

Streszczenie w języku polskim

Wprowadzenie: Rak gruczołu krokowego (*prostate cancer* – PCa) jest drugim najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym wśród mężczyzn na świecie. Częstość występowania PCa rośnie wraz z wiekiem, co razem z wydłużającą się spodziewaną długością życia pozwala zakładać że PCa stanowić będzie w przyszłości jeszcze istotniejszy problem, wpływający na zdrowie społeczeństwa. W celu oceny rokowania i prognozowania przebiegu PCa wykorzystywane są różne czynniki prognostyczne. Zaliczamy do nich m.in. klasyfikację histopatologiczną PCa w skali Gleasona, stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM, stężenie swoistego antygenu sterczowego (*prostate specific antigen* – PSA), klasyfikację pacjenta do danej grupy ryzyka wystąpienia wznowy biochemicznej po leczeniu radykalnym wg Europejskiego Towarzystwa Urologicznego (*European Association of Urology* – EAU) czy modele statystyczne takie jak nomogram Brigantiego. Obecność przerzutów węzłowych jest bardzo istotnym czynnikiem ryzyka negatywnie wpływającym na przeżycie oraz na ryzyko wznowy po leczeniu pierwotnym pacjentów z PCa. Wykrycie przerzutów w węzłach chłonnych po leczeniu pierwotnym wpływa na dalszy proces terapeutyczny (np. poprzez konieczność leczenia adjuwantowego) oraz wymusza ścisły nadzór nad pacjentem w celu wczesnego wykrycia ewentualnej wznowy. Pomimo ciągłego rozwoju technik diagnostyki obrazowej ich zdolność do wykrywania obecności przerzutów węzłowych PCa jest ciągle zdecydowanie mniejsza niż, aktualnie uważanej za złoty standard, rozszerzonej limfadenektomii miedniczej. Wyżej opisane klasyczne czynniki prognostyczne stanowią istotną pomoc w planowaniu leczenia pacjenta, w tym kwalifikacji do limfadenektomii, jednak ich dokładność określania ryzyka zajęcia węzłów chłonnych jest wciąż ograniczona. Limfadenektomia jest inwazyjną procedurą istotnie wydłużającą zabieg radykalnej prostatektomii, zwiększającą ryzyko powikłań około i pooperacyjnych jednocześnie nie wpływającą korzystnie na poprawę przeżycia pacjentów. Wyniki licznych badań sugerują potencjalne zastosowanie tzw. nowych markerów immunohistochemicznych w celu poprawy diagnostyki, oceny rokowania lub progresji PCa. Ich wykorzystanie w praktyce klinicznej wymaga potwierdzenia ich użyteczności w dalszych badaniach ale wstępne wyniki są obiecujące. Mogą stanowić niezależny parametr oceniany w materiale pobranym podczas biopsji prostaty lub w materiale po zabiegu operacyjnym. Oprócz tego są potencjalnym uzupełnieniem dla opisanych wyżej klasycznych czynników na których aktualnie opiera się prognozowanie przebiegu PCa. Obiecujące wyniki w tym zakresie uzyskano oceniając ekspresję fosfoproteiny 3 aparatu Golgiego (*Golgi phosphoprotein 3* - GOLPH3). Dokładna rola GOLPH3 w patogenezie PCa

pozostaje ciągle nie do końca określona. Dotychczas opisano kilka proponowanych mechanizmów działania GOLPH3 w komórkach PCa takich jak wpływ na proces różnicowania komórek (przez aktywację szlaku mTOR), a przez to stymulowanie transformacji z hormonowrażliwego PCa w opornego na kastrację PCa lub stymulację wydzielania metaloproteiny 9 macierzy (MMP9) a przez to udział w formowaniu przerzutów PCa. Innym białkiem, uznawanym za potencjalny nowy marker immunohistochemiczny PCa, jest interleukina 17A (IL-17A) oraz jej receptor IL-17RA. Zwiększoną ekspresję IL-17A i IL-17RA stwierdzano u pacjentów z bardziej agresywnym przebiegiem PCa również w warunkach kastracyjnych. Dokładne mechanizmy onkogenego działania IL-17 nie zostały do tej pory jednoznacznie określone. Na podstawie dostępnych danych sugeruje się że IL-17 stymuluje proliferację komórek PCa oraz angiogenezę przy równoczesnym hamowaniu apoptozy komórek nowotworowych. Pomimo obserwowanej korelacji pomiędzy ekspresją GOLPH3, IL-17A i IL-17RA a progresją PCa, w tym procesie formowania przerzutów, do tej pory nie badano ekspresji tych markerów w przerzutowych węzłach chłonnych.

Cel pracy: Usystematyzowanie aktualnej wiedzy na temat potencjalnych nowych biomarkerów histopatologicznych raka gruczołu krokowego oraz przeprowadzenia badania ekspresji wybranych markerów immunohistochemicznych (GOLPH3, IL-17A oraz IL-17RA) u pacjentów leczonych z powodu raka gruczołu krokowego z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych a następnie ocena ich wartości klinicznej i prognostycznej.

Materiały i metody: W Publikacji 1 dokonano przeglądu narracyjnego dostępnych danych literaturowych na temat potencjalnych nowych biomarkerów histopatologicznych raka gruczołu krokowego oraz ich możliwego wykorzystania w praktyce klinicznej. Prace zostały wyselekcjonowane na podstawie analizy dwóch baz danych elektronicznych: PubMed i Scopus. W Publikacji 2 oraz Publikacji 3 przeprowadzono ocenę ekspresji wybranych czynników immunohistochemicznych w materiale pooperacyjnym pacjentów poddanych radykalnej prostatektomii z limfadenektomią z powodu raka gruczołu krokowego oraz obecnymi przerzutami w węzłach chłonnych. W tym celu przygotowano mikromacierze tkankowe z materiału histopatologicznego guza pierwotnego oraz przerzutowego węzła chłonnego każdego z pacjentów, a następnie przeprowadzono barwienie immunohistochemiczne preparatów. W kolejnym etapie przeprowadzono ocenę poziomu ekspresji przy użyciu skali immunoreaktywności barwionych tkanek – ostateczny wynik poziomu ekspresji był wynikiem oceny dwóch cech tj. oceny odsetka komórek raka prostaty z obecnym barwieniem oraz intensywność ich barwienia. Następnie przeprowadzono analizę statystyczną uzyskanych

wyników w celu wykrycia ewentualnych korelacji pomiędzy poziomem ekspresji a danymi klinicznymi pacjentów oraz cechami patologicznymi guza pierwotnego i przerzutów węzłowych. Dodatkowo przeprowadzono analizę porównawczą pomiędzy grupą wysokiej i niskiej ekspresji. W Publikacji 2 oceniono ekspresję GOLPH3 w materiale pooperacyjnym 78 pacjentów, a w celu przeprowadzenia barwienia immunohistochemicznego wykorzystano monoklonalne przeciwciało anti-GOLPH3. W Publikacji 3 oceniono ekspresję IL-17A oraz IL-17RA w materiale pooperacyjnym 77 pacjentów, a w celu przeprowadzenia barwienia immunohistochemicznego wykorzystano poliklonalne przeciwciało anti-IL-17A oraz monoklonalne przeciwciało anti-IL-17RA.

Wyniki: W Publikacji 1 szczegółowo opisano możliwe wykorzystanie w procesie diagnostyki, prognozowania i leczenia raka prostaty takich markerów histopatologicznych jak: makrofagi CD169, neuropilina-1, CD15, interleukina 17, kofilina-1, STAT3, LIMK-1, AMACR, PSMA, Appl1, Sortylina, Syndekan-1 oraz p63. Wstępne wyniki prac badawczych badających rolę tych markerów w patogenezie raka prostaty, pozwalają zakładać że w przyszłości mogą stanowić istotną pomoc w procesie diagnostyki oraz prognozowania przebiegu choroby. W Publikacji 2 i Publikacji 3 zaprezentowano wyniki oceny ekspresji GOLPH3, IL-17A oraz IL-17RA. Ekspresję GOLPH3 stwierdzono we wszystkich badanych preparatach zarówno w tkankach z guza pierwotnego gruczołu krokowego jak również w przerzutowych węzłach chłonnych. Poziom ekspresji GOLPH3 był wyższy w przerzutowych węzłach chłonnych niż w gruczole krokowym, jednak nie były to różnice istotne statystycznie ($p=0.056$). Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy poziomem ekspresji GOLPH3 w guzie pierwotnym gruczołu krokowego a przerzutowymi węzłami chłonnymi ($\rho=0,294$, $p<0.05$). Zaobserwowano istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy poziomem ekspresji GOLPH3 w przerzutowych węzłach chłonnych a odsetkiem zajętych węzłów chłonnych ($p=0.036$). Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji GOLPH3 a takimi zmiennymi jak BMI, grupa ryzyka EAU czy przedoperacyjne stężenie PSA. Po przeprowadzeniu szczegółowej analizy stwierdzono że u pacjentów z wyższym odsetkiem komórek wykazujących ekspresję GOLPH3 częściej stwierdzano inwazję naczyń chłonnych (*lymphovascular invasion* – LVI; $p=0.02$). Dodatnią korelację stwierdzono również pomiędzy intensywnością barwienia w kierunku GOLPH3 w przerzutowym węzle chłonnym a grupą ryzyka EAU. Dodatkowo analizując dane pooperacyjne pacjentów stwierdzono istotną ujemną korelację pomiędzy ekspresją GOLPH3 a efektywnością radykalnej prostatektomii definiowaną jako stężenie PSA < 0.1 ng/ml w pierwszym pomiarze po operacji (zazwyczaj po

6 tygodniach). Ekspresję IL-17A stwierdzono w 98,7% preparatów guza pierwotnego gruczołu krokowego oraz w 100% przerzutowych węzłów chłonnych. Poziom ekspresji IL-17A w gruczole krokowym dodatnio korelowała z BMI pacjentów ($p=0.028$). W przerzutowych węzłach chłonnych poziomy ekspresji IL-17A dodatnio korelował z odsetkiem zajętych węzłów chłonnych ($p=0.006$) oraz grupą ryzyka EAU ($p=0.001$). Dodatkowo w grupie pacjentów z wysoką ekspresją IL-17A w przerzutowych węzłach chłonnych częściej stwierdzano przekraczanie torebki gruczołu krokowego przez guz (*extracapsular extension* – ECE; $p=0.033$). Ekspresję IL-17RA stwierdzono w 90,9% preparatów guza pierwotnego gruczołu krokowego oraz w 93,5% przerzutowych węzłów chłonnych. Ekspresja IL-17RA była istotnie wyższa w guzie pierwotnym gruczołu krokowego niż w przerzutowych węzłach chłonnych ($p=0.009$). Poziom ekspresji IL-17RA w przerzutowych węzłach chłonnych dodatnio korelował z grupą ryzyka EAU ($p=0.045$). W grupie pacjentów z wysoką ekspresją IL-17RA w przerzutowym węzle chłonnym istotnie częściej stwierdzano przekraczanie torebki węzła chłonnego przez raka gruczołu krokowego ($p=0.009$).

Wnioski:

1. Guz pierwotny gruczołu krokowego oraz przerzutowe węzły chłonne wykazują ekspresję GOLPH3, IL-17A i IL-17RA, a poziomy ekspresji pomiędzy tymi miejscami wykazują dodatnią korelację.
2. Wraz ze wzrostem poziomu ekspresji GOLPH3 w zajętych węzłach chłonnych rośnie odsetek zajętych węzłów chłonnych, częściej występuje inwazja naczyń chłonnych przez PCa oraz tym wyższa grupa ryzyka EAU pacjentów.
3. Im wyższy odsetek komórek wykazujących ekspresję GOLPH3 w gruczole krokowym tym niższa efektywność (radykałność) radykalnej prostatektomii, poza tym poziom ekspresji GOLPH3 nie koreluje z innymi cechami patologicznymi oraz wynikami pooperacyjnymi pacjentów.
4. Ekspresja IL-17A w przerzutowych węzłach chłonnych wykazuje dodatnią korelację z negatywnymi czynnikami prognostycznymi PCa takimi jak wyższa grupa ryzyka EAU, częstsze przekraczanie torebki prostaty przez guz czy wyższy odsetek zajętych węzłów chłonnych, natomiast poziom ekspresji w guzie pierwotnym prostaty rośnie wraz z BMI pacjenta.

5. Ekspresja IL-17RA w przerzutowych węzłach chłonnych jest niższa niż w guzie pierwotnym prostaty, natomiast jej poziom dodatnio koreluje z negatywnymi czynnikami prognostycznymi PCa takimi jak wyższa grupa ryzyka EAU oraz częstsze przekraczanie torebki węzła chłonnego przez PCa.

6. Wartość prognostyczna oznaczanej w materiale pooperacyjnym ekspresji GOLPH3, IL-17A i IL-17RA jest ograniczona w porównaniu do klastycznych czynników predykcyjnych raka gruczołu krokowego.

7. Zastosowanie potencjalnych nowych biomarkerów immunohistochemicznych może poprawić proces diagnostyczno-terapeutyczny pacjentów z rakiem gruczołu krokowego, jednak do tej pory jest zbyt mało badań oceniających możliwość ich wykorzystania w praktyce klinicznej.