

Streszczenie

Pomimo obserwowanego od połowy lat 70. malejącego trendu umieralności z powodu raka szyjki macicy, na skutek wprowadzonych badań przesiewowych oraz szczepienia przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego (ang. *Human Papilloma Virus, HPV*), wciąż stanowi on istotny problem społeczny, ekonomiczny i medyczny.

Jednym z kluczowych czynników rokowniczych w raku szyjki macicy jest stadium zaawansowania klinicznego w momencie rozpoznania. W przypadku rozpoznania we wczesnym stadium choroby, 5-letnie przeżycie wynosi 92%, natomiast jeśli nowotwór rozprzestrzenił się regionalnie na okoliczne tkanki i węzły chłonne, wówczas wskaźnik ten wynosi 58%, ale drastycznie spada do 18% w przypadku wystąpienia przerzutów odległych. Wczesne stadium choroby (IA-IB2 wg. FIGO 2018) ograniczone do szyjki macicy może być leczone radykalnym zabiegiem chirurgicznym niejednokrotnie z równoczesną chemioterapią. Postępowanie chirurgiczne zależne jest od stopnia zaawansowania klinicznego. Poczynając od zmian przednowotworowych typu HSIL leczenie opiera się o procedurę elektrokonizacji (ang. *Loop Electrosurgical Excision Procedure, LEEP*), natomiast w przypadku rozpoznania nowotworu złośliwego proponowaną procedurą jest histerektomia radykalna z obustronną resekcją przydatków wraz z ewentualną towarzyszącą limfadenektomią. Po samej operacji prawdopodobieństwo nawrotu wynosi co najmniej 30%. Przerzuty choć nie są częste przy pierwotnym rozpoznaniu, rozwijają się u 15% do 61% kobiet z rakiem szyjki macicy, zwykle w ciągu pierwszych dwóch lat od zakończenia leczenia [1-3].

Przeprowadzono wiele badań w celu lepszego poznania mechanizmów inicjacji, promocji i progresji raka szyjki macicy. Ryzyko rozwoju inwazyjnego raka szyjki macicy z HSIL wynosi około 20% (10-40% według literatury) [4-6]. Zjawisko przejścia epitelialno-mezenchymalnego będąc procesem wieloetapowym odgrywa ważną rolę na etapie progresji nowotworu, znacząco pogarszając rokowanie.

Kluczowymi białkami, które kontrolują mobilność i inwazyjność komórek w procesie EMT są kadheryny. Zmniejszenie ekspresji E-kadheryny prowadzi do utraty polaryzacji komórek i zmniejszenia ich adhezji. W wielu ludzkich nowotworach złośliwych obniżenie poziomu E-kadheryny wiąże się ze złym rokowaniem. Kilka ważnych czynników transkrypcyjnych takich jak SNAIL, SLUG i TWIST indukując EMT działa jako represory E-kadheryny. Wcześniejsze badania opisywały ekspresję markerów EMT w raku szyjki macicy, jednak nie prowadzono badań dotyczących ich ekspresji w zmianach przedinwazyjnych. Z uwagi na brak badań postanowiłam sprawdzić, czy istnieją jakiegokolwiek różnice w ekspresji

markerów EMT pomiędzy zmianami przedinwazyjnymi a inwazyjnymi oraz w prawidłowym nabłonku szyjki macicy.

Testyna jest białkiem obecnym w niemal wszystkich prawidłowych tkankach człowieka a jej ekspresja w komórce obserwowana jest zarówno w cytoplaźmie jak i błonie komórkowej, wzdłuż włókien aktyny. Testyna zaangażowana jest także w tworzenie ognisk przylegania. Kodowana jest przez gen *TES* znajdujący się na chromosomie 7q31.2, który stanowi kruche miejsce oznaczone jako FRA7G. Wiele autorów wskazuje, że wyższa ekspresja testyny indukuje apoptozę, hamuje proliferację komórek nowotworowych oraz zatrzymuje komórki w fazie G1 cyklu komórkowego. Ponadto, niska ekspresja testyny koreluje z wyższym stopniem złośliwości histologicznej oraz jest niekorzystnym markerem prognostycznym. W dostępnych bazach literaturowych nie odnajduje się prac analizujących ekspresję testyny w zmianach przedinwazyjnych i w raku szyjki macicy. Wobec trudności diagnostycznych oraz niezadowolających wyników leczenia pacjentek, poszukiwanie nowych markerów stanowi obiecujący obszar prac badawczych. Potencjalny związek testyny z markerami nowotworowymi jak również danymi kliniczno-patologicznymi wymaga dalszych badań.

W pracy pt. *The role of Testin in Human Cancers* zebrałam wszystkie najnowsze badania naukowe dotyczące roli ekspresji testyny w nowotworach człowieka. Zaobserwowałam, że testyna wykazuje obniżoną ekspresję m.in. w nowotworach jajnika, żołądka, płuc, głowy i szyi. W oparciu o przeprowadzone badania wykazano, że *TES* może pełnić rolę genu supresorowego dla wielu nowotworów. Odkrycie to może być przydatne w zindywidualizowanej terapii nowotworów. Zrozumienie molekularnych mechanizmów kancerogenezy jest ważnym krokiem naprzód w rozszerzaniu możliwości stosowania nowoczesnych metod terapeutycznych. Co więcej, istnieją dowody sugerujące możliwość wykorzystania testyny jako markera prognostycznego. Jednak konieczne są dalsze badania w tym obszarze.

W pracy pt. *Preliminary Study on the Expression of Testin, p16 and Ki-67 in the Cervical Intraepithelial Neoplasia*, z wykorzystaniem reakcji immunohistochemicznych (IHC) oceniłam nasilenie ekspresji testyny oraz p16 i Ki-67 - markerów kontrolujących cykl komórkowy oraz wskazujących na proliferację komórek. Grupę badawczą stanowiło 229 przypadków neoplazji śródnabłonkowej (CIN1 - 31 przypadków; CIN2 - 75; CIN3 - 123). Grupę kontrolną stanowił materiał prawidłowej tkanki szyjki macicy pacjentek, które przeszły całkowitą histerektomię z powodu mięśniaków macicy.

Wyniki przeprowadzonych badań poddałam analizie statystycznej, która wykazała istotnie wyższą ekspresję testyny w zmianach neoplazji śród nabłonkowej w porównaniu do kontroli ($p < 0,0001$). Ponadto wykazałam, że ekspresja testyny była wyższa w grupie zmian HSIL niż LSIL ($p < 0,0024$). Cytoplazmatyczna ekspresja testyny pozytywnie korelowała z ekspresją markera proliferacji komórkowej Ki-67 ($r = 0,4209$; $p < 0,0001$) oraz ekspresją białka p16 ($r = 0,5681$; $p < 0,0001$), które jest kluczowym białkiem regulującym prawidłowy przebieg cyklu komórkowego. W przeprowadzonym badaniu ekspresja Ki-67, p16 i testyny wzrastała stopniowo wraz ze stopniem zaawansowania zmian od LSIL do HSIL. Użycie w diagnostyce zmian przedinwazyjnych tych trzech markerów mogłoby poprawić czułość i swoistość badania.

W pracy pt. *The Expression of Testin, Ki-67 and p16 in Cervical Cancer Diagnostics* wykonałam badania IHC na 91 przypadkach raka szyjki macicy, w tym 73 przypadkach raka płaskonabłonkowego. Ponadto przeprowadziłam badania metodą Western Blot (WB) na trzech liniach komórkowych raka szyjki macicy: HeLa, SiHa (HPV pozytywna), C-33A (HPV negatywna) oraz linii komórkowej ludzkich keratynocytów – HaCaT jako kontroli.

Wykazałam, że ekspresja testyny jest niższa w komórkach nowotworowych w porównaniu do prawidłowej tkanki szyjki macicy ($p < 0,0113$). Ekspresja markerów Ki-67 ($p < 0,0001$) oraz p16 ($p < 0,0001$) była natomiast wyższa w grupie raków szyjki macicy. Analiza statystyczna wykazała, że testyna negatywnie koreluje z Ki-67 ($r = - 0,2359$; $p = 0,0278$) oraz p16 ($r = - 0,2104$; $p < 0,0465$). Analiza ekspresji testyny metodą WB we wszystkich liniach komórkowych raka szyjki macicy odpowiadała wynikom IHC i wykazała słabszą ekspresję w porównaniu z ekspresją w linii komórkowej HaCaT. Uzyskane wyniki mogą być związane z supresorowymi właściwościami testyny.

W pracy pt. *The Immunohistochemical Expression of Epithelial–Mesenchymal Transition Markers in Precancerous Lesions and Cervical Cancer* wykonałam badania IHC na 124 przypadkach raka szyjki macicy oraz 229 przypadkach śród nabłonkowej neoplazji. Wykazałam, wyższą ekspresję markerów przejścia epitelialno-mezenchymalnego TWIST, SNAIL oraz SLUG w zmianach HSIL niż w LSIL. Najsilniejszą ekspresję TWIST, SNAIL oraz SLUG stwierdziłam w zmianach CIN3 vs. CIN1 oraz CIN2 (odpowiednio TWIST $p < 0,0001$; SNAIL $p < 0,0013$; SLUG $p < 0,0001$). W raku szyjki macicy zaobserwowałam wyższą ekspresję wszystkich badanych markerów EMT w porównaniu do prawidłowej tkanki szyjki macicy ($p < 0,0001$). Ponadto analiza statystyczna wykazała, że ekspresja TWIST, SNAIL oraz SLUG znacząco różniła się pomiędzy stopniem zaawansowania histologicznego i była niższa w G1 vs. G2 (dla TWIST $p < 0,0011$; SNAIL $p < 0,0017$; SLUG $p < 0,0001$), a także G1 vs. G3 (dla TWIST $p < 0,0029$; SNAIL $p < 0,0005$; SLUG $p < 0,0001$). Wykazane różnice w ekspresji

badanych markerów w zmianach przednowotworowych oraz nowotworowych szyjki macicy mogą być wykorzystane w diagnostyce tego nowotworu.

W oparciu o powyższe badania dotyczące testyny wykonane na zmianach śródnabłonkowej neoplazji i rakach szyjki macicy wykazałam stopniowy wzrost ekspresji testyny w śródnabłonkowej neoplazji oraz jej obniżoną ekspresję w raku szyjki macicy. Ponadto wykazałam korelację pomiędzy ekspresją testyny a stosowanymi powszechnie w diagnostyce markerami proliferacji Ki-67 oraz p16. Badanie obejmujące markery EMT pozwoliło wykazać udział tego procesu w kancerogenezie raka szyjki macicy. Bardziej wnikliwe badania dotyczące testyny oraz mechanizmu EMT pozwolą na rozwój nowych narzędzi diagnostyczno-terapeutycznych, a w przyszłości mogą mieć wpływ na tworzenie terapii personalizowanych.

Piśmiennictwo

1. Landoni, F.; Manco, A.; Colombo, A.; Placa, F.; Milani, R.; Perego, P.; Favini, G.; Ferri, L.; Mangioni, C. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. *Lancet* 1997, 350, 535–540.
2. Rotman, M.; Sedlis, A.; Piedmonte, M.R.; Bundy, B.; Lentz, S.S.; Muderspach, L.I.; Zaino, R.J. A phase III randomized trial of postoperative pelvic irradiation in stage IB cervical carcinoma with poor prognostic features: Follow-up of a gynecologic oncology group study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006, 65, 169–176. [CrossRef]
3. Delgado, G.; Bundy, B.; Zaino, R.; Sevin, B.-U.; Creasman, W.T.; Major, F. Prospective surgical-pathological study of disease-free interval in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.* 1990, 38, 352–357
4. C. Rosty, D.G. Hewett, I.S. Brown, B. a Leggett, V.L.J. Whitehall, Serrated polyps of the large intestine: current understanding of diagnosis, pathogenesis, and clinical management., *J. Gastroenterol.* 48 (2013) 287–302. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0720-y>.
5. Y. Ge, P.A. Christensen, E. Luna, D. Arnylagos, J. Xu, J.W. Hsu, H. Zhou, M.R. Schwartz, D.R. Mody, Age-specific 3-year cumulative risk of cervical cancer and high-grade dysplasia on biopsy in 9434 women who underwent HPV cytology cotesting, *Cancer Cytopathol.* 127 (2019) 757–764. <https://doi.org/10.1002/cncy.22192>.
6. S.S. Raab, N.S. Bishop, M.S. Zaleski, Long-term outcome and relative risk in women with atypical squamous cells of undetermined significance, *Am. J. Clin. Pathol.* 112 (1999) 57–62. <https://doi.org/10.1093/ajcp/112.1.5>

Summary

Despite the trend of declining mortality from cervical cancer since the mid-1970s thanks to increased screening and the Human Papilloma Virus (HPV) vaccine, it is still a significant social, economic and medical problem.

One of the key prognostic factors in cervical cancer is the clinical stage at the time of diagnosis. If diagnosed at an early stage of the disease, the 5-year survival rate is 92%, however, if the cancer has spread regionally to surrounding tissues and lymph nodes, then the rate is 58%, but drops dramatically to 18% if distant metastasis occurs. Early stage disease (IA-IB2 according to FIGO 2018) confined to the cervix can be treated with radical surgery that may be accompanied by concurrent chemotherapy in specific cases. Surgical management depends on the clinical stage. Starting with premalignant lesions of the HSIL type, treatment is based on the Loop Electrosurgical Excision Procedure (LEEP), while in the case of a diagnosis of malignancy, the proposed procedure is radical hysterectomy with bilateral resection of the adnexa with possible accompanying lymphadenectomy. After surgery alone, the probability of recurrence is at least 30%. Metastasis, although not common at initial diagnosis, develops in 15% to 61% of women with cervical cancer, usually within the first two years of treatment [1-3].

Many studies have been conducted to better understand the mechanisms of cervical cancer initiation, promotion and progression. The risk of developing invasive cervical cancer with HSIL is about 20% (10-40% according to the literature) [4-6]. The phenomenon of epithelial-mesenchymal transition being a multistage process plays an important role at the stage of cancer progression, significantly worsening the prognosis of the patient.

The key proteins that control cell mobility and invasiveness in EMT are cadherins. Decreased E-cadherin expression leads to loss of cell polarity and reduced cell adhesion. In many human malignancies, decreased levels of E-cadherin are associated with a poor prognosis. Several important transcription factors such as SNAIL, SLUG and TWIST induce EMT by acting as repressors of E-cadherin. Previous studies have described the expression of EMT markers in cervical cancer, but there were no studies on their expression in pre-invasive lesions. Given the lack of studies, we decided to check if there were any differences in the expression of EMT markers between pre-invasive lesions, cervical cancer and normal cervical epithelium.

Testin is a protein present in almost all normal human tissues and its expression in the cell is observed both in the cytoplasm and the cell membrane, along actin filaments. Testin is also involved in the formation of adhesion foci. It is encoded by the TES gene located on

chromosome 7q31.2, which is a fragile site designated FRA7G. Many authors indicate that higher expression of testin induces apoptosis, inhibits tumor cell proliferation and arrests cells in the G1 phase of the cell cycle. In addition, low testin expression correlates with a higher degree of histological malignancy and is an unfavorable prognostic marker. The available literature databases do not find papers analyzing testin expression in pre-invasive lesions and cervical cancer. In view of the diagnostic difficulties and unsatisfactory results in patients, the search for new markers is a promising area of research work. The potential association of testin with tumor markers as well as clinicopathological data requires further research.

In the study *The role of Testin in Human Cancers*, I analysed the latest scientific studies on the role of testin expression in human cancers. I observed that testin shows weaker expression in ovarian, gastric, lung, head and neck cancers, among others. Based on the study, it was shown that *TES* may act as a tumor suppressor gene for many cancers. This discovery may be useful for individualized cancer therapy. Understanding the molecular mechanisms of carcinogenesis is an important step forward in expanding treatment options, such as the use of novel therapeutic methods. Moreover, there is evidence to suggest the possibility of using testin as a prognostic marker. However, further research is needed in this area.

In the paper titled *Preliminary Study on the Expression of Testin, p16 and Ki-67 in the Cervical Intraepithelial Neoplasia* by using of immunohistochemical (IHC) reactions, I assessed the expression of testin and p16, Ki-67 - markers that control the cell cycle and indicate cell proliferation. The study group consisted of 229 cases of intraepithelial neoplasia (CIN1 - 31 cases; CIN2 - 75; CIN3 - 123). The control group consisted of normal cervical tissue of patients who underwent total hysterectomy for myomas.

The statistical analysis was performed, which showed significantly higher expression of testin in lesions of intramural neoplasia compared to controls ($p < 0,0001$). In addition, I showed that testin expression was higher in the HSIL lesion group than in LSIL ($p < 0,0024$). Cytoplasmic testin expression positively correlated with the expression of the cell proliferation marker Ki-67 ($r = 0,4209$; $p < 0,0001$) and the expression of p16 protein ($r = 0,5681$; $p < 0,0001$), which is a key protein regulating the normal course of the cell cycle. In the conducted study, the expression of Ki-67, p16 and testin increased progressively with the stage of the lesions from LSIL to HSIL. The use of these three markers in the diagnosis of pre-invasive lesions could improve the sensitivity and specificity of the test.

In my work entitled *The Expression of Testin, Ki-67 and p16 in Cervical Cancer Diagnostics*, I performed IHC testing on 91 cases of cervical cancer, including 73 cases of squamous cell carcinoma. I performed Western Blot testing on three cervical cancer cell lines:

HeLa, SiHa (HPV positive), C-33A (HPV negative) and the human keratinocyte cell line - HaCaT as a control.

I showed that testin expression is lower in tumor cells compared to normal cervical tissue ($p < 0,0113$). In contrast, the expression of the markers Ki-67 ($p < 0,0001$) and p16 ($p < 0,0001$) was higher in the cervical cancer group. Statistical analysis showed that testin negatively correlates with Ki-67 ($r = - 0,2359$; $p = 0,0278$) and p16 ($r = - 0,2104$; $p < 0,0465$). WB analysis of testin expression in all cervical cancer cell lines matched the IHC results and showed weaker expression compared to that in the HaCaT cell line. The results obtained may be related to the suppressive properties of testin.

In my study entitled *The Immunohistochemical Expression of Epithelial-Mesenchymal Transition Markers in Precancerous Lesions and Cervical Cancer*, I performed IHC studies on 124 cases of cervical cancer and 229 cases of intraepithelial neoplasia. I showed that the epithelial-mesenchymal transition markers TWIST, SNAIL and SLUG had higher expression in HSIL lesions than in LSIL. The strongest expression of TWIST, SNAIL and SLUG was in CIN3 vs. CIN1 and CIN2 (correspondingly TWIST $p < 0,0001$; SNAIL $p < 0,0013$; SLUG $p < 0,0001$). Higher expression of all tested EMT markers was observed in cervical cancer compared to normal cervical tissue ($p < 0,0001$). In addition, statistical analysis revealed that the expression of TWIST, SNAIL and SLUG significantly differed between histological grades and was weaker in G1 vs. G2 (for TWIST $p < 0,0011$; SNAIL $p < 0,0017$; SLUG $p < 0,0001$) and also G1 vs. G3 (for TWIST $p < 0,0029$; SNAIL $p < 0,0005$; SLUG $p < 0,0001$). The results of the study clearly showed that the existing differences in the expression of the tested markers in precancerous lesions and cervical cancer can be used in the diagnosis of this cancer.

Based on the above studies on testin performed on lesions of intraepithelial neoplasia and cervical cancer, I showed a gradual increase in testin expression in intraepithelial neoplasia and its decreased expression in cervical cancer. In addition, a correlation between testin expression and the proliferation markers Ki-67 and p16, which are commonly used in diagnosis was revealed. A study involving EMT markers allowed me to demonstrate the involvement of this process in the carcinogenesis of cervical cancer. More in-depth studies of testin and the mechanism of EMT may lead to the development of new diagnostic and therapeutic tools which in the future. Such findings could be used in the creation of targeted and individualized therapies.

References

1. Landoni, F.; Manco, A.; Colombo, A.; Placa, F.; Milani, R.; Perego, P.; Favini, G.; Ferri, L.; Mangioni, C. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. *Lancet* 1997, 350, 535–540.
2. Rotman, M.; Sedlis, A.; Piedmonte, M.R.; Bundy, B.; Lentz, S.S.; Muderspach, L.I.; Zaino, R.J. A phase III randomized trial of postoperative pelvic irradiation in stage IB cervical carcinoma with poor prognostic features: Follow-up of a gynecologic oncology group study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006, 65, 169–176. [CrossRef]
3. Delgado, G.; Bundy, B.; Zaino, R.; Sevin, B.-U.; Creasman, W.T.; Major, F. Prospective surgical-pathological study of disease-free interval in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.* 1990, 38, 352–357
4. C. Rosty, D.G. Hewett, I.S. Brown, B. a Leggett, V.L.J. Whitehall, Serrated polyps of the large intestine: current understanding of diagnosis, pathogenesis, and clinical management., *J. Gastroenterol.* 48 (2013) 287–302. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0720-y>.
5. Y. Ge, P.A. Christensen, E. Luna, D. Arnylagos, J. Xu, J.W. Hsu, H. Zhou, M.R. Schwartz, D.R. Mody, Age-specific 3-year cumulative risk of cervical cancer and high-grade dysplasia on biopsy in 9434 women who underwent HPV cytology cotesting, *Cancer Cytopathol.* 127 (2019) 757–764. <https://doi.org/10.1002/cncy.22192>.
6. S.S. Raab, N.S. Bishop, M.S. Zaleski, Long-term outcome and relative risk in women with atypical squamous cells of undetermined significance, *Am. J. Clin. Pathol.* 112 (1999) 57–62. <https://doi.org/10.1093/ajcp/112.1.5>

