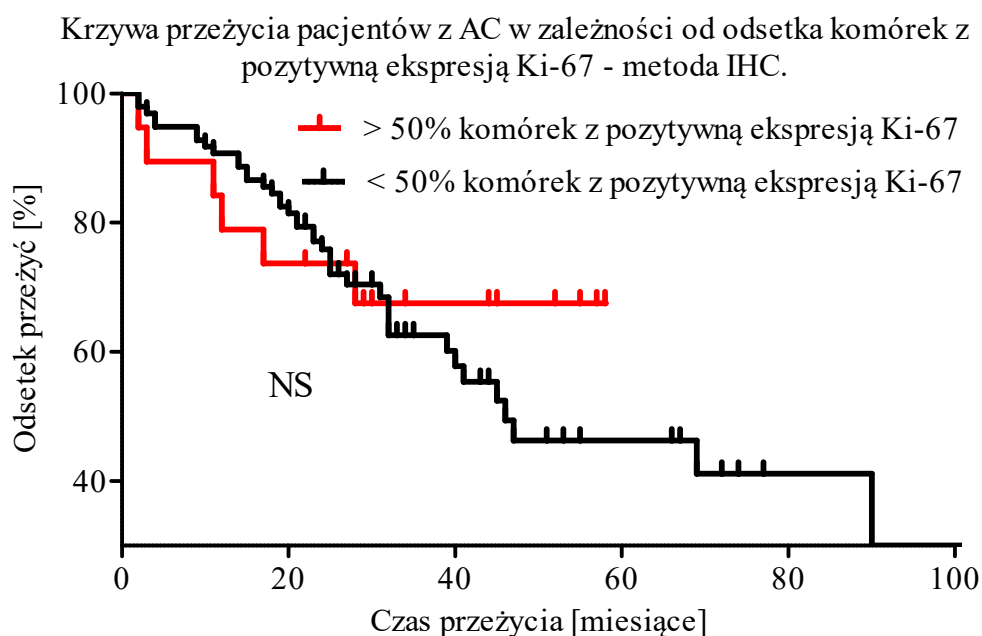
Wykres 21. Analiza przeżycia pacjentów z NSCLC z umiarkowaną lub silną jądrową ekspresją surwiwiny.

Przeprowadzona analiza krzywej przeżycia pacjentów wykazała istotnie krótszy czas przeżycia w grupie chorych z umiarkowaną lub silną jądrową ekspresją surwiwiny w porównaniu z pozostałą grupą badanych ( $p < 0,05$ )[Wykres 21].

### 6.7.3. Analiza przeżycia pacjentów w zależności od poziomu ekspresji Ki-67.



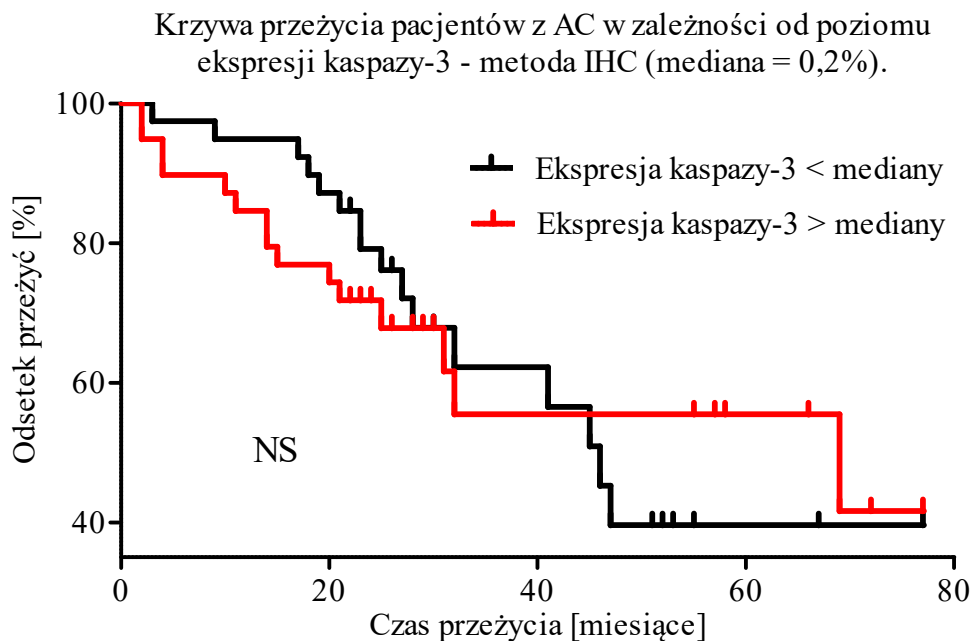
Wykres 22. Analiza przeżycia pacjentów z SCC w zależności od poziomu ekspresji białka Ki-67. NS – brak istotności statystycznej.



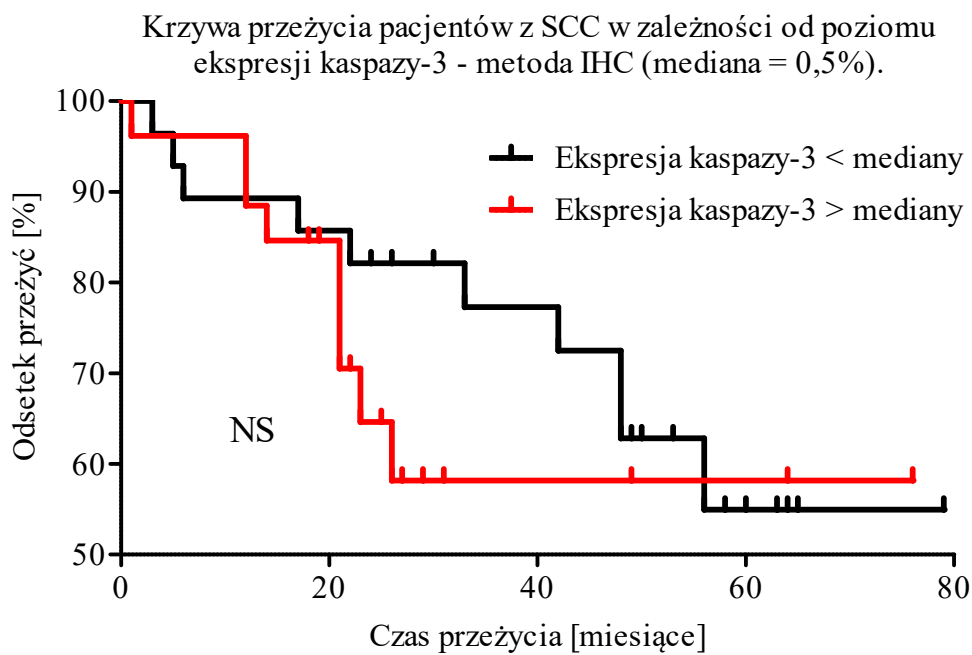
Wykres 23. Analiza przeżycia pacjentów z AC w zależności od poziomu ekspresji białka Ki-67. NS – brak istotności statystycznej.

Analiza krzywej przeżycia pacjentów z NSCLC, uwzględniająca poziom ekspresji Ki-67 w komórkach nowotworowych, nie wykazała żadnych różnic niezależnie od typu histologicznego nowotworu ( $p > 0,05$ ) [Wykresy 22 i 23]. Warto zaznaczyć, iż w danych literaturowych istnieją doniesienia sugerujące przyjęcie za punkt odcięcia dla niekorzystnego rokowania odsetka komórek nowotworowych z pozytywną ekspresją Ki-67 na poziomie 25%, zwłaszcza dla NSCLC typu AC [93]. Analiza uwzględniająca powyższe założenia również okazała się być nieistotna statystycznie ( $p > 0,05$ ).

#### 6.7.4. Analiza przeżycia pacjentów w zależności od poziomu ekspresji kaspazy-3.



Wykres 24. Analiza przeżycia pacjentów z AC w zależności od poziomu ekspresji kaspazy-3.



Wykres 25. Analiza przeżycia pacjentów z SCC w zależności od poziomu ekspresji kaspazy-3.

Analiza krzywej przeżycia pacjentów z NSCLC, w zależności od nasilenia ekspresji kaspazy-3 w komórkach nowotworowych, nie wykazała żadnych różnic niezależnie od typu histologicznego nowotworu ( $p > 0,05$ )[Wykres 24 i 25].

## 7. Omówienie wyników i dyskusja.

Na podstawie przeprowadzonych badań z wykorzystaniem metody immunohistochemicznej oraz metody Western blot wykazano zwiększoną cytoplazmatyczną ekspresję testyny w NSCLC, zarówno typu SCC jak i AC, w porównaniu z kontrolą stanowiącą prawidłowe tkanki z marginesu cięcia chirurgicznego. Ponadto w odniesieniu do SCC, silna ekspresja badanego białka korelowała z wyższym stadium zaawansowania choroby nowotworowej oraz istotnie większą średnicą guza. W grupie pacjentów z silną jej ekspresją choroba nowotworowa była diagnozowana w młodszym wieku (64 r.ż. vs. 67 r.ż.), jednak wartość ta była na granicy istotności statystycznej. Analiza krzywej przeżycia w grupie pacjentów z NSCLC typu SCC nie potwierdziła związku nasilenia ekspresji testyny z krótszym czasem przeżycia. Po uwzględnieniu wieku w momencie zachorowania i ponownym przeprowadzeniu analizy, zaobserwowano zależność wskazującą na niższą przeżywalnością w grupie pacjentów z silną ekspresją badanego białka. Uzyskany rezultat wymaga jednak potwierdzenia, w związku z celowym uwzględnieniem, niestosowanej powszechnie, poprawki dotyczącej wieku pacjenta w momencie zachorowania. W przypadku NSCLC typu AC zaobserwowano istotnie większą średnicę guza w grupie pacjentów z wysokim poziomem ekspresji testyny. Nie wykazano związku z czasem przeżycia, niezależnie od wieku w momencie zachorowania, klasyfikacją TNM czy stadium zaawansowania choroby nowotworowej.

Uzyskane rezultaty pośrednio mogą wskazywać na fakt, iż wysoki poziom ekspresji testyny może promować rozwój niedrobnokomórkowych raków płuc, zwłaszcza SCC. Wyższe stadium zaawansowania nowotworu, większa średnica guza czy młodszy wiek w momencie postawienia diagnozy mogą potwierdzać tę obserwację.

Niezależnie od typu histologicznego NSCLC, silna ekspresja testyny wiązała się z większym nasileniem ekspresji kaspazy-3, pośrednio świadczącej o nasileniu procesów apoptozy jako kaspazy wykonawczej programowanej śmierci komórki. Również indeks proliferacyjny (oceniany jako odsetek przypadków z silną jądrową ekspresją Ki-67), niezależnie od typu histologicznego NSCLC, był wyższy w grupie pacjentów z silną ekspresją badanego białka, jednak w przypadku SCC wynik był na granicy istotności statystycznej. Jednoczesowy wzrost nasilenia procesów apoptozy oraz wysoki indeks proliferacyjny wydają się być zaskakujące, zwłaszcza, że testyna fizjologicznie rozpatrywana jest jako białko supresorowe. W świetle powyżej

przedstawionych danych istnieją wątpliwości dotyczące przeciwnowotworowej roli testyny w NSCLC. Podkreśla to wykazanie istotnej dodatniej korelacji między poziomami ekspresji badanego białka i surwiwiny, będącej istotnym inhibitorem apoptozy, którego wysoki poziom ekspresji w komórkach nowotworowych rozpatrywany jest jako niekorzystny czynnik prognostyczny [132]. Wy tłumaczeniem jednoczesnego nasilenia proliferacji komórkowej oraz wzrostu ekspresji kaspaz wykonawczych procesu apoptozy są wyniki zespołów badawczych zajmujących się rolą apoptozy w NSCLC. Wysuwają oni hipotezę, iż nasilenie apoptozy jest raczej zjawiskiem wtórnym do nasilenia procesu proliferacji komórkowej i samo w sobie może nie mieć znaczenia prognostycznego w niedrobnokomórkowych rakach płuc [101]. Temat ten opisano szerzej w części dyskusji poświęconej ocenie nasilenia procesów apoptozy w NSCLC.

Otrzymane przy użyciu metod IHC oraz WB wyniki nie korespondują z rezultatami uzyskanymi za pomocą reakcji RQ-PCR oceniającej poziom *TES* mRNA w NSCLC. Warto zaznaczyć, iż wyniki analizy statystycznej z uwzględnieniem poziomu *TES* mRNA nie są istotne statystycznie, a wykazane zostały za ledwie trendy, będące w opozycji do prezentowanych powyżej wyników. Również analiza krzywej przeżycia, pomimo istotności statystycznej, obarczona jest pewnym ryzykiem w związku z dużą ilością obserwacji niekompletnych. Jednakże wyniki reakcji RQ-PCR korespondują z danymi literaturowymi. W kolejnych akapitach niniejszej sekcji podjęto próbę odniesienia się do zaistniałych rozbieżności prezentowanych wyników.

Dotychczas za ledwie w jednym opublikowanym badaniu wskazywano na odmienną rolę testyny w procesie kancerogenezy. Han i wsp. w swoich badaniach na liniach komórkowych raka żołądka (GTL-16) wskazywali na nadekspresję testyny w komórkach nowotworowych i prawdopodobny brak jej funkcji supresorowej w tym typie nowotworu [133].

Zaprezentowane powyżej rezultaty stoją w bezsprzecznej opozycji do pozostałych wyników badań uzyskanych przez wiele innych zespołów badawczych, przeprowadzonych z wykorzystaniem zarówno materiału klinicznego, jak i linii komórkowych. Grupa naukowców pod przewodnictwem Zhu wykazała obniżoną ekspresję testyny w rakach gruczołu piersiowego, ponadto zaobserwowała stopniowy spadek poziomu ekspresji badanego białka w kolejnych fazach procesu nowotworzenia: UDH (zwykły rozrost nabłonka przewodowego), ADH (atypowy rozrost nabłonka przewodowego), DCIS (rak przewodowy in situ) oraz inwazyjnego raka sutka. Ponadto

analiza krzywej przeżycia wykazała, iż obniżony poziom ekspresji *TES* był niekorzystnym czynnikiem prognostycznym, zarówno w analizie przeżycia całkowitego jak i czasu przeżycia wolnego od wznowy oraz przeżycia wolnego od przerzutów [13]. Steponaitis i wsp. przeprowadzili ocenę poziomu ekspresji testyny oraz stopnia metylacji promotora dla genu *TES* z wykorzystaniem materiału pochodzącego od pacjentów z glejakami mózgu. Wykazali oni zależność między wzrastającym stopniem metylacji promotora dla genu *TES* a stopniem złośliwości nowotworu. Ponadto zaobserwowali, iż w stopniu IV złośliwości (glejak wielopostaciowy) poziom ekspresji testyny jest niższy niż w stopniu II oraz III, a obniżony poziom ekspresji *TES* jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym. Zaprezentowane dane nie są jednak jednoznaczne, ponieważ w cytowanym artykule zaobserwować można wyraźny trend wskazujący na wzrastający poziom ekspresji testyny w glejakach w stopniach od I do III i dopiero spadek jej ekspresji w stopniu IV zaawansowania. Ponadto poziom ekspresji *TES* w stopniu IV złośliwości nie różnił się istotnie od jej poziomu w stopniu I. Pacjenci ze stwierdzoną metylacją promotora genu *TES* charakteryzowali się krótszym całkowitym czasem przeżycia, jednak należy mieć jednocześnie na uwadze, iż byli oni jednocześnie dużo starsi aniżeli grupa kontrolna ( $p < 0,001$ ), co może mieć przełożenie na prezentowane rezultaty [15]. Gu i wsp. wykazali, iż obniżona ekspresja testyny w raku endometrium wiąże się z wyższym stopniem zaawansowania choroby nowotworowej oraz częstszą inwazją naczyń chłonnych. Transfekcja plazmidu z genem *TES* do komórek raka endometrium z wykorzystaniem odpowiednich linii komórkowych skutkowało nasileniem apoptozy, zmniejszeniem tempa wzrostu guza oraz obniżeniem zdolności do formowania kolonii (ang. *colony-forming ability*) [21]. Należy mieć jednak na uwadze fakt, iż transfekcji dokonuje się wprowadzając do komórek typ dziki genu *TES*, co pozwala na ocenę fizjologicznej funkcji testyny, a w niepewnym stopniu pozwala przekładać uzyskane rezultaty na potencjalnie zmienioną funkcję produktu białkowego zmutowanego genu *TES*. Dowód na możliwą rolę testyny w patogenezie raków nosogardła stanowi korelacja pomiędzy obniżonym poziomem ekspresji *TES*, a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych, przerzutów odległych oraz stopniem zróżnicowania komórek nowotworowych [134]. Badania dotyczące poziomu ekspresji genu *TES* w pierwotnych rakach żołądka wykazały krótszy średni całkowity czas przeżycia w grupie pacjentów z obniżoną jego ekspresją w porównaniu z grupą pacjentów wykazujących dodatnią ekspresję omawianego genu. Ponadto przy użyciu estymatora Kaplana-Meiera



wykazano, iż brak ekspresji genu *TES* jest istotnym negatywnym czynnikiem prognostycznym pierwotnego raka żołądka [135]. Zhu i wsp. przeprowadzili natomiast badania z wykorzystaniem materiału klinicznego uzyskanego od pacjentów z rakiem jelita grubego (RJG). W analizowanej grupie chorych żaden z pacjentów nie otrzymał terapii przeciwnowotworowej przed pobraniem wycinków i postawieniem ostatecznej diagnozy RJG. Wykazano, iż obniżona ekspresja testyny wiąże się z niższym stopniem zróżnicowania histologicznego nowotworu oraz wyższym stadium zaawansowania choroby nowotworowej ocenianej w skali TNM. Analiza krzywej przeżycia z wykorzystaniem estymatora Kaplana-Meiera wykazała ponadto, iż pacjenci z niską ekspresją testyny charakteryzowali się krótszym całkowitym czasem przeżycia w porównaniu do grupy z jej wysoką ekspresją [18]. Dostępne są również wyniki badań przeprowadzonych przez grupę naukowców z Chin w zespole Wang i wsp., którzy prowadzili analizę ekspresji testyny z wykorzystaniem linii komórkowych NSCLC. W swoich badaniach wykazali obniżenie poziomu *TES* mRNA oraz stężenia białka testyny na liniach komórkowych NSCLC. Z kolei skuteczna transfekcja genu *TES* skutkowała wzrostem stężenia badanego białka, co w efekcie przekładało się na istotne statystycznie zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych, zmniejszenie inwazyjności oraz zdolności do tworzenia przerzutów. Zaobserwowano również, iż u myszy, którym inokulowano komórki nowotworowe NSCLC wykazujące nadekspresję genu *TES*, rozwój guza był istotnie wolniejszy, a jego masa mniejsza [22]. Wyniki badań przeprowadzonych przez Popiel-Kopaczyk i wsp. na materiale klinicznym uzyskanym od pacjentek z rakiem szyjki macicy wskazują na odwrotną korelację ekspresji testyny i białka Ki-67, co znajduje w pełni racjonalne uzasadnienie w funkcji testyny jako białka hamującego proliferację komórkową poprzez wpływ na cykl komórkowy [19].

Badania dotyczące patogenezy raka szyjki macicy wskazują na rolę testyny w hamowaniu proliferacji komórkowej poprzez wpływ na cykl komórkowy i zatrzymywanie komórek w fazie G1 [21]. Z kolei w przypadku ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) z komórek B reekspresja genu *TES* wiązała się z zahamowaniem cyklu komórkowego w fazie G2/M, co było niezależne od aktywności białka supresorowego TP53 [8]. Białko TES miało ponadto wpływ na przebieg choroby nowotworowej poprzez indukowanie procesów apoptozy niezależnie od szlaku aktywacji, zarówno w torze zewnątrz jak i wewnątrzpochoďnym, co zaobserwowano analizując pacjentki z rakami gruczołu piersiowego oraz jajnika

[136]-137]. Nadekspresja testyny w przypadku raka jelita grubego wiązała się z aktywacją szlaku sygnałowego kinaz aktywowanych mitogenami p38-MAPK (ang. *p38 mitogen-activated protein kinase*), co skutkowało nasileniem procesów apoptozy oraz osłabieniem proliferacji komórek nowotworowych [135]. Hamowanie przez badane białko aktywności metaloproteiny MMP-2 (ang. *matrix metalloproteinase-2*), zaangażowanej w degradację błony podstawnej, może wiązać się ze zmniejszeniem inwazyjności komórek nowotworowych oraz osłabieniem procesów angiogenezy w obrębie guza, a w efekcie obniżeniem ryzyka powstania przerzutów odległych [13]. Obniżenie ekspresji genu *TES* z wykorzystaniem specjalnie skonstruowanych plazmidów wiązało się z osłabieniem ekspresji białek adhezyjnych (E-kadheryny) oraz nasileniem ekspresji N-kadheryny, wimentyny i Snail, związanych z procesem przejścia epitelialno-mezenchymalnego (ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition* – EMT). Obecność powyższych markerów, świadczących o zjawisku EMT, wiązała się z gorszym rokowaniem u pacjentek z rakiem endometrium [14].

Wzrost poziomu ekspresji testyny w niedrobnokomórkowych rakach płuc oraz wyniki analizy wskazujące na rolę testyny jako niekorzystnego czynnika prognostycznego są zaskakujące w świetle znanych informacji na temat jej roli w procesach fizjologicznych. Funkcja testyny wydaje się być dobrze poznana, czego dowodem są liczne publikacje naukowe, które powstały na przestrzeni ostatnich lat. Uzyskane rezultaty, wskazujące na wzrost ekspresji testyny w komórkach nowotworowych NSCLC, przeczą większości opublikowanych rezultatów związanych z badaniami dotyczącymi ekspresji *TES*. Mając na uwadze potencjalne zastrzeżenia dotyczące uzyskanych rezultatów, postanowiono przeprowadzić ocenę nasilenia ekspresji testyny w komórkach nowotworowych NSCLC, niezależnie przy użyciu mikroskopii świetlnej oraz z zastosowaniem komputerowej analizy obrazu, co dokładnie opisano w sekcji dotyczącej metodyki przeprowadzonych badań. Uzyskane w ten sposób rezultaty w pełni ze sobą korelowały. Podjęte starania utwierdzają w przekonaniu, iż uzyskane rezultaty prawdopodobnie nie są dziełem przypadku ani efektem błędnej analizy, lecz rzeczywiście mogą wynikać z zaobserwowanej i niejasnej nadekspresji testyny w NSCLC. Podobnej obserwacji dokonał zespół Han i wsp. stwierdzając nadekspresję *TES* na liniach komórkowych raka żołądka, nie dokonując jednak analizy poziomu produktu białkowego [133].

Należy mieć również na uwadze fakt, iż nie jest to pierwsza obserwacja wskazująca na podwyższoną ekspresję w komórkach nowotworowych białka powszechnie

uważanego za białko supresorowe. Dostępne są liczne prace dowodzące, że nagromadzenie białka nazywanego „strażnikiem genomu” i będącego jednym z najważniejszych białek supresorowych, jest niekorzystnym czynnikiem rakotwórczym, związanym ze zwiększoną inwazyjnością oraz zdolnością do tworzenia przerzutów. Opis ten dotyczy białka TP53 [138]. Obecnie fakt akumulacji białka TP53 w różnych rodzajach nowotworów jest zjawiskiem coraz lepiej poznanym. Dane uzyskane z wykorzystaniem modeli zwierzęcych w kontekście onkogennych właściwości zmutowanej formy białka TP53 (ang. *MUT TP53*) wskazują na kluczową rolę posttranslacyjnych modyfikacji tego białka w nabywaniu przez nie zdolności do stymulowania procesów nowotworzenia [138–141]. Ponadto silna ekspresja zmutowanej formy białka TP53 skutkować może hamowaniem ekspresji białka typu dzikiego o właściwościach supresorowych (ang. *wild-type*), co jest jedną z możliwych hipotez wyjaśniających zjawisko nabywania funkcji promującej procesy nowotworzenia w przypadku niektórych nieprawidłowych izoform białka TP53 [138]. Obecnie uznaje się, że istnieją 3 główne konsekwencje mutacji białka TP53 (oraz generalnie mutacji genów kodujących białka supresorowe), do których należą:

1. utrata pełnionej funkcji (ang. *loss-of-function, LOF*),
2. nabycie nowej funkcji, także mogącej stymulować procesy kancerogenezy (ang. *gain-of-function, GOF*),
3. zmieniona funkcja białka skutkująca jego antagonistycznym działaniem wobec typu dzikiego (ang. *dominant-negative, DN*) [142].

Zarówno GOF jak i DN wiązać się mogą z patologiczną akumulacją nieprawidłowej izoformy danego białka, a przez to przekładać się na niekorzystne rokowanie oraz przebieg choroby nowotworowej.

W przypadku białka TP53 obserwowana akumulacja białka o nieprawidłowej budowie, wykazującego właściwości stymulujące procesy nowotworzenia, wiąże się z jego zmniejszoną podatnością na degradację przez fizjologiczne mechanizmy komórkowe [143]. Hipoteza ta znajduje potwierdzenie w badaniach prowadzonych przez Rodriguez i wsp., w których zaobserwowano, iż zmieniona forma białka TP53 podatna jest na acetylację przy resztach lizynowych, czego nie obserwowano w przypadku typu dzikiego białka. Modyfikacja ta wpływa prawdopodobnie na powinowactwo białka TP53 do DNA, czego odzwierciedleniem jest jej zmieniona funkcja obserwowana w przypadku komórek nowotworowych [144].

Hipotezą wyjaśniającą uzyskane rezultaty są przytoczone powyżej rozważania dotyczące akumulacji białka TP53 w pewnych typach nowotworów oraz obserwowana zmieniona funkcja tego białka i w efekcie nabywanie przez nie właściwości stymulowania procesów nowotworzenia. Opisano różne warianty transkrypcyjne dla genu *TES* skutkujące ekspresją wielu różnych izoform białka testyny, jednak dotychczas brak jest danych wskazujących na zmienioną funkcję izoform testyny czy rolę zmienionego białka w indukowaniu i promowaniu procesu transformacji nowotworowej [24]. Należy również zwrócić uwagę na fakt, iż badanie wykonane przy użyciu RT-PCR dotyczy pomiaru ilości *TES* mRNA, co odpowiada procesowi transkrypcji, natomiast metody IHC oraz WB analizują produkt białkowy w komórkach nowotworowych, co stanowi odzwierciedlenie procesu translacji. Można w tym miejscu zacytować artykuł opublikowany w renomowanym czasopiśmie *Nature*, w którym podjęto próbę scharakteryzowania procesów ekspresji genów w komórkach ludzkiego organizmu, oceniając jednocześnie poziom mRNA oraz obecność i ilość produktu białkowego badanych genów [145]. Na podstawie przeprowadzonych dla danych genów pomiarów stabilności odpowiednich mRNA oraz czasu półtrwania białek, będących produktami ich ekspresji, wyodrębniono 4 główne grupy genów:

1. grupa: stabilne mRNA, produkt białkowy o długim czasie półtrwania
2. grupa: niestabilne mRNA, produkt białkowy o długim czasie półtrwania
3. grupa: stabilne mRNA, produkt białkowy o krótkim czasie półtrwania
4. grupa: niestabilne mRNA, produkt białkowy o krótkim czasie półtrwania

Do grupy 4. charakteryzującej się niską stabilnością mRNA oraz krótkim czasem półtrwania zaliczają się przede wszystkim geny kodujące białka będące m.in. czynnikami transkrypcyjnymi, enzymami modyfikującymi chromatynę czy białka zaangażowane w regulację cyklu komórkowego [145]. Funkcja testyny jako białka supresorowego, zaangażowanego w regulację procesów apoptozy oraz proliferacji komórkowej, pozwala przypuszczać, że prawdopodobnie gen kodujący białko *TES* również może przynależeć do grupy 4 w powyższej charakterystyce. Kolejnym wnioskiem płynącym z cytowanego powyżej artykułu jest stwierdzenie, iż głównym mechanizmem regulującym obecność danego białka w komórce są procesy translacji, a nie transkrypcji. Wytłumaczeniem tego faktu jest maksymalna optymalizacja wydatków energetycznych komórki na procesy ekspresji genów, gdyż procesy translacji i syntezy białek zużywają średnio aż 90% energii spożytkowanej na proces ekspresji genów, podczas gdy procesy transkrypcji zaledwie około 10%. Dla komórki regulacja

na poziomie translacji pozwala na uniknięcie zbędnego wydatkowania energii [145]. Powyższe mechanizmy prowadzić mogą do rozbieżności między obserwowaną ilością specyficznego mRNA w komórce i stężeniem jego produktu białkowego. Może mieć to miejsce zwłaszcza w sytuacji, gdy na drodze mechanizmów posttranslacyjnych lub zmiany sekwencji aminokwasów (np. na skutek zaistniałej mutacji w obrębie danego genu), dojdzie do wydłużenia czasu półtrwania danego białka i zwiększenia jego stabilności.

Niewykluczone, iż posttranslacyjne zmiany białka testyny w komórkach nowotworowych lub mutacje genu *TES* skutkują nieprawidłową strukturą produktu białkowego i w efekcie zmniejszoną jego podatnością na degradację, a w rezultacie jego akumulacją w komórce. Hipotetycznie, w świetle zaprezentowanych powyżej zależności między stabilnością mRNA a czasem półtrwania produktu białkowego konkretnego genu, wydłużony czas półtrwania białka na skutek dotychczas niewyjaśnionych mechanizmów, powodowałby rozbieżność uzyskanych rezultatów metodami RT-PCR oraz IHC i WB. Zwłaszcza, że wyniki uzyskane przy użyciu metody IHC korespondują z rezultatami uzyskanymi przy pomocy metody WB.

Zróżnicowany poziom ekspresji genu *TES* na poziomie białka i mRNA może być również efektem ujemnego sprzężenia zwrotnego, w którym hamowanie transkrypcji *TES* wynikałoby z patologicznie dużej ilości zmienionego białka w komórkach nowotworowych NSCLC.

Niezależnie od opisanych powyżej wyników badań i prowadzonych rozważań oczywistym jest fakt, iż konieczne są dalsze badania dotyczące roli ekspresji testyny w niedrobnokomórkowych rakach płuc oraz poszukiwanie potencjalnych mechanizmów epigenetycznych, mogących mieć istotny wpływ na supresorowe funkcje tego białka.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano zwiększoną ekspresję surwiwiny w NSCLC, zarówno w typie gruczołowym jak i płaskonabłonkowym. Duan i wsp. w przeprowadzonej metaanalizie obejmującej niemal 30 oryginalnych prac badawczych dotyczących roli ekspresji surwiwiny w NSCLC wykazali związek pomiędzy dodatnią ekspresją omawianego białka a niższym stopniem zróżnicowania histologicznego nowotworu, wyższym stadium zaawansowania nowotworu w klasyfikacji TNM oraz obecnością przerzutów w węzłach chłonnych [132]. Cytowana powyżej metaanaliza ma pewne ograniczenia, do których należą brak analizy wartości prognostycznej pozytywnej ekspresji surwiwiny oraz fakt, iż zaledwie w niewielkiej części analizowanych prac pacjenci należeli do rasy kaukaskiej. Różnice w przebiegu

i rokowaniu NSCLC w przypadku rasy kaukaskiej i azjatyckiej są niejasne i słabo poznane. W omawianej metaanalizie brak jednoznacznego wniosku dotyczącego związku pomiędzy danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów a lokalizacją ekspresji surwiwiny. W zależności od analizowanej pracy część badaczy skłaniała się do uznania ekspresji surwiwiny za rokowniczo pozytywną w przypadku stwierdzenia ekspresji cytoplazmatycznej, inni uznawali ekspresję cytoplazmatyczno-jądrową za pozytywną, z kolei jeszcze inni analizowali ekspresję cytoplazmatyczną i jądrową osobno [132].

Wnioski z przeprowadzonej metaanalizy pozostają w ogólnej zgodzie z uzyskanymi w niniejszej rozprawie doktorskiej rezultatami. Nie wykazano związku całościowej ekspresji surwiwiny z danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów, jednak po uwzględnieniu lokalizacji jej ekspresji udowodniono, iż jądrowa ekspresja surwiwiny wiąże się z większą średnicą guza, częstszym zajęciem węzłów chłonnych, wyższą cechą T w klasyfikacji TNM oraz wyższym stadium zaawansowania klinicznego nowotworu. Analiza krzywej przeżycia również wykazała, iż pacjenci z umiarkowaną lub silną jądrową ekspresją surwiwiny należą do grupy o istotnie gorszym rokowaniu. Uważa się, że białko surwiwina (izoforma  $\Delta\text{Ex3}$  [35]) obecna w jądrze komórkowym pełni funkcje anty-apoptotyczne [37], co pozostaje w związku logicznym z uzyskanymi wynikami. Ponadto uważa się, że zwiększona ekspresja surwiwiny w komórkach nowotworowych może być jednym z ważniejszych czynników odpowiedzialnych za zmniejszenie skuteczności chemioterapii w trakcie leczenia przeciwnowotworowego [60]. W niniejszej pracy nie wykazano związku między nasileniem ekspresji surwiwiny w cytoplazmie a danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów. Analizując dostępną literaturę przedmiotu można spotkać się z wnioskami, iż cytoplazmatyczna ekspresja surwiwiny może nie mieć w ogóle lub mieć znikomy wpływ na komórki nowotworowe oraz prognozowanie w NSCLC [146].

Istnieją doniesienia, iż palenie papierosów (a właściwie to znajdująca się w papierosach nikotyna) powoduje hamowanie procesów apoptozy poprzez nasilenie ekspresji między innymi białka surwiwiny [147]. W prezentowanych wynikach odsetek czynnych palaczy był istotnie wyższy w grupie z jądrową ekspresją surwiwiny o silnym lub umiarkowanym jej nasileniu, co pozostaje w zgodzie z przytoczonymi wynikami badań. Pacjenci, którzy kontynuowali palenie papierosów w porównaniu z tymi, którzy zerwali z nałogiem już po postawieniu diagnozy (jednak jeszcze przed rozpoczęciem leczenia), charakteryzowali się gorszym rokowaniem oraz istotnie krótszym czasem przeżycia [148].

W przeprowadzonych badaniach podjęto się również próby analizy nasilenia procesów apoptozy w NSCLC oceniając indeks apoptotyczny (AI). Dokonano oceny poziomu ekspresji kaspazy-3 jako kaspazy wykonawczej procesu apoptozy, będącej aktywowaną w procesie programowanej śmierci komórki niezależnie od szlaku aktywacji, zarówno w torze zewnątrz jak i wewnątrzpochodnym [102-103]. Langendijka i wsp. prowadząc badania w grupie pacjentów z nieoperacyjnymi NSCLC w stadium III zaawansowania klinicznego poddanych radioterapii wykazali, iż wysoki indeks apoptotyczny wiązał się z krótszym czasem przeżycia oraz częstszym występowaniem przerzutów odległych w analizowanej grupie chorych [100]. Także badacze w zespole Törmänen i wsp. wykazali, iż zwiększony indeks apoptotyczny jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w grupie pacjentów z NSCLC [106]. Zacytowane prace analizowały związek pomiędzy nasileniem procesów apoptozy a danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów z NSCLC, jednak wyciągnięte wnioski nie odnoszą się do typu histologicznego raków płuc. Z kolei w prezentowanych rezultatach istotną zależność między nasileniem procesów apoptozy, a wyższym stadium zaawansowania klinicznego oraz krótszym czasem przeżycia wykazano wyłącznie dla typu płaskonabłonkowego raka płuc, czego nie udowodniono w przypadku raka gruczołowego. Niezależnie od typu histologicznego analiza krzywych przeżycia pacjentów nie potwierdziła znaczenia poziomu ekspresji kaspazy-3 jako negatywnego czynnika prognostycznego.

Odwrotne wnioski dostarcza analiza badań przeprowadzonych przez Dworakowska i wsp., w których nie wykazano znaczenia indeksu apoptotycznego jako niezależnego czynnika prognostycznego. Dopiero wspólna analiza nasilenia procesów apoptozy oraz indeksu proliferacyjnego przekładała się na gorsze rokowanie pacjentów z NSCLC. Próbą wyjaśnienia uzyskanych rezultatów jest hipoteza, iż w grupie pacjentów z nowotworami płuc o wysokim indeksie proliferacyjnym, duże nasilenie apoptozy jest zjawiskiem wtórnym i nie jest rozpatrywane jako mechanizm obronny przed procesem nowotworowym [101]. Jednak hipotezie tej zaprzeczają wnioski płynące z badań przeprowadzonych przez Tanaka i wsp., gdzie wykazano, iż zarówno niski jak i bardzo wysoki indeks apoptotyczny był korzystnym czynnikiem prognostycznym (w odniesieniu do przypadków z pośrednimi wartościami AI). Odpowiedzią na tak uzyskane rezultaty ma być niski indeks proliferacyjny w grupie pacjentów z niskim AI oraz ochronne działanie procesów apoptozy w grupie pacjentów z wysokim AI, gdzie procesy programowanej śmierci komórki mają przeważać

nad proliferacją komórek nowotworowych. Co ważne, Ci sami autorzy udowodnili, iż do nasilenia procesów apoptozy przy zwiększonej proliferacji komórkowej dochodzi tylko w sytuacji, gdy zachowane są prawidłowo działające mechanizmy indukujące apoptozę [98]. W prezentowanych powyżej rezultatach obserwowano istotną dodatnią korelację ekspresji kaspazy-3 oraz białka Ki-67 w komórkach nowotworowych niezależnie od typu histologicznego NSCLC. Przemawia to za nasileniem apoptozy jako skutkiem równoczesowego wzrostu proliferacji komórkowej w tym typie nowotworu.

Analiza dostępnej literatury nie pozwala jednoznacznie stwierdzić wartości prognostycznej indeksu apoptotycznego w NSCLC. Obserwacje płynące z cytowanych prac mogą wskazywać, iż rozpatrywanie nasilenia apoptozy jako niezależnego czynnika prognostycznego może mieć ograniczoną wartość, ponieważ jest to prawdopodobnie tylko obserwacja sumarycznego efektu wszystkich zjawisk zachodzących w komórce nowotworowej. Potwierdzeniem złożoności omawianego zjawiska z pewnością są prace Tanaki oraz Dworakowskiej, którzy wyjaśniają, iż nasilenie proliferacji komórkowej nie zawsze idzie w parze z nasileniem procesów apoptozy, a wysoki indeks apoptotyczny jako czynnik prognostyczny musi być rozważany również w kontekście prawidłowości działania mechanizmów molekularnych programowanej śmierci komórki.

Uzyskane i zaprezentowane powyżej wyniki wskazują ponadto na wzrost poziomu ekspresji białka Ki-67 w komórkach nowotworowych NSCLC niezależnie od podtypu histologicznego. W przypadku SCC stwierdzono, iż pacjenci z wysoką ekspresją badanego białka charakteryzowali się większą średnicą guza oraz większym obszarem martwicy. Zaobserwowano wyższe stadium zaawansowania choroby nowotworowej oraz częstsze zajęcie węzłów chłonnych w tej grupie, jednak wartość te były nieistotne statycznie i stanowiły wyłącznie trend. W przypadku AC nie zaobserwowano istotnych różnic w zależności od nasilenia ekspresji Ki-67. Analiza krzywej przeżycia nie potwierdziła znaczenia białka Ki-67 jako niekorzystnego czynnika prognostycznego. Uzyskane rezultaty, pomimo istotności zaledwie niewielkiej części spośród analizowanych danych klinicznych, pozostają w ogólnej zgodzie z danymi literaturowymi wskazującymi na Ki-67 jako niekorzystny czynnik prognostyczny i dowodzącymi związku omawianego białka z zaawansowaniem choroby nowotworowej.



Na podstawie metaanalizy przeprowadzonej przez Xie i wsp. wykazano, iż w przypadku raka nerki, silna ekspresja Ki-67 w komórkach nowotworowych związana była z istotnie krótszym całkowitym czasem przeżycia, czasem przeżycia wolnym od wznowy oraz czasem przeżycia do zgonu wywołanego chorobą nowotworową. Nasilona ekspresja omawianego białka związana była ponadto z wyższym stadium zaawansowania choroby nowotworowej, wyższym odsetkiem przerzutów odległych oraz wyższym stopniem złośliwości raka nerki w skali Fuhrmana [75]. Również w przypadku nowotworów gruczołu piersiowego wykazano, iż silna ekspresja Ki-67 koreluje z wyższym stopniem złośliwości histologicznej, krótszym czasem przeżycia wolnym od wznowy oraz całkowitym czasem przeżycia [76, 78-79]. W grupie pacjentek z odsetkiem ekspresji Ki-67 w komórkach nowotworowych >15% stwierdzano ponadto istotnie częściej obecność przerzutów odległych [77]. W grupie pacjentów z czerniakiem (melanoma) w obrębie błony śluzowej jamy ustnej wysoki poziom ekspresji Ki-67 w komórkach nowotworowych związany był z istotnie krótszym całkowitym czasem przeżycia [80]. Szentkúti i wsp. wykazali, iż w grupie pacjentów z rakami płaskonabłonkowymi okolicy głowy i szyi, wysoka ekspresja Ki-67 związana była z krótszym całkowitym czasem przeżycia oraz częstszym zajęciem węzłów chłonnych [81]. W przypadku nowotworów podścieliskowych przewodu pokarmowego chorzy z wysoką ekspresją omawianego białka charakteryzowali się istotnie krótszym czasem przeżycia bez wznowy [82]. W grupie chorych z nowotworami trzustki, z obecnością przerzutów odległych, wysoki indeks proliferacyjny (oceniany z wykorzystaniem poziomu ekspresji Ki-67 w komórkach nowotworowych) wiązał się z istotnie krótszym czasem przeżycia wolnym od progresji w analizowanej grupie pacjentów [83]. Analiza przeprowadzona z wykorzystaniem materiału klinicznego uzyskanego od pacjentów z wczesnym rakiem gruczołu krokowego wykazała, iż wysoki poziom ekspresji Ki-67 wiąże się z wyższym stadium zaawansowania klinicznego, częstszym naciekaniem komórek nowotworowych na pęcherzyki nasienne oraz poza torebkę gruczołu krokowego, a także wyższym stopniem w skali Gleasona. (ang. *Gleason Score – GS*). Ponadto silna ekspresja Ki-67 wiązała się z istotnie krótszym czasem przeżycia wolnym od wznowy oraz krótszym całkowitym czasem przeżycia w analizowanej grupie pacjentów [84]. Z kolei inna grupa badaczy donosiła o przydatności oceny poziomu ekspresji Ki-67 w ocenie prawdopodobieństwa wznowy biochemicznej raka gruczołu krokowego, co miałyby

pomóc w wyborze odpowiedniej terapii adjuwantowej oraz kwalifikacji pacjentów do ścisłego nadzoru onkologicznego [85–87].

W odniesieniu do NSCLC wykazano, iż silna ekspresja antygenu Ki-67 w komórkach nowotworowych związana była z niekorzystnym rokowaniem, krótszym czasem przeżycia wolnego od choroby oraz krótszym czasem przeżycia wolnego od wznowy po zabiegu resekcji guza [88–92]. Podobne rezultaty uzyskano analizując grupę pacjentów pochodzenia azjatyckiego z rozpoznanym NSCLC, jednak istotnym ograniczeniem dla rzetelnego wyciągnięcia wniosków była niewielka grupa analizowanych przypadków klinicznych [149]. Dowiedziono również, iż poziom ekspresji Ki-67 w komórkach nowotworowych NSCLC związany był z istotnie wyższym ryzykiem powstania przerzutów do mózgu [150]. Retrospektywna analiza z wykorzystaniem danych ponad tysiąca pacjentów z NSCLC potwierdziła przydatność oceny poziomu ekspresji antygenu Ki-67 jako markera prognostycznego, jednak równocześnie podkreślona została konieczność stosowania odmiennych punktów odcięcia indeksu proliferacyjnego dla różnych typów NSCLC [93]. Przeprowadzono dodatkowe analizy, uwzględniające sugerowane w powyższej pracy badawczej odmiennie punkty odcięcia w analizie krzywej przeżycia, jednak uzyskane rezultaty również nie były istotne statystycznie.

## 8. Silne i słabe strony przeprowadzonych badań.

Niewątpliwie najsłabszą stroną przeprowadzonych badań jest niezgodność uzyskanych rezultatów z danymi literaturowymi oraz wynikami uzyskanymi przez innych badaczy z różnych ośrodków. Wykazanie wzrostu ekspresji testyny w komórkach nowotworowych NSCLC kontrastuje z prezentowanymi w dyskusji wynikami innych grup badawczych. W zgodności pozostaje zaobserwowany trend wskazujący na zmniejszenie stężenia *TES* mRNA w NSCLC oraz wyniki analizy poziomu ekspresji pozostałych białek.

Silną stroną wykonanych badań jest potwierdzenie uzyskanych rezultatów poprzez przeprowadzenie niezależnej analizy materiału klinicznego przy pomocy mikroskopii świetlnej oraz komputerowej analizy obrazu. Również wykorzystanie zróżnicowanych metod badawczych, takich jak reakcja immunohistochemiczna, metoda Western blot, reakcja łańcuchowa polimerazy DNA w czasie rzeczywistym, zastosowanie mikroskopii konfokalnej, wykorzystanie linii komórkowych czy ocena indeksu apoptotycznego, podnoszą wartość niniejszej rozprawy doktorskiej. Nie bez znaczenia jest również duża grupa badawcza stanowiąca łącznie 203 przypadki NSCLC, wzbogacona o pełne dane kliniczno-patologiczne, w tym o analizę czasu przeżycia. Mając na uwadze dużą wagę analizowanego zagadnienia klinicznego, jakim jest rak płuca, postanowiono również przeprowadzić szczegółową analizę tematu, czego efektem jest obszerna bibliografia zawierająca liczne pozycje literaturowe.

## **9. Wnioski.**

1. Nasiloną ekspresja testyny wiąże się z wyższym zaawansowaniem choroby nowotworowej w grupie pacjentów z NSCLC, zwłaszcza w typie SCC. Zależności takiej nie wykazano w odniesieniu do AC.
2. Analiza poziomu ekspresji testyny nie znajduje zastosowania w ocenie rokowania pacjentów z NSCLC.
3. Zmiana nasilenia ekspresji testyny może mieć związek z rozwojem NSCLC.
4. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją testyny oraz surwiwiny i Ki-67 wskazuje na zmienioną funkcję badanego białka w NSCLC.
5. Jądrowa ekspresja surwiwiny, w przeciwieństwie do ekspresji cytoplazmatycznej, jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w NSCLC.

## 10. Bibliografia.

- [1] C. Tatarelli, A. Linnenbach, K. Mimori, and C. M. Croce: “Characterization of the Human TESTIN Gene Localized in the FRA7G Region at 7q31.2” *Genomics*, vol. 68, no. 1, pp. 1–12, 2000.
- [2] S. L. Williams: “Reduced genetic diversity in eelgrass transplantations affects both population growth and individual fitness” *Ecol. Appl.*, vol. 11, no. 5, pp. 1472–1488, 2001.
- [3] S. Gurzu, D. Ciortea, I. Ember, and I. Jung: “The possible role of mena protein and its splicing-derived variants in embryogenesis, carcinogenesis, and tumor invasion: A systematic review of the literature” *BioMed Research International*, vol. 2013, p. 365192, 2013.
- [4] K. Burridge and L. Connell: “A new protein of adhesion plaques and ruffling membranes” *J. Cell Biol.*, vol. 97, no. 2, pp. 359–367, 1983.
- [5] A. S. Coutts, E. MacKenzie, E. Griffith, and D. M. Black: “TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading” *J. Cell Sci.*, vol. 116, no. 5, pp. 897–906, 2003.
- [6] H. Li, K. Huang, L. Gao, L. Wang, Y. Niu, H. Liu, Z. Wang, L. Wang, G. Wang and J. Wang: “TES inhibits colorectal cancer progression through activation of p38” *Oncotarget*, vol. 7, no. 29, pp. 45819–45836, 2014.
- [7] A. Drusco, N. Zanesi, C. Roldo, F. Trapasso, J. L. Farber, L. Y. Fong, and C. M. Croce: “Knockout mice reveal a tumor suppressor function for Testin” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 31, pp. 10947–51, 2005.
- [8] R. J. Weeks, J. L. Ludgate, G. LeMée, and I. M. Morison: “TESTIN Induces Rapid Death and Suppresses Proliferation in Childhood B Acute Lymphoblastic Leukaemia Cells” *PLoS One*, vol. 11, no. 3, p. e0151341, 2016.
- [9] J. L. Kadrmas and M. C. Beckerle: “The LIM domain: From the cytoskeleton to the nucleus” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 5, no. 11, pp. 920–931, 2004.
- [10] I. Bach: “The LIM domain: regulation by association” *Mech. Dev.*, vol. 91, no. 1–2, pp. 5–17, 2000.
- [11] A. Lath, O. Cussenot, G. Fournier, J.-C. Baron, and R. Lidereau: “Loss of Heterozygosity at 7q31 Is a Frequent and Early Event in Prostate Cancer” vol. 1, pp. 385–389, 1995.

- [12] R. J. Weeks, U. R. Kees, S. Song, and I. M. Morison: “Silencing of TESTIN by dense biallelic promoter methylation is the most common molecular event in childhood acute lymphoblastic leukaemia” *Mol. Cancer*, vol. 9, p. 163, 2010.
- [13] J. Zhu, X. Li, X. Kong, M. S. Moran, P. Su, B. G. Haffty and Q. Yang: “Testin is a tumor suppressor and prognostic marker in breast cancer” *Cancer Sci.*, vol. 103, no. 12, pp. 2092–2101, 2012.
- [14] R. Dong, H. Pu, Y. Wang, J. Yu, K. Lian, and C. Mao: “TESTIN was commonly hypermethylated and involved in the epithelial-mesenchymal transition of endometrial cancer” *APMIS*, vol. 123, no. 5, pp. 394–400, 2015.
- [15] G. Steponaitis, A. Kazlauskas, D. Skiriute, I. Valiulyte, K. Skauminas, A. Tamasauskas and P. Vaitkieneet: “Testin (TES) as a candidate tumour suppressor and prognostic marker in human astrocytoma” *Oncol. Lett.*, vol. 12, no. 5, pp. 3305–3311, 2016.
- [16] Z. Zhong, F. Zhang, and S. C. Yin: “Effects of TESTIN gene expression on proliferation and migration of the 5-8F nasopharyngeal carcinoma cell line” *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, vol. 16, no. 6, pp. 2555–2559, 2015.
- [17] W. Huang, D. Weng, Z. Pan, K. Pan, P. Ding, J. Zhou, H. Wang, H. Zhang, J. Li and J. Xia: “Expression and clinical significance of TESTIN in primary gastric cancer” *Ai Zheng*, vol. 27, no. 9, pp. 984–8, 2008.
- [18] Y. Zhu and Q. Qiao: “The relationship between TESTIN expression and the prognosis of colorectal cancer” *Pathol. Res. Pract.*, vol. 232, p. 153744, 2022.
- [19] A. Popiel-Kopaczyk, J. Grzegorzolka, A. Piotrowska, M. Olbromski, B. Smolarz, H. Romanowicz, A. Rusak, M. Mrozowska, P. Dziegiel, M. Podhorska-Okolow and Ch. Kobierzycki: “The Expression of Testin, Ki-67 and p16 in Cervical Cancer Diagnostics” *Curr. Issues Mol. Biol.*, vol. 45, no. 1, pp. 490–500, 2023.
- [20] E. S. Tobias, A. F. Hurlstone, E. MacKenzie, R. Mcfarlane and D. M. Black: “The TES gene at 7q31.1 is methylated in tumours and encodes a novel growth-suppressing LIM domain protein” *Oncogene*, vol. 20, no. 22, pp. 2844–2853, 2001.
- [21] Z. Gu, G. Ding, K. Liang, H. Zhang, G. Guo, L. Zhang and J. Cui: “TESTIN suppresses tumor growth and invasion via manipulating cell cycle progression in endometrial carcinoma” *Med. Sci. Monit.*, vol. 20, pp. 980–987, 2014.
- [22] M. Wang, Q. Wang, W. Peng, J. Hu, Z. Wang, H. Liu and L. Huang: “Testin is a tumor suppressor in non-small cell lung cancer” *Oncol. Rep.*, vol. 37, no. 2,

- pp. 1027–1035, 2017.
- [23] S. Zhuang, J. T. Demirs, and I. E. Kochevar: “p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 34, pp. 25939–25948, 2000.
- [24] GenBank: “Homo sapiens testin LIM domain protein (TES),” 2019. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26136>. [Accessed: 04-Nov-2019].
- [25] D. C. Altieri: “Validating survivin as a cancer therapeutic target” *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 1, pp. 46–54, 2003.
- [26] F. Li, G. Ambrosini, E. Y. Chu, J. Plescia, S. Tognin, P. C. Marchisio, D. C. Altieri: “Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin” *Nature*, vol. 396, no. 6711, pp. 580–584, 1998.
- [27] D. C. Altieri and P. C. Marchisio: “Survivin apoptosis: An interloper between cell death and cell proliferation in cancer” *Laboratory Investigation*, vol. 79, no. 12, p. 1543, 1999.
- [28] S. Kaitna, M. Mendoza, V. Jantsch-Plunger, and M. Glotzer: “Incenp and an Aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis” *Curr. Biol.*, vol. 10, no. 19, pp. 1172–1181, 2000.
- [29] J. C. Reed: “The survivin saga goes in vivo” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 108, no. 7. The American Society for Clinical Investigation, pp. 965–969, 2001.
- [30] Q. L. Deveraux and J. C. Reed: “IAP family proteins - Suppressors of apoptosis” *Genes and Development*, vol. 13, no. 3, pp. 239–252, 1999.
- [31] C. Adida, P. L. Crotty, J. McGrath, D. Berrebi, J. Diebold, and D. C. Altieri: “Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation” *Am. J. Pathol.*, vol. 152, no. 1, pp. 43–49, 1998.
- [32] R. Konno: “Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium” *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 6, no. 6, pp. 529–534, 2000.
- [33] A. Endoh, K. Asanuma, R. Moriai, M. Yamada, Y. Koyanagi, T. Sato, A. Yagihashi, M. Nakamura, D. Kobayashi and N. Watanabe: “Expression of survivin mRNA in CD34-positive cells” *Clin. Chim. Acta.*, vol. 306, no. 1–2, pp. 149–151, 2001.

- [34] G. Ambrosini, C. Adida, G. Sirugo, and D. C. Altieri: “Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 18, pp. 11177–11182, 1998.
- [35] H. Garg, P. Suri, J. C. Gupta, G. P. Talwar, and S. Dubey: “Survivin: A unique target for tumor therapy” *Cancer Cell International*, vol. 16, no. 1, 2016.
- [36] R. de Necochea-Campion, C.-S. Chen, S. Mirshahidi, F. D. Howard, and N. R. Wall: “Clinico-pathologic relevance of Survivin splice variant expression in cancer” *Cancer Lett.*, vol. 339, no. 2, pp. 167–74, 2013.
- [37] F. Li: “Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis” *Br. J. Cancer*, vol. 92, no. 2, pp. 212–6, 2005.
- [38] L. Lo Muzio, G. Pannone, R. Leonardi, S. Staibano, M.D. Mignogna, G. De Rosa, Y. Kudo, T. Takata and D.C. Altieri: “Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa” *J. Dent. Res.*, vol. 82, no. 11, pp. 923–928, 2003.
- [39] M. Falleni, C. Pellegrini, A. Marchetti, B. Oprandi, F. Buttitta, F. Barassi, L. Santambrogio, G. Coggi and S. Bosari: “Survivin gene expression in early-stage non-small cell lung cancer” *J. Pathol.*, vol. 200, no. 5, pp. 620–626, 2003.
- [40] B. Tringler, R. Lehner, A. L. Shroyer and K. R. Shroyer: “Immunohistochemical localization of survivin in serous tumors of the ovary” *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* vol. 12, no. 1, pp. 40–3, 2004.
- [41] A. C. Fields, G. Cotsonis, D. Sexton, R. Santoianni and C. Cohen: “Survivin expression in hepatocellular carcinoma: Correlation with proliferation, prognostic parameters and outcome” *Mod. Pathol.*, vol. 17, no. 11, pp. 1378–1385, 2004.
- [42] B. Lu, A. Gonzalez, P. P. Massion, Y. Shyr, B. Shaktour, D. P. Carbone and D. E. Hallahan: “Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer” *Br. J. Cancer*, vol. 91, no. 3, pp. 537–540, 2004.
- [43] M. M. Javle, D. Tan, J. Yu, Ch. M. LeVea, F. Li, B. W. Kuvshinoff and J. F. Gibbs: “Nuclear survivin expression predicts poor outcome in cholangiocarcinoma” *Hepatogastroenterology*, vol. 51, no. 60, pp. 1653–7, 2004.
- [44] A. Martinez, B. Bellosillo, F. Bosch, A. Ferrer, S. Marcé, N. Villamor, G. Ott, E. Montserrat, E. Campo and D. Colomer: “Nuclear Survivin Expression in Mantle Cell Lymphoma Is Associated with Cell Proliferation and Survival” *Am. J. Pathol.*, vol. 164, no. 2, pp. 501–510, 2004.
- [45] W. S. Moon and A. S. Tarnawski: “Nuclear Translocation of Survivin in



- Hepatocellular Carcinoma: A Key to Cancer Cell Growth?" *Hum. Pathol.*, vol. 34, no. 11, pp. 1119–1126, 2003.
- [46] C. Cohen, C. M. Lohmann, G. Cotsonis, D. Lawson and R. Santoianni: "Survivin expression in ovarian carcinoma: Correlation with apoptotic markers and prognosis" *Mod. Pathol.*, vol. 16, no. 6, pp. 574–583, 2003.
- [47] P. Grabowski, T. Kühnel, F. Mühr-Wilkenshoff, B. Heine, H. Stein, M. Höpfner, C. T. Germer and H. Scherübl: "Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma" *Br. J. Cancer*, vol. 88, no. 1, pp. 115–119, 2003.
- [48] T. Ito, K. Shiraki, K. Sugimoto, T. Yamanaka, K. Fujikawa, M. Ito, K. Takase, M. Moriyama, H. Kawano, M. Hayashida, T. Nakano and A. Suzuki: "Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma" *Hepatology*, vol. 31, no. 5, pp. 1080–1085, 2000.
- [49] S. K. Chiou, W. S. Moon, M. K. Jones and A. S. Tarnawski: "Survivin expression in the stomach: Implications for mucosal integrity and protection" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 305, no. 2, pp. 374–379, 2003.
- [50] N. Takai, T. Miyazaki, M. Nishida, K. Nasu, and I. Miyakawa: "Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior and survival rate in endometrial carcinoma" *Cancer Lett.*, vol. 184, no. 1, pp. 105–116, 2002.
- [51] M. Frost, E. A. Jarboe, D. Orlicky, R. Gianani, L. Ch. Thompson, T. Enomoto and K. R. Shroyer: "Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma" *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 117, no. 5, pp. 738–744, 2002.
- [52] R. A. Altura, R. S. Olshefski, Y. Jiang and D. R. Boué: "Nuclear expression of Survivin in paediatric ependymomas and choroid plexus tumours correlates with morphologic tumour grade" *Br. J. Cancer*, vol. 89, no. 9, pp. 1743–1749, 2003.
- [53] K. Trieb, R. Lehner, T. Stulnig, I. Sulzbacher and K. R. Shroyer: "Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival" *Eur. J. Surg. Oncol.*, vol. 29, no. 4, pp. 379–382, 2003.
- [54] S. M. Kennedy, L. O'Driscoll, R. Purcell, N. Fitz-Simons, E. W. McDermott, A. D. Hill, N. J. O'Higgins, M. Parkinson, R. Linehan and M. Clynes: "Prognostic importance of survivin in breast cancer" *Br. J. Cancer*, vol. 88, no. 7,

- pp. 1077–1083, 2003.
- [55] R. Lehner, M. S. Lucia, E. A. Jarboe, D. Orlicky, A. L. Shroyer, J. A. McGregor and K. R. Shroyeret: “Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma” *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, vol. 10, no. 2, pp. 134–138, 2002.
- [56] E. Okada, Y. Murai, K. Matsui, S. Isizawa, C. Cheng, M. Masuda and Y Takano: “Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients” *Cancer Lett.*, vol. 163, no. 1, pp. 109–116, 2001.
- [57] J. Javid, R. Mir, P. K. Julka, P. C. Ray and A. Saxena: “Role of survivin re-expression in the development and progression of non-small cell lung cancer” *Tumor Biol.*, vol. 36, no. 7, pp. 5543–5550, 2015.
- [58] W. H. Hoffman, S. Biade, J. T. Zilfou, J. Chen and M. Murphy: “Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 5, pp. 3247–3257, 2002.
- [59] A. Mirza, M. McGuirk, T. N. Hockenberry, Q. Wu, H. Ashar, S. Black, S. F. Wen, L. Wang, P. Kirschmeier, W. R. Bishop, L. L. Nielsen, C. B. Pickett and S. Liu: “Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway” *Oncogene*, vol. 21, no. 17, pp. 2613–2622, 2002.
- [60] N. Zaffaroni, M. Pennati, G. Colella, P. Perego, R. Supino, L. Gatti, S. Pilotti, F. Zunino and M. G. Daidone: “Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 59, no. 8, pp. 1406–1412, 2002.
- [61] J. Tran, Z. Master, J. L. Yu, J. Rak, D. J. Dumont and R. S. Kerbel: “A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 7, pp. 4349–4354, 2002.
- [62] X. Ling and F. Li: “Silencing of antiapoptotic survivin gene by multiple approaches of RNA interference technology” *Biotechniques*, vol. 36, no. 3, pp. 450–4, 456–60, 2004.
- [63] K. Zhang, K. Zhang, Y. Li, W. Liu and X. Gao: “Silencing survivin expression inhibits the tumor growth of non.small.cell lung cancer cells in vitro and in vivo” *Mol. Med. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 639–644, 2015.
- [64] D. M. Schonk, H. J. Kuijpers, E. van Drunen, C. H. van Dalen, A. H. Geurts van Kessel, R. Verheijen and F. C. Ramaekers: “Assignment of the gene(s) involved

- in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10” *Hum. Genet.*, vol. 83, no. 3, pp. 297–299, 1989.
- [65] S. Bruno and Z. Darzynkiewicz: “Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells” *Cell Prolif.*, vol. 25, no. 1, pp. 31–40, 1992.
- [66] T. Scholzen and J. Gerdes: “The Ki-67 protein: From the known and the unknown” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 182, no. 3, pp. 311–322, 2000.
- [67] J. Isola, H. Helin and O. P. Kallioniemi: “Immunoelectron-microscopic localization of a proliferation-associated antigen Ki-67 in MCF-7 cells” *Histochem. J.*, vol. 22, no. 9, pp. 498–506, 1990.
- [68] R. Verheijen, H. J. Kuijpers, R. O. Schlingemann, A. L. Boehmer, R. van Driel, G. J. Brakenhoff and F. C. Ramaekers: “Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase” *J. Cell Sci.*, vol. 92, no. 1, pp. 123–130, 1989.
- [69] J. Gerdes, U. Schwab, H. Lemke and H. Stein: “Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation” *Int. J. Cancer*, vol. 31, no. 1, pp. 13–20, 1983.
- [70] M. Takagi, T. Natsume, M. T. Kanemaki and N. Imamoto, “Perichromosomal protein Ki67 supports mitotic chromosome architecture” *Genes to Cells*, vol. 21, no. 10, pp. 1113–1124, 2016.
- [71] S. Cuylen, C. Blaukopf, A. Z. Politi, T. Müller-Reichert, B. Neumann, I. Poser, J. Ellenberg, A. A. Hyman and D. W. Gerlich: “Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes” *Nature*, vol. 535, no. 7611, pp. 308–312, 2016.
- [72] D. G. Booth, M. Takagi, L. Sanchez-Pulido, E. Petfalski, G. Vargiu, K. Samejima, N. Imamoto, C. P. Ponting, D. Tollervey, W. C. Earnshaw and P. Vagnarelli: “Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery” *Elife*, vol. 2014, no. 3, p. 1641, 2014.
- [73] J. Bullwinkel, B. Baron-Lühr, A. Lüdemann, C. Wohlenberg, J. Gerdes and T. Scholzen: “Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells” *J. Cell. Physiol.*, vol. 206, no. 3, pp. 624–635, 2006.
- [74] C. Yang, J. Zhang, M. Ding, K. Xu, L. Li, L. Mao and J. Zheng: “Ki67 targeted strategies for cancer therapy” *Clinical and Translational Oncology*, vol. 20, no. 5, pp. 570–575, 2018.

- [75] Y. Xie, L. Chen, X. Ma, H. Li, L. Gu, Y. Gao, Y. Fan, Y. Zhang and X. Zhang: “Prognostic and clinicopathological role of high Ki-67 expression in patients with renal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis” *Scientific Reports*, vol. 7, 2017.
- [76] R. Nishimura, T. Osako, Y. Okumura, M. Hayashi, Y. Totoyozumi and N. Arima: “Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer” *Exp. Ther. Med.*, vol. 1, no. 5, pp. 747–754, 2010.
- [77] N. A. Soliman and S. M. Yussif: “Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype” *Cancer Biol. Med.*, vol. 13, no. 4, pp. 496–504, 2016.
- [78] R. Stuart-Harris, C. Caldas, S. E. Pinder and P. Pharoah: “Proliferation markers and survival in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients” *Breast*, vol. 17, no. 4, pp. 323–334, 2008.
- [79] A. Nishimukai, T. Yagi, A. Yanai, Y. Miyagawa, Y. Enomoto, K. Murase, M. Imamura, Y. Takatsuka, I. Sakita, T. Hatada and Y. Miyoshi: “High Ki-67 expression and low progesterone receptor expression could independently lead to a worse prognosis for postmenopausal patients with estrogen receptor-positive and HER2-negative breast cancer” *Clin. Breast Cancer*, vol. 15, no. 3, pp. 204–211, 2015.
- [80] X. Ma, Y. Wu, T. Zhang, H. Song, H. Jv, W. Guo and G. Ren: “Ki67 proliferation index as a histopathological predictive and prognostic parameter of oral mucosal melanoma in patients without distant metastases” *J. Cancer*, vol. 8, no. 18, pp. 3828–3837, 2017.
- [81] G. Szentkúti, K. Dános, D. Brauswetter, G. Kiszner, T. Krenács, L. Csákó, G. Répássy and L. Tamás: “Correlations Between Prognosis and Regional Biomarker Profiles in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas” *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 21, no. 3, pp. 643–650, 2015.
- [82] W. Y. Zhao, J. Xu, M. Wang, Z. Zhang, L. Tu, Ch. Wang, T. Lin, Y. Shen, Q. Liu and H. Cao: “Prognostic value of Ki67 index in gastrointestinal stromal tumors” *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 7, no. 5, pp. 2298–2304, 2014.
- [83] S. Temraz, A. Shamseddine, D. Mukherji, M. Charafeddine, A. Tfayli, H. Assi, M. S. Hammoud, I. Makki and S. Nassif: “Ki67 and P53 in Relation to Disease Progression in Metastatic Pancreatic Cancer: a Single Institution Analysis,”

- Pathol. Oncol. Res.*, vol. 25, no. 3, pp. 1059–1066, 2019.
- [84] M. S. Tretiakova, W. Wei, H. D. Boyer, L. F. Newcomb, S. Hawley, H. Auman, F. Vakar-Lopez, J. K. McKenney, L. Fazli, J. Simko, D. A. Troyer, A. Hurtado-Coll, I. M. Thompson Jr P. R. Carroll, W. J Ellis, M. E. Gleave, P. S. Nelson, D. W. Lin, L. D. True, Z. Feng and J. D. Brooks: “Prognostic value of Ki67 in localized prostate carcinoma: A multi-institutional study of >1000 prostatectomies” *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, vol. 19, no. 3, pp. 264–270, 2016.
- [85] R. Mathieu, S. F. Shariat, Ch. Seitz, P. I. Karakiewicz, H. Fajkovic, M. Sun, Y. Lotan, D. S Scherr, A. Tewari, F. Montorsi, A. Briganti, M. Rouprêt, I. Lucca, V. Margulis, M. Rink, L. A Kluth, M. Rieken, A. Bachman, E. Xylinas, B. D. Robinson, K. Bensalah and M. Margreiter: “Multi-institutional validation of the prognostic value of Ki-67 labeling index in patients treated with radical prostatectomy” *World J. Urol.*, vol. 33, no. 8, pp. 1165–1171, 2015.
- [86] A. C. Wilkins, B. Gusterson, Z. Szigyarto, J. Haviland, C. Griffin, Ch. Stuttle, F. Daley, C. M. Corbishley, D. P. Dearnaley, E. Hall and N. Somaiah: “Ki67 Is an Independent Predictor of Recurrence in the Largest Randomized Trial of 3 Radiation Fractionation Schedules in Localized Prostate Cancer” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 101, no. 2, pp. 309–315, 2018.
- [87] J. Lobo, Â. Rodrigues, L. Antunes, I. Graça, J. Ramalho-Carvalho, F. Quintela Vieira, A. T. Martins, J. Oliveira, C. Jerónimo and R. Henrique: “High immunoexpression of Ki67, EZH2, and SMYD3 in diagnostic prostate biopsies independently predicts outcome in patients with prostate cancer” *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, vol. 36, no. 4, pp. 161.e7-161.e17, 2018.
- [88] L. R. Chirieac: “Ki-67 expression in pulmonary tumors” *Transl. Lung Cancer Res.*, vol. 5, no. 5, pp. 547–551, 2016.
- [89] C. T. Sofocleous. S. K. Garg, P. Cohen, E. N. Petre, M. Gonen, J. P. Erinjeri, R. J. Downey, W. D. Travis and S. B. Solomon: “Ki 67 is an independent predictive biomarker of cancer specific and local recurrence-free survival after lung tumor ablation” *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 20, no. 3, 2013.
- [90] C. Poleri, J. L. Morero, B. Nieva, M. F. Vázquez, C. Rodríguez, E. de Titto and M. Rosenberg: “Risk of recurrence in patients with surgically resected stage I non-small cell lung carcinoma: Histopathologic and immunohistochemical analysis” *Chest*, vol. 123, no. 6, pp. 1858–1867, 2003.

- [91] S. Yamashita, T. Moroga, K. Tokuishi, M. Miyawaki, M. Chujo, S. Yamamoto and K. Kawahara: “Ki-67 labeling index is associated with recurrence after segmentectomy under video-assisted thoracoscopic surgery in stage I non-small cell lung cancer” *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 17, no. 4, pp. 341–346, 2011.
- [92] B. Martin, M. Paesmans, C. Mascaux, T. Berghmans, P. Lothaire, A. P. Meert, J. J. Lafitte and J. P. Sculier: “Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: Systematic review of the literature with meta-analysis” *British Journal of Cancer*, vol. 91, no. 12. pp. 2018–2025, 2004.
- [93] A. Warth, J. Cortis, A. Soltermann, M. Meister, J. Budczies, A. Stenzinger, B. Goeppert, M. Thomas, F. J. F. Herth, P. Schirmacher, P. A. Schnabel, H. Hoffmann, H. Dienemann, T. Muley and W. Weichert: “Tumour cell proliferation (Ki-67) in non-small cell lung cancer: a critical reappraisal of its prognostic role” *Br. J. Cancer*, vol. 111, no. 6, pp. 1222–1229, 2014.
- [94] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter: “Programmed Cell Death (Apoptosis)” in *Molecular Biology of the Cell*, Nowy Jork: Garland Science, 2002.
- [95] I. Böhm and H. Schild: “Apoptosis: The complex scenario for a silent cell death” *Molecular Imaging and Biology*, vol. 5, no. 1. pp. 2–14, 2003.
- [96] P. A. J. Krijnen, R. Nijmeijer, C. J. L. M. Meijer, C. A. Visser, C. E. Hack and H. W. M. Niessen: “Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction” *Journal of Clinical Pathology*, vol. 55, no. 11. pp. 801–811, 2002.
- [97] J. B. Alimonti, T. B. Ball and K. R. Fowke: “Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS,” *Journal of General Virology*, vol. 84, no. 7. pp. 1649–1661, 2003.
- [98] F. Tanaka, Y. Kawano, M. Li, T. Takata, R. Miyahara, K. Yanagihara, Y. Ohtake, T. Fukuse and H. Wada: “Prognostic significance of apoptotic index in completely resected non-small-cell lung cancer” *J. Clin. Oncol.*, vol. 17, no. 9, pp. 2728–36, 1999.
- [99] F. Tanaka, T. Takata, T. Yamada, K. Yanagihara, Y. Otake, R. Miyahara, T. Nakagawa, Y. Kawano, S. Ishikawa, K. Inui and H. Wada: “Apoptotic tumor-cell death in response to cell proliferation is influenced by p53 status in resected non-small cell lung cancer” *Lung Cancer*, vol. 36, no. 1, pp. 27–32, 2002.
- [100] H. Langendijk, E. Thunnissen, J. W. Arends, J. de Jong, G. ten Velde, R. Lamers,

- D. Guinee, J. Holden and M. Wouters: “Cell proliferation and apoptosis in stage III inoperable non-small cell lung carcinoma treated by radiotherapy” *Radiother. Oncol.*, vol. 56, no. 2, pp. 197–207, 2000.
- [101] D. Dworakowska, E. Jassem, J. Jassem, A. Karmoliński, M. Lapiński, D. Tomaszewski, W. Rzyman, K. Jaśkiewicz, K. Sworzak and A. B. Grossman: “Prognostic value of the apoptotic index analysed jointly with selected cell cycle regulators and proliferation markers in non-small cell lung cancer” *Lung Cancer*, vol. 66, no. 1, pp. 127–133, 2009.
- [102] S. Ghavami, M. Hashemi, S. R. Ande, B. Yeganeh, W. Xiao, M. Eshraghi, C. J. Bus, K. Kadkhoda, E. Wiechec, A. J. Halayko and M. Los: “Apoptosis and cancer: Mutations within caspase genes” *Journal of Medical Genetics*, vol. 46, no. 8, pp. 497–510, 2009.
- [103] G. S. Salvesen: “Caspases: Opening the boxes and interpreting the arrows” *Cell Death and Differentiation*, vol. 9, no. 1, pp. 3–5, 2002.
- [104] A. M. Bastian, T. L. Yogesh and K. L. Kumaraswamy: “Various methods available for detection of apoptotic cells-A review” *Indian Journal of Cancer*, vol. 50, no. 3, pp. 274–283, 2013.
- [105] V. Viswanathan, R. Juluri, S. Goel, J. Madan, S. K. Mitra and D. Gopalakrishnan: “Apoptotic index and proliferative index in premalignant and malignant squamous cell lesions of the oral cavity” *J. Int. oral Heal. JIOH*, vol. 7, no. 1, pp. 40–403, 2015.
- [106] U. Törmänen, A. K. Eerola, P. Rainio, K. H. Vähäkangas, Y. Soini, R. Sormunen, R. Bloigu, V. P. Lehto and P. Pääkkö: “Enhanced Apoptosis Predicts Shortened Survival in Non-Small Cell Lung Carcinoma” *Cancer Res.*, vol. 55, no. 23, pp. 5595–5602, 1995.
- [107] T. Hanaoka, J. Nakayama, M. Haniuda and T. A. Sato: “Immunohistochemical demonstration of apoptosis-regulated proteins, Bcl-2 and Bax, in resected non-small-cell lung cancers” *Int. J. Clin. Oncol.*, vol. 7, no. 3, pp. 152–158, 2002.
- [108] P. Gajewski: “Nowotwory płuca i opłucnej,” in *Interna Szczeklika 2018*, Kraków: Medycyna Praktyczna, 2018, pp. 800–813.
- [109] Krajowy Rejestr Nowotworów: “Nowotwory złośliwe opłucnej i płuca.” [Online]. Available: <http://onkologia.org.pl/nawotwory-zlosliwe-oplucnej-pluca-c33-34/>. [Accessed: 22-Oct-2019].
- [110] B. F. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo,

- D.M. Parkin and D. Forman: “Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012” *Int J Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. 359–86, 2015.
- [111] P. I. Szlitkus: “Epidemiologia nowotworu płuc w Polsce” *Lett. Oncol. Sci.*, vol. 15, no. 2, pp. 71–77, 2018.
- [112] L. Pelosof, Ch. Ahn, A. Gao, L. Horn, A. Madrigales, J. Cox, D. McGavic, J. D. Minna, A. F. Gazdar and J. Schiller: “Proportion of Never-Smoker Non-Small Cell Lung Cancer Patients at Three Diverse Institutions” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 109, no. 7, 2017.
- [113] F. Badar, F. Meerza, R. A. Khokhar, F. A. Ali, N. Irfan, S. Kamran, N. Shahid and S. Mahmood: “Characteristics of lung cancer patients--the Shaukat Khanum Memorial experience” *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 7, no. 2, pp. 245–8, 2006.
- [114] S. K. Jindal, S. K. Malik, R. Dhand, J. S. Gujral and B. N. Datta: “Bronchogenic carcinoma in Northern India” *Thorax*, vol. 37, no. 5, pp. 343–347, 1982.
- [115] G. C. Kabat and E. L. Wynder: “Lung cancer in nonsmokers” *Cancer*, vol. 53, no. 5, pp. 1214–1221, 1984.
- [116] J. E. Muscat and E. L. Wynder: “Lung cancer pathology in smokers, ex-smokers and never smokers” *Cancer Lett.*, vol. 88, no. 1, pp. 1–5, 1995.
- [117] R. L. Hines and K. E. Marschall: “Lung Cancer,” in *Stoelting’s Anesthesia and Co-Existing Disease*, Wydanie 7., Elsevier, Ed. Filadelfia, USA, 2018, pp. 585–610.
- [118] A. Ciałkowska-Rysz and T. Dzierżanowski, *Medycyna Paliatywna*, 1st ed. Poznań: Termedia, 2019.
- [119] M. Krzakowski, *Onkologia Kliniczna*, II. Warszawa: Borgis Wydawnictwo Medyczne, 2006.
- [120] K. D. Davies, A. T. Le, M. F. Theodoro, M. C. Skokan, D. L. Aisner, E. M. Berge, L. M. Terracciano, F. Cappuzzo, M. Incarbone, M. Roncalli, M. Alloisio, A. Santoro, D. R. Camidge, M. Varella-Garcia and R. C. Doebele.: “Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer” *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 17, pp. 4570–4579, 2012.
- [121] K. D. Davies and R. C. Doebele: “Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer” *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 15, pp. 4040–4045, 2013.
- [122] M. M. Awad and A. T. Shaw: “ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: Crizotinib and beyond” *Clin. Adv. Hematol. Oncol.*, vol. 12, no. 7, pp. 429–439,



2014.

- [123] M. Scheffler, A. Schultheis, C. Teixeira, S. Michels, D. Morales-Espinosa, S. Viteri, W. Hartmann, S. Merkelbach-Bruse, R. Fischer, H. Schildhaus, J. Fassunke, M. Sebastian, M. Serke, B. Kaminsky, W. Randerath, U. Gerigk, Y. Ko, S. Krüger, R. Schnell, A. Rothe, C. Kropf-Sanchen, L. Heukamp, R. Rosell, R. Büttner and J. Wolf: “ROS1 rearrangements in lung adenocarcinoma: Prognostic impact, therapeutic options and genetic variability” *Oncotarget*, vol. 6, no. 12, pp. 10577–10585, 2015.
- [124] J. Domagala-Kulawik, I. Osinska and G. Hoser: “Mechanisms of immune response regulation in lung cancer” *Translational Lung Cancer Research*, vol. 3, no. 1. AME Publications, pp. 15–22, 2014.
- [125] H. Yu, T. A. Boyle, C. Zhou, D. L. Rimm and F. R. Hirsch: “PD-L1 expression in lung cancer” *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 11, no. 7. J Thorac Oncol, pp. 964–975, 2016.
- [126] C. G. O’Leary, V. Andelkovic, R. Ladwa, N. Pavlakis, C. Zhou, F. Hirsch, D. Richard and K. O’Byrne: “Targeting BRAF mutations in non-small cell lung cancer” *Transl. Lung Cancer Res.*, vol. 8, no. 6, pp. 1119–1124, 2019.
- [127] N. Yan, S. Guo, H. Zhang, Z. Zhang, S. Shen and X. Li: “BRAF-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Current Treatment Status and Future Perspective” *Front. Oncol.*, vol. 12, 2022.
- [128] J. G. Bustamante Alvarez and G. A. Otterson: “Agents to treat BRAF-mutant lung cancer” *Drugs Context*, vol. 8, 2019.
- [129] W. Remmele and H. E. Stegner: “Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue” *Pathologe*, vol. 8, no. 3, pp. 138–40, 1987.
- [130] U. K. Laemmli: “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4” *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–5, 1970.
- [131] “Główny Urząd Statystyczny” [Online]. Available: <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/ludnosc/trwanie-zycia/trwanie-zycia-tablice,1,1.html>. [Accessed: 04-Sep-2019].
- [132] L. Duan, X. Hu, Y. Jin, R. Liu and Q. You: “Survivin protein expression is involved in the progression of non-small cell lung cancer in Asians: A meta-analysis” *BMC Cancer*, vol. 16, no. 1, 2016.

- [133] S. Y. Han, T. Druck and K. Huebner: “Candidate tumor suppressor genes at FRA7G are coamplified with MET and do not suppress malignancy in a gastric cancer” *Genomics*, vol. 81, no. 2, pp. 105–107, 2003.
- [134] H. L. Li and M. Xue: “Relationship between Testin expression and clinicopathological characteristics in nasopharyngeal carcinoma patients” *Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery*, vol. 30, no. 4, pp. 310–3, 2016.
- [135] H. Ma, D. Weng, Y. Chen, W. Huang, K. Pan, H. Wang, J. Sun, Q. Wang, Z. Zhou, H. Wang and J. Xia: “Extensive analysis of D7S486 in primary gastric cancer supports TESTIN as a candidate tumor suppressor gene” *Mol. Cancer*, vol. 9, p. 190, 2010.
- [136] M. Sarti, C. Seignani, G. A. Calin, R. Aqeilan, M. Shimizu, F. Pentimalli, M. C. Picchio, A. Godwin, A. Rosenberg, A. Drusco, M. Negrini and C. M. Croce: “Adenoviral transduction of TESTIN gene into breast and uterine cancer cell lines promotes apoptosis and tumor reduction in vivo” *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 806–813, 2005.
- [137] H. Qiu, J. Zhu, C. Yuan, S. Yan, Q. Yang and B. Kong: “Frequent hypermethylation and loss of heterozygosity of the testis derived transcript gene in ovarian cancer” *Cancer Sci.*, vol. 101, no. 5, pp. 1255–1260, 2010.
- [138] P. A. J. Muller, K. H. Vousden and J. C. Norman: “p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion” *Journal of Cell Biology*, vol. 192, no. 2, pp. 209–218, 2011.
- [139] H. L. Armata, D. S. Garlick and H. K. Sluss: “The ataxia telangiectasia-mutated target site Ser18 is required for p53-mediated tumor suppression” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 24, pp. 11696–11703, 2007.
- [140] D. MacPherson, J. Kim, T. Kim, B. K. Rhee, C. Th. M. van Oostrom, R. A. DiTullio, M. Venere, T. D. Halazonetis, R. Bronson, A. de Vries, M. Fleming and T. Jacks: “Defective apoptosis and B-cell lymphomas in mice with p53 point mutation at Ser 23” *EMBO J.*, vol. 23, no. 18, pp. 3689–99, 2004.
- [141] C. Chao, D. Herr, J. Chun and Y. Xu: “Ser18 and 23 phosphorylation is required for p53-dependent apoptosis and tumor suppression” *EMBO J.*, vol. 25, no. 11, pp. 2615–2622, 2006.
- [142] Y. Li, M. Zhang, X. Xu, Y. Zhao, Ch. Mahanand, T. Zhu, H. Deng, E. Nevo, J. Du and X. Chen: “Functional diversity of p53 in human and wild animals”

- Frontiers in Endocrinology*, vol. 10, p. 152, 2019.
- [143] T. A. Nguyen, D. Menendez, M. A. Resnick and C. W. Anderson: “Mutant TP53 posttranslational modifications: Challenges and opportunities” *Human Mutation*, vol. 35, no. 6. Wiley-Liss Inc., pp. 738–755, 2014.
- [144] O. C. Rodriguez, S. Choudhury, V. Kolukula, E. E. Vietsch, J. Catania, A. Preet, K. Reynoso, J. Bargonetti, A. Wellstein, Ch. Albanese, M. L. Avantiaggiati: “Dietary downregulation of mutant p53 levels via glucose restriction: Mechanisms and implications for tumor therapy” *Cell Cycle*, vol. 11, no. 23, pp. 4436–4446, 2012.
- [145] B. Schwanhüusser, D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt, J. Wolf, W. Chen and M. Selbach: “Global quantification of mammalian gene expression control” *Nature*, vol. 473, no. 7347, pp. 337–342, 2011.
- [146] H. Hirano, H. Maeda, T. Yamaguchi, S. Yokota, M. Mori and S. Sakoda: “Survivin expression in lung cancer: Association with smoking, histological types and pathological stages” *Oncol. Lett.*, vol. 10, no. 3, pp. 1456–1462, 2015.
- [147] P. Dasgupta, R. Kinkade, B. Joshi, C. DeCook, E. Haura and S. Chellappan: “Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 16, pp. 6332–6337, 2006.
- [148] G. Bepler: “Lung cancer: Provoking new concepts, generating novel ideas, and rekindling enthusiasm” *Cancer Control*, vol. 10, no. 4, H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, pp. 275–276, 2003.
- [149] S. Wen, W. Zhou, Ch. Li, J. Hu, X. Hu, P. Chen, G. Shao and W. Guo: “Ki-67 as a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer in Asian patients: A meta-analysis of published studies involving 32 studies” *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, p. 520, 2015.
- [150] A. G. Saad, B. Y. Yeap, F. B. Thunnissen, G. S. Pinkus, J. L. Pinkus, M. Loda, D. J. Sugarbaker, B. E. Johnson and L. R. Chirieac: “Immunohistochemical markers associated with brain metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma” *Cancer*, vol. 113, no. 8, pp. 2129–2138, 2008.

## 11. 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.

## 12. 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.