

STRESZCZENIE

Wstęp

Niemelanocytowe raki skóry (NMSC), w tym rak podstawnokomórkowy (BCC) oraz rak kolczystokomórkowy (SCC), są najczęściej występującymi nowotworami złośliwymi człowieka. Wśród nich przeważa BCC stanowiący 75-80% wszystkich NMSC. Charakteryzuje się miejscową złośliwością i niewielką tendencją do tworzenia przerzutów odległych. SCC, drugi pod względem częstości występowania, w dużej mierze powstaje na podłożu stanów przedrakowych, a także wiąże się z większym ryzykiem tworzenia przerzutów odległych w zaawansowanych stadiach niż BCC.

Iryzyna jest fragmentem domeny zewnątrzkomórkowej białka FNDC5. Bodźcem do jej uwolnienia jest wysiłek fizyczny oraz stymulacja PGC-1 α . Jej funkcja w etiopatogenezie nowotworów nie jest do końca wyjaśniona, chociaż istnieją liczne doniesienia o związku tego białka z procesem kancerogenezy. Badania wykazały, że iryzyna w konkretnych przypadkach może hamować proliferację komórek nowotworowych, pozwala różnicować typy histologiczne danego nowotworu oraz guzy łagodne od złośliwych, wzmacnia cytotoksyczość wybranych chemioterapeutyków, a także może być markerem występowania przerzutów. Do tej pory nie ma doniesień na temat jej roli w NMSC. Periostyna jest białkiem macierzy pozakomórkowej. Odgrywa rolę w procesie gojenia się ran, wpływa na produkcję kolagenu i przebudowę skóry. Jej związek z chorobami skóry został potwierdzony m.in. w dermatozach przebiegających ze wzmożonym stanem zapalnym oraz włóknieniem. Dostępne badania wykazały ogromną rolę mikrośrodowiska nowotworów w rozwoju i progresji komórek rakowych. Liczne badania udowodniły oddziaływanie periostyny na wzrost guza, apoptozę komórek, angiogenezę, a także promowanie powstania przerzutów. Podoplanina, będąca markerem specyficznym dla naczyń limfatycznych, jest obiektem wielu badań dotyczących procesu kancerogenezy jak i powstawania przerzutów. Udowodniony jest udział tego białka w indukowaniu migracji komórek nowotworowych, przejściu epitelialno-mezenchymalnym, a także promowaniu inwazji nowotworu poprzez reorganizację cytoszkieletu aktynowego komórek, co zwiększa ich ruchliwość. W konsekwencji, jej zwiększona ekspresja, w większości badanych przypadków, wiąże się z gorszym rokowaniem.

Cel pracy

Celem pracy była ocena ekspresji iryzyiny, periostyny oraz podoplaniny w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnocomórkowym i raku kolczystocomórkowym oraz analiza korelacji ekspresji tych białek z ekspresją antygenu proliferacyjnego Ki-67 oraz danymi klinicznymi.

Material i metody

Badanie przeprowadzono na grupie 196 przypadków. Archiwalne bloczki parafinowe pochodziły od pacjentów leczonych w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii we Wrocławiu z rozpoznaniem i potwierdzonym badaniem histopatologicznym rogowacieniem słonecznym (42 przypadki), rakiem podstawnocomórkowym (104 przypadki) oraz rakiem kolczystocomórkowym (50 przypadków). W celu określenia ekspresji iryzyiny, periostyny, podoplaniny oraz Ki-67 wykonano badanie immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko badanym białkom. Następnie dokonano oceny ekspresji przy pomocy mikroskopu optycznego Olympus BX41. Nasilenie reakcji immunohistochemicznej dla iryzyiny, periostyny oraz podoplaniny zostało ocenione za pomocą skali IRS wg Remmele i Stegner uwzględniającej odsetek komórek nowotworowych i/lub komórek podścieliska wykazujących pozytywną reakcję w stosunku do wszystkich komórek nowotworowych oraz intensywność reakcji barwnej. Ekspresję antygenu Ki-67 oceniano według skali uwzględniającej liczbę pozytywnych jąder komórkowych raka w stosunku do wszystkich komórek nowotworowych.

Wyniki

Wśród wszystkich ocenianych zmian średnia ekspresja iryzyiny była najwyższa w SCC, najniższa w BCC. Nie wykazano istotnych różnic w ekspresji białka między grupami AK, BCC, SCC ($p > 0.05$). W przypadku periostyny, najwyższa średnia ekspresja dotyczyła BCC, natomiast najniższa SCC. Wykazano istotną statystycznie różnicę w ekspresji tego białka w BCC w porównaniu do AK, jak również BCC do SCC ($p < 0,05$). Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w poziomie ekspresji periostyny w AK w stosunku do SCC. Najwyższa średnia ekspresja podoplaniny była w SCC, najniższa w AK. Wykazano istotną statystycznie różnicę w ekspresji tego białka w BCC w porównaniu do AK oraz SCC, jak również AK do SCC ($p < 0,05$). Obecność białka Ki-67 była na zbliżonym poziomie w komórkach BCC oraz SCC, natomiast na znacząco niższym w AK. Wykazano istotną statystycznie różnicę w poziomie

ekspresji między AK i BCC oraz AK i SCC ($p < 0,05$). W przypadku raka podstawnocomórkowego, wykazano istotną statystycznie ujemną korelację między ekspresją periostyny a ekspresją iryzyny ($p = 0,0114$). Bliską statystycznej istotności ujemną korelację uzyskano pomiędzy periostyną a podoplaniną ($p = 0,0607$) w BCC oraz dodatnią pomiędzy iryzyną a Ki-67 ($p = 0,0644$) w BCC. Analiza ekspresji Ki-67 wykazała, że w AK występującym w miejscach nieeksponowanych na UV ekspresja tego markera była istotnie wyższa niż w miejscach przewlekłe eksponowanych. Wykazano ujemną korelację między ekspresją periostyny w BCC a czasem trwania choroby, a także istotnie wyższą ekspresję periostyny w SCC u kobiet.

Dyskusja

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały zróżnicowane nasilenie ekspresji iryzyny, podoplaniny i Ki-67 w komórkach rogowacenia słonecznego, raka podstawnocomórkowego i raka kolczystocomórkowego, a także ekspresję periostyny w podścielisku zmian rogowacenia słonecznego i niemelanocytowych raków skóry.

Zgodnie z moją wiedzą, jest to pierwsze badanie demonstrujące obecność **iryzyny** w AK oraz NMSC. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji iryzyny pomiędzy zmianami łagodnymi a nowotworowymi i dlatego na podstawie otrzymanych wyników nie można jednoznacznie określić roli iryzyny w rogowaceniu słonecznym i w rakach skóry. Niewątpliwie wymagane są dalsze badania na większych grupach.

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach, pozytywna ekspresja **periostyny** występowała jedynie w podścielisku łącznotkankowym wszystkich badanych zmian, nie wykazano jej w komórkach nowotworowych BCC, SCC ani w AK. Ekspresja periostyny w grupie BCC była istotnie wyższa niż w obu pozostałych badanych grupach, tj. AK czy SCC. Trudno wyjaśnić wyższy poziom ekspresji periostyny w mniej agresywnych BCC w porównaniu z SCC, jednak jedną z przyczyn może być nierówna liczebność grup w poszczególnych typach badanych przeze mnie zmian. Z kolei zbliżony poziom ekspresji białka w SCC i AK może być związany z faktem, iż część zmian ze spektrum AK ulega progresji nowotworowej właśnie w kierunku SCC. Ze względu na brak danych czy w badanej grupie zmiana nowotworowa była zmianą pierwotną czy ewoluowała ze zmiany przedrakowej, teza ta wymaga dalszych badań. Przeprowadzona analiza korelacji wykazała istotną statystycznie ujemną zależność między ekspresją iryzyny i periostyny jedynie w przypadku

raka podstawnokomórkowego, co może sugerować ochronną rolę iryzyny oraz prokancerogenną periostyny.

Ekspresja **podoplaniny**, w moich badaniach występowała w komórkach AK oraz badanych NMSC, a także w komórkach podścieliska zmian (CAF). Najwyższą jej ekspresję obserwowano w komórkach raka kolczystokomórkowego, niższą w komórkach raka podstawnokomórkowego, a najniższą w komórkach rogowacenia słonecznego. Różnice w nasileniu ekspresji podoplaniny pomiędzy badanymi grupami były istotne statystycznie co niewątpliwie potwierdza rolę podoplaniny jako czynnika niekorzystnego rokowniczo. Dodatkowo, wykazałam istotnie statystycznie wyższą ekspresję podoplaniny w zmianach SCC w przypadku zmian na skórze ekspozowanej na promienie UV w stosunku do skóry nieekspozowanej, co potwierdza doniesienia o wiodącej roli promieniowania UV w transformacji nowotworowej NMSC.

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych badań można przypuszczać, że iryzyna, periostyna oraz podoplanina mogą brać udział w procesie powstawania rogowacenia słonecznego oraz niemelanocytowych raków skóry. Jednakże do określania jednoznacznych funkcji tych białek wymagane są dalsze szczegółowe badania.

SUMMARY

Introduction

Nonmelanoma skin cancers (NMSC), including basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC), are the most common type of malignancy in the white population. BCC predominates among them accounting for 75-80% of all NMSC. It is characterized by local malignancy and a low risk of metastases. SCC, second most common skin cancer, is most often formed on the basis of precancerous conditions, and has a higher potential for metastasis in more advanced forms than BCC.

Irisin is a proteolytic cleavage product of the extracellular domain of the protein FNDC5 and its expression is increased by exercise and stimulated by PGC-1 α . Its role in the etiopathogenesis of cancer is not fully explained, although there are numerous reports of the association of this protein with the process of carcinogenesis. Studies have shown that irisin in specific cases can inhibit the proliferation of cancer cells, allows for the differentiation of histological types or distinguish benign and malignant tumours, enhances the cytotoxicity of selected chemotherapeutics and may also be a marker of metastases. So far, there are no reports on its role in NMSC. Periostin is an extracellular matrix protein. It plays an important role in the wound healing process, affects collagen production and skin remodeling. Its connection with skin diseases has been proved, among others, in dermatoses with increased inflammation and fibrosis. Studies have demonstrated the important role of the tumor microenvironment in the development and progression of cancer cells. Numerous studies have proven the effect of periostin on tumor growth, cell apoptosis, angiogenesis, and promoting the development of metastases. Podoplanin, a marker specific for lymphatic vessels, is the subject of many studies on the process of carcinogenesis and the formation of metastases. The role of this protein in inducing cancer cell migration, epidermal-mesenchymal transition, and promoting tumor invasion by reorganizing the actin cytoskeleton of cells, which increases their motility, has been proven. Consequently, its increased expression, in most cases, is associated with a worse prognosis.

Objective

The aim of the study was to evaluate the expression of irisin, periostin and podoplanin in actinic keratosis, basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma and to analyze the correlation of the expression of these proteins with the expression of the proliferative antigen Ki-67 and clinical data.

Material and methods

The study was conducted on a group of 196 cases. Archived paraffin blocks came from patients treated at the Department of Dermatology, Venereology and Allergology in Wrocław with diagnosed and histopathologically confirmed actinic keratosis (42 cases), basal cell carcinoma (104 cases) and squamous cell carcinoma (50 cases). In order to determine the expression of irisin, periostin, podoplanin and Ki-67, immunohistochemical examination was performed using antibodies against the tested proteins. Expression was then assessed using an Olympus BX41 optical microscope. The intensity of the immunohistochemical reaction for irisin, periostin and podoplanin was assessed using the IRS scale according to Remmele and Stegner, taking into account the percentage of tumor cells and/or stromal cells showing a positive reaction in relation to all tumor cells and the intensity of the color reaction. Ki-67 antigen expression was assessed according to a scale that took into account the number of positive cancer cell nuclei in relation to all cancer cells.

Results

Among all the assessed lesions, the average irisin expression was the highest in SCC and the lowest in BCC. There were no significant differences in protein expression between the AK, BCC and SCC groups ($p > 0.05$). In the case of periostin, the highest average expression was in BCC, while the lowest was in SCC. There was a statistically significant difference in the expression of this protein in BCC compared to AK, as well as BCC to SCC ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference in the level of periostin expression in AK compared to SCC. The highest average podoplanin expression was in SCC, the lowest in AK. There was a statistically significant difference in the expression of this protein in BCC compared to AK and SCC, as well as AK to SCC ($p < 0.05$). The presence of Ki-67 protein was at a similar level in BCC and SCC cells, but significantly lower in AK cells. There was a statistically significant difference in the expression level between AK and BCC and AK and SCC ($p < 0.05$). In the case of basal cell carcinoma, a statistically significant negative correlation was found between periostin expression and irisin expression ($p = 0.0114$). A negative correlation close to statistical significance was obtained between periostin and podoplanin ($p = 0.0607$) and a positive correlation between irisin and Ki-67 ($p = 0.0644$) in BCC. Analysis of Ki-67 expression showed that in AK localized on the sites not exposed to UV, the expression of this marker was significantly higher than on chronically UV-exposed sites. A negative correlation was found between the expression of periostin in BCC and the duration of the disease, as well as a significantly higher expression of periostin in SCC in women.

Discussion

My research showed differential expression of irisin, podoplanin and Ki-67 in actinic keratosis, basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma cells, as well as periostin expression in the stroma of actinic keratosis lesions and non-melanocytic skin cancers.

To my knowledge, this is the first study demonstrating the presence of **irisin** in AK and NMSC. There were no statistically significant differences in irisin expression between benign and cancerous lesions, and therefore, based on the results obtained, the role of irisin in actinic keratosis and skin cancer cannot be clearly determined. Further research on larger groups is undoubtedly required.

In the research, positive expression of **periostin** occurred only in the cancer stroma of all examined lesions; it was not detected in tumor cells of BCC, SCC or AK. Periostin expression in the BCC group was significantly higher than in both other studied groups, i.e. AK and SCC. It is difficult to explain the higher level of periostin expression in less aggressive BCCs compared to SCCs, but one possible reason may be the unequal group sizes in the different types of lesions I examined. The similar level of protein expression in SCC and AK may be related to the fact that some lesions from the AK spectrum undergo cancer progression towards SCC. Due to the lack of data whether the cancerous lesion in the study group was a primary lesion or evolved from a precancerous lesion, this thesis requires further research. The performed correlation analysis showed a statistically significant negative relationship between the expression of irisin and periostin only in the case of basal cell carcinoma, which may suggest the protective role of irisin and the procarcinogenic role of periostin.

In my studies, **podoplanin** expression occurred in the cells of AK and the examined NMSCs, as well as in the stromal cells of the lesions (CAF). Its highest expression was observed in the cells of SCC, lower in BCC, and the lowest in AK. The differences in the intensity of podoplanin expression between the studied groups were statistically significant, which undoubtedly confirms the role of podoplanin as an unfavorable prognostic factor. Additionally, I showed statistically significantly higher expression of podoplanin in SCC in the case of lesions on skin exposed to UV rays compared to unexposed skin, which confirms the reports on the leading role of UV radiation in the neoplastic transformation of NMSC.

In summary, based on conducted research, it can be assumed that irisin, periostin, and podoplanin may be involved in the process of actinic keratosis and nonmelanoma skin cancers.

However, further detailed studies are required to determine the specific functions of these proteins.