

EWELINA FREJLICH

„OCENA EKSPRESJI KASPAZY-3,-8,-9 I SURWIWINY ORAZ JEJ WPŁYW NA CZYNNIKI KLINICZNO-PATOLOGICZNE W RAKU ŻOŁĄDKA I JELITA GRUBEGO”

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Mimo postępu nauki, metod diagnostycznych i leczniczych zachorowania na nowotwory złośliwe stanowią jedną z najczęstszych przyczyn zgonów w Polsce i na świecie. Rak jelita grubego i odbytu jest trzecim najczęściej występującym w Polsce nowotworem u mężczyzn (12%) i drugim u kobiet (10%). Od 1980 roku nastąpił prawie 4-krotny wzrost liczby zachorowań u mężczyzn i około 3-krotny wzrost częstości u kobiet. Przeżycia 5-letnie zależą w znacznym stopniu od stadium w jakim rozpoznano chorobę i możliwości wykonania chirurgicznego usunięcia guza nowotworowego wraz z uzupełniającym leczeniem systemowym.

Rak żołądka znajduje się na 5 pozycji wśród najczęstszych nowotworów u mężczyzn (4,5%) i na 9 wśród kobiet (2,4%). Nowotwory te są przyczyną około 7% zgonów u mężczyzn oraz około 5% zgonów kobiet w grupie zgonów z powodu nowotworu złośliwego. W przypadku tego typu nowotworu od kilku dekad obserwuje się jednak tendencje spadkową zarówno w zachorowalności, jak i umieralności. Znaczny odsetek tych nowotworów rozpoznawany jest niestety w stadium, kiedy chirurgia pozostaje na drugim planie, a niekiedy zabieg operacyjny nie może być wykonany i pacjent jest leczony wyłącznie systemowo.

Rozpoznawanie i leczenie tych nowotworów jest zatem niezwykle ważne z punktu widzenia społecznego. Pomimo rozwoju leczenia chemioterapeutycznego, radioterapii, immunoterapii czy dodatkowych technik jak HIPEC ,czy PIPEC przewidywanie skuteczności i przebiegu choroby nowotworowej jest trudne. Od dziesięcioleci prowadzone są różne badania kliniczne i laboratoryjne mające na celu wykrycie istoty choroby nowotworowej, a także specyficznych wykładników mogących pomóc w identyfikacji i intensyfikacji leczenia onkologicznego u wybranych pacjentów z tak zwanych grup ryzyka. W wykonanym przeze mnie badaniu starałam się poszukiwać wskaźników prognostycznych wśród podstawowych elementów procesu apoptozy-zaprogramowanej przez naturę śmierci komórki.

Po długiej analizie do badania wybrałam 4 elementy tego procesu- kaspazy inicjujące – kaspaz -8 i -9, kaspazę wykonawczą -3 oraz supresora procesu- surwiwinę.

Cele badania można podzielić na dwie grupy- ogólne i szczegółowe. Ogólne założenia badania to sprawdzenie czy tak różne, choć posiadające wspólny mianownik w postaci pochodzenia embriologicznego raki mają podobne lub takie same zaburzenia procesu apoptozy. Czy w obu tych nowotworach ekspresja badanych czynników jest na porównywalnym poziomie, czy w ogóle jest sens badać je razem? Cele szczegółowe dotyczyły wykazania bezpośrednio związku badanych elementów, a dokładnie ekspresji kaspazy-3, -8,-9 i surwiwiny z czynnikami klinicznymi takimi jak typ nowotworu, stopień jego zaawansowania klinicznego, w tym obecność przerzutów w węzłach chłonnych, czy wreszcie czasem całkowitego przeżycia.

Badanie przeprowadziłam na materiale pooperacyjnym, zabezpieczonym w postaci blochków parafinowych. Barwienia immunohistochemiczne przeprowadzone zostały w Laboratorium Immunohistochemicznym Katedry i Zakładu Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej

Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Do oznaczeń wykorzystano komercyjne przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw badanym antygenom. Procedura badań IHC przeprowadzona została zgodnie z protokołem stosowanym w pracowni histopatologicznej, w systemie maszynowym, z zastosowaniem urządzenia Autostainer Link48 (Dako, Dania), pozwalającym na zautomatyzowanie samego procesu barwień, co zapewnia stałe i powtarzalne wyniki badań.

Następnie wyniki zostały odczytane. Oceniono wszystkie pola obejmujące cały wycinek materiału z raka żołądka i jelita grubego niezależnie od jego wielkości, uwzględniając odsetek dodatnio wybarwionych komórek lub odsetek powierzchni reaktywnej tkanki oraz intensywność barwienia. Wyniki przedstawiono w skali półilościowej wg Remmele.

Aby udzielić odpowiedzi na postawione pytania badawcze przeprowadzono analizy korelacji Spearmana oraz testy ANOVA, t-Studenta, Kruskala-Wallisa, U-Manna-Whitney'a, Chi2 i analizy regresji. Za poziom istotności uznano $\alpha < 0,05$.

Na podstawie analizy danych statystycznych stwierdzono istotne różnice pomiędzy badanymi nowotworami. W materiale z raka jelita grubego IRS dla kaspazy-3, -9 w kompartmentie nowotworowym oraz surwiwiny był wyższy niż w przypadku materiału z raka żołądka. W tym ostatnim natomiast wyższy był dla kaspaz -8 i -9 ale w kompartmentie pozanowotworowym. Pacjenci z rakiem żołądka mieli też wyższy stopień zróżnicowania komórek G oraz większą liczbę zajętych węzłów chłonnych. Nie wpłynęło to jednak na przeżycia odległe, które w obu przypadkach były podobne. Wydaje się zatem, że różnice biologicznie są dość znaczne, a ocena obu tych nowotworów łącznie, nie przynosi istotnych wniosków.

Analizując przypadki raka jelita grubego, nie stwierdzono istotnego statystycznie związku ekspresji wybranych kaspaz i surwiwiny z lokalizacją zmiany nowotworowej, ani stopniem jej zaawansowania ocenianym w klasyfikacji Astler-Coller. W odniesieniu do stopnia zaawansowania w skali TNM wykazano ujemną korelację z IRS dla kaspazy-8 w kompartmentie pozanowotworowym, czyli im niższa wartość IRS KPN C8 tym wyższy stopień zaawansowania, co może mieć implikacje kliniczne. Wykazano także związek poziomu ekspresji kaspazy-8 w kompartmentie nowotworowym i pozanowotworowym oraz z kaspazą-9 w tkance nowotworu. Jest to zgodne z biologią procesu i w związku z brakiem wpływu kaspazy -8 i -9 oraz surwiwiny na kaspazę wykonawczą-3 ($F(5) = 0,33$, $p = 0,886$) może stanowić przesłankę o blokowaniu procesu na tym poziomie. Wydaje się potwierdzać to także stwierdzana istotna korelacja pomiędzy poziomem ekspresji kaspazy-9 w kompartmentie poza- i nowotworowym. Nie stwierdzono natomiast istotnego związku pomiędzy przeżyciem a IRS score dla wszystkich badanych elementów. Dodatkowo zbadano także, czy cecha G korelowała z przeżyciem, lecz nie wykazano istotnej korelacji w grupie z nowotworem jelita grubego, $\rho = -0,22$, $p = 0,109$. Zaobserwowano jeszcze jedną zależność, a mianowicie słabą ujemną korelację między wartościami Ca19-9 i współczynnika IRS dla kaspazy-8 w kompartmentie pozanowotworowym, zależność ta wymaga jednak dalszego zbadania.

W grupie pacjentów z rakiem żołądka nie stwierdzono związku badanych elementów z lokalizacją zmiany, klasyfikacją Laurena ani innymi cechami klinicznymi, w tym z przeżyciem całkowitym. W kontekście wpływu poszczególnych kaspaz i suwiwiny na siebie, stwierdzono korelacje pomiędzy ekspresją kaspazy -8 w kompartmentie nowotworowym jak i pozanowotworowym, co jest zgodne z biologią procesu. Najsilniejszy wpływ stwierdzono pomiędzy kaspazą-8 w kompartmentie pozanowotworowym a kaspazą-3, co wskazuje na prawidłowe działanie szlaku zewnętrznego kaskady reakcji.

Podsumowując, raki żołądka i jelita grubego różnią się istotnie biologicznie. Nieprawidłowości w zakresie kaskady reakcji prowadzących do aktywacji procesu apoptozy mogą być zaburzone, a wyniki niniejszej pracy wskazują na większe znaczenie tych zaburzeń w raku jelita grubego.

EWELINA FREJLICH

„OCENA EKSPRESJI KASPAZY-3,-8,-9 I SURWIWINY ORAZ JEJ WPŁYW NA CZYNNIKI KLINICZNO-PATOLOGICZNE W RAKU ŻOŁĄDKA I JELITA GRUBEGO”

Despite the progress of science, diagnostic and therapeutic methods, malignant neoplasms are one of the most common causes of death in Poland and in the world. Colorectal cancer is the third most common cancer in Poland in the group of male (12%) and the second in the group of female (10%). Since 1980, there has been an almost 4-times increase in the number of cases among men and an approximately 3-times increase in the incidence among women. The 5-year survival depends on a large extent on the stage at which the disease was diagnosed and the possibility of surgical removal of the tumor with subsequent systemic treatment.

Gastric cancer is the 5th most common cancer among men (4.5%) and 9th among women (2.4%). These cancers are the cause of about 7% of deaths among men and about 5% among women in the group of deaths due to malignant neoplasms. However, in the case of this cancer, a downward trend in both morbidity and mortality has been observed for several decades. A significant percentage of these cancers is unfortunately diagnosed at the stage when surgery cannot be performed so these patients are treated only systemically.

Diagnosis and treatment of these cancers is therefore extremely important from the social point of view. Despite the development of chemotherapeutic treatment, radiotherapy, immunotherapy or additional techniques such as HIPEC or PIPEC, predicting the effectiveness and course of cancer is difficult. For decades, various clinical and laboratory studies have been conducted to detect the essence of cancer as well as specific exponents that can help to identify and intensify oncological treatment in selected patients from the so-called risk groups. In my study, I tried to look for such indicators among the basic elements of the apoptosis process - cell death programmed by the nature.

For the study, after a long analysis, I've chosen 4 elements of this process - initiating caspases - caspases -8 and -9, executive caspases -3 and a suppressor of the process - survivin.

The objectives of the study can be divided into two groups - general and specific. The general assumptions of the study were to check whether such different, although having a common denominator in the form of embryological origin and the leading type of cancer - adenocarcinoma, have similar or the same disorders of the apoptosis process. Is the expression of the investigated factors at a comparable level in both of these tumors, or does it make sense to study them together at all?

The specific objectives were to demonstrate the direct relationship between the tested elements, namely the expression of caspase-3, -8, -9 and survivin, with clinical factors such as the type of cancer, its stage, including the presence of metastases in lymph nodes, and finally survival time.

I conducted the examination on postoperative material, secured in the form of paraffin blocks. Immunohistochemical staining was carried out in the Immunohistochemical Laboratory of the Department of Pathomorphology and Oncological Cytology of the Wrocław Medical University. Commercial monoclonal antibodies directed against the tested antigens were used for the determination. The IHC test procedure was carried out in accordance with the protocol used in the histopathology laboratory in a machine system using the Autostainer Link48 device (Dako, Denmark) that allows automation of the staining process itself, which ensures constant and repeatable test results.

The results were then read and evaluated by viewing all fields covering the entire gastric and colorectal cancer section, regardless of size, taking into account the percentage of positively stained cells or the percentage of reactive tissue area and the intensity of staining.

The results are presented on a semi-quantitative scale according to Remmele. In order to answer the research questions, Spearman's correlation analysis and ANOVA, t-Student, Kruskal-Wallis, U-Mann-Whitney, Chi2 and regression tests were performed. The significance level was $\alpha < 0.05$.

Based on the analysis of statistical data, significant differences between the examined tumors were found. In the colorectal cancer material, the IRS for caspase-3, -9 in the tumor compartment and survivin was higher than in the gastric cancer material. In the latter, it is higher for caspases -8 and -9, but in the extraneoplastic compartment. Patients with gastric cancer also had a higher degree of G-cell differentiation and a greater number of involved lymph nodes. However, this did not affect long-term survival, which was similar in both cases. It seems, therefore, that the biological differences are quite significant, and the assessment of both these tumors together does not bring any significant conclusions.

Analyzing the cases of colorectal cancer, no statistically significant relationship between the expression of selected caspases and survivin with the location of the neoplastic lesion or its advancement grade assessed in the Astler-Coller classification was found. With regard to the TNM stage, a negative correlation with the IRS for caspase-8 in the extraneoplastic compartment was found, i.e. the lower the IRS value of KPN C8, the higher the stage, which may have clinical implications. The relationship between the level of caspase-8 expression in the neoplastic and non-cancer compartments as well as with caspase-9 in the tumor tissue was also demonstrated. This is consistent with the biology of the process and, due to the lack of effect of caspase -8 and -9 and survivin on executive caspase-3 ($F(5) = 0.33$, $p = 0.886$), it[KF1] may be a premise for blocking the process at this level. This seems to be confirmed by the significant correlation found between the level of caspase-9 expression in the extra- and neoplastic compartment. However, there was no significant relationship between survival and IRS score for all examined items. Additionally it was also examined whether the G feature correlated with survival, but no significant correlation was found in the group with colorectal cancer, $\rho = -0.22$, $p = 0.109$. Another relationship was observed - a weak negative correlation between the values of Ca19-9 and the IRS coefficient for kazpasa-8 in the extraneoplastic compartment - however, this relationship requires further investigation.

In the group of patients with gastric cancer, there was no relationship between the examined elements and the location of the lesion, Lauren's classification or other clinical features, including survival. In the context of the influence of individual caspases and suvinin on each other, correlations were found between capsase -8, both in

the neoplastic and extraneoplastic compartments, which is consistent with the biology of the process. The strongest effect was found between caspase-8 in the extra-tumor compartment and caspase-3, which indicates the proper functioning of the external pathway of the reaction cascade.

In summary, gastric and colorectal cancers are biologically very different. Abnormalities in the cascade of reactions leading to the activation of the apoptosis process may be disturbed, and the results of this study indicate a greater importance of these disorders in colorectal cancer.