



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Marta Bałaj-Oleszczuk

**Ocena ekspresji iryzyny, periostyny i podoplaniny w rogowaceniu słonecznym,
raku podstawnokomórkowym i kolczystokomórkowym skóry.**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotorzy:

dr hab. n. med. Alina Jankowska- Konsur

prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów

Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii

Wrocław 2024

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania za nieocenioną pomoc, wsparcie merytoryczne i poświęcony czas na każdym etapie powstawania niniejszej rozprawy doktorskiej

Pani Prof. dr hab. Marzennie Podhorskiej-Okolów

Pani dr hab. n. med. Alinie Jankowskiej- Konsur

Pani Dr n. med. Aleksandrze Piotrowskiej

oraz Kierownikowi Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii

Panu prof. dr hab. n. med. Jackowi Szepietowskiemu

Pracę dedykuję moim Córkom, Liliannie i Jaśminie.

Niech Nauka czyni wasz świat lepszym.

Spis treści

1. WYKAZ SKRÓTÓW	4
2. WSTĘP	6
IRYZYNA	6
Odkrycie, budowa i funkcje	6
Iryzyna w chorobach nowotworowych	8
Iryzyna w dermatologii	11
PERIOSTYNA	14
Odkrycie, budowa i funkcje	14
Periostyna w chorobach nowotworowych	15
Periostyna w dermatologii	16
PODOPLANINA	20
Odkrycie, budowa i funkcje	20
Podoplanina w chorobach nowotworowych	21
Podoplanina w dermatologii	23
ROGOWACENIE SŁONECZNE	25
Epidemiologia i etiopatogeneza	25
Obraz histopatologiczny	26
NIEMELANOCYTOWE RAKI SKÓRY	27
RAK PODSTAWNOKOMÓRKOWY	27
RAK KOLCZYSTOKOMÓRKOWY	29
3. CELE PRACY	32
4. MATERIAŁ I METODY	34
Grupa badana	34
Metody	35
Reakcje immunohistochemiczne (IHC)	35
Ocena nasilenia reakcji immunohistochemicznych	36
Analiza statystyczna	37
5. WYNIKI	38
Ekspresja iryzyny, periostyny, podoplaniny oraz Ki-67 w rogowaceniu słonecznym	38
Ekspresja iryzyny w rogowaceniu słonecznym	38
Ekspresja periostyny w rogowaceniu słonecznym	39
Ekspresja podoplaniny w rogowaceniu słonecznym	40
Ekspresja Ki-67 w rogowaceniu słonecznym	41

Ekspresja iryzyny, periostyny, podoplaniny oraz Ki-67 w raku podstawnokomórkowym..	42
Ekspresja iryzyny w raku podstawnokomórkowym	42
Ekspresja periostyny w raku podstawnokomórkowym	43
Ekspresja podoplaniny w raku podstawnokomórkowym	45
Ekspresja Ki-67 w raku podstawnokomórkowym	46
Ekspresja iryzyny, periostyny, podoplaniny oraz Ki-67 w raku kolczystokomórkowym....	47
Ekspresja iryzyny w raku kolczystokomórkowym	47
Ekspresja periostyny w raku kolczystokomórkowym	48
Ekspresja podoplaniny w raku kolczystokomórkowym	49
Ekspresja Ki-67 w raku kolczystokomórkowym	51
Ocena nasilenia ekspresji iryzyny w AK, BCC oraz SCC	52
Ocena nasilenia ekspresji periostyny w AK, BCC oraz SCC.....	53
Ocena nasilenia ekspresji podoplaniny w AK, BCC oraz SCC	54
Ocena nasilenia ekspresji Ki-67 w AK, BCC oraz SCC	54
Ocena zależności ekspresji iryzyny, periostyny, podoplaniny oraz Ki-67 w rogowaceniu słonecznym	55
Ocena zależności ekspresji iryzyny, periostyny, podoplaniny oraz Ki-67 w raku podstawnokomórkowym	55
Ocena zależności ekspresji iryzyny, periostyny, podoplaniny oraz Ki-67w raku kolczystokomórkowym	57
6. DYSKUSJA.....	58
7. WNIOSKI.....	65
8. STRESZCZENIE.....	66
9. SUMMARY.....	70
10. PIŚMIENNICTWO	74

1. WYKAZ SKRÓTÓW

AFP alfa-fetoproteina

AK ang. actinic keratosis, rogowacenie słoneczne

AN ang. acanthosis nigricans, rogowacenie ciemne

AZS atopowe zapalenie skóry

BAT ang. brown adipose tissue, brązowa tkanka tłuszczowa

BCC ang. basal cell carcinoma, rak podstawnocomórkowy

bFGF zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów

BMI ang. body mass index, wskaźnik masy ciała

CAFs ang. cancer-associated fibroblasts, fibroblasty towarzyszące guzom

EMT ang. epithelial-mesenchymal transition, przejście epithelialno-mezenchymalne

FAK ang. focal adhesion kinase, kinaza ogniskowo-adhezyjna

HOMA-IR ang. Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance, Indeks HOMA-IR

HS hidradenitis suppurativa

IF- γ interferon-gamma

IGF-1 ang. insulin-like growth factor 1, insulinowy czynnik wzrostu

IHC immunohistochemia

IL-2, IL-3, IL-6, IL-13 interleukina-2, interleukina-3, interleukina-6, interleukina 13

IRS ang. Immunoreactive Score, skala IRS

KIN ang. keratotic intraepithelial neoplasia

MAPK ang. mitogen activated protein kinases, kinazy aktywowane mitogenami

MF ang. mycosis fungoides, ziarniniak grzybiasty

NMSC ang. non-melanoma skin cancers, niemelanocytowe raki skóry

NSCLC ang. non-small cell lung cancer, rak niedrobnokomórkowy płuc

OSCC ang. oral squamous cell carcinoma rak płaskonabłonkowy jamy ustnej

OSF-2 ang. osetoblast-specific factor, czynnik swoisty dla osteoblastów

PASI ang. Psoriasis Area and Severity Index

PDPN podoplanina

PGC-1 α ang. peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, koaktywator 1 alfa receptora gamma aktywowanego przez proliferatory peroksysomów

PLAG ang. platelet aggregation-stimulating domain

POSTN periostyna

Receptor CLLEC-2 ang. C-type lectin-like receptor 2

SCC ang. squamous cell carcinoma, rak kolczystokomórkowy

TAM ang. tumor-associated macrophages, makrofagi odpowiedzialne za rozwój nowotworu

TGF β 1 czynnik wzrostu β 1

TNF- α ang. tumor necrosis factor -alpha, czynnik martwicy nowotworów alfa

TNM ang. tumor, lymph nodes, metastasis

TSLP ang. thymic stromal lymphopoietin, limfopoetyna zrębu grasicy

UCP1 ang. uncoupling protein 1, białko rozprzegające, termogenina

UV ang. ultraviolet radiation, promieniowanie ultrafioletowe

WAT ang. white adipose tissue biała tkanka tłuszczowa

2. WSTĘP

IRYZYNA

Odkrycie, budowa i funkcje

Iryzyna jest adipomiokiną, białkiem produkowanym przez mięśnie szkieletowe i tkankę tłuszczową pod wpływem wysiłku fizycznego. Stanowi łącznik sygnałowy między włóknami mięśni szkieletowych i innymi tkankami. Poprzez analogię do pełnionych funkcji, jej nazwa pochodzi od imienia posłanki bogów olimpijskich, Iris. Iryzyna po raz pierwszy została opisana w 2012 roku przez Boström i wsp. Jest cząsteczką o masie 12kDa, a jej prekursorem jest białko FNDC5 (20-32 kDa), którego gen kodowany jest na chromosomie 1 w pozycji 35.1 (1p35.1). W mięśniach iryzyna powstaje w wyniku odszczepienia fragmentu zewnątrzkomórkowej domeny białka FNDC5. Z kolei ekspresja białka FNDC5 jest stymulowana przez koaktywator 1-alfa receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksisomów – PGC1- α (ang. peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) w odpowiedzi na wysiłek fizyczny. W tkance tłuszczowej wzrost ekspresji iryzyny stymuluje brązowienie białej tkanki tłuszczowej, a tym samym termogenezę, wzrost ekspresji białka rozprzegającego 1 (UCP1, ang. uncoupling protein 1), wzrost zużycia energetycznego organizmu, czego efektem jest pozytywny wpływ na insulinooporność związaną z otyłością [1]. W swoim badaniu przekrojowym, Huh i wsp. opisali dodatnią korelację między poziomem krążącej iryzyny w krwi ludzkiej a wskaźnikiem masy ciała – BMI (ang. body mass index), stężeniem glukozy, greliny oraz insulinowego czynnika wzrostu-1 (IGF-1; ang. insulin-like growth factor-1), natomiast ujemną korelację wykazano w stosunku do wieku, poziomu insuliny, cholesterolu i adiponektyn [2]. Te wyniki mogą wskazywać na możliwą kompensacyjną rolę iryzyny w regulacji metabolizmu.

Interesująca jest rola iryzyny w brązowieniu tkanki tłuszczowej. Powszechnie wiadomo, że biała tkanka tłuszczowa (WAT; ang. white adipose tissue) pełni funkcję podporową oraz magazynuje energię. WAT wykazuje również zdolność do produkcji adipokin mających wpływ na rozwój przewlekłego stanu zapalnego, a także na rozwój insulinooporności, co w konsekwencji może prowadzić do otyłości, rozwoju chorób metabolicznych, chorób sercowo-naczyniowych, a nawet nowotworów. Komórki brunatnej tkanki tłuszczowej (BAT; ang. brown adipose tissue), w przeciwieństwie do WAT, zawierają liczne mitochondria, a w ich wewnętrznej błonie mitochondrialnej znajduje się białko

rozprzegające, UCP1. Z tego względu to właśnie brązowa tkanka tłuszczowa jest zdolna do produkcji ciepła na drodze termogenezy bezdrzeniowej [3,4]. Opisuje się także jeszcze jeden typ komórek tłuszczowych, określane mianem beżowych adipocytów (brite, beige). Są to komórki pochodzące z tej samej linii, co komórki WAT ale wykazują charakterystyczne cechy budowy oraz funkcji komórek BAT. Według Spiegelmana i wsp. do brązowienia białej tkanki tłuszczowej dochodzi pod wpływem stymulacji przez PGC1 α , pochodzącego z mięśni szkieletowych. Odkrycie iryzyny dopełniło łańcuch sygnałów indukujących powstanie beżowej tkanki tłuszczowej, począwszy od wysiłku fizycznego, ekspresji PGC1- α , poprzez odłączenie się fragmentu białka FNDC5 i powstanie iryzyny do ostatecznej biogenezy mitochondrialnej w białych adipocytach oraz wzrostu ekspresji białka UCP1. Proces ten skutkuje przede wszystkim poprawą homeostazy glukozy i zmniejszeniem insulinooporności [4,5,6]. Pierwsze doniesienia dotyczyły występowania ekspresji iryzyny w mięśniach szkieletowych po wysiłku fizycznym. W kolejnych pracach wykazano obecność iryzyny również w płynach organizmu tj. osoczu, ślinie oraz płynie mózgowo-rdzeniowym [7,8]. Oprócz mięśni szkieletowych oraz tkanki tłuszczowej, ekspresję iryzyny potwierdzono również za pomocą badań immunohistochemicznych (IHC) w innych narządach, takich jak podwzgórze, ślinianki, tkanka łączna w skórze, wątroba, żołądek, mięsień sercowy, nerki, jądra, trzustka i otoczka mielinowa nerwów obwodowych [7,8,9]. Niestety bardzo mało wiadomo o mechanizmie jej działania na komórki docelowe. Dopiero w 2019 roku, Kim i wsp. opisali potencjalny receptor dla iryzyny na tkankach docelowych. Swoje badania przeprowadzili na osteocytach wyróżniając kompleks integryn $\alpha V/\beta 5$ jako miejsce przyłączania się iryzyny [10,11]. Jako dowód wykazali zniesienie działania iryzyny w wyniku inhibicji kompetycyjnej obecnego na powierzchni adipocytów kompleksu integryn $\alpha V/\beta 5$ i $\alpha V/\beta 1$ oraz CD81, pośredniczącego w szlaku fosforylacji kinazy ogniskowo-adhezyjnej – FAK (ang. focal adhesion kinase), który z kolei jest aktywowany przez iryzynę [10,12]. W swoich badaniach Oguri wyodrębnił linię adipocytów CD81+, która szczególnie predysponuje do brązowienia tkanki tłuszczowej. Obecność markera CD81 na powierzchni adipocytów okazała się niezbędna do utworzenia przez iryzynę kompleksu z integrynami $\alpha V/\beta 1$ i $\alpha V/\beta 5$ i aktywacji szlaku fosforylacji FAK. Z kolei utrata cząsteczki CD81 skutkowałą rozwinięciem otyłości, nietolerancji glukozy i insulinooporności, a także zapaleniem tkanki tłuszczowej [12]. Ponadto, Bi i wsp. w swoich badaniach wykazali, że połączenie iryzyny z integrynami $\alpha V/\beta 5$ jako receptorem i aktywowanie szlaku AMPK-UCP 2 (AMP-activated protein kinase) wywiera pozytywny wpływ na odbudowę wcześniej uszkodzonej w wyniku niedokrwienia bariery jelitowej [13].

Badania nad funkcją iryzyny w organizmie ludzkim wykazały nie tylko jej rolę protekcyjną w procesach metabolicznych. Jej różnorodne działanie zostało dotychczas opisane również m.in. w chorobach sercowo-naczyniowych, chorobach nerek, płuc, układu nerwowego czy w zaburzeniach metabolizmu kości [14,15].

Iryzyna w chorobach nowotworowych

W wielu badaniach udowodniono pozytywny wpływ wysiłku fizycznego na procesy kancerogenezy. Jednym z niedawno odkrytych białek jest iryzyna, adipomiokina wytwarzana w mięśniach szkieletowych oraz tkance tłuszczowej pod wpływem wysiłku fizycznego. Dotychczas dobrze poznaną funkcją iryzyny jest jej udział w gospodarce węglowodanowej organizmu. Ze względu na pozytywny efekt wysiłku fizycznego w profilaktyce oraz przebiegu choroby nowotworowej, nie dziwi wzrost zainteresowania wielu naukowców w określeniu ewentualnej roli iryzyny w procesie nowotworowym. Większość przeprowadzonych badań dotyczy analizy korelacji poziomu iryzyny w surowicy krwi pacjentów z chorobą nowotworową w porównaniu do osób zdrowych, a tylko część z nich ocenia bezpośredni wpływ iryzyny na komórki nowotworowe w hodowlach komórkowych [16,17,18].

W badaniach *in vitro* wykazano, że iryzyna może wykazywać zarówno działanie hamujące, jak również stymulujące żywotność komórek nowotworowych. Istotne zmniejszenie proliferacji, żywotności oraz migracji komórek nowotworowych po dodaniu do hodowli iryzyny, bez istotnego wpływu na komórki prawidłowe obserwowano w liniach komórkowych raka piersi, prostaty, płuc, mięsaka kościopochodnego i glejaka [19,20,21,22,23]. Ponadto, dodanie iryzyny do hodowli komórkowej raka piersi poddanych działaniu doksorubicyny istotnie nasilało efekt chemioterapeutyczny leku na komórki [24]. Podobnie w przypadku raka trzustki, ekspozycja na iryzynę hamowała wzrost, proliferację i migrację komórek nowotworowych oraz wzmacniała odpowiedź na działanie chemioterapeutyczne doksorubicyny i gemcytabiny [25,26,27]. Z kolei w liniach komórkowych raka endometrium, okrężnicy, tarczycy i przełyku wykazano brak wpływu iryzyny na żywotność tych komórek [28]. Zaskakujące wyniki uzyskano w badaniach na komórkach raka wątrobowokomórkowego, w których dodanie iryzyny do hodowli stymulowało proliferację i migrację komórek nowotworowych, a także znacznie obniżyło działanie terapeutyczne doksorubicyny [29]. Należy zwrócić uwagę, że w wyżej

wymienionych badaniach, stężenia iryzyny oraz czas ekspozycji komórek na jej działanie były różne, co z pewnością sugeruje konieczność przeprowadzenia dalszych badań, w tym również w modelach *in vivo*. Jak wynika z powyższych badań, w większości przypadków iryzyna wykazuje działanie protekcyjne i wpływa hamująco na proces kancerogenezy. Dotychczas nie poznano jeszcze mechanizmów działania iryzyny na komórki nowotworowe, jednak przypuszcza się, że może ona wywierać wpływ hamujący na szlaki sygnałowe regulujące kluczowe dla komórek procesy, jak proliferacja, cykl komórkowy czy naprawa uszkodzeń DNA: kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy białkowej AKT (PI3K/AKT), kinazy mTOR, przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji (STAT3), jądrowy czynnik transkrypcyjny NF-kappaB (NF-κB), a także na aktywację kinazy AMPK.

Badania dotyczące występowania iryzyny w guzach nowotworowych u ludzi wykazały nierzadko niejednoznaczne wyniki. Obecność iryzyny za pomocą metody immunohistochemicznej potwierdzono w komórkach niektórych nowotworów [18]. W raku tarczycy oraz nerki ekspresję IHC tego białka stwierdzono jedynie w komórkach nowotworowych, ale nie w komórkach prawidłowych tych narządów [30,31]. Te wyniki mogłyby sugerować możliwość przydatności badania IHC w diagnostyce różnicowej guzów złośliwych i łagodnych tarczycy oraz nerki, a także w określaniu ich podtypów. Zwiększenie ekspresji iryzyny w komórkach raka piersi w porównaniu do komórek prawidłowych opisali również m. in. Cebulski i wsp. [32]. Ponadto, ekspresja ta była istotnie wyższa u chorych bez przerzutów do węzłów chłonnych w porównaniu do chorych z przerzutami, co może określać iryzynę jako dobry marker prognostyczny. Natomiast komórki zmian łagodnych lub prawidłowe tych narządów nie wykazywały ekspresji iryzyny. Podobnie Nowińska i wsp. wykazali wzrost ekspresji iryzyny w komórkach raka niedrobnokomórkowego płuc (NSCLC) lecz jednocześnie iryzyna była również obecna w komórkach podścieliska guza. Ci sami badacze wykazali również wzrost ekspresji genu kodującego prekursor iryzyny, białko FNDC5 zarówno w komórkach raka NSCLC, jak i w komórkach podścieliska guza [33]. Z kolei Fan i wsp. obserwowali obniżoną ekspresję tego białka w komórkach raka NSCLC [34]. Jednocześnie wykazali nasilenie działania leku na paklitaksel-oporne komórki raka NSCLC po dodaniu iryzyny do hodowli. Autorzy Ci sugerują, że obecność iryzyny może wywierać korzystny wpływ na leczenie w wyniku zmniejszenia chemiooporności komórek nowotworowych [34].

Badania nad rakiem wątrobowokomórkowym przyniosły rozbieżne wyniki. W pracy Gaggini i wsp. ekspresja FNDC5/iryzyny w komórkach nowotworu była istotnie wyższa

niż w zdrowych hepatocytach [35]. Jednocześnie poziom iryzyny w surowicy pacjentów z rozpoznaniem rakiem wątrobowokomórkowym, nie różnił się istotnie od poziomu tego białka w surowicy osób zdrowych. Przeciwnie wyniki uzyskali Zhang i wsp., którzy opisali znacząco niższy poziom iryzyny w surowicy chorych na raka wątrobowokomórkowego w porównaniu do grupy kontrolnej [36]. Dodatkowo, u chorych z niskim stężeniem iryzyny przebieg pooperacyjny po hepatektomii był obarczony większą ilością komplikacji i dłuższym okresem hospitalizacji. Zauważyli, że jej niskie stężenie w większości przypadków, tj. u 77% chorych było związane z płcią męską, przebyciem wirusowym zapaleniem wątroby i wysokim poziomem AFP (alfa-fetoproteiny) [36]. W innym badaniu również stwierdzono ujemną korelację między poziomem iryzyny w surowicy krwi a ciężkością uszkodzenia wątroby u pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym [37]. Natomiast Zhu i wsp. wysunęli nawet hipotezę, że poziom iryzyny w surowicy mógłby być potencjalnym markerem diagnostycznym w rozpoznawaniu raka okrężnicy. Zaobserwowali, że niski poziom białka był związany z wysokim prawdopodobieństwem wystąpienia choroby nowotworowej [38]. Niskie poziomy iryzyny w surowicy zostały również potwierdzone u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego oraz prostaty [39,40], natomiast wysokie jej stężenie dodatkowo korelowało z występowaniem raka nerki i raka żołądka. [41,42] Panagiotou wykazał wyższe stężenia iryzyny u pacjentek z łagodnymi i złośliwymi guzami piersi w porównaniu z grupą kontrolną. [43] Natomiast Provatopoulou otrzymała odmienne wyniki swoich badań, w których poziom iryzyny był znacząco niższy u pacjentek z rozpoznaniem nowotworem piersi. Jednocześnie poziom iryzyny w surowicy krwi u tych chorych dodatkowo korelował ze stadium zaawansowania guza. [44] Wysokie stężenie iryzyny, dodatkowo korelujące z BMI u pacjentek z rakiem piersi wg Zhang'a może być czynnikiem protekcyjnym powstania przerzutów do kręgosłupa [45].

Wyniki tych badań sugerują, że iryzyna mogłaby pełnić rolę markera diagnostycznego i prognostycznego w niektórych nowotworach. Powyższe badania potwierdzają rolę iryzyny nie tylko w procesie kancerogenezy, również w progresji choroby nowotworowej. Jednak możliwość ewentualnego jej wykorzystania jako markera diagnostycznego, prognostycznego lub predykcyjnego wymaga dalszych badań.

Iryzyna w dermatologii

Jak już opisano wcześniej, iryzyna jest adipomiokiną, cząsteczką produkowaną przez m.in. adipocyty tkanki tłuszczowej trzewnej i podskórnej, regulującą procesy zapalne i funkcje układu odpornościowego. Dotychczas badania nad rolą iryzyny w przebiegu chorób dermatologicznych dotyczą jedynie sześciu jednostek chorobowych - trądziku zwyczajnego, pokrzywki, łuszczycy, hydradenitis suppurativa, rogowacenia ciemnego (AN; ang. acanthosis nigricans,) oraz choroby Behçeta.

Trądzik pospolity jest przewlekłą chorobą zapalną skóry dotyczącą jednostki włosowo-łojowej. Na patomechanizm składa się kilka różnych czynników: nadczynność gruczołów łojowych, nadmierne rogowacenie przewodów wyprowadzających i ujść gruczołów łojowych, kolonizacja przez bakterie beztlenowe (*Cutibacterium acnes*) oraz rozwój lokalnego stanu zapalnego. W badaniu Mustafy i wsp. oceniono poziom iryzyny w surowicy krwi pacjentów z trądzikiem pospolitym oraz jej wpływ na przebieg choroby w korelacji z występowaniem insulinooporności. Insulinooporność była oceniana za pomocą wskaźnika HOMA-IR (ang. Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance), na podstawie zależności pomiędzy stężeniem insuliny i glukozy we krwi obwodowej na czczo. U chorych z trądzikiem wykazano istotnie niższy poziom iryzyny w surowicy krwi oraz wysoki wskaźnik HOMA-IR w porównaniu z grupą kontrolną. Wraz z nasileniem zmian skórnych w przebiegu choroby, poziom iryzyny spadał, natomiast wzrastał wskaźnik HOMA-IR [46]. Spadek stężenia iryzyny u pacjentów z rozpoznanym trądzikiem zwyczajnym oraz ujemną korelację ze wskaźnikiem HOMA-IR wykazano również w badaniu Tang'a [47]. Wyniki tych badań nie tylko potwierdzają udział insulinooporności w patogenezie trądziku, ale także traktują iryzynę jako wskaźnik zaawansowania choroby.

Pokrzywka jest chorobą charakteryzującą się występowaniem bąbli pokrzywkowych lub obrzęku naczyńioruchowego bądź obu tych zmian jednocześnie pod wpływem różnorodnych bodźców. Zakłada się, że zmiany skórne ustępują do 24h, natomiast obrzęk naczyńioruchowy może utrzymywać się do 72h. Za powstanie bąbli pokrzywkowych odpowiedzialne są głównie komórki tuczne, które uwalniają liczne mediatory prozapalne, przede wszystkim histaminę, prostaglandyny i leukotireny. W wyniku uwolnienia tych mediatorów dochodzi do wzrostu przepuszczalności naczyń krwionośnych, a w konsekwencji pojawiają się charakterystyczne zmiany skórnych [48]. W związku z doniesieniami o przeciwzapalnym działaniu iryzyny, Us Altay jako pierwszy postanowił ocenić jej rolę w etiopatogenezie pokrzywki. Poziom iryzyny w surowicy porównywał z poziomem

interleukiny-2 (IL-2), interleukiny-3 (IL-3), czynnika martwicy nowotworów (TNF- α ; ang. Tumor Necrosis Factor-alpha -) oraz interferonu- γ (IF- γ). U pacjentów ze stwierdzoną pokrzywką spontaniczną poziom iryzyny był istotnie niższy niż u osób zdrowych. Przeciwnie przedstawiał się poziom IL-2, IL-3, TNF- α i IF- γ , który był istotnie wyższy u osób chorych niż zdrowych. Wyniki te pokazują, że iryzyna mogłaby stać się markerem prognostycznym występowania pokrzywki spontanicznej [49].

Łuszczyca jest przewlekłą dermatozą zapalną, nierzadko współistniejącą z chorobami metabolicznymi i układu sercowo-naczyniowego. W patogenezie tej choroby zwraca się uwagę na rozwój ogólnoustrojowego stanu zapalnego, wyzwalanego przez mediatory zapalne uwalniane z adipocytów, co przy współdziałaniu czynników genetycznych i środowiskowych prowadzi do indukowania zmian skórnych [50]. W badaniu Alatas i wsp. wykazano, że poziom iryzyny był znacząco niższy w grupie chorych w porównaniu z osobami zdrowymi. Jednocześnie jej poziom negatywnie korelował ze nasileniem choroby mierzonym skalą PASI (ang. Psoriasis Area and Severity Index) [51]. Podobne wyniki uzyskali Amborgio i wsp., którzy udokumentowali ujemną korelację między poziomem iryzyny a nasileniem łuszczycy [52]. Odmienne wyniki uzyskano w pracach Burula oraz Gamila, którzy niezależnie od siebie odnotowali istotnie znaczące dodatnie korelacje między poziomem iryzyny a nasileniem łuszczycy ocenianej w skali PASI [53,54]. Rozbieżność prezentowanych wyników wskazuje na potrzebę dalszych badań nad ewentualną rolą iryzyny w patogenezie oraz przebiegu łuszczycy.

Hidradenitis suppurativa (HS) jest przewlekłą, nawracającą, zapalną chorobą objawiającą się występowaniem charakterystycznych bolesnych guzów, ropni, przetok i bliznowacenia, najczęściej w obrębie pach, pachwin i okolicy anogenitalnej, co znacznie upośledza funkcjonowanie i obniża jakość życia pacjentów [55]. U chorych istnieje zwiększone ryzyko współwystępowania otyłości, cukrzycy, zespołu metabolicznego oraz innych chorób przebiegających z ogólnoustrojowym stanem zapalnym [56]. W przypadku tej choroby wykazano, że w surowicy krwi pacjentów z HS poziom iryzyny był nieistotnie podwyższony w porównaniu do osób zdrowych i dodatnio korelował ze wskaźnikiem HOMA-IR [57].

Rogowacenie ciemne (AN; ang. acanthosis nigricans) jest zmianą skórną o charakterze ograniczonej hiperpigmentacji i brodawkowania skóry lokalizującą się najczęściej na szyi, karku, w okolicach pachowych, niekiedy w zgięciach łokciowych czy podkolanowych. W większości przypadków AN jest skórny objawem insulinooporności,

otyłości, zespołu metabolicznego czy zespołu policystycznych jajników. Sugeruje się też, że AN może być rewelatorem choroby nowotworowej czy poważnych zespołów endokrynych [58]. Biorąc pod uwagę opisywany wcześniej i poruszany w wielu badaniach związek iryzyny z otyłością, insulinoopornością i innymi zaburzeniami metabolicznymi, Chen ocenił poziom iryzyny w surowicy krwi w grupie osób otyłych z rogowaceniem ciemnym lub bez niego i wykazał istotnie wyższy poziom iryzyny w surowicy pacjentów z otyłością w porównaniu do osób o prawidłowej masie ciała. Poziom iryzyny u osób z otyłością dodatnio korelował m.in. z BMI, obwodem talii czy wykładnikami gospodarki lipidowej. Następnie w grupie chorych z otyłością wykazał także istotnie wyższe stężenie iryzyny w surowicy krwi u pacjentów z AN w porównaniu do osób bez AN. Te wyniki mogą sugerować związek między podwyższonym stężeniem iryzyny a rozwojem zmian skórnych. Grupa pacjentów z otyłością z rogowaceniem ciemnym wykazywała lepszą tolerancję glukozy i odpowiedź na insulinę, co według Chen i wsp. może sugerować protekcyjną rolę iryzyny [59].

Choroba Behçeta jest postacią układowego zapalenia naczyń. Do jej charakterystycznych objawów należą nawracające owrzodzenia jamy ustnej i narządów rodnych oraz zajęcie narządu wzroku w postaci zapalenia błony naczyniowej. Zmiany skórne w przebiegu tej choroby manifestują się pod postacią różnych zmian skórnych (np. rumień guzowaty, wykwity typu trądzikowego, zmiany pęcherzykowe lub wędrujące zapalenia żył powierzchownych). Proces chorobowy może dotyczyć naczyń tętniczych i żylnych wszystkich typów, stąd różnorodność występujących objawów [60]. W badaniu Icli i wsp. wykazano, że poziom iryzyny w surowicy krwi pacjentów z chorobą Behçeta był znacząco niższy w porównaniu osób zdrowych. Ponadto u tych chorych istnieje ujemna korelacja między poziomem iryzyny w surowicy a grubością kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy szyjnej, który pozwala na ocenę ryzyka rozwoju miażdżycy. Te wyniki pokazały, że obniżony poziom iryzyny może być traktowany jako marker predykcyjny rozwoju miażdżycy u pacjentów z chorobą Behçeta [61].

PERIOSTYNA

Odkrycie, budowa i funkcje

Periostyna (POSTN), początkowo zwana czynnikiem swoistym dla osteoblastów (OSF-2; ang. osteoblast-specific factor) jest glikoproteiną macierzy zewnątrzkomórkowej o masie molekularnej 93.3 kDa, składająca się z ok. 814 aminokwasów [62]. Została odkryta w 1993 roku jako białko produkowane przez komórki okostnej, a dalsze badania wykazały, że jej ekspresja obecna jest w komórkach tkanki łącznej bogatej w kolagen (tj. w więzadłach przyzębia, ścięgnach oraz zastawkach serca) oraz pojawia się w odpowiedzi na bodziec mechaniczny. POSTN ma zdolność interakcji z komórkami oraz innymi białkami macierzy pozakomórkowej (za pośrednictwem domeny FAS1, domeny EMI oraz domeny C-końcowej CTD). Co ciekawe, oddziaływanie na komórki odbywa się za pomocą tego samego receptora co receptor dla iryzyny, tj. $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$, powodując aktywację m.in. szlaków sygnałowych FAK, kinazy PI-3 - AKT [63,64,65]. Przekazując informacje do wnętrza komórki, szlaki te regulują wiele procesów, m.in. cykl komórkowy, apoptozę, adhezję komórek, ich zdolność do migracji, a w konsekwencji inwazję i tworzenie przerzutów nowotworowych. W wielu badaniach wykazano, że aktywacja szlaku FAK przez POSTN w komórkach nowotworowych odpowiada za wzrost proliferacji oraz hamowanie apoptozy [66,67]. Do podstawowych funkcji POSTN w organizmie należy utrzymywanie prawidłowej struktury kości i zębów, a także udział w rozwoju zastawek serca. Fizjologicznie, jej ekspresja stabilizuje się na niskich poziomach w wielu różnych tkankach, natomiast w stanach patologicznych (np. uraz, zapalenie, nowotworzenie) zdecydowanie rośnie. Jej obecność została potwierdzona w tkance pozawałowej mięśnia sercowego, stanach przebiegających z włóknieniem, w procesie gojenia, a także, co interesujące w zrębie guzów nowotworowych [68]. W wielu stanach patologicznych (m. in. zawał mięśnia sercowego, gojenie ran, przeciążenia nadcisnieniowe) POSTN bierze udział w remodelingu macierzy pozakomórkowej, co prowadzi do przebudowy tkanek [69,70,71,72]. Jak wykazano, POSTN poprzez wpływ na adhezję komórek i ich zdolność do migracji, może wywierać stymulujący wpływ na przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT; ang. epithelial-mesenchymal transition) komórek nowotworowych, czego konsekwencją jest utrata adhezji i wzrost inwazyjności tych komórek oraz tworzenie odległych przerzutów [63].

Periostyna w chorobach nowotworowych

W rozwoju i progresji nowotworu ogromną rolę przypisuje się mikrośrodowisku, w jakim się rozwija. W skład zrębu guzów nowotworowych wchodzi wiele komórek nienowotworowych (gł. fibroblasty, komórki układu odpornościowego, etc.), różnorodne białka macierzy pozakomórkowej oraz naczynia krwionośne i limfatyczne. W większości nowotworów ekspresja POSTN została wykazana w komórkach podścieliska. W części badań opisuje się jej ekspresję również w samych komórkach nowotworowych bądź w obu tych lokalizacjach jednocześnie [73]. Jak wiadomo, POSTN działa poprzez receptory integrynowe, które są obecne na komórkach nowotworowych, aktywując w ten sposób szlaki sygnałowe prowadzące do proliferacji komórek i hamowania apoptozy. Jednocześnie POSTN, jak wykazano, działa stymulująco na proces angiogenezy oraz powstawania przerzutów. Baril i wsp. udowodnili, że POSTN oddziałująca poprzez receptory integrynowe na komórki raka trzustki, promowała ich zdolność do migracji i inwazji. Jednocześnie wywierała hamujący wpływ na proces apoptozy tych komórek, co prowadziło do zwiększenia ich przeżycia w warunkach stresowych [74]. Podobne wyniki uzyskano również w badaniach nad komórkami raka okrężnicy, raka żołądka, piersi [75,76,77]. W wielu innych eksperymentach zaobserwowano, że zwiększona ekspresja tego białka była związana z promocją angiogenezy, co z kolei zwiększa ryzyko powstania przerzutów. Z tego względu niektórzy badacze określili POSTN jako marker prognostyczny przerzutowania m.in. raka kolczystokomórkowego jamy ustnej oraz nowotworów głowy i szyi, okrężnicy i żołądka [78,79,80,81]. W swoim badaniu, Sasaki i wsp. stwierdzili wyższe stężenie POSTN w surowicy krwi pacjentek chorych na raka przewodowego piersi z przerzutami do kości w porównaniu do chorych bez przerzutów. Z kolei u pacjentów z rakiem drobnokomórkowym płuc stężenie POSTN w surowicy utrzymywało się na zbliżonym poziomie niezależnie od występowania przerzutów do kości. Jednakże u tych pacjentów obserwowano wzrost poziomu POSTN w surowicy wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania klinicznego guza i zajęciem węzłów chłonnych w skali TNM [82]. Większość dostępnych badań opisuje POSTN jako czynnik prokancerogeny, odpowiadający za gorsze rokowanie nowotworu. Jednak niektórzy autorzy sugerują przeciwne jej działanie. W swoich badaniach wykazali supresyjne działanie tego białka na komórki niektórych nowotworów, tj. raka żołądka czy raka pęcherza moczowego [83,84]. Działanie POSTN jako białka macierzy pozakomórkowej i jej wpływ na progresję nowotworu zostało potwierdzone w wielu badaniach. W większości z nich wykazano obecność ekspresji POSTN w podścielisku guza, natomiast jej brak lub słabą ekspresję w samych komórkach

nowotworowych. Mimo ww. wyników, jej rola nie jest do końca jednoznaczna i wymaga dalszych poszukiwań.

Periostyna w dermatologii

W warunkach fizjologicznych, POSTN w skórze jest zlokalizowana głównie w keratynocytach w dolnych warstwach naskórka oraz w fibroblastach w warstwie brodawkowatej skóry właściwej. Natomiast w stanach patologicznych (m.in. uszkodzenie mechaniczne, stany zapalne, nadmierna odpowiedź immunologiczna, zwiększone włóknienie) dochodzi do wzrostu jej ekspresji również w komórkach innych warstw skóry oraz w macierzy pozakomórkowej [85,86]. Jackson-Boeters i wsp. ocenili ekspresję POSTN w skórze w warunkach fizjologicznych oraz podczas procesu gojenia rany powstałej po urazie. Wykazali oni istotny wzrost ekspresji POSTN w macierzy zewnątrzkomórkowej w miejscu urazu w porównaniu ze zdrową skórą. Wzrost jej ekspresji w ranie był przejściowy, z początkiem ok. 3 dnia i najwyższym poziomem osiągniętym ok. 7 dnia od momentu urazu oraz spadku w 28 dniu do stanu początkowego. Zjawisko to może być związane ze stymulacją ekspresji POSTN przez komórki tuczne oraz brakiem udziału POSTN w początkowej fazie zapalnej procesu gojenia. Mastocyty pojawiające się w okolicy rany wydzielają histaminę, która z kolei wpływa na remodeling macierzy pozakomórkowej w ziarninie, indukuje angiogenezę, migrację i proliferację komórek. Histamina stymuluje również ekspresję transformującego czynnika wzrostu $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF) i POSTN, które następnie wpływają na syntezę kolagenu typu I. Dodatkowo, Autorzy potwierdzili, że wraz ze wzrostem ekspresji periostyny zwiększała się liczba miofibroblastów α -SMA+ niezbędnych w procesie gojenia rany [85,87].

Atopowe zapalenie skóry (AZS; ang. atopic dermatitis,) jest częstą, przewlekłą dermatozą przebiegającą z okresami zaostrzeń i remisji, związaną z odpowiedzią immunologiczną typu Th2. Przewlekły proces zapalny prowadzi do nadmiernej proliferacji fibroblastów w skórze, gdzie obecne są też liczne komórki tuczne. Histamina, uwalniana przez mastocyty, odpowiada przede wszystkim za silny świąd skóry, ale także stymuluje wzrost ekspresji POSTN. Shiraishi i wsp. wykazali, że periostyna stymuluje proliferację keratynocytów poprzez aktywację szlaku sygnałowego AKT, co prowadzi do pogrubienia naskórka w zmianach skórnych w przebiegu atopowego zapalenia skóry. Dodatkowo, POSTN bierze również udział w zaostrzeniach AZS stymulując keratynocyty do produkcji cytokiny

TSLP (limfopoetyna zrębu grasicy, ang. thymic stromal lymphopoietin), białka o funkcji prozapalnej, niewykrywalnego w zdrowej skórze [88]. W przebiegu AZS jest ono odpowiedzialne za potęgowanie Th2-zależnej odpowiedzi immunologicznej [89]. Z kolei Kou i wsp. stwierdzili wyższy poziom POSTN w surowicy krwi pacjentów z AZS w porównaniu do chorych na łuszczycę i osób zdrowych, a jej poziom obniżał się po zastosowaniu leczenia. Poziom badanego białka dodatnio korelował z zaawansowaniem i ciężkością przebiegu choroby. Wśród badanych pacjentów z AZS, osoby ze zmianami skórnymi o rozległej lokalizacji oraz u których lichenifikacja zmian dotyczyła powyżej 5% powierzchni ciała cechowały się wyższymi poziomami periostyny niż pozostali chorzy. To samo badanie potwierdziło również zwiększoną ekspresję POSTN w skórze właściwej u tych chorych. Wyższy poziom ekspresji POSTN korelował dodatnio z zaawansowaniem zmian skórnych, tj. w stanach erytrodermii czy lichenifikacji [90].

Twardzina ograniczona (morphea) jest przewlekłą chorobą tkanki łącznej, charakteryzującą się miejscowym włóknieniem skóry, co prowadzi do jej stwardnienia. W większości przypadków proces chorobowy toczy się w skórze, ale może także obejmować mięśnie, powięzi i kości. W macierzy międzykomórkowej zmian skórnych przeważają włókna kolagenowe typu I i III, co spowodowane jest ich nadprodukcją oraz nieprawidłowym procesem degradacji. Ekspresja POSTN w biopsjach skóry zmienionej chorobowo występowała na całej grubości skóry właściwej oraz w tkance podskórnej, w przeciwieństwie do skóry zdrowej, w której POSTN lokalizowała się na granicy skórno-naskórkowej [91].

Pęcherzyca zwykła i pemphigoid to choroby pęcherzowe skóry i/lub błon śluzowych o podłożu autoimmunologicznym. W pęcherzycy wykazano udział przeciwciał klasy IgG, rzadko IgA w destabilizacji połączeń międzykomórkowych obecnych między komórkami naskórka (desmosomów). W obrazie klinicznym obserwuje się nadżerki na błonach śluzowych i/lub skórze oraz pęcherze o wiotkiej pokrywie, wypełnione płynem surowicznym. W przebiegu pemfigoidu zmiany skórne mają formę pęcherzy oraz zmian rumieniowo-obrzękowych. W pemphigoidzie przeciwciała skierowane są przeciwko hemidesmosomom, połączeniom keratynocytów z błoną podstawną naskórka, stąd występujące pęcherze podnaskórkowe mają dobrze napiętą pokrywę i są wypełnione treścią surowiczą, niekiedy krwistą. Fujimura i wsp. wykazali zwiększoną ekspresję POSTN w zmianach skórnych u pacjentów z rozpoznaną pęcherzycą czy pemphigoidem oraz zasugerowali jej rolę w stymulowaniu makrofagów do produkcji czynników prozapalnych [92].

Pokrzywkę spontaniczną może mieć postać ostrą i przewlekłą, w której objawy utrzymują się powyżej 6 tygodni. Bae i wsp. wykazali, że poziom periostyny w surowicy chorych z rozpoznaną pokrzywką przewlekłą był znacząco niższy niż u osób zdrowych. Nie wykazano korelacji poziomu POSTN z interleukiną-13 (IL-13), całkowitym poziomem IgE czy liczbą eozynofiliów. Natomiast stwierdzono istnienie negatywnej korelacji między poziomem ekspresji POSTN a nasileniem objawów choroby. Warto jednak podkreślić fakt, że badanie przeprowadzono na małej grupie chorych, a dodatkowo na wyniki mogło mieć wpływ stosowane przez pacjentów leczenie (leki przeciwhistaminowe). Stąd na podstawie powyższych badań nie można jednoznacznie określić roli POSTN w przebiegu przewlekłej pokrzywki spontanicznej [93].

Ziarniniak grzybiasty (MF; ang. mycosis fungoides) jest najczęstszą postacią chłoniaka pierwotnie skórno T-komórkowego, o przewlekłym i nawrotowym przebiegu. Obraz kliniczny zależy od stadium choroby. W pierwszym stadium, rumieniowym, widoczne są zmiany rumieniowe obejmujące poniżej 10% powierzchni ciała. Stadium naciekowe to grudki i płaskie nacieki. Kolejne stadia wiążą się z gorszym rokowaniem. Może dojść do stanu erythrodermii, gdy zajęte jest powyżej 80% powierzchni ciała lub do stadium guzowatego oraz do uogólnienia procesu chorobowego, w tym zajęcia węzłów chłonnych i narządów wewnętrznych [94]. Badanie IHC uwidocznilo ekspresję POSTN w zmianach skórnych w przebiegu MF wokół fibroblastów w skórze właściwej. W stadium guzowatym tej choroby wykazano słabszą ekspresję POSTN w porównaniu do stadium rumieniowego i naciekowego. Może to sugerować zdolność POSTN do indukowania populacji makrofagów odpowiedzialnych za rozwój nowotworu (TAM; ang. tumor-associated macrophages), a także do produkcji przez nie chemokin (w tym CCL7, CXCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11) i cytokin prozapalnych oddziałujących na komórki nowotworowe w początkowych stadiach [95]

Czerniak (melanoma) jest nowotworem wywodzącym się z neuroektodermalnych komórek melanocytarnych, mającym zdolność do tworzenia przerzutów do węzłów chłonnych oraz formowania przerzutów odległych. Badania IHC wykazały ekspresję POSTN w podścielisku inwazyjnego czerniaka, jak również w węzłach chłonnych objętych przerzutami, natomiast nie obserwowano jej ekspresji w samych komórkach nowotworowych. Badania *in vitro* wykazały aktywujący wpływ POSTN na proliferację komórek nowotworowych poprzez aktywację szlaku sygnałowego MAPK (kinazy aktywowane mitogenami; ang. mitogen activated protein kinases) [96]. Tilman w swoim badaniu wykazał

wyższą ekspresję POSTN w zmianach przerzutowych czerniaka w porównaniu ze zmianą pierwotną. Jednocześnie obserwował też dodatnią korelację poziomu ekspresji POSTN ze stopniem zaawansowania zmiany pierwotnej [97].

Badanie IHC **raka kolczystokomórkowego** wykazało ekspresję periostyny w zrębie nowotworowym, a jej poziom dodatnio korelował ze wzrostem agresywności raka. Nie stwierdzono natomiast ekspresji omawianego markera w samych komórkach rakowych czy keratynocytach [98]. Typ naciekający **raka podstawnkomórkowego** charakteryzuje się gorszym rokowaniem od typu guzkowego i powierzchniowego. Villani opisał w swoim badaniu, udział periostyny w stymulacji proliferacji i inwazji komórek nowotworowych sugerując powstanie postaci naciekającej z innego typu raka podstawnkomórkowego o niższym ryzyku [99].

PODOPLANINA

Odkrycie, budowa i funkcje

Podoplanina (PDPN) jest glikoproteiną transbłonową typu mucynowego o masie 38-kDa, złożoną z 162 aminokwasów, z których tylko 9 tworzy domenę wewnątrzkomórkową [100]. Po raz pierwszy opisana i nazwana została przez Breiteneder-Geleff'a i wsp., którzy w 1997r. wykazali jej obecność w podocytach kłębuszków nerkowych [101]. Opisano ją wówczas jako białko, którego brak odpowiada za patologiczną transformację podocytów skutkującą spłaszczeniem wyrostków stopowatych, a w konsekwencji utratą integralności bariery filtracyjnej prowadzącą do glomerulopatii i proteinurii. Rok wcześniej, Wetterwald opisał homologiczne białko o nazwie E11, biorące udział w procesie różnicowania się osteoblastów w szurzych liniach komórkowych [102]. Inne nazwy białka o budowie odpowiadającej PDPN to glikoproteina 38 (gp38), OST-8, aggrus, antygen PA2.26, RANDAM-2 (retinoic acid-induced neuronal differentiated-associated molecule-2), które wyizolowano m.in. na powierzchni pęcherzyków płucnych typu I, w kłębuszkach nerkowych szczurów czy mysich keratynocytach oraz ludzka glikoproteina 36 (gp36) i T1 α [100]. Jednak dopiero identyfikacja w 2005 r. specyficznego dla ludzkiej podoplaniny, monoklonalnego przeciwciała D2-40 przez Schachta i wsp. umożliwiła poszerzenie spektrum badań nad PDPN, jej występowaniem oraz rolą w ludzkim organizmie, w tym w procesach kancerogenezy [103]. Autorzy ci wykazali obecność PDPN m. in. w komórkach dróg żółciowych, osteocytach, komórkach mioepitelialnych gruczołów piersiowych i ślinowych, miofibroblastach prostaty, pneumocytach typu I, komórkach międzybłonka otrzewnej czy komórkach wyściółki (ependyma). Sporadycznie obserwowano również jej ekspresję w komórkach warstwy podstawnej naskórka, a także w naczyniach limfatycznych.

W warunkach fizjologicznych PDPN odgrywa istotną funkcję w kształtowaniu się płuc oraz układu limfatycznego. Pneumocyty typu I pokrywają 95% powierzchni pęcherzyków płucnych i odpowiedzialne są za wymianę gazową. Podczas embriogenezy i formowania się płuc dochodzi do wzmożonej ekspresji homologicznego do PDPN białka T1 α na powierzchni tych komórek. Badanie Ramirez i wsp. wykazało, że myszy pozbawione T1 α umierały zaraz po porodzie w związku upośledzeniem wymiany gazowej z powodu nieprawidłowej funkcji pneumocytów typu I [104]. PDPN została opisana jako marker specyficzny dla naczyń limfatycznych [105]. Z kolei Schacht i wsp., na modelu zwierzęcym, wykazali, że brak ekspresji PDPN w trakcie embriogenezy skutkuje zaburzeniem rozwoju naczyń limfatycznych u myszy, czego efektem było wystąpienie wrodzonego obrzęku

limfatycznego. Jednocześnie knockout genu PDPN nie wpływał na powstanie naczyń krwionośnych [106]. Podoplanina jest również niezbędna do prawidłowego funkcjonowania kłębuszków nerkowych. Jak wspomniano wcześniej, jej obecność zapewnia odpowiednią morfologię podocytów, zapewniającą prawidłową filtrację kłębuszkową.

Podoplanina w chorobach nowotworowych

Ze zrozumiałych względów, większość badań dotyczących podoplaniny związana jest z jej rolą w nowotworach, zwłaszcza w kancerogenezie oraz powstawaniu przerzutów. W przebiegu procesu nowotworowego może dochodzić do rozwoju nowych naczyń limfatycznych (limfangiogenezy), co z kolei wiąże się z gorszym rokowaniem. Wykazano, że wzrost ekspresji PDPN jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym choroby. Dużą rolę odgrywa w tym budowa PDPN, ponieważ jej zewnątrzkomórkowa domena zawierająca segment PLAG (ang. platelet aggregation-stimulating domain), odpowiada za udział w agregacji płytek krwi. PLAG wiąże się z płytkami poprzez receptor CLLEC-2 (ang. C-type lectin-like receptor 2), a proces ten odbywa się bez udziału osoczowych czynników krzepnięcia [107]. Gay i Felding-Habermann opisali związek między aktywacją płytek krwi i układu krzepnięcia a powstawaniem krwiopochodnych przerzutów nowotworowych [108]. Aktywowane płytki krwi chronią komórki nowotworowe przed limfocytami NK układu immunologicznego, przyczyniając się do ich utrzymania na śródbłonku naczyń, co sprzyja powstawaniu zmian przerzutowych.

W wielu badaniach wykazano udział PDPN w progresji nowotworów poprzez jej udział w przejściu epithelialno-mezenchymalnym. EMT jest procesem zachodzącym zarówno w warunkach fizjologicznych podczas embriogenezy, jak i patologicznych, tj. gojeniu się ran, remodelingu tkanek czy kancerogenezie. Wiąże się ze zmianą fenotypu komórek z nabłonkowego na mezenchymalny i polega na utracie połączeń pomiędzy komórkami, ich polaryzacji, przebudowie cytoszkieletu oraz nabyciu zdolności migracyjnych. W konsekwencji dochodzi do zwiększenia zdolności do migracji i inwazyjności komórek. Ma to szczególne znaczenie w progresji i przerzutowaniu nowotworów. Indukcja EMT wymaga złożonych procesów transkrypcyjnych i uruchomienia szlaków sygnalizacyjnych [109]. Wykazano, że PDPN jest związana z nabywaniem inwazyjnego typu mezenchymalnego przez komórki [110,111]. Stymuluje reorganizację cytoszkieletu aktynowego i zwiększa zdolność komórek do wzrostu migracji komórek nowotworowych, a w konsekwencji do wzrostu ich

inwazyjności i powstawania przerzutów. Jednym z mechanizmów jest jej interakcja z ezryną i moezyną, białkami należącymi do rodziny ERM, odpowiedzialnymi za kotwiczenie białek błonowych w cytoszkielecie aktynowym komórki oraz przekazywanie sygnałów do wnętrza komórkowego [112]. PDPN łącząc się z ezryną i moezyną powoduje ich fosforylację, doprowadzając do zmiany konformacji przestrzennej kompleksu i odsłonięcia miejsc wiązania aktyny i innych białek. Martín-Villar i wsp. udowodnili w swoim badaniu, że indukowane przez PDPN przejście epithelialno-mezenchymalne jest również związane z aktywacją białek z rodziny Rho będących GTP-azami. Do aktywacji Rho dochodzi poprzez wiązanie się z białkami kompleksu ERM, co w konsekwencji prowadzi do fosforylacji kompleksu białek ERM promując EMT. Zmiana fenotypu komórek na mezenchymalny i nabywanie zdolności migracyjnych wiąże się również z indukowanym przez PDPN zmniejszeniem ekspresji E-kadheryn (białek błonowych typowych dla komórek nabłonkowych), odpowiedzialnych za prawidłową adhezję komórek z jednoczesnym wzrostem ekspresji N-kadheryn, nadających komórkom zdolność do migracji [111]. W regulacji adhezji i migracji komórek bierze też udział CD44, przezbłonowa glikoproteina typu I, opisywana w różnych procesach patologicznych, jak np. stany zapalne, gojenie ran czy powstawanie przerzutów. Ekspresję białka CD44 zwiększa jego ligand – kwas hialuronowy, który pobudzając go indukuje liczne szlaki biochemiczne związane m. in. z rozwojem choroby nowotworowej [113]. Martín-Villar i wsp. wykazali iż PDPN i CD44 współdziałają w indukowaniu migracji komórek nowotworowych. W swoim badaniu udowodnili również, że ten proces jest niezależny od interakcji podoplaniny z białkami ERM [114].

Ekspresja PDPN obserwowana jest zarówno w samych komórkach nowotworowych, jak również w komórkach zrębu, w szczególności fibroblastach związanych z nowotworem (CAFs; ang. cancer-associated fibroblasts). CAFs są najliczniejszymi komórkami występującymi w podścielisku guzów nowotworowych. Pod wpływem różnych czynników mogą chronić komórki nowotworowe, mogą również indukować zjawisko chemiooporności komórek nowotworowych oraz brać udział w progresji nowotworowej. CAFs wydzielają czynniki nieustannie stymulujące komórki nowotworowe i indukujące EMT, przez co nowotwór nabiera bardziej agresywnego charakteru. Wśród z tych czynników znajdują się POSTN i PDPN [115]. Zazwyczaj obecność PDPN wiąże się ze złym rokowaniem, jednak w przypadku raka płaskonabłonkowego płuc oraz raka szyjki macicy ekspresja PDPN stanowiła dobry czynnik prognostyczny [116]. Jabour i wsp. potwierdzili obecność PDPN w komórkach raka podstawnokomórkowego skóry (BCC; ang. basal cell carcinoma). Ich

badanie wykazało istotną statystycznie różnicę w zależności od typu histologicznego. Najniższa ekspresja PDPN dotyczyła typu mikroguzkowego i naciekającego, natomiast najwyższa była obserwowana w typie adenoidalnym, co może czynić PDPN możliwym markerem prognostycznym [117]. Większość dostępnych badań dotyczy ekspresji PDPN w raku kolczystokomórkowym (SCC; ang. squamous cell carcinoma), a jej obecność wiąże się z gorszym rokowaniem. Wojciechowska-Zdrojowy i wsp. ocenili poziom ekspresji PDPN w rogowaceniu słonecznym (AK; ang. actinic keratosis), BCC oraz SCC wykazując istotną statystycznie wyższą ekspresję w komórkach rakowych SCC oraz w podścielisku tego nowotworu niż w BCC czy AK. Ekspresja PDPN dodatkowo korelowała także z głębokością naciekania SCC, ocenianą w skali Clarka, co potwierdza jej udział w kancerogenezie i wiąże się z gorszym rokowaniem [118].

Podoplanina w dermatologii

W zdrowej skórze, ekspresję PDPN obserwuje się jedynie w naczyniach limfatycznych, komórkach warstwy podstawnej gruczołów łojowych oraz pochewce zewnętrznej korzenia włosa będącego w fazie anagenu [119]. W stanach patologicznych przebiegających z hiperproliferacją komórek, tj. procesie gojenia się ran czy łuszczycy oraz kancerogenezie i pod wpływem czynników prozapalnych, dochodzi do wzrostu jej ekspresji w komórkach warstwy podstawnej naskórka oraz w fibroblastach skóry właściwej [120]. W przebiegu gojenia się ran, najwyższą ekspresję PDPN obserwuje się w fazie epitelizacji. Pod jej wpływem dochodzi wówczas do zmniejszenia ekspresji E-kadheryn odpowiadających za adhezję komórkową, co stymuluje migrację keratynocytów [119]. W przebiegu łuszczycy dochodzi do zaburzeń immunologicznych z przewagą aktywności odpowiedzi typu Th1, produkcji licznych czynników prozapalnych i w konsekwencji do hiperprolifracji keratynocytów. Honma i wsp. przeprowadzili badanie porównujące ekspresję PDPN w keratynocytach w miejscu zmian chorobowych w zależności od aktywności choroby. Wysoka ekspresja białka dotyczyła zmian z nasiloną hiperproliferacją komórek, charakteryzująca się brakiem warstwy ziarnistej. Zmiany będące w fazie regresji nie wykazywały obecności PDPN. Wyniki dodatkowo korelowały z ekspresją białka Ki-67, co potwierdza udział podoplaniny w procesie proliferacji komórek [121]. Zanotowano również, że ekspresja PDPN w keratynocytach była stymulowana przez TGF- β 1, IFN- γ , IL-6, and IL-22 na drodze różnych szlaków sygnałowych [121]. Podwyższoną ekspresję PDPN wykazano również w ziarniniaku grzybiastym, najczęściej występującym typem skórniego chłoniaka T-

komórkowego. Co istotne, wysoka ekspresja PDPN dodatnio korelowała ze stadiem zaawansowania choroby oraz zajęciem węzłów chłonnych i była związana z krótszym przeżyciem u tych pacjentów. Jankowska-Konsur i wsp. wykazali jej obecność w komórkach warstwy podstawnej naskórka, złośliwych limfocytach oraz naczyniach limfatycznych skóry właściwej zmian objętych procesem chorobowym [122].

ROGOWACENIE SŁONECZNE

Epidemiologia i etiopatogeneza

Rogowacenie słoneczne (AK) jest przewlekłą i postępującą zmianą skórą, rozwijającą się wskutek nieprawidłowej proliferacji keratynocytów. W niektórych przypadkach może wykazywać potencjał transformacji nowotworowej w raka kolczystokomórkowego skóry. Pojęcie „rogowacenie słoneczne” do terminologii medycznej wprowadził Pinkus w 1958 roku. Wcześniej określano je zmianą przedrakową, przedinwazyjną czy rakiem kolczystokomórkowym *in situ*, co wynika z faktu, iż zmiany histopatologiczne nie przekraczają granicy skórno-naskórkowej. Liczne i często stosowane zamiennie nazewnictwo spowodowane jest brakiem jednoznacznego określenia punktu transformacji AK do SCC, można zatem założyć, że rogowacenie słoneczne należy do spektrum ewolucyjnego raka kolczystokomórkowego [123]. Szacuje się, że około 26% ognisk AK ulega regresji w nieznanym dotąd mechanizmie, natomiast 0,025% - 16% ewoluje do zmiany nowotworowej. Ryzyko rośnie u pacjentów z mnogimi ogniskami AK [124,125].

Rogowacenie słoneczne najczęściej dotyczy rasy kaukaskiej, przede wszystkim osób o fototypie I oraz II oraz osób szczególnie narażonych na promieniowanie słoneczne. Szacuje się, że u 11-25% mieszkańców półkuli północnej dojdzie do rozwoju ogniska rogowacenia słonecznego [126]. Kolejnym ważnym czynnikiem determinującym rozwój AK jest wiek. Obserwowany jest znaczący wzrost rozpoznawalności wraz z wiekiem. Dodatkowymi czynnikami ryzyka są immunosupresja oraz wcześniej rozpoznane już zmiany AK czy niemelanocytowe raki skóry

Oprócz czynników indywidualnych i genetycznych, w patogenezie AK główną rolę odgrywa promieniowanie słoneczne. Nadmierna i przewlekła ekspozycja na promieniowanie UV uszkadza DNA keratynocytów, prowadząc do powstawania mutacji w obrębie białek supresorowych i regulatorowych, przede wszystkim inaktywacji białka p53, co promuje procesy kancerogenezy. Mutacja w genie supresorowym p53 została wykryta w 30%-50% przypadkach analizowanych zmian AK. Promieniowanie UVB jednocześnie osłabia odpowiedź immunologiczną w skórze, skutkując upośledzeniem apoptozy i obniżeniem zdolności ochronnej organizmu względem czynnika sprawczego [127,128,129]. Występowanie licznych ognisk AK oznacza osiągnięcie przez pacjenta krytycznej dawki promieniowania UV i jest wskazaniem do częstych i regularnych kontroli celem wczesnego rozpoznania ewentualnego raka podstawno-, oraz kolczystokomórkowego, a także czerniaka.

W powstaniu wszystkich wymienionych nowotworów rola promieniowania UV jest kluczowa [130].

Obraz histopatologiczny

Obraz histopatologiczny zależy od stadium zaawansowania zmiany oraz od typu histologicznego. Wyróżnia się sześć odmian AK, a wspólnymi cechami dla wszystkich zmian są dysplazja i atypowe keratynocyty z hiperchromatycznymi i pleomorficznymi jądrami widocznymi we wszystkich warstwach naskórka, liczne podziały mitotyczne z nieprawidłowym procesem różnicowania oraz akantozą. Dodatkowo stwierdza się hiperkeratozę warstwy rogowej naskórka z ogniskową ortokeratozą i parakeratozą. W skórze właściwej stwierdza się różnie obfite nacieki limfocytarno-histiocytarne [129,131]. Biorąc pod uwagę obraz kliniczny oraz histopatologiczny, Cockerell zaproponował klasyfikację KIN (ang. keratotic intraepithelial neoplasia) analogiczną do innych nowotworów nabłonkowych:

1. Stadium I AK (KIN I), najwcześniejsze, charakteryzujące się jedynie drobnymi, płaskimi plamkami, bez cech hiperkeratozy. Histologicznie nie stwierdza się nieprawidłowości oprócz pojedynczych zmian kształtu jąder komórkowych.
2. Stadium II AK (KIN II). Zmiana staje się bardziej rogowaciejąca na podłożu różowo-czerwonym. W obrazie histologicznym dominuje nadmierna proliferacja keratynocytów, zlokalizowana zwykle w dolnych warstwach naskórka.
3. Stadium III (KIN III). Zmiana jest hiperkeratotyczna, czasami nawet obserwowane są strupy na skórze mocno uszkodzonej przez promieniowanie UV. Badanie histopatologiczne uwidacznia proliferację atypowych keratynocytów na całej grubości naskórka. Komórki charakteryzują się mocno zmienioną morfologią, dochodzi do nieprawidłowych podziałów mitotycznych [132,133].

NIEMELANOCYTOWE RAKI SKÓRY

Niemelanocytowe raki skóry (NMSC; ang. nonmelanoma skin cancer) są najczęściej rozpoznawanymi nowotworami w populacji rasy kaukaskiej. Należy do nich rak podstawnokomórkowy (BCC) oraz rak kolczystokomórkowy (SCC) [134]. Brak jest światowych danych dotyczących częstości występowania NMSC, ale szacuje się ciągły wzrost zachorowalności na te nowotwory. W Stanach Zjednoczonych w 2012 roku zostało rozpoznanych i leczonych ponad 5,4 mln przypadków. Na przestrzeni lat 2006-2012 w USA zaobserwowano wzrost procedur medycznych związanych z niemelanocytowymi rakami skóry o 13% [135]. Wśród niemelanocytowych raków skóry, BCC jest najczęstszą zmianą złośliwą (75-80%), z kolei SCC stanowi 15-20% NMSC, a pozostałe postacie stanowią niewielki ich odsetek. W Polsce ryzyko zachorowania na NMSC w ciągu życia przekracza 20% [136]. W opublikowanych w 2021 r. badaniach retrospektywnych, dotyczących występowania NMSC w Polsce na przestrzeni lat 1999-2019 przedstawiono stały wzrost zachorowań na NMSC. U 23% chorych rozpoznano więcej niż jedną zmianę nowotworową. Ze wszystkich zmian NMSC 85,2% stanowił BCC, a wśród jego typów dominował typ guzkowy. Typ powierzchniowy częściej występował w okolicach nieeksponowanych na słońce [137].

RAK PODSTAWNOKOMÓRKOWY

Epidemiologia i etiopatogeneza

Rak podstawnokomórkowy (BCC) w 80% zlokalizowany jest na skórze głowy i szyi. Jest to wolno rosnący guz pochodzenia naskórkowego, rozwijający się z komórek warstwy postawnej naskórka. W przypadku BCC zwykle nie dochodzi do rozwoju odległych przerzutów, jednak ma zdolność do miejscowego naciekania i w stadiach zaawansowanych może prowadzić do destrukcji i deformacji otaczających tkanek, w tym nawet struktur chrzęstnych i kostnych, co znacznie obniża jakość życia pacjentów i niekiedy upośledza funkcjonowanie [138]. Na bardziej agresywny przebieg BCC narażeni są pacjenci w trakcie leczenia immunosupresyjnego bądź z genetyczną predyspozycją [139].

Na powstanie zmiany nowotworowej mają wpływ czynniki środowiskowe, fenotypowe i genetyczne. Najważniejszym czynnikiem ryzyka powstania BCC jest ekspozycja na promieniowanie UV, zarówno słoneczne jak i sztuczne, tj. urządzenia emitujące

UV. Najbardziej narażone są osoby o jasnej karnacji ze sporadycznymi, ale intensywnymi ekspozycjami na UV oraz osoby, które doświadczyły oparzeń słonecznych w dzieciństwie [140]. Rola promieniowania UV w procesie kancerogenezy dotyczy powodowania mutacji w genach supresorowych *TP53* (kodujący białko p53), *PTCH* (ang. protein patched homolog) i *PTEN* (ang. phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), a także upośledzenia funkcjonowania układu immunologicznego i uwolnienia z keratynocytów głównie interleukiny 6 (IL-6) i TNF-alfa oraz aktywacji stresu oksydacyjnego. Zmiany te pośrednio i bezpośrednio uszkodzają komórki naskórka i stymulują ich transformację nowotworową [141,142]. W czasie rozwoju embrionalnego szlak *hedgehog* odpowiada za prawidłową proliferację, różnicowanie komórek i tkanek, a w organizmie dorosłym reguluje procesy naprawcze i regeneracyjne. W sporadycznych postaciach BCC szlak *hedgehog-PTCH-SMO-Gli* odgrywa kluczową rolę, ponieważ dochodzi do jego nadmiernej aktywacji poprzez inaktywację receptora *PTCH1* (*Patched1*) (w 90% przypadków) lub poprzez onkogeną aktywację receptora *SMO* (*Smoothed*) (w 10%). Analizy powyższych mutacji doprowadziły do powstania terapii celowanych i nowych możliwości terapeutycznych [143,144]. Osobną grupę ryzyka stanowią osoby o fototypie I i II wg Fitzpatricka. Większą czujność należy zachować u pacjentów z immunosupresją, w trakcie radioterapii, zakażonych onkogennymi typami wirusa brodawczaka ludzkiego oraz narażonych na czynniki kancerogenne, a także u osób z dodatnim wywiadem w kierunku raków skóry w przeszłości. U około 40-50% pacjentów, u których zostało zdiagnozowane pierwotne ognisko BCC, istnieje zwiększone ryzyko rozwoju następnych zmian BCC w kolejnych 5 latach i wzrasta z każdym następnym rozpoznaniem BCC [145]. Do genetycznych czynników ryzyka rozwoju BCC należy zespół Gorlina – Goltza (ang. nevoid basal cell carcinoma syndrome), skóra pergaminowata barwnikowa (*xeroderma pigmentosum*), pęcherzowe oddzielanie się naskórka, zespół Fergusona-Smitha, zespół Muira-Torre'a, zespół Bazexa i zespół Rombo [143,145].

Metody diagnostyczne – obraz kliniczny i histopatologiczny

Rozpoznanie BCC ustala się na podstawie obrazu klinicznego, dermatoskopowego oraz histologicznego. Cechy charakterystyczne wyróżnia się w zależności od typu BCC. Najczęściej występujący typ guzkowy to błyszcząca, perłowa grudka lub guzek z dobrze widocznymi drzewkowatymi naczyniami, często z obecną nadżerką i uniesionymi brzegami. W większości przypadków występuje na głowie i szyi. Drugi co do częstości występowania to

typ powierzchniowy BCC. Jest to dobrze odgraniczona różowo-czerwona blaszka, niekiedy pokryta strupem, lokalizująca się zazwyczaj na ramionach, klatce piersiowej czy plecach. W niektórych podtypach BCC, szczególnie guzkowym i powierzchniowym mogą być widoczne komórki barwnikowe charakterystyczne dla odmiany barwnikowej BCC. Pozostałe, rzadziej występujące typy, ale jednocześnie bardziej agresywne to BCC twardzinopodobny i naciekający. Postać twardzinopodobna ma charakter słabo odgraniczonej, czerwonej lub jasnej połyskującej blaszki mogącej przypominać bliznę. Typ naciekający zazwyczaj współistnieje z inną odmianą już występującą, najczęściej typem guzkowym. W obrazie histopatologicznym BCC obserwuje się gniazda nabłonkowych komórek o morfologii komórek warstwy podstawnej naskórka (bazaloidalnych), z cechami atypii jądrowej i cytoplazmatycznej, z nieprawidłowymi cechami podziałów komórkowych, często ograniczone do warstwy brodawkowatej skóry. W sąsiedztwie dominuje naciek zapalny oraz włóknienie podścieliska łącznotkankowego. W niektórych przypadkach widoczne jest owrzodzenie [143,145].

RAK KOLCZYSTOKOMÓRKOWY

Epidemiologia i etiopatogeneza

Inwazyjny rak kolczystokomórkowy (SCC) jest zmianą złośliwą, drugą co do częstotliwości występowania wśród wszystkich nowotworów skóry. Wywodzi się z komórek rogowaciejących warstwy kolczystej naskórka [146]. Podobnie jak BCC, w większości przypadków jest miejscowo złośliwy, jednak w 4 % może dawać przerzuty, najczęściej do węzłów chłonnych. 10-letnie przeżycie sięga 90%, natomiast znacznie spada w przypadku powstania przerzutów [147]. Najważniejszymi czynnikami ryzyka powstania SCC są wiek, immunosupresja, jasny fototyp skóry, nadmierna ekspozycja na promieniowanie słoneczne, infekcje onkogennymi wirusami HPV, narażenie na substancje kancerogenne oraz wywiad onkologiczny w kierunku innych raków skóry i stanów przedrakowych. Może też powstawać w bliznach poparzeniowych czy miejscach występowania przewlekłego stanu zapalnego [146]. Wyniki badań przeprowadzonych przez Marksa i wsp., wykazały, że większość SCC rozpoznanych na skórze przewlekle ekspozowanej na promieniowanie słoneczne rozwinęła się z uprzednio istniejącego rogowacenia słonecznego [148]. W przeciwieństwie do BCC, intensywna ekspozycja na słońce w dzieciństwie nie ma istotnego znaczenia dla rozwoju SCC w dorosłym życiu. Wydaje się, że na ryzyko powstania SCC ma wpływ przewlekle narażenie na UV (np. zawodowe) w 10-letnim okresie poprzedzającym rozpoznanie [149]. Na poziomie

molekularnym, główną rolę w kancerogenezie odgrywa mutacja w genie supresorowym *TP53*, obecna w większości przypadków SCC (54% - 95%). Jest ona prowokowana przez promieniowanie UV, głównie UVB. Mutacja ta jest obserwowana w 75-90% ognisk rogowacenia słonecznego, które najczęściej staje się miejscem transformacji nowotworowej do SCC. Białko p53 odpowiada za regulację cyklu komórkowego oraz indukcję procesu apoptozy, dlatego przy jego mutacji dochodzi do ciągłego i nieprawidłowego dzielenia się komórek posiadających inne zaburzenia w genomie [150,151].

Metody diagnostyczne – obraz kliniczny i histopatologiczny

Predysponowane okolice występowania raka koleczystokomórkowego to szczególnie okolice ekspozowane na promieniowanie słoneczne, ale SCC może lokalizować się na skórze całego ciała oraz błonach śluzowych. Inwazyjny SCC występuje zarówno pod postacią wolno rosnącego, o niskim ryzyku przerzutów, dobrze reagującego na leczenie, jak i agresywnego, przerzutującego, o głębokim stopniu inwazji do tkanek głębokich, co nie pozwala na wyleczenie SCC metodami chirurgicznymi czy radioterapią [152,153]. Obraz kliniczny wczesnej, minimalnie inwazyjnej zmiany przedstawia rumieniową blaszkę, niekiedy o hiperkeratotycznej powierzchni. W późniejszych formach, dobrze zróżnicowanych obserwuje się dobrze odgraniczony guzek lub guz, o uniesionych brzegach, z widocznym rogowaceniem lub nadżerkami. Postacie słabo zróżnicowane mogą przybierać formę krwotocznych, nawet z obszarami martwicy, mocno naciekających guzów. Rozrost atypowych keratynocytów ograniczony do naskórka, nie przekraczający granicy skórno-naskórkowej charakteryzuje raka koleczystokomórkowego *in situ*. W przypadku występowania SCC *in situ* na błonach śluzowych okolicy genitalnej mówimy o erytroplazji Queyrata [146]. Odmiany morfologiczne inwazyjnego SCC to rak brodawkowy – dobrze zróżnicowany, o niskim stopniu złośliwości, powolnym wzroście, postać wrzodziejąca - silnie naciekająca, bujająca - egzofitycznie rosnący guz oraz postać rogowaciejąca [154]. Odmiana SCC rozwijająca się na podłożu blizn, najczęściej pooparzeniowych, czy przewlekle niegojących się ran określa się jako owrzodzenie Marjolina. Przebiega ono agresywniej niż pozostałe postacie i stanowi 2% - 5% wszystkich SCC [155].

Powszechnie używaną klasyfikacją do oceny stopnia zaawansowania raka koleczystokomórkowego jest klasyfikacja TNM zaproponowana przez American Joint Committee on Cancer (AJCC) oraz the International Union Against Cancer (UICC), jednak ma swoje ograniczenia, ponieważ dotyczy jedynie nowotworów zlokalizowanych na głowie

i szyi. Najnowsze, 8. wydanie zostało opublikowane w 2017 roku. Opiera się ono na ocenie guza pierwotnego (T - tumor), regionalnych węzłów chłonnych (N – nodes) i odległych przerzutów (M – metastasis). Zmiany w stadium T2 i wyższym (o średnicy większej bądź równej 2 cm) określane są jako SCC o wysokim ryzyku i gorszym rokowaniu. [156,157,158,159,160]. Alternatywną klasyfikacją jest skala Brigham and Women's Hospital, 2013 (BWH), która w swojej ocenie nie uwzględnia kryterium zajęcia węzłów chłonnych ani występowania odległych przerzutów. Zaletą tej klasyfikacji w porównaniu ze skalą AJCC jest fakt, że na równi z rozmiarem guza stawia też inne czynniki złego rokowania oraz zakłada możliwość przerzutowania zmian nowotworowych mniejszych niż 2 cm. Do cech wysokiego ryzyka należą: średnica guza >2cm, słabo zróżnicowane komórki nowotworowe w obrazie histologicznym, naciekanie struktur nerwowych >0.1mm oraz inwazja zmiany poza tkankę podskórną. Naciekanie struktur kostnych jest równoważne ze stadium T3, niezależnie od innych cech [161,162].

W obrazie histopatologicznym SCC w górnych warstwach naskórka występują cechy niepełnego rogowacenie (parakeratozy). We wczesnych stadiach inwazyjnego SCC widoczne są duże, atypowe keratynocyty posiadające obfitą, kwasochłonną cytoplazmę i wyraźnie powiększone jądra komórkowe, obecne na całej grubości naskórka, wnikające do skóry właściwej owalnymi guzkami lub językami nabłonka. Możliwa jest obecność tzw. pereł rakowych świadczących o nieprawidłowym rogowaceniu w dolnych częściach utkania guza. Im mniej zróżnicowany nowotwór, tym stopień rogowacenia jest mniejszy. W postaciach słabo zróżnicowanych atypowe keratynocyty posiadają pleomorficzne jądra komórkowe i częste podziały mitotyczne, a wokół komórek nowotworowych jest obecny odczyn zapalny [163,146]. Badanie histopatologiczne pozwala jednocześnie na ocenę stopnia zróżnicowania komórkowego, głębokość naciekania (określana w mm), ocenę głębokości naciekania poszczególnych warstw skóry w klasyfikacji Clarka, ocenę marginesów a także ewentualne naciekanie na sąsiednie struktury limfatyczne, nerwowe czy naczyniowe.

3. CELE PRACY

Raki skóry są najczęściej występującymi nowotworami u ludzi i dlatego stanowią bardzo ważny problem kliniczny. Liczba pacjentów dotkniętych zarówno czerniakiem, jak i niemelanocytowymi nowotworami skóry wzrasta z roku na rok. Raki skóry stały się schorzeniem cywilizacyjnym. Ekspozycja na promieniowanie UV jest uznanym czynnikiem etiologicznym chorób nowotworowych skóry. Raki niemelanocytowe skóry stanowią bardzo szerokie spektrum kliniczne zmian skóry, zaczynając od ogniskowych zmian przedrakowych (m. in. rogowacenie słoneczne), a kończąc na raku podstawnkomórkowym i kolczystokomórkowym. Pomimo tak częstego występowania klinicznego raków niemelanocytowych skóry, nadal brakuje wielu danych o ich specyficznych, molekularnych markerach ich aktywności biologicznej. Raki niemelanocytowe skóry są nowotworami w pełni wyleczalnymi, o ile rozpoznanie i wdrożenie leczenia (gł. radykalne leczenie chirurgiczne) będzie miało miejsce w ich wczesnym stadium.

Ze względu na budowę histologiczną skóry, w której występują nie tylko komórki nabłonkowe lecz również bogate podścielisko łącznotkankowe oraz na opisywaną w innych narządach rolę iryzyny i periostyny w przebudowie tkanek, a także w kancerogenezie, podjęłam się badań dotyczących ekspresji tych białek w wybranych zmianach łagodnych oraz nowotworowych skóry. Tym bardziej, że zgodnie z danymi z literatury, iryzyna i periostyna przypuszczalnie działają na komórki docelowe w wyniku aktywacji tych samych receptorów. Dotychczas ich udział w schorzeniach dermatologicznych był przedmiotem bardzo nielicznych doniesień, a ich wyniki są niejednoznaczne. Z kolei podoplanina jest białkiem, biorącym udział m. in. w transformacji nowotworowej oraz migracji komórek, a także jest uznanym markerem naczyń limfatycznych pełniących rolę w przerzutowaniu komórek nowotworowych. Mimo, iż w dostępnym piśmiennictwie istnieją nieliczne publikacje na temat ekspresji podoplaniny w zmianach łagodnych oraz rakach skóry, brakuje jednak badań dotyczących potencjalnych korelacji ekspresji podoplaniny z ekspresją iryzyny i periostyny. Tym bardziej, że wszystkie badane przeze mnie białka mogą pełnić podobne role w procesie nowotworowym. Poszukiwanie markerów aktywności biologicznej w tak częstych schorzeniach jakim są niemelanocytowe nowotwory skóry wydaje się więc być w pełni uzasadnione.

Biorąc pod uwagę powyższe dane głównym celem podjętych przeze mnie badań było zbadanie występowania iryzyny, periostyny oraz podoplaniny oraz określenie ich wzajemnej korelacji w niemelanocytowych zmianach łagodnych i rakach skóry.

W tym celu wyznaczyłam dwa cele szczegółowe:

1. Określenie lokalizacji oraz poziomu ekspresji iryzyny, periostyny oraz podoplaniny w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnokomórkowym i raku kolczystokomórkowym.
2. Analizę korelacji ekspresji iryzyny, periostyny oraz podoplaniny z ekspresją antygenu proliferacyjnego Ki-67 oraz danymi klinicznymi w badanych przypadkach

4. MATERIAŁ I METODY

Grupa badana

Materiał do badań stanowiły archiwalne bloczki parafinowe pochodzące od 196 pacjentów z rozpoznaniem i potwierdzonym badaniem histopatologicznym rógowaceniem słonecznym, rakiem podstawnokomórkowym oraz rakiem kolczystokomórkowym. Materiał pochodził od pacjentów z Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii we Wrocławiu z lat 2013 - 2019.

Dane kliniczne ustalono na podstawie archiwalnej dokumentacji medycznej zakwalifikowanych do badania pacjentów. Szczegółowa charakterystyka kliniczno-patologiczna obejmowała następujące parametry: rozpoznanie kliniczne na podstawie wyniku badania histopatologicznego, wiek, płeć pacjentów, lokalizację guza (w tym czy dana okolica była ekspozycja na promieniowanie słoneczne) czas trwania choroby oraz głębokość nacieku w przypadku raka kolczystokomórkowego.

Badaną grupę stanowiło łącznie 196 przypadków, w tym 42 przypadki AK, 104 przypadki BCC oraz 50 przypadków SCC.

Grupa AK obejmowała 42 przypadki, wśród których 30 (71,43%) pochodziły od kobiet, a pozostałe 12 (28,57%) od mężczyzn. Wiek pacjentów wynosił od 39 do 87 lat (średnio $70,9 \pm 12,39$). Średni czas trwania choroby to $1,97 \pm 2,31$ lat. Zmiany chorobowe w 80,95% lokalizowały się na skórze ekspozycji na UV, pozostałe 19,05% na obszarach osłoniętych skóry.

W grupie z rozpoznaniem BCC wśród 104 przypadków 56 (53,85%) stanowiły kobiety, a 48 (46,15%) mężczyźni. Wiek pacjentów wynosił od 37 do 99 lat (średnio $71,28 \pm 12,6$ lata). Czas trwania choroby do momentu usunięcia zmiany nowotworowej wynosił średnio $1,91 \pm 1,88$ roku. Zmiany chorobowe lokalizowały się najczęściej na skórze ekspozycji na promieniowanie słoneczne (76,92% przypadków).

Wśród pacjentów z SCC mężczyźni stanowili 32 osoby (64%), a kobiety 18 (36%). Wiek chorych zawierał się w granicach 55-99 lat (średnio $79,68 \pm 9,33$). Czas trwania choroby wynosił średnio $1,62 \pm 1,57$ roku. Większość, tj. 98,04% zmian SCC była zlokalizowana na skórze narażonej na działanie promieniowania słonecznego, a tylko jedna zmiana znajdowała się na obszarze skóry nieekspozycji na UV. Średnia głębokość nacieku SCC wynosiła $4,16 \pm 3,46$.

Prowadzone badania uzyskały pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (opinia Komisji Bioetycznej nr KB - 100/2021)

Metody

Reakcje immunohistochemiczne (IHC)

Materiał zarchiwizowany w bloczkach parafinowych pokrojono na skrawki grubości 4 μm , które następnie były gotowane w temperaturze 97°C w aparacie PTLINK (Dako, Dania) w buforze EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (dla iryzyny, periostyny i podoplaniny) lub w buforze EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (dla przeciwciała Ki-67) przez 20 minut celem deparafinizacji, uwodnienia oraz odsłonięcia determinant antygenowych. Kolejnym etapem było studzenie, którego dokonano za pomocą buforu płuczącego Wash Buffer (bufor TBS z Tween 20). Właściwe reakcje IHC przeprowadzono w aparacie AutostainerLink 48 (Dako, Dania) z zastosowaniem systemu do wizualizacji En Vision FLEX+, Mouse, High pH (Link). Zablockowano aktywność endogennej peroksydazy przy pomocy odczynnika EnVision FLEX Peroxidase Blochking Reagent (5 minut, temperatura pokojowa). Następnie, przepłukane preparaty w buforze płuczącym, poddano 60-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej z pierwszorzędowymi przeciwciałami przeciwko iryzynie (królicze, poliklonalne przeciwciało, nr kat. NBP2-14024, 1:100, Novus Biologicals, Minnesota, Stany Zjednoczone) oraz 20-minutowej inkubacji w przypadku periostyny (królicze, poliklonalne przeciwciało, 1:100, Novus Biologicals), podoplaniny (mysie, monoklonalne przeciwciało, nr kat. IR072, klon D2-40, ready-to-use, Dako) oraz Ki-67 (mysie, monoklonalne przeciwciało, nr kat. IR626, klon MIB-1, ready-to-use, Dako). Celem usunięcia nadmiaru przeciwciał preparaty przepłukano za pomocą Wash Buffer. Tak przygotowane preparaty poddano 20-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej z drugorzędowym przeciwciałem sprzężonym z peroksydazą chrzanową (EnVision FLEX/HRP). Kolejnym etapem było przepłukanie w buforze płuczającym i dodanie tetrachlorowodoru 3,3'-diaminobenzyny (DAB), będącym substratem dla peroksydazy chrzanowej. Całość inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Celem całkowitego usunięcia resztek odczynnika, dwukrotnie przepłukano preparaty w buforze płuczającym. Następnie wykonano barwienie kontrastujące hematoksyliną (EnVision FLEX Hematoxylin) przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Ostatniego płukania dokonano przy użyciu wody destylowanej. Odwodnienie materiału uzyskano poprzez 5-minutowe kąpiele

w szeregu alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu (70, 96 i 99,8%) w temperaturze pokojowej, a następnie przeprowadzono je przez 5 minut przez ksylen również w temperaturze pokojowej. Preparaty zabezpieczono szkiełkiem nakrywkowym w aparacie Coverslipper żywicą syntetyczną Dako Mounting Medium (Dako, Dania).

Ocena nasilenia reakcji immunohistochemicznych

Preparaty, z uzyskaną reakcją przy użyciu metody immunohistochemicznej, oceniano przy pomocy mikroskopu optycznego Olympus BX41. Zastosowano powiększenia 100x, 200x oraz 400x.

W zależności od lokalizacji ekspresji badanych antygenów stosowano odmienne metody oceny jej nasilenia. Nasilenie reakcji immunohistochemicznej dla iryzyiny, periostyny oraz podoplaniny zostało ocenione za pomocą skali IRS (Immunoreactive Score) wg Remmele i Stegner [164] przedstawioną w Tabeli 1. W preparatach oceniany był odsetek komórek nowotworowych i/lub komórek podścieliska wykazujących pozytywną reakcję w stosunku do wszystkich komórek nowotworowych oraz intensywność reakcji barwnej. Ostatecznym wynikiem był iloczyn tych dwóch wartości, dający wskaźnik IRS.

Odsetek pozytywnych komórek (%)		Intensywność reakcji barwnej	
0	0 pkt	Brak reakcji barwnej	0 pkt
<10	1 pkt	Słaba	1 pkt
10 – 50	2 pkt	Średnia	2 pkt
51 – 80	3 pkt	Silna	3 pkt
>80	4 pkt		

Ilość uzyskanych punktów	Interpretacja wyniku
0 – 1	Negatywny
2 – 3	Pozytywny: słaba ekspresja
4 – 8	Pozytywny: średnia ekspresja
9 – 12	Pozytywny : silna ekspresja

Tabela 1. Skala IRS wg Remmele i Stegner

Ekspresję antygenu Ki-67 oceniano licząc liczbę pozytywnych jąder komórkowych raka w stosunku do wszystkich komórek nowotworowych według skali przedstawionej w Tabeli 2.

Odsetek komórkowych (%)	pozytywnych jąder	Wartość punktowa
0		0 pkt
1 – 10		1 pkt
11 – 25		2 pkt
26 – 50		3 pkt
51 – 100		4 pkt

Tabela 2. Skala nasilenia ekspresji Ki-67

Dokumentację fotograficzną wykonano stosując program SlideViewer (3D HISTECH, Węgry).

Analiza statystyczna

Wyniki badań zostały zebrane w arkuszu kalkulacyjnym Excel, a następnie poddane analizie statystycznej przy użyciu programu Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, Kalifornia, USA) i STATISTICA 10 (StatSoft Inc. Tulsa, Oklahoma, USA). W celu określenia rozkładu badanych cech ilościowych wykorzystany został test Kołmogorowa-Smirnowa, a różnice pomiędzy średnimi w grupach były porównane za pomocą testu t-Studenta lub Manna Whitneya (dla porównania cechy w dwóch grupach) oraz ANOVA lub testem Kruskala Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunna (dla więcej niż dwóch grup). Cechy jakościowe w poszczególnych grupach porównane zostały za pomocą testu Chi-kwadrat oraz testu Fischera. Dla porównania badanej cechy w różnych grupach, w różnym czasie była wykorzystana wielowymiarowa analiza wariancji (MANOVA). Dodatkowo zastosowany został test Pearsona i Spearmana do analizy istniejących korelacji.

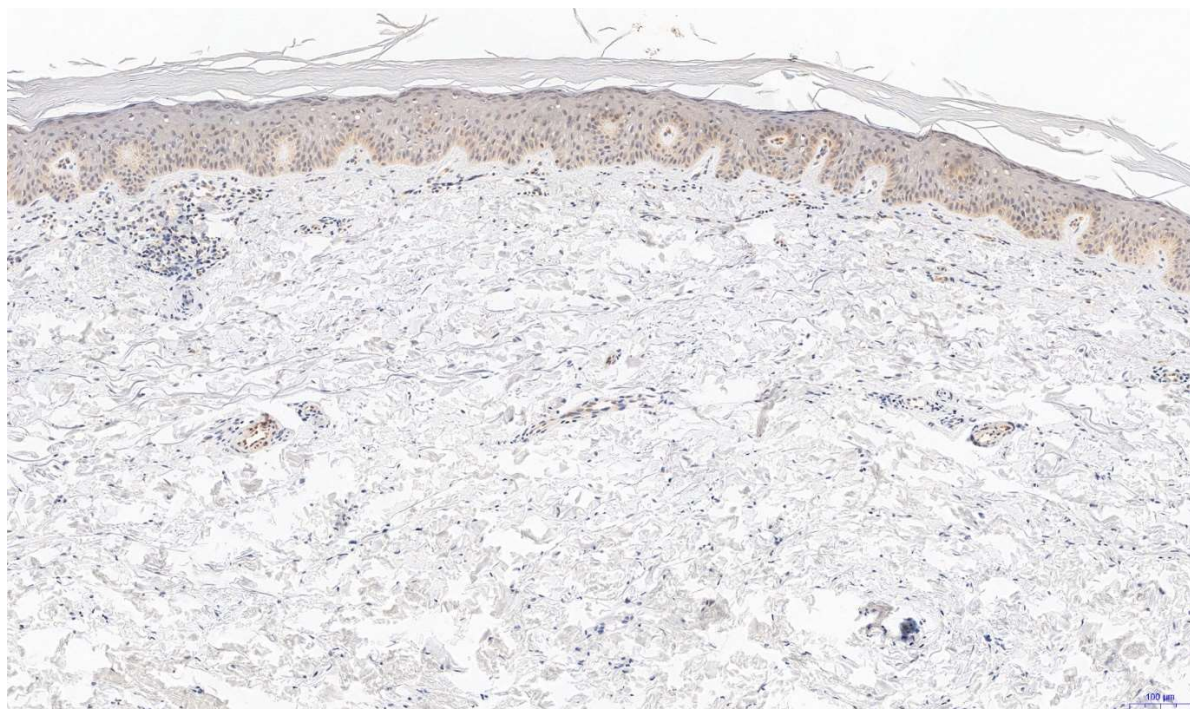
W zastosowanych testach statystycznych wartości testów i współczynników na poziomie $p < 0,05$ zostały przyjęte za statystycznie istotne. Prezentacja danych została przygotowana w oparciu o tabele i wykresy.

5. WYNIKI

Ekspresja iryzyny, periostyny, podoplaniny oraz Ki-67 w rogowaceniu słonecznym

Ekspresja iryzyny w rogowaceniu słonecznym

Analizę ekspresji iryzyny w AK przeprowadzono na 40 przypadkach. Pozytywną ekspresję iryzyny obserwowano w 39 przypadkach (97,5%) co przedstawiono na Rycinie 1. Ekspresję iryzyny obserwowano w komórkach ognisk rogowacenia słonecznego oraz w komórkach warstwy podstawnej naskórka. Średni poziom ekspresji iryzyny oceniony wg skali IRS wynosił $4,075 \pm 2,464$. Słabe natężenie reakcji zaobserwowano w 19 przypadkach (45,5%), średnie natężenie w 18 przypadkach (45%), a duże w 2 przypadkach (5%). Brak reakcji występował w 1 przypadku (2,5%).

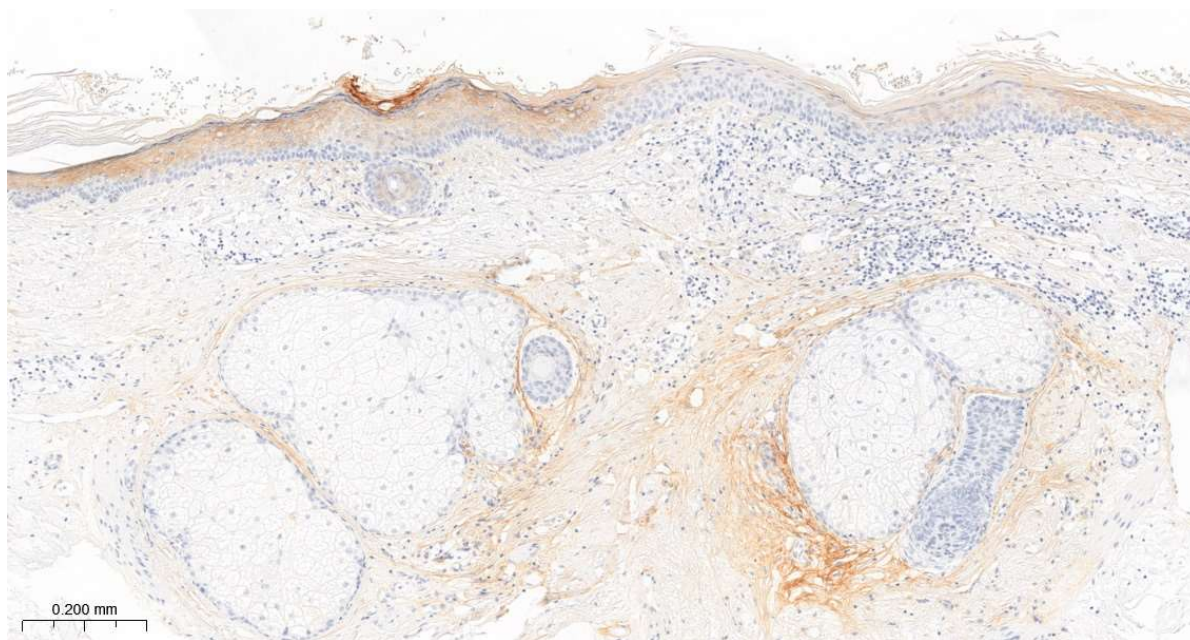


Rycina 1. Ekspresja IHC iryzyny w komórkach ognisk rogowacenia słonecznego oraz w komórkach warstwy podstawnej naskórka (powiększenie 100x).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między ekspresją iryzyny w AK u pacjentów w zależności od płci ($p=0,4056$), wieku ($p=0,9465$), lokalizacji w zależności od ekspozycji na promieniowanie UV ($p=0,4133$) czy czasu trwania choroby ($p=0,0737$).

Ekspresja periostyny w rógowaceniu słonecznym

Ekspresja periostyny oceniana była w 42 przypadków AK. Ekspresję periostyny obserwowano w podścielisku łącznotkankowym rógowacenia słonecznego. Średni poziom ekspresji periostyny oceniony wg skali IRS wynosił $3,095 \pm 2,387$. Pozytywną ekspresję periostyny w AK obserwowano w 31 przypadkach (73,8%), co przedstawiono na Rycinie 2. W 19 przypadkach (45,2%) stwierdzono słabe natężenie reakcji, w 11 przypadkach (26,2%) średnie natężenie, a w jednym przypadku (2,4%) silne. Brak reakcji obserwowano w 11 przypadkach (26,2%).

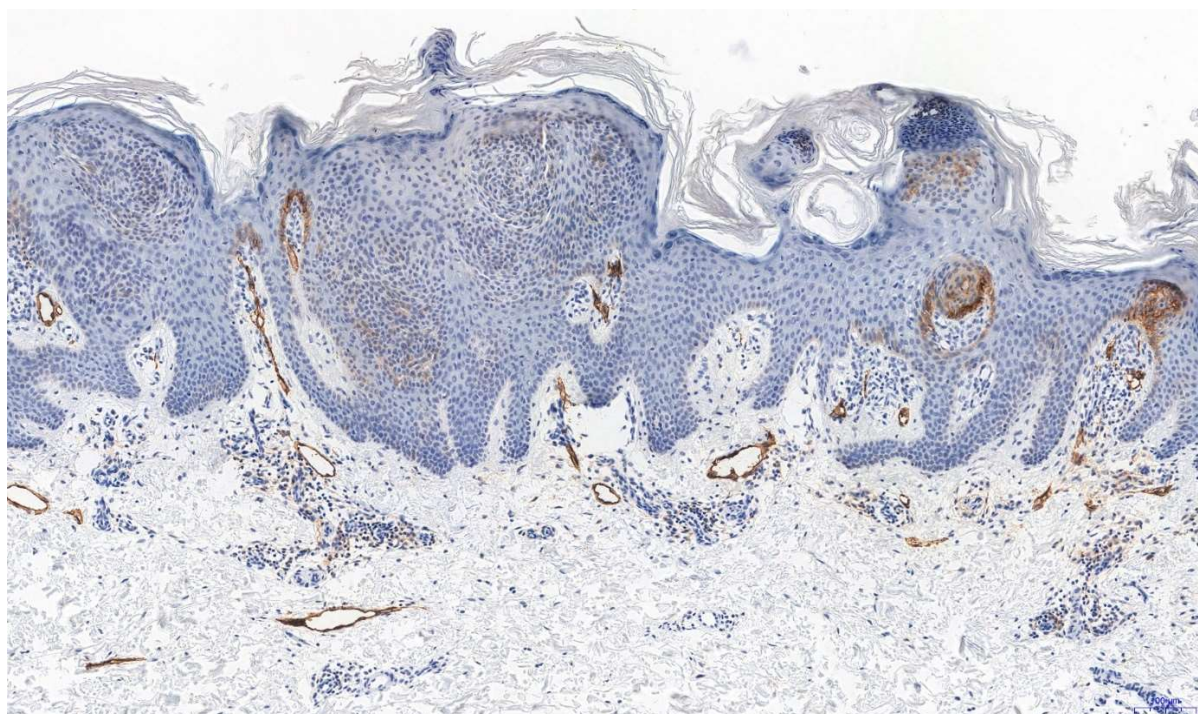


Rycina 2. Ekspresja IHC periostyny w podścielisku łącznotkankowym rógowacenia słonecznego (powiększenie 100x).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między ekspresją periostyny w AK u pacjentów w zależności od płci ($p=1$), lokalizacji w zależności od ekspozycji na UV ($p=1$), wieku ($p=0,2136$) czy czasu trwania choroby ($p=0,5097$).

Ekspresja podoplaniny w rógowaceniu słonecznym

Analizę ekspresji podoplaniny w AK przeprowadzono na 38 przypadkach. Pozytywną ekspresję podoplaniny obserwowano w cytoplazmie oraz błonie komórek ognisk rógowacenia słonecznego, a także w naczyniach limfatycznych. Pozytywną ekspresję podoplaniny obserwowano jedynie w 7 przypadkach (18,42%) co przedstawiono na Rycinie 3. W 31 przypadkach (81,58%) odnotowano brak reakcji. Średni poziom ekspresji podoplaniny oceniony wg skali IRS wynosił $0,92 \pm 1,42$. Słabe nasilenie reakcji zaobserwowano w 3 przypadkach (7,89%), średnie w 4 przypadkach (10,53%), a silnego nie obserwowano w żadnym przypadku ($n=0$).

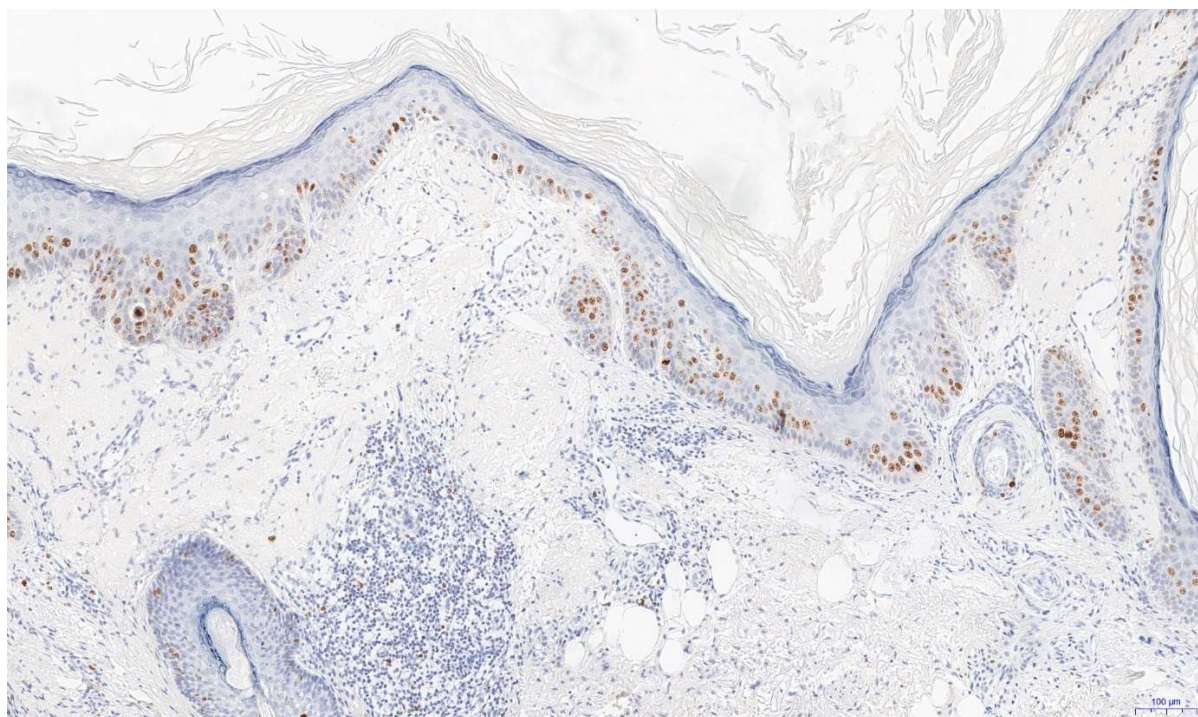


Rycina 3. Ekspresja IHC podoplaniny w cytoplazmie oraz błonie komórek ognisk rógowacenia słonecznego (powiększenie 100x).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między ekspresją podoplaniny w AK u pacjentów w zależności od płci pacjentów ($p=0,89$), wieku ($p=0,86$), lokalizacji uwzględniającej narażenie na promieniowanie słoneczne ($p=0,45$) czy czasu trwania choroby ($p=0,45$).

Ekspresja Ki-67 w rógowaceniu słonecznym

Analizę ekspresji markera proliferacyjnego Ki-67 przeprowadzono na 42 przypadkach AK. Pozytywną ekspresję Ki-67 obserwowano w jądrach komórkowych w komórkach ognisk rógowacenia słonecznego oraz w warstwie podstawnej naskórka, co przedstawiono na Rycinie 4. Pozytywna ekspresja białka Ki-67 obecna była we wszystkich badanych przypadkach AK (100%). Najwięcej badanych przypadków (n=19) wykazało stosunkowo niewielkie nasilenie reakcji, tj. od 1% do 10% pozytywnych jąder komórkowych (45,24%). W 18 przypadkach obserwowano średnie nasilenie reakcji, tj. od 11 do 25% pozytywnych jąder komórkowych (42,86%), natomiast w 4 przypadkach zanotowano od 26% do 50% pozytywnych jąder (9,52%). Tylko w jednym przypadku (2,38%) obserwowano silne natężenie reakcji, tj. wysoki odsetek (>50%) pozytywnych jąder komórkowych.

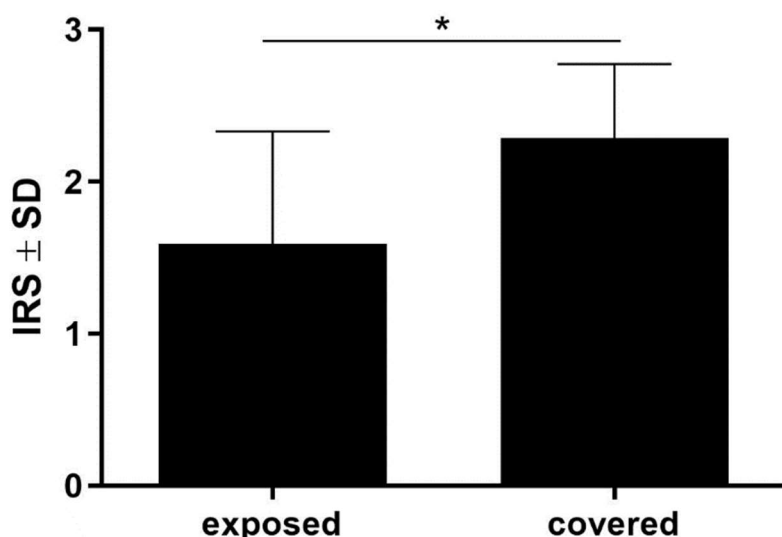


Rycina 4. Ekspresja IHC markera proliferacyjnego Ki-67 w jądrach komórkowych komórek ognisk rógowacenia słonecznego oraz w warstwie podstawnej naskórka (powiększenie 100x).

Analiza ekspresji Ki-67 w zależności od lokalizacji zmian (miejsca eksponowane na UV vs miejsca nieeksponowane) wykazała, że w AK występującym w miejscach nieeksponowanych na promieniowanie słoneczne ekspresja tego markera była istotnie wyższa

(wynik średni $2,286 \pm 0,4880$) niż w miejscach przewlekle ekspozowanych (wynik średni $1,588 \pm 0,7434$). Wyniki przedstawiono na Rycinie 5.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między ekspresją Ki-67 w AK u pacjentów w zależności od pozostałych danych klinicznych, tj. płci pacjentów ($p=0,11$), wieku ($p=0,63$) czy czasu trwania choroby ($p=0,37$).

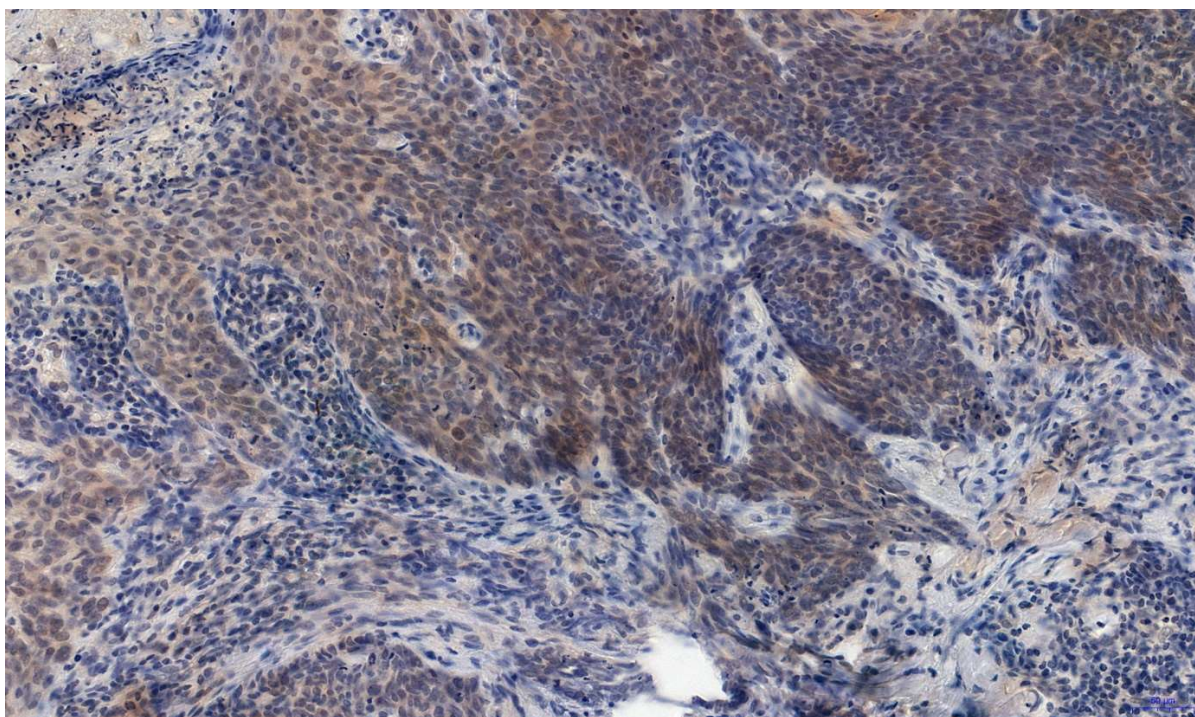


Rycina 5. Analiza ekspresji Ki-67 w zależności od lokalizacji AK (obszar ekspozowany oraz nieekspozowany na UV), (test Mann-Whitney'a, $p=0.0108$)

Ekspresja iryzyny, periostyny, podoplaniny oraz Ki-67 w raku podstawnokomórkowym

Ekspresja iryzyny w raku podstawnokomórkowym

Analizę ekspresji iryzyny przeprowadzono na 104 przypadkach BCC. Ekspresję iryzyny obserwowano w cytoplazmie komórek raka podstawnokomórkowego. Pozytywną ekspresję iryzyny zanotowano w 90 przypadkach (86,54%), co przedstawiono na Rycinie 6. Średni poziom ekspresji iryzyny oceniany w skali IRS wyniósł $3,648 \pm 2,325$. Słabe natężenie reakcji zaobserwowano w 43 przypadkach (41,35%), średnie natężenie w 46 przypadkach (44,23%), a silną reakcję zanotowano w 1 przypadku (0,96%). Brak reakcji występował w 14 przypadkach (13,46%).



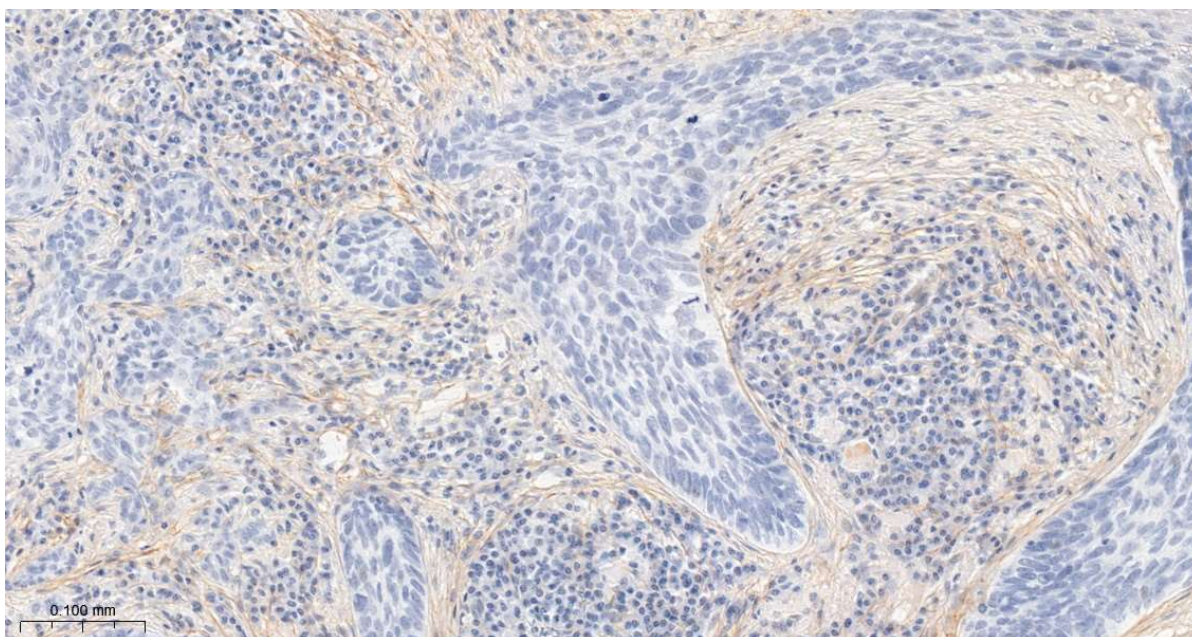
Rycina 6. Ekspresja IHC iryzyzny w komórkach raka podstawnkomórkowego (powiększenie 200x).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między ekspresją iryzyzny w BCC u pacjentów w zależności od płci ($p=0,3722$), wieku ($p=0,1084$), lokalizacji w zależności od ekspozycji na promieniowanie słoneczne ($p=0,6851$) czy czasu trwania choroby ($p=0,3410$).

Ekspresja periostyny w raku podstawnkomórkowym

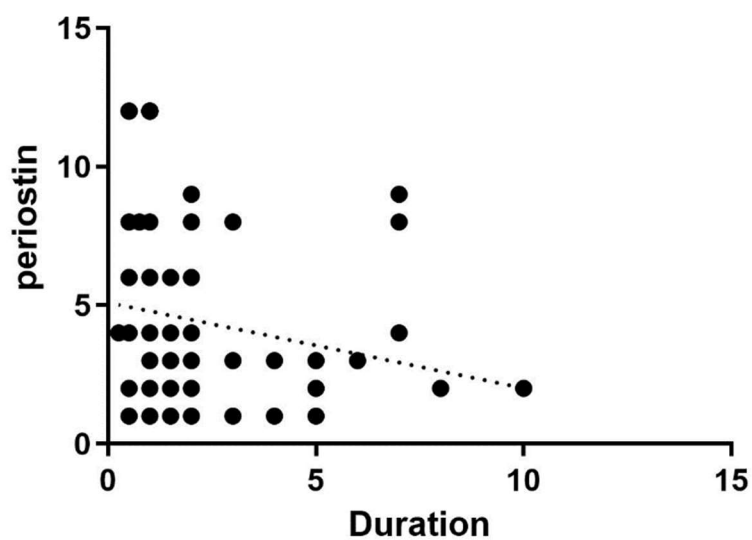
Ekspresja periostyny oceniana była w 104 przypadkach BCC. Ekspresję periostyny obserwowano w podścielisku raka podstawnkomórkowego. Pozytywną ekspresję periostyny w BCC obserwowano w 89 przypadkach (85,58%), co przedstawiono na Rycinie 7. Średnia ekspresja periostyny wynosiła $4,471 \pm 3,081$. W 37 przypadkach (35,58%) stwierdzono słabe natężenie reakcji, w 44 przypadkach (42,31%) średnie natężenie, a w 8 przypadkach (7,69%) silną reakcję. Brak reakcji obserwowano w 15 przypadkach (14,42%).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między ekspresją periostyny w podścielisku łącznotkankowym BCC u pacjentów w zależności od wieku ($p=0,1446$), płci ($p=0,362$) czy lokalizacji w zależności od ekspozycji na UV ($p=0,1258$).



Rycina 7. Ekspresja IHC periostyny w podścielisku łącznotkankowym raka podstawnokomórkowego (powiększenie 200x).

Przeprowadzona analiza korelacji wykazała istotną, ujemną korelację między ekspresją periostyny w BCC a czasem trwania choroby ($p=0,0106$, $r=-0,266$), co przedstawiono na Rycinie 8.

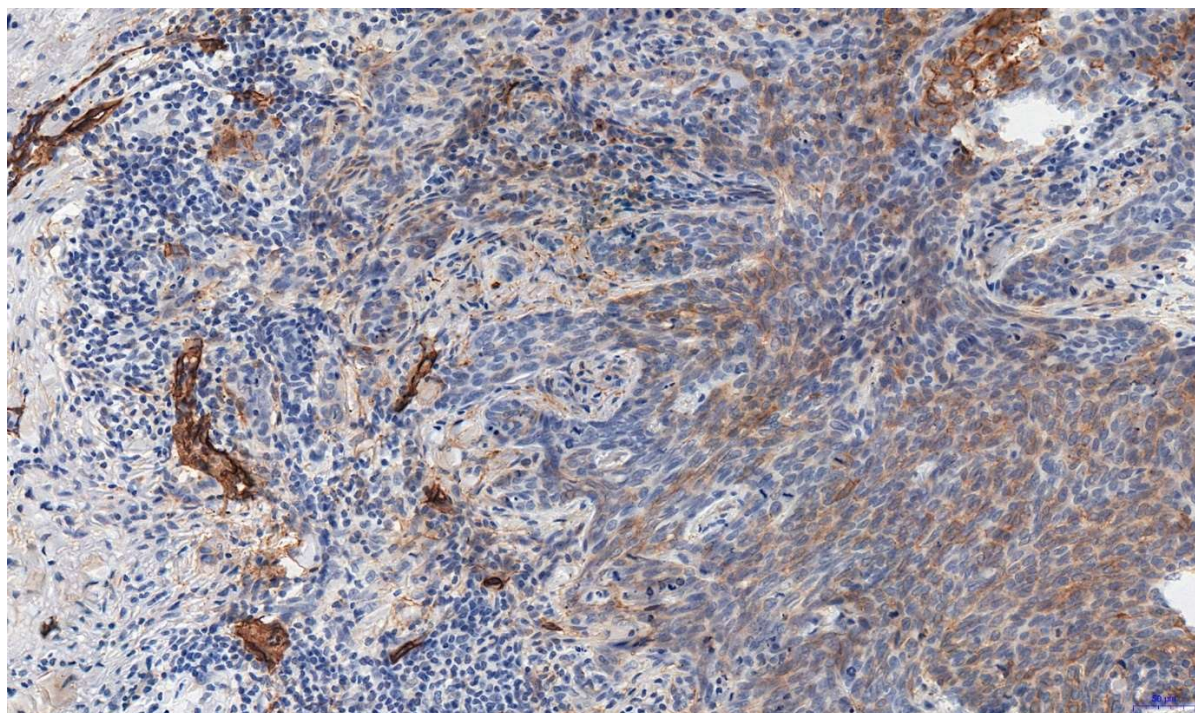


Rycina 8. Ujemna korelacja między ekspresją periostyny w BCC a czasem trwania choroby ($p=0,0106$, $r=-0,266$)

Ekspresja podoplaniny w raku podstawnocomórkowym

Ekspresja podoplaniny była oceniana w 87 przypadkach BCC. Ekspresję podoplaniny obserwowano w cytoplazmie oraz błonie komórek raka podstawnocomórkowego. Pozytywną ekspresję podoplaniny w BCC obserwowano w 51 przypadkach (58,62%), co przedstawiono na Rycinie 9. Średnia ekspresja podoplaniny wynosiła $2,494 \pm 2,118$. W 25 przypadkach (28,74%) stwierdzono słabe natężenie reakcji, w 25 przypadkach (28,74%) średnie natężenie, a w 1 przypadku (1,15%) silną reakcję. Brak reakcji obserwowano w 36 przypadkach (41,38%).

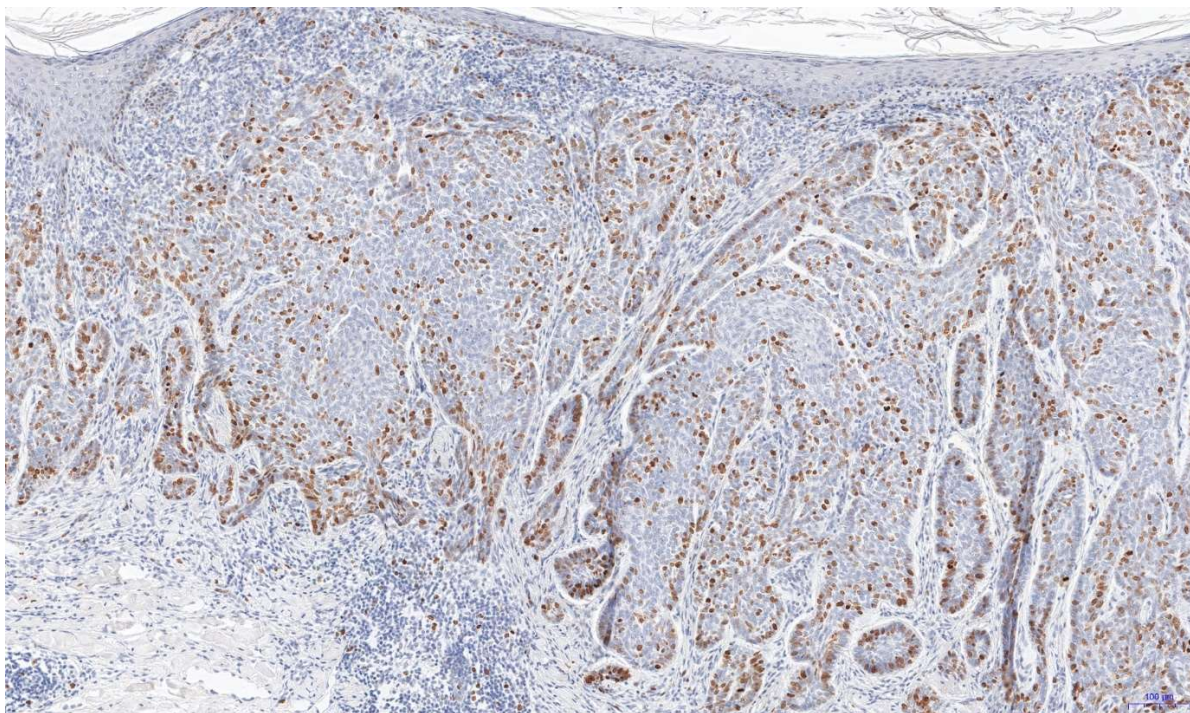
Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między ekspresją podoplaniny u pacjentów z BCC w zależności od płci pacjentów ($p=0,1435$), wieku ($p=0,1852$), lokalizacji uwzględniającej narażenie na promieniowanie słoneczne ($p=0,9447$) czy czasu trwania choroby ($p=0,4673$).



Rycina 9. Ekspresja IHC podoplaniny w cytoplazmie oraz błonie komórek raka podstawnocomórkowego (powiększenie 200x).

Ekspresja Ki-67 w raku podstawnocomórkowym

Analizę ekspresji markera proliferacyjnego Ki-67 przeprowadzono na 103 przypadkach BCC. Pozytywną ekspresję Ki-67 obserwowano w jądrach komórkowych w komórek BCC, co przedstawiono na Rycinie 10. Pozytywna ekspresja białka Ki-67 obecna była we wszystkich badanych przypadkach BCC (100%). Najwięcej badanych przypadków (n=40) wykazało stosunkowo niewielkie nasilenie reakcji, tj. od 10% do 25% pozytywnych jąder komórkowych (38,83%). W 31 przypadkach obserwowano średnie nasilenie reakcji, tj. od 26 do 50% pozytywnych jąder komórkowych (30,1%), a w 20 przypadkach (19,42%) silne natężenie reakcji, tj. wysoki odsetek (>50%) pozytywnych jąder komórkowych. W 12 przypadkach (11,65%) zanotowano słabą reakcję, tj. niski odsetek (<10%) pozytywnych jąder komórkowych.



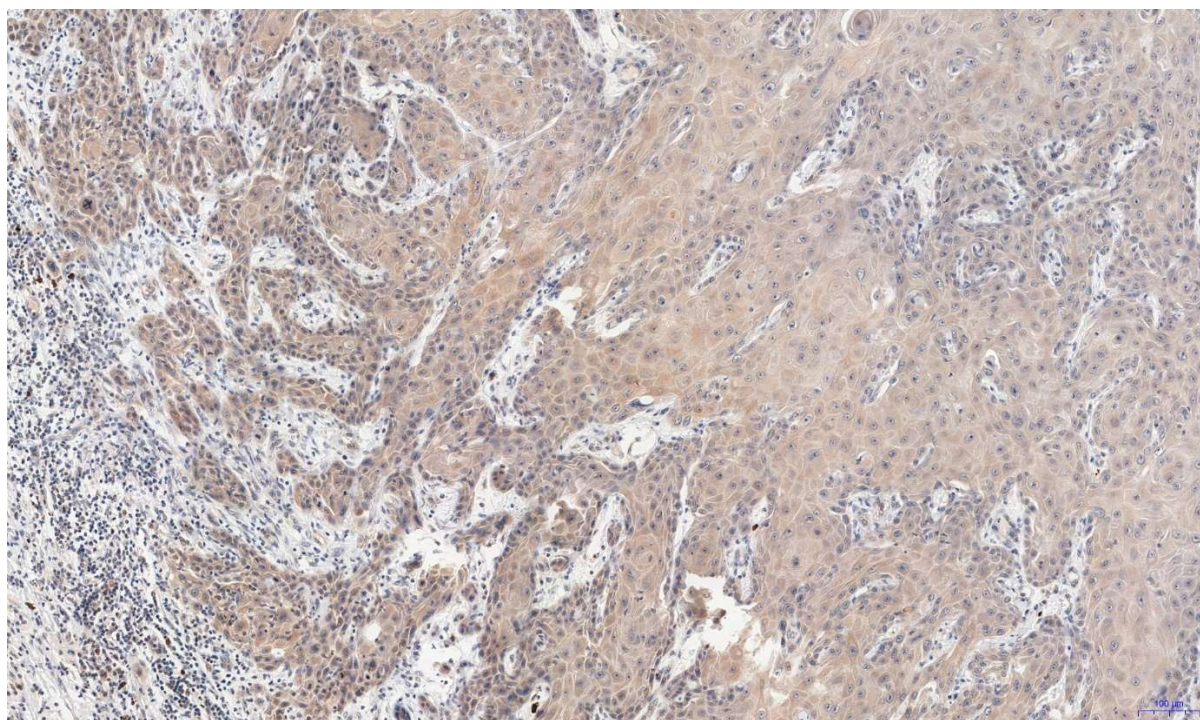
Rycina 10. Ekspresja IHC markera proliferacyjnego Ki-67 w jądrach komórkowych komórek raka podstawnocomórkowego (powiększenie 100x).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między ekspresją Ki-67 u pacjentów z BCC w zależności od wieku pacjentów ($p=0,3734$), płci ($p=0,5716$), lokalizacji w zależności od ekspozycji na UV ($p=0,4166$) czy czasu trwania choroby ($p=0,6404$)

Ekspresja iryzyny, periostyny, podoplaniny oraz Ki-67 w raku kolczystokomórkowym

Ekspresja iryzyny w raku kolczystokomórkowym

Analizę ekspresji iryzyny przeprowadzono na 49 przypadkach SCC. Ekspresję białka obserwowano w cytoplazmie komórek raka kolczystokomórkowego. Ekspresję iryzyny obserwowano w 44 przypadkach (89,8%), co przedstawiono na Rycinie 11. Średni poziom jej ekspresji oceniony wg skali IRS wynosił $4,633 \pm 2,797$. Słabe natężenie reakcji zaobserwowano w 14 przypadkach (28,57%), średnie natężenie w 28 przypadkach (57,14%), a silną reakcję zanotowano w 2 przypadkach (4,08%). Brak reakcji występował w 5 przypadkach (10,2%).

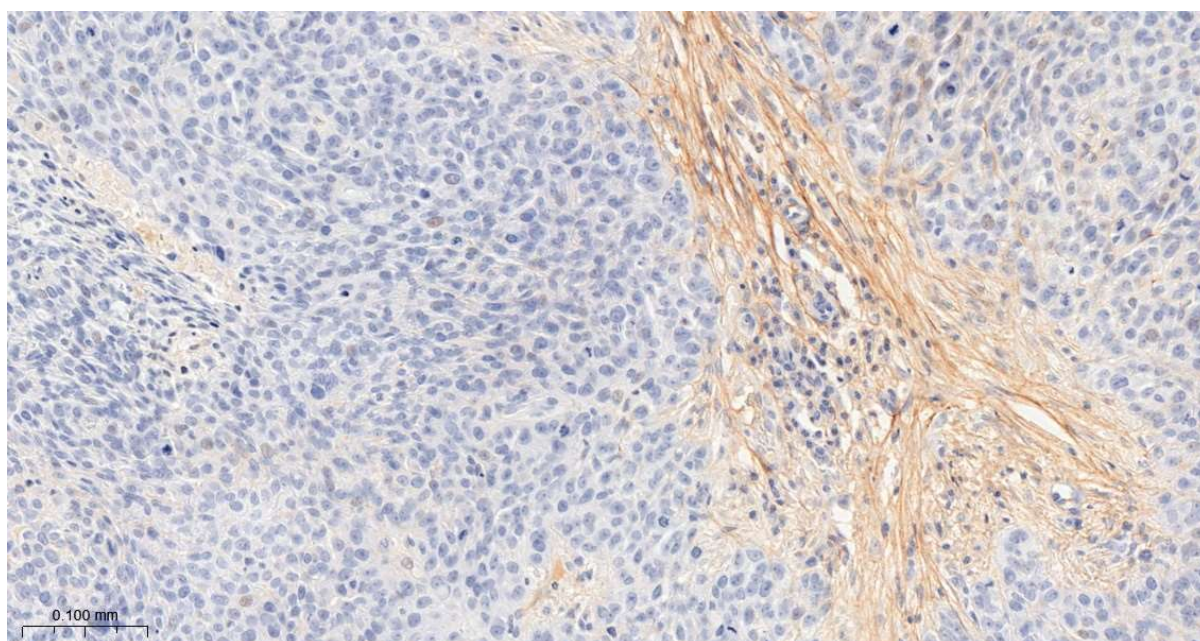


Rycina 11. Ekspresja IHC iryzyny w komórkach raka kolczystokomórkowego (powiększenie 100x).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji iryzyny w SCC w zależności od płci ($p=0,2313$), wieku ($p=0,6114$), czasu trwania choroby ($p=0,6577$) czy głębokości nacieku zmiany nowotworowej ($p=0,4596$).

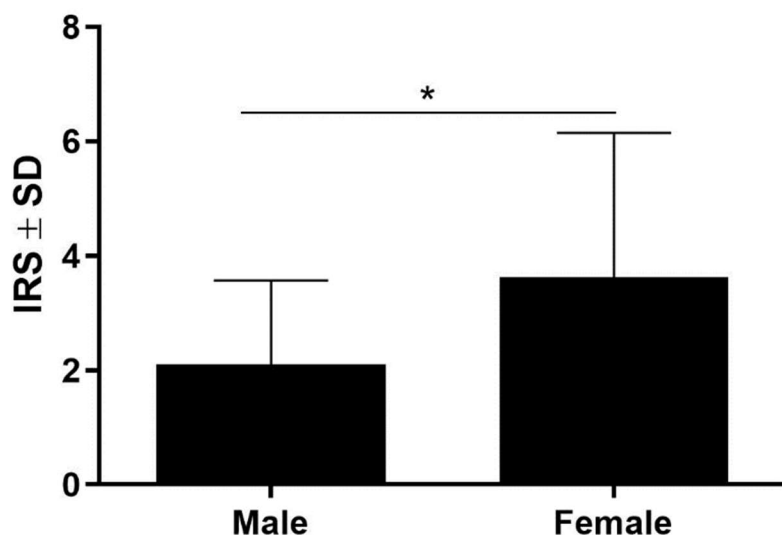
Ekspresja periostyny w raku kolczystokomórkowym

Ekspresja periostyny oceniana była w 49 przypadkach SCC. Ekspresję periostyny obserwowano w podścielisku łącznotkankowym raka kolczystokomórkowego. Pozytywną ekspresję periostyny w SCC obserwowano w 28 przypadkach (57,14%), co przedstawiono na Rycinie 12. Średnia ekspresja periostyny wynosiła $2,673 \pm 2,025$. W 10 przypadkach (20,4%) stwierdzono słabe, a w 18 przypadkach (36,73%) średnie natężenie reakcji, w żadnym przypadku nie wykazano silnej ekspresji. W 21 przypadkach zaobserwowano brak pozytywnej reakcji (42,86%).



Rycina 12. Ekspresja IHC periostyny w podścielisku łącznotkankowym raka kolczystokomórkowego (powiększenie 200x).

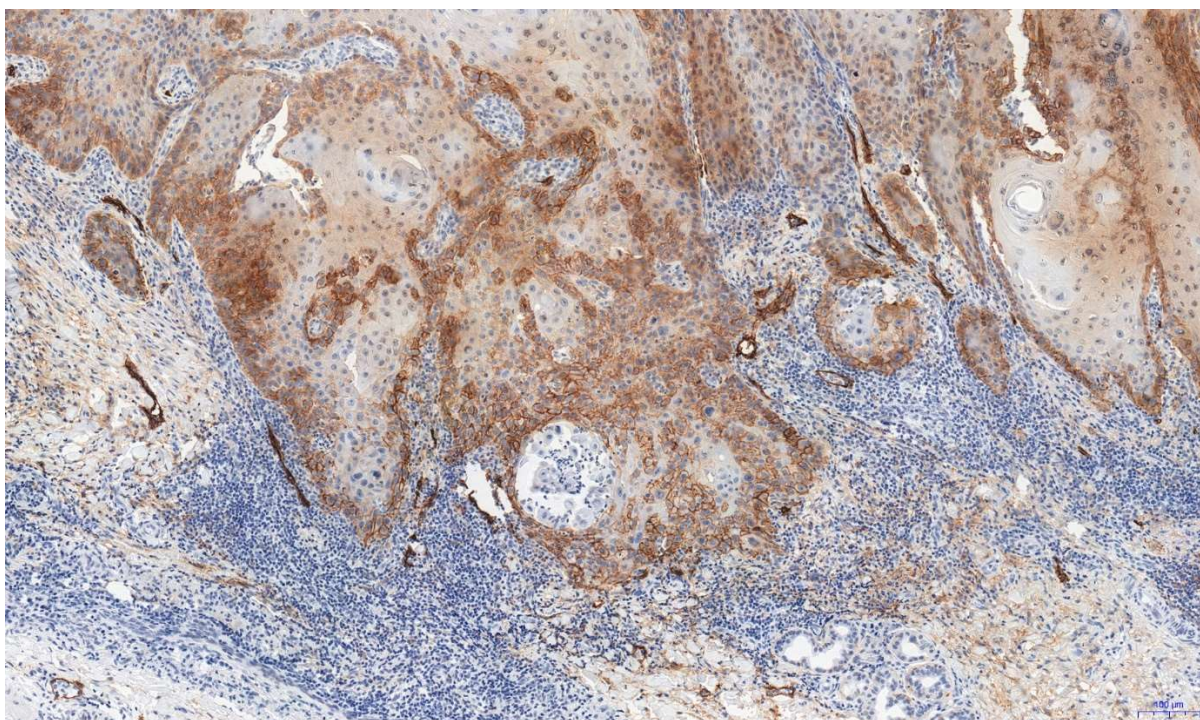
Analiza ekspresji periostyny w zależności danych kliniczno-patologicznych pacjentów wykazała, że ekspresja periostyny w SCC była istotnie statystycznie wyższa (wynik średni $3,625 \pm 2,527$) u kobiet w porównaniu z mężczyznami (wynik średni $2,100 \pm 1,470$). Wyniki przedstawiono na Rycinie 13. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji iryzyny w SCC w zależności od wieku ($p=0,6114$), czasu trwania choroby ($p=0,6577$) czy głębokości nacieku zmiany nowotworowej ($p=0,4596$).



Rycina 13. Analiza ekspresji periostyny w zależności od płci w przypadku SCC, test Mann-Whitney'a, $p=0,0459$)

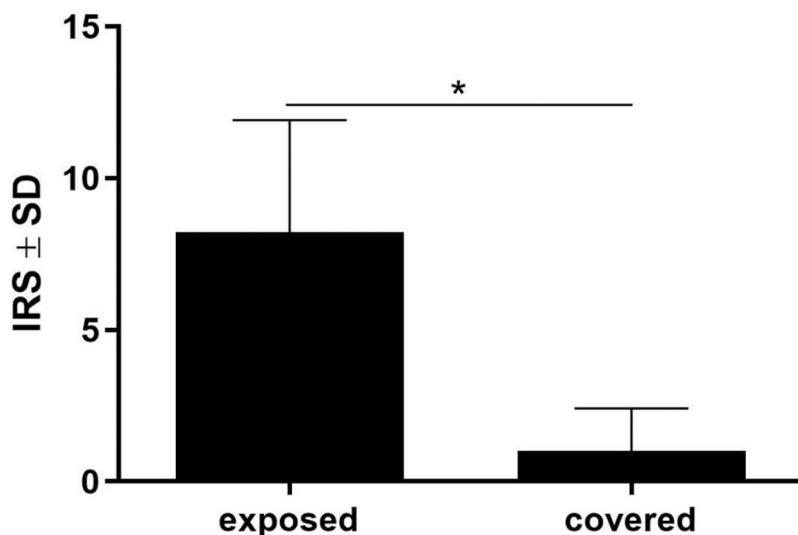
Ekspresja podoplaniny w raku kolczystokomórkowym

Ekspresja podoplaniny była oceniana w 35 przypadkach SCC. Ekspresję podoplaniny obserwowano głównie w cytoplazmie oraz błonie komórek raka kolczystokomórkowego. Pozytywną ekspresję podoplaniny w SCC obserwowano w 34 przypadkach (97,14%), co przedstawiono na Rycinie 14. Średnia ekspresja podoplaniny wynosiła $8,371 \pm 3,671$. W 2 przypadkach (5,71%) obserwowano słabe nasilenie reakcji, w 14 przypadkach (40%) średnie natężenie oraz w 18 przypadkach (51,43%) silne natężenie reakcji. Tylko w jednej zmianie nowotworowej (2,86%) zanotowano brak reakcji.



Rycina 14. Ekspresja IHC podoplaniny w cytoplazmie oraz błonie komórek raka kolczystokomórkowego (powiększenie 100x).

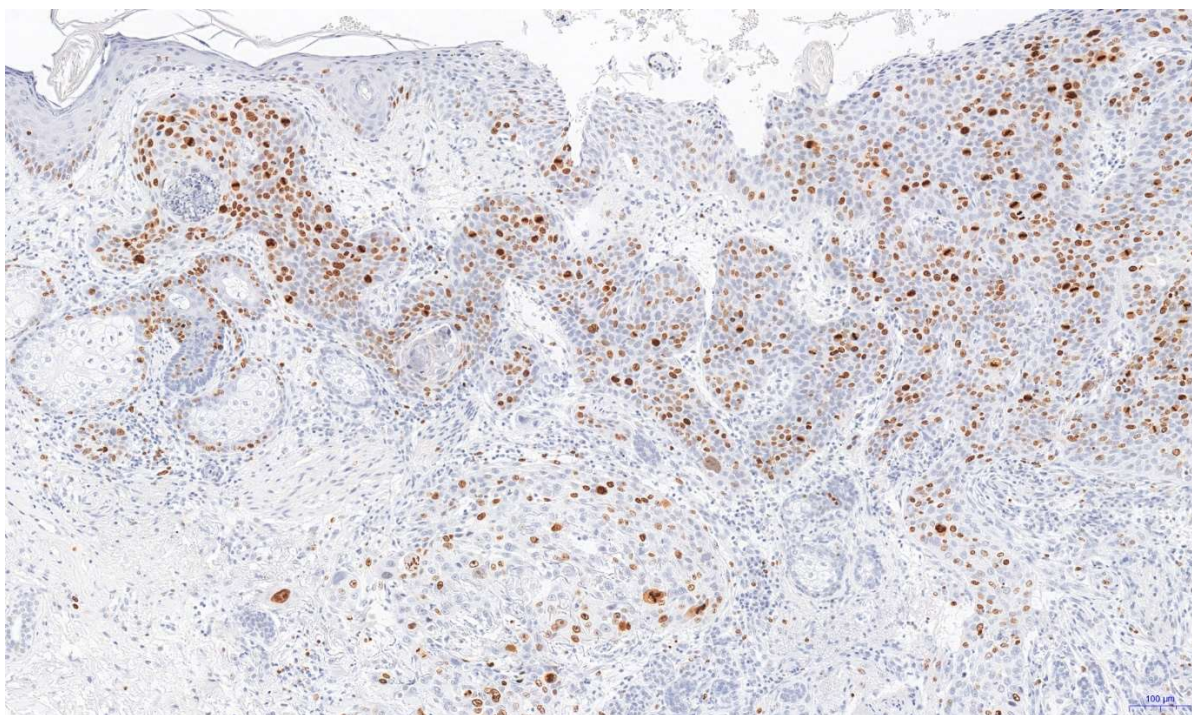
Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji podoplaniny w komórkach SCC w zależności od wieku ($p=0,3137$) oraz płci ($p=0,2388$). Jednak w przypadku zależności ekspresji podoplaniny od lokalizacji zmiany uwzględniającej narażenie na promieniowanie słoneczne ekspresja podoplaniny była istotnie statystycznie wyższa ($p=0,0277$) w zmianach na skórze ekspozowanej na promienie UV w stosunku do skóry nieekspozowanej (Rycina 15). Należy brać pod uwagę, że jedynie dwa przypadki (5,51%) znajdowały się na skórze osłoniętej przed promieniowaniem UV. Przeprowadzona analiza korelacji nie wykazała zależności w ekspresji podoplaniny w zależności od czasu trwania choroby ($p=0,9081$) oraz głębokości nacieku nowotworowego ($p=0,0966$).



Rycina 15. Ekspresja podopłaniny w zależności od lokalizacji uwzględniającej narażenie na promieniowanie słoneczne w przypadku SCC (test Mann-Whitney'a, $p=0,0277$)

Ekspresja Ki-67 w raku kolczystokomórkowym

Analizę ekspresji markera proliferacyjnego Ki-67 przeprowadzono na 50 przypadkach SCC. Pozytywną ekspresję Ki-67 obserwowano w jądrach komórkowych w komórek SCC, co przedstawiono na Rycinie 16. Pozytywna ekspresja białka Ki-67 obecna była we wszystkich badanych przypadkach SCC (100%). Najwięcej badanych przypadków ($n=18$) wykazało stosunkowo średnie nasilenie reakcji, tj. od 26% do 50% pozytywnych jąder komórkowych (36%). W 16 przypadkach (32%) zanotowano niższy odsetek pozytywnej reakcji (od 11% do 25% pozytywnych jąder), natomiast słabą reakcją, tj. niski odsetek (<10%) pozytywnych jąder komórkowych w 6 przypadkach (12%). W 10 przypadkach (20%) wykazano silne natężenie reakcji, tj. wysoki odsetek (>50%) pozytywnych jąder komórkowych.



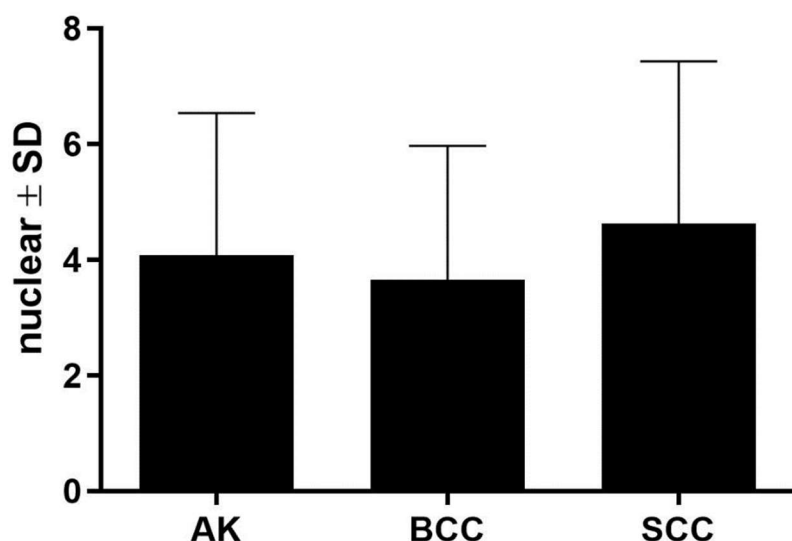
Rycina 16. Ekspresja IHC markera proliferacyjnego Ki-67 w jądrach komórkowych komórek raka kolczystokomórkowego (powiększenie 100x).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji Ki-67 w SCC w zależności od płci ($p=0,2313$) oraz wieku ($p=0,6114$). Przeprowadzona analiza korelacji nie wykazała również zależności między ekspresją Ki-67 a czasem trwania choroby ($p=0,4340$) oraz głębokością nacieku nowotworowego ($p=0,7358$). Tylko jedna ze wszystkich poddanych analizie zmian SCC lokalizowała się na obszarze skóry nienarażonej na przewlekłe działanie promieniowania słonecznego. Tak mała liczba uniemożliwia badanie statystyczne.

Ocena nasilenia ekspresji iryzyny w AK, BCC oraz SCC

Średnie wartości nasilenia ekspresji iryzyny w AK, BCC oraz SCC wynosiły odpowiednio $4,075 \pm 2,464$, $3,648 \pm 2,325$, $4,633 \pm 2,797$. Wśród wszystkich ocenianych zmian średnia ekspresja iryzyny była najwyższa w SCC, najniższa w BCC.

Nie wykazano istotnych różnic w ekspresji białka między grupami AK, BCC, SCC ($p > 0.05$). Wyniki otrzymane na tym etapie badania przedstawiono na rycinie 17.

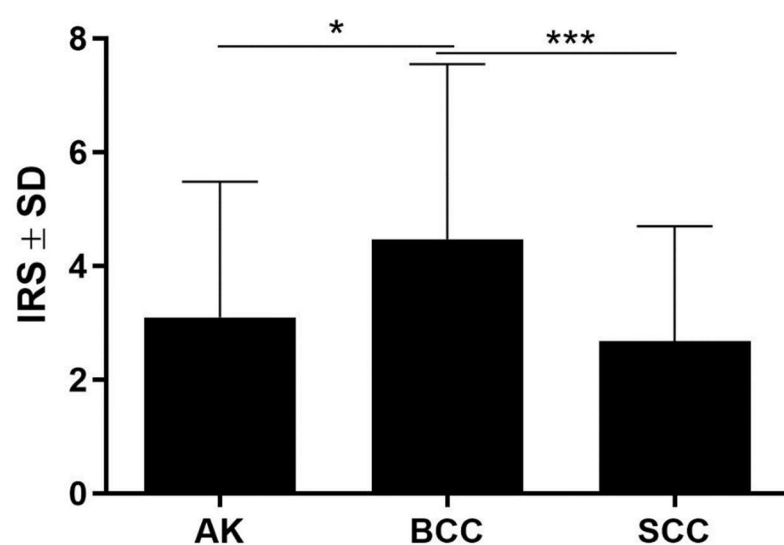


Rycina 17. Ocena ekspresji iryzyny w AK, BCC oraz SCC

Ocena nasilenia ekspresji periostyny w AK, BCC oraz SCC

Średnie wartości nasilenia ekspresji periostyny w AK, BCC oraz SCC wynosiły odpowiednio $3,095 \pm 2,387$, $4,471 \pm 3,081$, $2,673 \pm 2,025$. 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 (Dunn's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$). Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w poziomie ekspresji periostyny w AK w stosunku do SCC. Wyniki przedstawiono na rycinie 18.

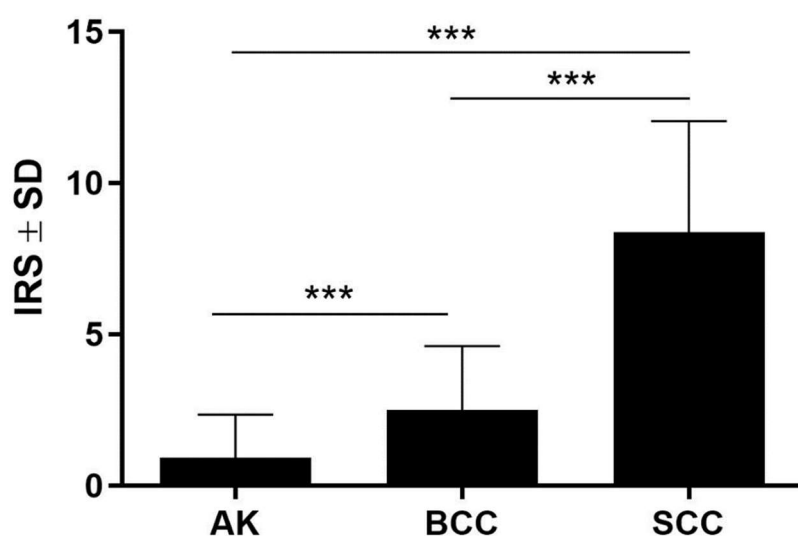


Rycina 18. Ocena ekspresji periostyny w AK, BCC oraz SCC

Ocena nasilenia ekspresji podoplaniny w AK, BCC oraz SCC

Średnie wartości nasilenia ekspresji podoplaniny w AK, BCC oraz SCC wynosiły odpowiednio $0,9211 \pm 1,421$, $2,494 \pm 2,118$, $8,371 \pm 3,671$. Otrzymane wyniki wskazują najwyższą ekspresję badanego białka w SCC, najniższą w AK.

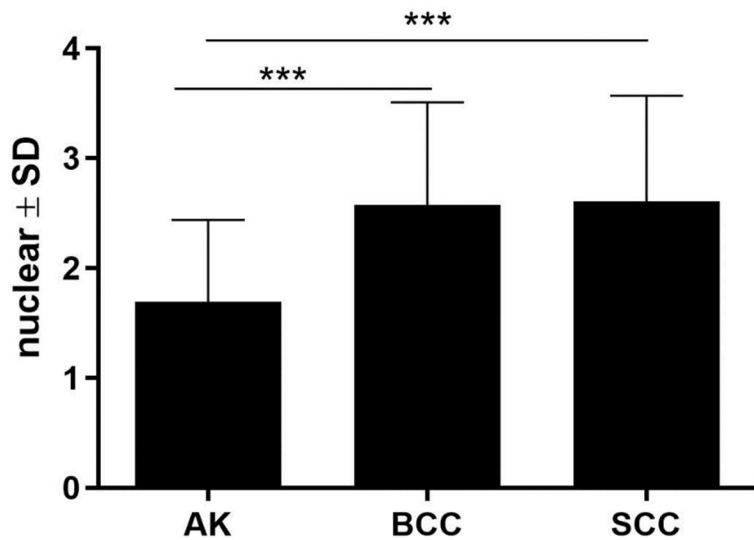
Wykazano istotną statystycznie różnicę w ekspresji tego białka w BCC w porównaniu do AK oraz SCC, jak również AK do SCC (Dunn's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$). Wyniki otrzymane na tym etapie badania przedstawiono na rycinie 19.



Rycina 19. Ocena ekspresji podoplaniny w AK, BCC oraz SCC

Ocena nasilenia ekspresji Ki-67 w AK, BCC oraz SCC

Średnie wartości nasilenia ekspresji Ki-67 w AK, BCC oraz SCC wynosiły odpowiednio $1,690 \pm 0,7486$, $2,573 \pm 0,9352$, $2,608 \pm 0,9608$. 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 (Dunn's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$). Wyniki przedstawiono na rycinie 20.



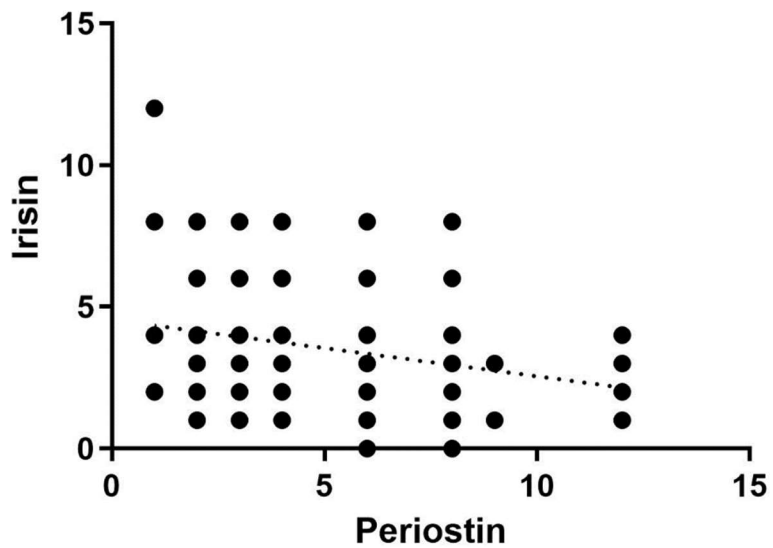
Rycina 20. Ocena ekspresji Ki-67 w AK, BCC oraz SCC

Ocena zależności ekspresji iryzyny, periostyny, podoplaniny oraz Ki-67 w rogowaceniu słonecznym

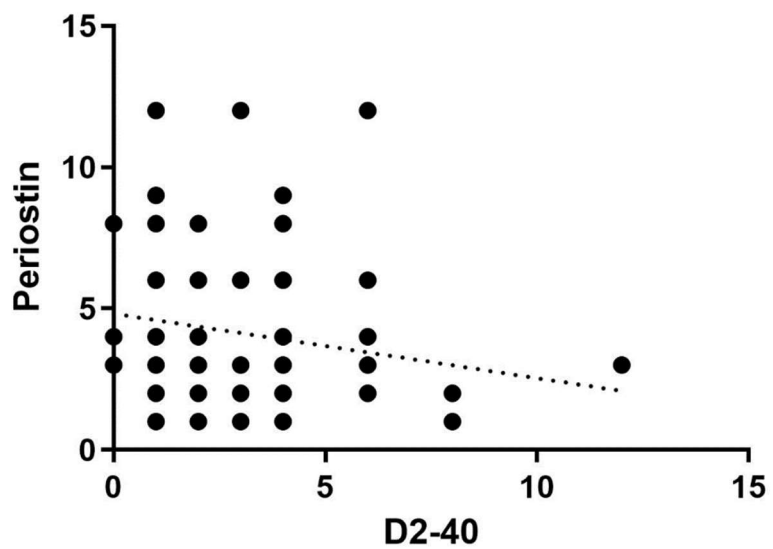
Wyniki nie wykazały istotnych statycznie korelacji między ekspresją białek: iryzyny, periostyny, podoplaniny czy Ki-67 w badanych przypadkach rogowacenia słonecznego.

Ocena zależności ekspresji iryzyny, periostyny, podoplaniny oraz Ki-67 w raku podstawnocomórkowym

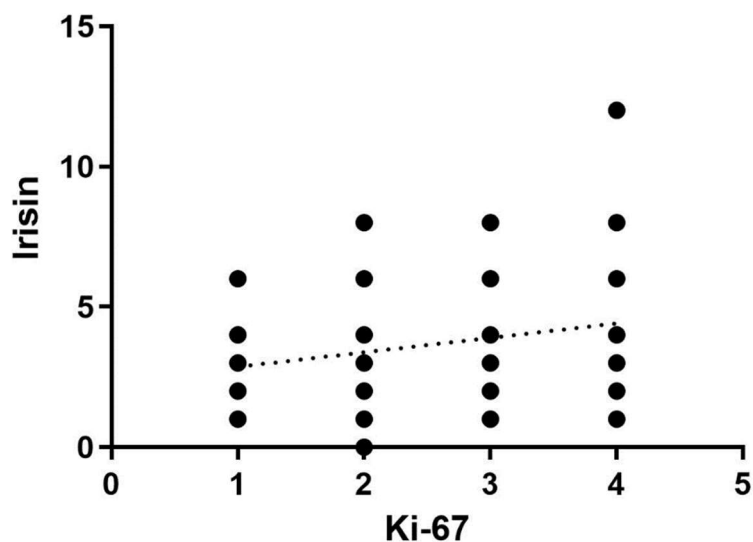
W przypadku raka podstawnocomórkowego, wykazano istotną statystycznie ujemną korelację między ekspresją periostyny a ekspresją iryzyny ($p = 0,0114$), co obrazuje rycina 21. Bliską statystycznej istotności ujemną korelację uzyskano pomiędzy periostyną a podoplaniną ($p = 0,0607$) oraz dodatnią pomiędzy iryzyną a Ki-67 ($p = 0,0644$). Wynik przedstawiono na rycinie 22 oraz rycinie 23.



Rycina 21. Ujemna korelacja między ekspresją periostyny a ekspresją iryzyny ($p = 0,0114$)



Rycina 22. Ujemna korelacja między ekspresją periostyny a ekspresją podoplaniny ($p=0,0607$)



Rycina 23 Dodatnia korelacja między ekspresją iryzyny a ekspresją Ki-67 ($p = 0,0644$)

Ocena zależności ekspresji iryzyny, periostyny, podoplaniny oraz Ki-67 w raku koleczystokomórkowym

Wyniki nie wykazały istotnych statycznie korelacji między ekspresją białek: iryzyny, periostyny, podoplaniny czy Ki-67 w badanych przypadkach raka koleczystokomórkowego.

6. DYSKUSJA

Niemelanocytowe raki skóry (NMSC) są najczęściej rozpoznawanymi nowotworami u rasy kaukaskiej. Choć ta grupa nowotworów charakteryzuje się powolnym wzrostem, to jednak zdarzają się również przypadki o bardziej agresywnym przebiegu, z naciekiem sąsiednich struktur, dające wznovy oraz, znacznie rzadziej, przerzuty do odległych narządów [139]. Wielu badaczy koncentruje się więc na poszukiwaniu czynników mających wpływ na rozwój i progresję NMSC [165]. Jednym z niedawno odkrytych białek jest **iryzyna**, adipomiokina, która powstaje w procesie indukowanym przez wysiłek fizyczny. Rola wysiłku fizycznego w prewencji nowotworów została już wielokrotnie wykazana w badaniach naukowych. Z kolei znany jest fakt, że otyłość i siedzący tryb życia są jednymi z istotniejszych czynników ryzyka kancerogenezy [166]. Wpływają one między innymi na stymulację układu hormonalnego, immunologicznego oraz regulację metabolizmu insulinowo-glukozowego. Nadmiar tkanki tłuszczowej prowadzi do uwolnienia czynników prozapalnych, stymuluje nasilenie stresu oksydacyjnego, a pośrednio indukuje proliferację komórek doprowadzając do neoangiogenezy i kancerogenezy [166,167]. Wysiłek fizyczny jako czynnik zmniejszający ryzyko nowotworzenia wymieniany jest w przypadku wielu nowotworów, m.in. jelita grubego, piersi, nerki, endometrium, pęcherza moczowego, żołądka, przełyku czy płuca. Wśród nich nie znajduje się żaden z typów raka skóry, wręcz przeciwnie, American College of Sports Medicine opublikowało raport, w którym podaje, że wysiłek fizyczny zwiększa ryzyko powstania czerniaka skóry. Jest to jednak prawdopodobnie związane z większą ekspozycją na promieniowanie słoneczne podczas aktywności na świeżym powietrzu przy braku odpowiedniej ochrony przeciwsłonecznej [168]. Nie dziwi więc, że obecnie wiele badań skupia się na wykazaniu ewentualnej roli iryzyny w kancerogenezie [16]. Wprawdzie ich wyniki nie są jednoznaczne, aczkolwiek wiele z nich wskazuje na możliwość pełnienia przez iryzynę roli protekcyjnej [18]. Stąd moje zainteresowanie tym białkiem w rakach niemelanocytowych skóry, w których dotychczas nie przeprowadzono takich badań. Wyniki moich badań wykazały, że ekspresja iryzyny w badanych przeze mnie grupach zmian skórnych była zróżnicowana, tj. najwyższa w komórkach raka kolczystokomórkowego, niższa w rogowaceniu słonecznym a najniższa w raku podstawnkomórkowym. Podobnie do otrzymanych przeze mnie wyników, ekspresję iryzyny w komórkach nowotworowych wykazało wielu innych badaczy, m. in. w raku tarczycy, płuc czy gruczołu piersiowego [30,31,33,32]. Jednak w przeciwieństwie do tych Autorów, w badanych przez mnie przypadkach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic

w nasileniu ekspresji iryzyny pomiędzy zmianami łagodnymi (AK) a nowotworowymi (BCC oraz SCC). Te rozbieżności mogą wynikać z niewielkiej liczebności badanych przeze mnie grup oraz z odmiennej biologii tych nowotworów. Jak wiadomo, zarówno w BCC, jak również w SCC, mimo że są nowotworami złośliwymi, rzadko dochodzi do powstania odległych przerzutów, które mogą przyczynić się do śmierci. A badania wspomnianych powyżej Autorów zostały przeprowadzone na typach nowotworów znacznie agresywniejszych w swojej naturze. Pomimo, że promieniowanie słoneczne i czynniki genetyczne stanowią główne i niepodważalne czynniki ryzyka rozwoju raka podstawnocomórkowego oraz kolczystocomórkowego, to w żadnej z grup nie zaobserwowałam istotnej korelacji pomiędzy ekspresją iryzyny a lokalizacją tych zmian w zależności od ekspozycji na słońce. Może to oznaczać, że promieniowanie słoneczne i jego rola w uszkodzeniu komórek, indukowanie stanu zapalnego czy udział w powodowaniu mutacji genetycznych nie wpływa na poziom ekspresji iryzyny. W dostępnym piśmiennictwie wprawdzie nie ma doniesień o występowaniu iryzyny w NMSC, jednak przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, zgodnie z moją wiedzą, po raz pierwszy pozytywną ekspresję tego białka we wszystkich badanych grupach. Niestety, wyniki te nie pozwalają na obecnym etapie na jednoznaczne określenie jej roli w rogowaceniu słonecznym czy rakach skóry.

Kolejnym badaniem w mojej pracy białkiem była **periostyna**, glikoproteina wydzielana głównie przez komórki tkanki łącznej. Jako białko macierzy pozakomórkowej ma zdolność do interakcji z różnymi komórkami i białkami, a dzięki temu wywiera wpływ na regulację wielu procesów, m.in. cykl komórkowy, apoptozę, zdolność do migracji czy adhezji komórek. Procesy te odgrywają istotną rolę w transformacji komórek nowotworowych oraz w progresji guza. Periostyna wpływa również aktywująco na proces angiogenezy w otoczeniu guza, co sprzyja tworzeniu przerzutów odległych [65]. Jej wielokierunkowe działanie i udział w kancerogenezie czyni ją obiektem badań w wielu nowotworach. Prace dotyczące wpływu periostyny na choroby nowotworowe w zdecydowanej większości opisują jej udział w stymulacji proliferacji i zdolności do migracji komórek nowotworowych, czego konsekwencją jest wzrost ich inwazyjności, powstawanie przerzutów i gorsze rokowanie. Dotychczas nie powstało wiele doniesień o jej roli w NMSC, co może być podyktowane niskim ryzykiem przerzutowania i niską śmiertelnością tych nowotworów. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach, ekspresja periostyny została wykazana w podścielisku łącznotkankowym, natomiast nie uwidoczniono jej w komórkach nowotworowych BCC, SCC ani w AK. Wyniki te są zgodne z wynikami innych autorów, którzy

zdefiniowali periostynę jako białko macierzy pozakomórkowej oddziałujące na komórki docelowe [63]. W większości dotychczasowych badań opisywano periostynę jako czynnik prokancerogeny oraz niekorzystny prognostyczny [73]. Jednak w mojej pracy najwyższą ekspresję periostyny obserwowałam w raku podstawnocomórkowym, niższą w rógowaceniu słonecznym, a najniższą w raku kolczystocomórkowym. Co ważniejsze, jej ekspresja w grupie BCC była istotnie wyższa niż w obu pozostałych badanych grupach, tj. AK czy SCC. Moje wyniki częściowo potwierdzają doniesienia Villani i wsp., którzy również wykazali nasilenie ekspresji periostyny w macierzy międzykomórkowej [99]. Co więcej, Autorzy Ci wykazali zróżnicowaną ekspresję periostyny w zależności od molekularnego podtypu tego nowotworu oraz istotny wzrost ekspresji periostyny w głęboko naciekających, agresywniejszych typach BCC. Te wyniki mogą sugerować możliwość wykorzystania badania ekspresji periostyny w określaniu podtypów molekularnych BCC. Z kolei badanie ekspresji periostyny w rakach kolczystocomórkowych wykazało istotnie wyższą ekspresję periostyny w podścielisku zmian o najwyższym stopniu zaawansowania, a najniższą w raku kolczystocomórkowym *in situ*, co potwierdza powyższe wyniki [98]. Celem moich badań była ocena ekspresji periostyny w obu typach NMSC niezależnie od ich podtypów molekularnych oraz wykazanie różnic między nimi w porównaniu ze zmianami nienowotworowymi o typie rógowacenia słonecznego. Istotnie wyższą ekspresję periostyny wykazałam w podścielisku raka podstawnocomórkowego w stosunku do raka kolczystocomórkowego oraz rógowacenia słonecznego. Rezultat ten jest zgodny z wynikami większości dotychczasowych badań, w których periostyna jest opisywana jako czynnik prokancerogeny [73]. Jednak istotnie wyższa ekspresja periostyny w macierzy zewnątrzkomórkowej BCC w porównaniu do SCC jest trudna do interpretacji, zwłaszcza biorąc pod uwagę, że BCC nie są z reguły klinicznie bardziej agresywne w porównaniu do SCC. Jedną z przyczyn może być nierówna liczebność grup w poszczególnych typach badanych przeze mnie zmian. Ponadto, 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. Wśród zebranych przeze mnie danych klinicznych brakuje informacji czy zmiana rakowa była zmianą pierwotną czy ewoluowała ze zmiany przedrakowej, tj. AK. W badaniach dotyczących ekspresji periostyny w raku żołądka obserwowano podobne wyniki, czyli brak jej ekspresji w podścielisku wczesnych zmian, tj. Tis oraz T1 w klasyfikacji TNM w przeciwieństwie do zmian o wyższym stopniu zaawansowania [76].

W wielu badaniach przeprowadzonych *in vitro* udowodniono stymulujące działanie periostyny na komórki nowotworowe. Poprzez różne szlaki sygnałowe, m.in. FAK, kinazy PI-3 – AKT, wpływa ona na cykl komórkowy, hamuje proces apoptozy, indukuje proliferację i inwazję komórek, a nawet stymuluje angiogenezę [64]. W swoich badaniach grupie BCC zaobserwowałam istotną statystycznie ujemną korelację pomiędzy poziomem ekspresji periostyny a czasem trwania choroby. Zakładając, że formy bardziej agresywne charakteryzują się szybszym rozwojem, moje wyniki zgadzają się z wynikami Villaniego i wsp., którzy zaobserwowali większą i rozleglejszą ekspresję periostyny w typie naciekającym BCC, który charakteryzuje się gorszym rokowaniem niż pozostałe [99]. Ryzyko rozwoju przerzutów odległych w przypadku BCC jest niskie, szacuje się poniżej 0,5%, jednak może dochodzić do jego powolnego wzrostu i zaawansowania miejscowego, a w konsekwencji do destrukcji otaczających tkanek. Otrzymane przeze mnie wyniki niewątpliwie wskazują potrzebę dalszych, bardziej zaawansowanych badań nad rolą periostyny w BCC, szczególnie z uwzględnieniem podziału na zmiany o niskim i wysokim stopniu ryzyka (dane obejmujące m.in. wielkość zmiany, lokalizację, nawrotowość, podtyp histologiczny). Pozwoli to na wcześniejszą ocenę ryzyka miejscowego zaawansowania i ewentualnych przerzutów, a także wybór odpowiedniej metody terapeutycznej czy ocenę ryzyka nawrotu.

Podoplanina (PDNP), kolejne badane przeze mnie białko odgrywa istotną rolę w kancerogenezie, m. in. ze względu na jej udział w limfangiogenezie [105]. W wielu nowotworach przerzuty odległe powstają właśnie na drodze limfatycznej. Stąd podoplanina, uznana jako marker naczyń limfatycznych, w większości nowotworów określana jest jako czynnik niekorzystny rokowniczo [105]. Wykazano również, że obecność podoplaniny w fibroblastach podścieliska guza (CAFs) jest związana z nabywaniem przez komórki raka inwazyjnego typu mezenchymalnego w wyniku przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT). Promując EMT komórek nowotworowych, podoplanina wpływa na zmianę fenotypu komórek raka z nabłonkowego na mezenchymalny, czego efektem jest zwiększenie zdolności do migracji i inwazyjności tych komórek. Zjawisko EMT odgrywa więc istotne znaczenie w progresji i przerzutowaniu nowotworów [100,110,111]. CAFs cechują się nie tylko ekspresją podoplaniny, ale również periostyny. Zhao i wsp. wykazali, że periostyna wydzielana przez CAFs o wysokiej ekspresji podoplaniny stymulowały komórki nowotworowe do progresji i promowały przerzutowanie [169]. Jednoczesna obecność periostyny i podoplaniny w podścielisku guza wiązała się z większym wzrostem guza

nowotworowego *in situ* oraz promowaniem powstania przerzutów odległych, co sugeruje istnienie zależności między ekspresją podoplaniny i periostyny a progresją nowotworu, a obecność obu białek jest związana z gorszym rokowaniem [169]. Choć NMSC charakteryzują się niskim ryzykiem rozwoju przerzutów odległych, szacuje się, że w poniżej 4% SCC oraz w poniżej 0,5% BCC [143,146], to jednak może dojść do zaawansowania miejscowego i destrukcji otaczających tkanek. Raki koleczystokomórkowe w porównaniu z rakami podstawnokomórkowymi cechuje większa zdolność inwazji. [143,146] Schwab i wsp. w swoich badaniach wykazali, że utrata genu dla podoplaniny skutkowałą zmniejszoną migracją i inwazją komórek nowotworowych w badaniu przeprowadzonym *in vitro* na mysich komórkach SCC, a w badaniach *in vivo* mniejszym rozmiarem guza w porównaniu do grupy kontrolnej [170]. W innych badaniach wykazano również, że wysoka ekspresja podoplaniny w leukoplakii, zmianie śluzówkowej jamy ustnej o zwiększonym ryzyku transformacji nowotworowej, jest związana z istotnie wyższym ryzykiem ewolucji zmiany w raka jamy ustnej. Z kolei nowotwory powstałe na podłożu leukoplakii, w których nie obserwowano ekspresji PDPN rozwijały się znacznie dłużej [171]. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach wykazałam, że nasilenie ekspresji podoplaniny pomiędzy badanymi grupami zmian skórnych wykazało istotne zróżnicowanie. Najwyższa ekspresja podoplaniny była obserwowana w raku koleczystokomórkowym, niższa w raku podstawnokomórkowym, a najniższa w rogowaceniu słonecznym. Wyniki moich badań są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Wojciechowską-Zdrojowy i wsp. które wykazały znacząco wyższą ekspresję tego białka w komórkach SCC w porównaniu do komórek BCC i AK, co świadczy o wyższej ekspresji podoplaniny w zmianach o wyższym typie złośliwości [118]. Dodatkowo, wyniki przedstawione przez Kreppel'a i wsp. pokazały, że u pacjentów z innym typem nowotworu, tj. z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej (OSCC), w przypadkach z wysoką ekspresją PDPN, 5-letnie przeżycie było istotnie niższe niż w przypadkach raka o niskiej i średniej ekspresji PDPN [172]. Według tych badaczy, nasilenie ekspresji podoplaniny dodatnio korelowało ze stadium OSCC oraz występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych. Moje wyniki potwierdzają doniesienia sugerujące udział podoplaniny w kancerogenezie, a także jej zwiększoną ekspresję w zmianach o gorszym rokowaniu [117,118,172].

Ekspresję podoplaniny obserwowano nie tylko w komórkach nowotworowych, lecz również w mikrośrodowisku guza, w szczególności w fibroblastach związanych z nowotworem (CAFs). Wojciechowska-Zdrojowy i wsp. wykazali istotnie wyższą ekspresję

komórkową podoplaniny w SCC i AK w porównaniu z podścieliskiem tych zmian [118]. W moim badaniu, bliską istotności statystycznej, ujemną korelację między ekspresją podoplaniny i periostyny zaobserwowałam jedynie w grupie BCC. Ekspresja periostyny w podścielisku nowotworu malała wraz z rosnącą ekspresją podoplaniny w komórkach raka. W związku z licznymi doniesieniami w innych nowotworach na temat prokancerogennej roli zarówno periostyny, jak i podoplaniny, fakt ich ujemnej zależności w przypadku BCC jest trudny do interpretacji i wymaga dalszych badań na większej liczbie przypadków z podziałem na podtypy histologiczne. Dodatkowo, w moich badaniach zaobserwowałam istotnie statystyczną różnicę ekspresji podoplaniny w zależności od lokalizacji zmiany uwzględniającej narażenie na promieniowanie słoneczne. Ekspresja podoplaniny była istotnie wyższa w przypadku zmiany na skórze ekspozowanej na promienie UV w stosunku do skóry nieekspozowanej na promieniowanie UV w grupie SCC. Te wyniki potwierdzają dotychczasowe dane z piśmiennictwa na temat wiodącej roli promieniowania UV w transformacji nowotworowej niemelanocytowych raków skóry [143,146].

Białko Ki-67, znane także jako antygen **Ki-67**, jest markerem proliferacji komórkowej. Jest obecny w komórce podczas faz czynnych cyklu komórkowego (G1, S, G2 i mitozą) i nie stwierdza się go w komórce będącej w fazie spoczynkowej (G0). Białko Ki-67 jest szeroko stosowane w dziedzinie patologii, szczególnie w onkologii, gdzie jest używane do oceny stopnia proliferacji komórek nowotworowych [173]. W moich badaniach, najwyższa ekspresja antygeny Ki-67 była obserwowana w komórkach SCC, niższa w komórkach BCC, a najniższa w komórkach AK, co potwierdza dużą aktywność mitotyczną komórek obu typów raka skóry w porównaniu do zmian łagodnych. Różnice w nasileniu ekspresji między grupą SCC a pozostałymi były istotne statystycznie. Te wyniki potwierdzają dane o bardziej agresywnej naturze raków kolczystokomórkowych w porównaniu z rakami podstawnocomórkowymi czy łagodnymi zmianami typu AK [147].

W dostępnym piśmiennictwie nie opisano dotychczas potencjalnego związku iryzyny oraz periostyny w niemelanocytowych rakach skóry. Pomimo szeregu różnic, poczynając od mechanizmu powstawania poprzez sposób działania, a także miejsce ich ekspresji w tkankach, sugeruje się, że wspólną cechą obu białek jest przypuszczalnie ich działanie na komórki docelowe poprzez ten sam receptor błonowy [10,64]. Według niektórych autorów oba te białka łączą się z komórką docelową poprzez receptory integrynowe, uczestniczące w komunikacji międzykomórkowej, a także w komunikacji między komórkami i macierzą zewnątrzkomórkową. Integryny są złożone z dwóch podjednostek alfa (α) i beta (β). Badania

Kim i wsp. oraz Oguri i wsp. wskazują, że iryzyna łączy się z receptorem integrynowym $\alpha V\beta 5$, aczkolwiek nie można wykluczyć również jej oddziaływania na komórki poprzez inne białka błonowe. [10,11,12]. Z kolei periostyna posiada w swojej budowie cztery domeny FAS1 (ang. fascilin-like domain) poprzez które oddziałuje z receptorami integrynowymi $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 6\beta 4$ aktywując podobne szlaki sygnałowe jak iryzyna (m.in. FAK, PI3K-AKT). [64] Biorąc pod uwagę fakt wspólnego oddziaływania na receptor $\alpha V\beta 5$ chciałam sprawdzić czy istnieje korelacja między iryzyną a periostyną w NMSC. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały w każdej z badanych grup ekspresję iryzyny w komórkach nowotworowych oraz ekspresję periostyny w podścielisku tych nowotworów. Ponadto, między ekspresją iryzyny i periostyny wykazano istotną ujemną korelację w rakach podstawnokomórkowych. Wyniki te mogą wskazywać na istnienie potencjalnego związku między ekspresją iryzyny a periostyny w NMSC. Ujemna korelacja między tymi białkami może potwierdzać protekcyjną rolę iryzyny oraz przeciwną, tj. promującą rozwój nowotworów periostyny w NMSC. Jednak wyniki te wymagają jeszcze dodatkowych, szczegółowych badań na znacznie większych grupach poszczególnych typów niemelanocytowych raków skóry.

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.

7. WNIOSKI

W przeprowadzonym przeze mnie badaniu zrealizowałam wyznaczone cele pracy:

1. Wykazana obecność ekspresji iryzyiny, periostyny oraz podoplaniny w AK, BCC i SCC może sugerować ich potencjalną rolę w powstawaniu tych zmian i/lub ich progresji.

2. Brak istotnych statystycznie różnic w ekspresji iryzyiny między rogowaceniem słonecznym, rakiem podstawnkomórkowym oraz rakiem kolczystokomórkowym skóry nie potwierdza jej protekcyjnej roli w rozwoju niemelanocytowych raków skóry.

3. Zbliżony poziom ekspresji periostyny w zmianie łagodnej (AK) i nowotworowej (SCC) sugeruje możliwość transformacji nowotworowej komórek.

4. Jedynie w raku podstawnkomórkowym analiza korelacji wykazała istotną ujemną zależność między ekspresją iryzyiny i periostyny, co może sugerować ochronną rolę iryzyiny oraz prokancerogenną periostyny.

5. Istotne statystycznie różnice w nasileniu ekspresji podoplaniny wraz ze wzrostem stopnia złośliwości badanych zmian skórnych może wskazywać na rolę tego białka w transformacji nowotworowej oraz progresji zmian.

6. Jedynie w raku kolczystokomórkowym wyższa ekspresja podoplaniny w zmianach zlokalizowanych na skórze ekspozowanej na promienie UV potwierdza doniesienia o wiodącej roli promieniowania UV w transformacji nowotworowej NMSC.

8. STRESZCZENIE

Wstęp

Niemelanocytowe raki skóry (NMSC), w tym rak podstawnkomórkowy (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 cytotoksyczność 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 iryzyny, periostyny oraz podoplaniny w rogowaceniu słonecznym, raku podstawnkomórkowym i raku kolczystokomórkowym

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 rogowaceniem słonecznym (42 przypadki), rakiem podstawnokomórkowym (104 przypadki) oraz rakiem kolczystokomórkowym (50 przypadków). W celu określenia ekspresji iryzyny, 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 iryzyny, 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 iryzyny 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 podstawnokomórkowego, 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

dotadnią 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 podstawnokomórkowego i raka kolczystokomórkowego, 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 możliwych 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 eksponowanej na promienie UV w stosunku do skóry nieeksponowanej, 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.

9. 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.

10. PIŚMIENNICTWO

1. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012; 481: 463-468.
2. Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, et al. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism*. 2012; 61(12): 1725-38. doi: 10.1016/j.metabol.2012.09.002
3. Pukajło K, Kolackov K, Łaczmanski Ł, et al. Irisin – a new mediator of energy homeostasis. *Postepy Hig Med Dosw*. 2015; 69: 233-242.
4. Spiegelman BM. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes*. 2013; 62: 1774-1782.
5. Mahajan RD, Patra SK. Irisin, a novel myokine responsible for exercise induced browning of white adipose tissue. *Indian J Clin Biochem*. 2013; 28(1): 102-3. doi: 10.1007/s12291-012-0255-2.
6. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*. 2010; 285(10): 7153-64. doi: 10.1074/jbc.M109.053942.
7. Aydin S, Aydin S, Kobat MA. Decreased saliva/serum irisin concentrations in the acute myocardial infarction promising for being a new candidate biomarker for diagnosis of this pathology. *Peptides*. 2014; 56:141-5. doi: 10.1016/j.peptides.2014.04.002.
8. Piya MK, Harte AL, Sivakumar K, et al. The identification of irisin in human cerebrospinal fluid: influence of adiposity, metabolic markers, and gestational diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014; 306(5): E512-8. doi: 10.1152/ajpendo.00308.2013.
9. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, et al. A comprehensive immunohistochemical examination of the distribution of the fat-burning protein irisin in biological tissues. *Peptides*. 2014; 61:130-6. doi: 10.1016/j.peptides.2014.09.014.
10. Kim H, Wrann CD, Jedrychowski M, et al. Irisin Mediates Effects on Bone and Fat via α V Integrin Receptors. *Cell*. 2018;175(7): 1756-1768.e17. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.025. Erratum in: *Cell*. 2019 Jul 11;178(2):507-508.
11. Park EJ, Myint PK, Ito A, et al. Integrin-Ligand Interactions in Inflammation, Cancer, and Metabolic Disease: Insights Into the Multifaceted Roles of an Emerging Ligand Irisin. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 588066. doi: 10.3389/fcell.2020.588066.

12. Oguri Y, Shinoda K, Kim H, et al. CD81 Controls Beige Fat Progenitor Cell Growth and Energy Balance via FAK Signaling. *Cell*. 2020; 182(3): 563-577.e20. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.021.
13. Bi J, Zhang J, Ren Y, et al. Irisin reverses intestinal epithelial barrier dysfunction during intestinal injury via binding to the integrin $\alpha V\beta 5$ receptor. *J Cell Mol Med*. 2020; 24(1): 996-1009. doi: 10.1111/jcmm.14811.
14. Jandova T, Buendía-Romero A, Polanska H, et al. Long-Term Effect of Exercise on Irisin Blood Levels-Systematic Review and Meta-Analysis. *Healthcare (Basel)*. 2021; 9(11): 1438. doi: 10.3390/healthcare9111438.
15. Ma J, Chen K. The role of Irisin in multiorgan protection. *Mol Biol Rep*. 2021; 48(1): 763-772. doi: 10.1007/s11033-020-06067-1.
16. Tsiani E, Tsakiridis N, Kouvelioti R, et al. Current Evidence of the Role of the Myokine Irisin in Cancer. *Cancers*. 2021; 13(11): 2628. doi:10.3390/cancers13112628.
17. Vliora M, Nintou E, Karligiotou E, et al. Implication of Irisin in Different Types of Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(17): 9971. doi: 10.3390/ijms23179971.
18. Maalouf GE, El Khoury D. Exercise-Induced Irisin, the Fat Browning Myokine, as a Potential Anticancer Agent. *J Obes*. 2019; 6561726. doi: 10.1155/2019/6561726.
19. Tekin S, Erden Y, Sandal S, et al. Is Irisin an Anticarcinogenic Peptide? *Med-Science*. 2015; 4(2): 2172-80 doi: 10.5455/medscience.2014.03.8210
20. Shao L, Li H, Chen J, et al. Irisin suppresses the migration, proliferation, and invasion of lung cancer cells via inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2017; 485: 598–605.
21. Kong G, Jiang Y, Sun X, et al. Irisin reverses the IL-6 induced epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma cell migration and invasion through the STAT3/Snail signaling pathway. *Oncol Rep*. 2017; 38: 2647-2656.
22. Cheng G, Xu D, Chu K, et al. The Effects of MiR-214-3p and Irisin/FNDC5 on the Biological Behavior of Osteosarcoma Cells. *Cancer Biother. Radiopharm*. 2020; 35: 92–100.
23. Huang CW, Chang YH, Lee HH, et al. Irisin, an exercise myokine, potently suppresses tumor proliferation, invasion, and growth in glioma. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol*. 2020; 34: 9678–9693.
24. Gannon NP, Vaughan RA, Garcia-Smith R, et al. Effects of the exercise-inducible myokine irisin on malignant and non-malignant breast epithelial cell behavior in vitro. *Int. J. Cancer*. 2015; 136: E197-E202. doi: 10.1002/ijc.29142
25. Liu J, Huang Y, Liu Y, et al. Irisin Enhances Doxorubicin-Induced Cell Apoptosis in Pancreatic Cancer by Inhibiting the PI3K/AKT/NF- κ B Pathway. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res*. 2019; 25: 6085–6096.

26. Liu J, Song N, Huang Y, et al. Irisin inhibits pancreatic cancer cell growth via the AMPK-mTOR pathway. *Sci. Rep.* 2018; 8: 15247.
27. Zhang D, Zhang P, Li L, et al. Irisin functions to inhibit malignant growth of human pancreatic cancer cells via downregulation of the PI3K/AKT signaling pathway. *Onco Targets Ther.* 2019; 12:7243-7249. <https://doi.org/10.2147/OTT.S214260>.
28. Moon HS, Mantzoros CS. Regulation of cell proliferation and malignant potential by irisin in endometrial, colon, thyroid and esophageal cancer cell lines. *Metabolism: Clinical and Experimental.* 2014; 63(2): 188-193. doi: 10.1016/j.metabol.2013.10.005
29. Shi G, Tang N, Qiu J, et al. Irisin stimulates cell proliferation and invasion by targeting the PI3K/AKT pathway in human hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017; 493: 585–591.
30. Ugur K, Aydin S, Kuloglu T, et al. Comparison of irisin hormone expression between thyroid cancer tissues and oncocytic variant cells. *Cancer Manag Res.* 2019; 11: 2595-2603. doi: 10.2147/CMAR.S201979.
31. Kuloglu T, Artas G, Yardim M, et al. Immunostaining characteristics of irisin in benign and malignant renal cancers. *Biotech. Histochem.* 2019; 94: 435–441.
32. Cebulski K, Nowińska K, Jabłońska K, et al. Expression of Irisin/FNDC5 in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022; 23(7): 3530. doi: 10.3390/ijms23073530.
33. Nowińska K, Jabłońska K, Pawełczyk K, et al. Expression of Irisin/FNDC5 in Cancer Cells and Stromal Fibroblasts of Non-small Cell Lung Cancer. *Cancers.* 2019; 11:1538.
34. Fan GH, Zhu TY, Huang J. FNDC5 promotes paclitaxel sensitivity of non-small cell lung cancers via inhibiting MDR1. *Cell. Signal.* 2020; 72: 109665.
35. Gaggini M, Cabiati M, Del Turco S, et al. Increased FNDC5/Irisin expression in human hepatocellular carcinoma. *Peptides.* 2017; 88: 62-66. doi: 10.1016/j.peptides.2016.12.014.
36. Zhang J, Ke M, Ren Y, et al. Serum Irisin Predicts Posthepatectomy Complications in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Dis Markers.* 2019; 2019:9850191. doi: 10.1155/2019/9850191.
37. Pazgan-Simon M, Zuwala-Jagiello J, Kukla M, et al. Serum concentrations of selected adipokines in virus-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Clinical and Experimental Hepatology.* 2020; 6(3): 235-242. doi:10.5114/ceh.2020.99517.
38. Zhu H, Liu M, Zhang N, et al. Serum and Adipose Tissue mRNA Levels of ATF3 and FNDC5/Irisin in Colorectal Cancer Patients With or Without Obesity. *Front. Physiol.* 2018; 9: 1125.
39. Esawy MM, Abdel-Samd KM. The diagnostic and prognostic roles of serum irisin in bladder cancer. *Curr Probl Cancer.* 2020; 44(4): 100529. doi: 10.1016/j.currproblcancer.2019.100529.

40. Aslan R, Alp HH, Eryilmaz R, et al. Can the Irisin be a Biomarker for Prostate Cancer? A Case Control Study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2020; 21(2): 505-509. doi: 10.31557/APJCP.2020.21.2.505.
41. Altay DU, Keha EE, Karagüzel E, et al. The Diagnostic Value of FNDC5/Irisin in Renal Cell Cancer. *Int Braz J Urol.* 2018; 44(4): 734-739. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2017.0404.
42. Shahidi S, Hejazi J, Moghimi M, et al. Circulating Irisin Levels and Redox Status Markers in Patients with Gastric Cancer: A Case-Control Study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2020; 21(10): 2847-2851. doi: 10.31557/APJCP.2020.21.10.2847.
43. Panagiotou G, Triantafyllidou S, Tarlatzis BC, et al. Serum Levels of Irisin and Omentin-1 in Breast Neoplasms and Their Association with Tumor Histology. *Int J Endocrinol.* 2021; 2021: 6656671. doi: 10.1155/2021/6656671.
44. Provatopoulou X, Georgiou GP, Kalogera E, et al. Serum irisin levels are lower in patients with breast cancer: association with disease diagnosis and tumor characteristics. *BMC Cancer.* 2015; 15: 898. doi: 10.1186/s12885-015-1898-1.
45. Zhang ZP, Zhang XF, Li H, et al. Serum irisin associates with breast cancer to spinal metastasis. *Medicine (Baltimore).* 2018; 97(17): e0524. doi: 10.1097/MD.00000000000010524.
46. Mustafa AI, El-Shimi OS. Serum irisin: A prognostic marker for severe acne vulgaris. *J Cosmet Dermatol.* 2018; 17(5): 931-934. doi: 10.1111/jocd.12753.
47. Tang L, Yu B, Liao Y, et al. Serum Irisin: A Potential Diagnostic Marker for Insulin Resistance in Acne Vulgaris. *Indian J Dermatol.* 2022; 67(4): 477. doi: 10.4103/ijd.ijd_251_22.
48. Nowicki RJ, Grubska-Suchanek E, Jahnz-Różyk K, et al. Urticaria. Interdisciplinary diagnostic and therapeutic recommendations of the Polish Dermatological Society and the Polish Society of Allergology. *Pokrzywka. Interdyscyplinarne rekomendacje diagnostyczno-terapeutyczne Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego i Polskiego Towarzystwa Alergologicznego. Przegląd Dermatologiczny.* 2020; 107: 1–14. doi:10.5114/dr.2020.93966.
49. Us Altay D, Onder S, Etgu F, et al. A newly identified myokine: irisin, and its relationship with chronic spontaneous urticaria and inflammation. *Arch Dermatol Res.* 2023; 315(3): 437-442. doi: 10.1007/s00403-022-02378-4.
50. Reich K. The concept of psoriasis as a systemic inflammation: implications for disease management. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012; 26: 3-11.
51. Alatas TE, Kalayci M, Kara A, et al. Association between insulin resistance and serum and salivary irisin levels in patients with psoriasis vulgaris. *Dermatol. Sin.* 2017; 35: 12–15.
52. Ambrogio F, Sanesi L, Oranger A, et al. Circulating Irisin Levels in Patients with Chronic Plaque Psoriasis. *Biomolecules.* 2022; 12(8): 1096. doi: 10.3390/biom12081096.
53. Bulur I, Erdogan HK, Kocatürk E, et al. The role of irisin in the relationship between psoriasis and insulin resistance. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 2018; 153: 477–482.

54. Gamil AH, Abdel-Mawla MY, Khalifa NA, et al. Irisin Level in the Serum of Patients with Psoriasis and its Correlation with Adiponectin Level and the Clinical Severity. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2021; 25(6): 12449–12457.
55. Matusiak Ł, Kaszuba A, Krasowska D, et al. Epidemiology of hidradenitis suppurativa in Poland in relation to international data. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny*. 2017; 104(4): 377-384. doi:10.5114/dr.2017.69945.
56. Menter A. Recognizing and managing comorbidities and complications in hidradenitis suppurativa. *Semin Cutan Med Surg*. 2014; 33(3 Suppl): 54-6. doi: 10.12788/j.sder.0093.
57. Özkur E, Erdem Y, Altunay İK, et al. Serum irisin level, insulin resistance, and lipid profiles in patients with hidradenitis suppurativa: a case-control study. *An Bras Dermatol*. 2020; 95(6): 708-713. doi: 10.1016/j.abd.2020.04.009.
58. Salomon J. Rogowacenie ciemne - postępowanie diagnostyczne i terapeutyczne. *Medycyna po Dyplomie*. 2017; 26: 8–12.
59. Chen JQ, Fang LJ, Song KX, et al. Serum Irisin Level is Higher and Related with Insulin in Acanthosis Nigricans-related Obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2016; 124(3): 203-7. doi: 10.1055/s-0035-1565060.
60. Postępski J, Tuszkiewicz-Misztal E, Musiał J, et al. Zapalenie naczyń w chorobie Behçeta [w: Choroby układowe tkanki łącznej]. In J. J. Pietrzyk, H. Szajewska, & J. Z. Mrukowicz (Eds.), *Podręcznik pediatrii oparty na zasadach EBM* (pp. [1–1]). *Medycyna Praktyczna*. 2021.
61. Icli A, Cure E, Cumhuri Cure M, et al. Novel myokine: irisin may be an independent predictor for subclinic atherosclerosis in Behçet's disease. *J Investig Med*. 2016; 64(4): 875-81. doi: 10.1136/jim-2015-000044.
62. Kudo A. Periostin. *Advances in experimental medicine and biology*. 2019; 1132. Springer, *Dermatol. Sin.* (eBook) doi: 10.1007/978-981-13-6657-4.
63. González-González L, Alonso J. Periostin: A Matricellular Protein With Multiple Functions in Cancer Development and Progression. *Front Oncol*. 2018; 8:225. doi: 10.3389/fonc.2018.00225.
64. Wang Z, An J, Zhu D, et al. Periostin: an emerging activator of multiple signaling pathways. *J Cell Commun Signal*. 2022; 16(4) :515-530. doi: 10.1007/s12079-022-00674-2.
65. Ratajczak-Wielgomas K, Dziegiel P. The role of periostin in neoplastic processes. *Folia Histochem Cytobiol*. 2015; 53(2): 120-32. doi: 10.5603/FHC.a2015.0014.
66. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; 4(9): a011189. doi: 10.1101/cshperspect.a011189. Erratum in: *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Apr;7(4). doi: 10.1101/cshperspect.a026609.
67. Totoń E, Rybczyńska M. Charakterystyka białka FAK i jego rola w procesie nowotworzenia. *Postepy Hig Med Dosw.* (online), 2007; 61: 303-309.

68. Kudo A, Kii I. Periostin function in communication with extracellular matrices. *J Cell Commun Signal*. 2018; 12(1): 301-308. doi: 10.1007/s12079-017-0422-6.
69. Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, et al. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res*. 1999; 14(7): 1239-49. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.7.1239.
70. Conway SJ, Molkenin JD. Periostin as a heterofunctional regulator of cardiac development and disease. *Curr Genomics*. 2008; 9: 548–555. doi: 10.2174/138920208786847917.
71. Ruan K, Bao S, Ouyang G. The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(14): 2219-30. doi: 10.1007/s00018-009-0013-7.
72. Hamilton DW. Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease. *J Cell Commun Signal*. 2008; 2(1-2): 9-17. doi: 10.1007/s12079-008-0023-5.
73. Dorafshan S, Razmi M, Safaei S, et al. Periostin: biology and function in cancer. *Cancer Cell Int*. 2022; 22(1): 315. doi: 10.1186/s12935-022-02714-8.
74. Baril P, Gangeswaran R, Mahon PC, et al. Periostin promotes invasiveness and resistance of pancreatic cancer cells to hypoxia-induced cell death: role of the beta4 integrin and the PI3k pathway. *Oncogene*. 2007; 26(14): 2082-94. doi: 10.1038/sj.onc.1210009.
75. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*. 2005; 9(1): 59-71. doi: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00337.x.
76. Kikuchi Y, Kunita A, Iwata C, et al. The niche component periostin is produced by cancer-associated fibroblasts, supporting growth of gastric cancer through ERK activation. *Am J Pathol*. 2014; 184(3): 859-70.
77. Shao R, Bao S, Bai X, et al. Acquired expression of periostin by human breast cancers promotes tumor angiogenesis through up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(9): 3992-4003. doi: 10.1128/MCB.24.9.3992-4003.2004.
78. Siriwardena BS, Kudo Y, Ogawa I, et al. Periostin is frequently overexpressed and enhances invasion and angiogenesis in oral cancer. *Br J Cancer*. 2006; 95(10): 1396-403. doi: 10.1038/sj.bjc.6603431.
79. Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, et al. Periostin directly and indirectly promotes tumor lymphangiogenesis of head and neck cancer. *PLoS One*. 2012; 7(8): e44488. doi: 10.1371/journal.pone.0044488.
80. Bao S, Ouyang G, Bai X, et al. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell*. 2004; 5(4): 329-39. doi: 10.1016/s1535-6108(04)00081-9.

81. Liu GX, Xi HQ, Sun XY, et al. Role of periostin and its antagonist PNDA-3 in gastric cancer metastasis. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(9): 2605-13. doi: 10.3748/wjg.v21.i9.2605.
82. Sasaki H, Yu CY, Dai M, et al. Elevated serum periostin levels in patients with bone metastases from breast but not lung cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2003; 77(3): 245-52. doi: 10.1023/a:1021899904332.
83. Lv H, Liu R, Fu J, et al. Epithelial cell-derived periostin functions as a tumor suppressor in gastric cancer through stabilizing p53 and E-cadherin proteins via the Rb/E2F1/p14ARF/Mdm2 signaling pathway. *Cell Cycle*. 2014; 13(18): 2962-74. doi: 10.4161/15384101.2014.947203.
84. Kim CJ, Yoshioka N, Tambe Y, et al. Periostin is down-regulated in high grade human bladder cancers and suppresses in vitro cell invasiveness and in vivo metastasis of cancer cells. *Int J Cancer*. 2005; 117(1): 51-8. doi: 10.1002/ijc.21120.
85. Jackson-Boeters L, Wen W, Hamilton DW. Periostin localizes to cells in normal skin, but is associated with the extracellular matrix during wound repair. *J Cell Commun Signal*. 2009; 3(2): 125-33. doi: 10.1007/s12079-009-0057-3.
86. Murota H, Lingli Y, Katayama I. Periostin in the pathogenesis of skin diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74(23): 4321-4328. doi: 10.1007/s00018-017-2647-1.
87. Walker JT, McLeod K, Kim S, et al. Periostin as a multifunctional modulator of the wound healing response. *Cell Tissue Res*. 2016; 365(3): 453-465. doi:10.1007/s00441-016-2426-6.
88. Shiraishi H, Masuoka M, Ohta S, et al. Periostin Contributes to the Pathogenesis of Atopic Dermatitis by Inducing TSLP Production from Keratinocytes. *Allergology International*. 2012; 61: 563-572.
89. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2008; 358(14): 1483-94. doi: 10.1056/NEJMra074081. PMID: 18385500.
90. Kou K, Okawa T, Yamaguchi Y, et al. Periostin levels correlate with disease severity and chronicity in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2014; 171(2): 283-91. doi: 10.1111/bjd.12943.
91. Kim MW, Park JT, Kim JH, et al. Periostin in Mature Stage Localized Scleroderma. *Ann Dermatol*. 2017; 29(3): 268-275. doi: 10.5021/ad.2017.29.3.268.
92. Fujimura T, Kakizaki A, Furudate S, et al. A possible interaction between periostin and CD163+ skin-resident macrophages in pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *Exp Dermatol*. 2017; 26(12): 1193-1198. doi: 10.1111/exd.13157.
93. Bae Y, Izuhara K, Ohta S, et al. Periostin and Interleukin-13 Are Independently Related to Chronic Spontaneous Urticaria. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2016; 8(5): 457-60. doi: 10.4168/aair.2016.8.5.457.
94. Sokołowska-Wojdyło M. Diagnostyka i leczenie ziarniniaka grzybiastego. *Dermatologia po Dyplomie* 2014 (01).

95. Furudate S, Fujimura T, Kakizaki A, et al. The possible interaction between periostin expressed by cancer stroma and tumor-associated macrophages in developing mycosis fungoides. *Exp Dermatol*. 2016; 25: 107-112. Doi: 10.1111/exd.12873.
96. Kotobuki Y, Yang L, Serada S, et al. Periostin accelerates human malignant melanoma progression by modifying the melanoma microenvironment. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014; 27: 630-639. doi: 10.1111/pcmr.12245.
97. Tilman G, Mattiussi M, Brasseur F, et al. Human periostin gene expression in normal tissues, tumors and melanoma: evidences for periostin production by both stromal and melanoma cells. *Mol Cancer*. 2007; 6: 80. doi: 10.1186/1476-4598-6-80.
98. Lincoln V, Chao L, Woodley DT, et al. Over-expression of stromal periostin correlates with poor prognosis of cutaneous squamous cell carcinomas. *Exp Dermatol*. 2021; 30(5): 698-704. doi: 10.1111/exd.14281.
99. Villani R, Murigneux V, Alexis J, et al. Subtype-Specific Analyses Reveal Infiltrative Basal Cell Carcinomas Are Highly Interactive with their Environment. *J Invest Dermatol*. 2021; 141(10): 2380-2390. doi: 10.1016/j.jid.2021.02.760.
100. Ugorski M, Dziegiel P, Suchanski J. Podoplanin - a small glycoprotein with many faces. *Am J Cancer Res*. 2016; 6(2): 370-86
101. Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, et al. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol*. 1997; 151(4): 1141-52.
102. Wetterwald A, Hoffstetter W, Cecchini MG, et al. Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone*. 1996; 18(2): 125-32. doi: 10.1016/8756-3282(95)00457-2.
103. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, et al. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol*. 2005; 166(3): 913-21. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62311-5.
104. Ramirez MI, Millien G, Hinds A, et al. T1alpha, a lung type I cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth. *Dev Biol*. 2003; 256(1): 61-72. doi: 10.1016/s0012-1606(02)00098-2.
105. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol*. 1999; 154(2): 385-94. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65285-6.
106. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J*. 2003; 22(14): 3546-56. doi: 10.1093/emboj/cdg342.

107. Kaneko MK, Kato Y, Kitano T, et al. Conservation of a platelet activating domain of Aggrus/podoplanin as a platelet aggregation-inducing factor. *Gene*. 2006; 378: 52-7. doi: 10.1016/j.gene.2006.04.023.
108. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(2): 123-34. doi: 10.1038/nrc3004.
109. Nowak EM, Bednarek IA. Przejście epithelialno-mezenchymalne w procesach nowotworzenia. *Postępy Biologii Komórki*. 2018; 45: 223–236.
110. Astarita JL, Acton SE, Turley SJ. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Front Immunol*. 2012; 3: 283. doi: 10.3389/fimmu.2012.00283.
111. Martín-Villar E, Megías D, Castel S, et al. Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci*. 2006; 119(Pt 21): 4541-53. doi: 10.1242/jcs.03218.
112. Hałoń A, Piotr Donizy P. Rodzina białek ERM (ezrin/radixin/moesin) – rola i znaczenie w procesach polaryzacji, adhezji i mobilności komórkowej. *Postępy Hig Med Dosw* 2012; 66: 158-164.
113. Marhaba R, Zöller M. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol*. 2004; 35(3): 211-31. doi: 10.1023/b:hijo.0000032354.94213.69.
114. Martín-Villar E, Fernández-Muñoz B, Parsons M, et al. Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. *Mol Biol Cell*. 2010; 21(24): 4387-99. doi: 10.1091/mbc.E10-06-0489.
115. Dominiak A, Nowicki T, Łacheta D, et al. Fibroblasty związane z nowotworem jako potencjalny cel terapii onkologicznej. *Postępy Hig Med Dosw*, 2019; 73: 536–548.
116. Quintanilla M, Montero-Montero L, Renart J, et al. Podoplanin in Inflammation and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(3): 707. doi: 10.3390/ijms20030707.
117. Jabour SA, Al-Drobie BF, Abdullah BH, et al. Immunohistochemical Evaluation of S100, Alpha-Smooth Muscle Actin, Podoplanin, Matrix Metalloproteinase 13, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2neu Markers in Basal Cell Carcinoma Variants. *Cureus*. 2022; 14(11): e31221. doi: 10.7759/cureus.31221.
118. Wojciechowska-Zdrojowy M, Szepietowski JC, Matusiak Ł, et al. Expression of Podoplanin in Non-melanoma Skin Cancers and Actinic Keratosis. *Anticancer Res*. 2016; 36(4): 1591-7.
119. Asai J, Hirakawa S, Sakabe J, et al. Platelets Regulate the Migration of Keratinocytes via Podoplanin/CLEC-2 Signaling during Cutaneous Wound Healing in Mice. *Am J Pathol*. 2016; 186(1): 101-8. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.09.007.
120. Honma M, Minami-Hori M, Takahashi H, et al. Podoplanin expression in wound and hyperproliferative psoriatic epidermis: regulation by TGF- β and STAT-3 activating cytokines, IFN- γ , IL-6, and IL-22. *J Dermatol Sci*. 2012; 65(2): 134-40. doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.11.011.

121. Honma M, Fujii M, Iinuma S, et al. Podoplanin expression is inversely correlated with granular layer/filaggrin formation in psoriatic epidermis. *J Dermatol.* 2013; 40(4): 296-7. doi: 10.1111/1346-8138.12060.
122. Jankowska-Konsur A, Kobierzycki C, Grzegorzółka J, et al. Podoplanin Expression Correlates with Disease Progression in Mycosis Fungoides. *Acta Derm Venereol.* 2017; 97(2): 235-241. doi: 10.2340/00015555-2517.
123. Reinehr CPH, Bakos RM. Actinic keratoses: review of clinical, dermoscopic, and therapeutic aspects. *An Bras Dermatol.* 2019; 94(6): 637-657. doi: 10.1016/j.abd.2019.10.004.
124. Glogau RG. The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 42: 23-4. doi: 10.1067/mjd.2000.103339. PMID: 10607353.
125. Hashim PW, Chen T, Rigel D, et al. Actinic Keratosis: Current Therapies and Insights Into New Treatments. *J Drugs Dermatol.* 2019; 18(5): 161-166.
126. Traianou A, Ulrich M, Apalla Z, et al. Risk factors for actinic keratosis in eight European centres: a case-control study. *Br J Dermatol.* 2012; 167: 36-42. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.11085.x.
127. Narbutt J, Wolska H, Kaszuba A, et al. Photoprotection. Recommendations of the Polish Dermatological Society. Part 1: Ultraviolet radiation and sunscreens. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny*, 2018; 105(1): 19-29. doi:10.5114/dr.2018.74163.
128. Timares L, Katiyar SK, Elmetts CA. DNA damage, apoptosis and langerhans cells--Activators of UV-induced immune tolerance. *Photochem Photobiol.* 2008; 84(2): 422-36. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00284.x.
129. Padilla, R. Steven. *Epidemiology, natural history, and diagnosis of actinic keratosis.* UpToDate. Waltham (MA) 2017.
130. Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 42: 4-7. doi: 10.1067/mjd.2000.103342.
131. Nockowski P, Woźniak Z. Histologia rogowacenia słonecznego. *Dermatologia Po Dyplomie.* 2019; 10: 46–49.
132. Placek W, Markiewicz A, Zajac N, et al. Actinic keratosis – definition, aetiopathogenesis and therapeutical approach. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny.* 2013; 100(3): 171-177.
133. Cockerell CJ. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). *J Am Acad Dermatol.* 2000; 42: 11-7. doi: 10.1067/mjd.2000.103344.
134. Newlands C, Currie R, Memon A, et al. Non-melanoma skin cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol.* 2016; 130(S2): 125-132. doi: 10.1017/S0022215116000554.

135. Rogers HW, Weinstock MA, Feldman SR, et al. Incidence Estimate of Nonmelanoma Skin Cancer (Keratinocyte Carcinomas) in the U.S. Population, 2012. *JAMA Dermatol.* 2015; 151(10): 1081-6. doi: 10.1001/jamadermatol.2015.1187.
136. Krajowy Rejestr Nowotworów www.onkologia.org.pl
137. Ciążyńska M, Szczęśna P, Narbutt J, et al. Przypadek raka podstawnkomórkowego skóry — jak leczyć, gdy chirurg już nic nie może? *Forum Dermatologicum* 2017; 3(2): 58–62.
138. Ciążyńska M, Kamińska-Winciorek G, Lange D, et al. The incidence and clinical analysis of non-melanoma skin cancer. *Sci Rep.* 2021; 11(1): 15705. doi: 10.1038/s41598-021-94435-7. Erratum for: *Sci Rep.* 2021 Feb 22;11(1):4337.
139. Owczarek W, Rutkowski P, Słowińska M, et al. Zalecenia dotyczące leczenia raka podstawnkomórkowego i raka kolczystokomórkowego przygotowane przez Sekcję Onkologiczną Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego i Sekcję Akademii Czerniaka Polskiego Towarzystwa Chirurgii Onkologicznej; *Onkol Prakt Klin Edu* 2015; 1(2): 96-106.
140. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, et al. Sunlight Exposure, Pigmentary Factors, and Risk of Nonmelanocytic Skin Cancer: I. Basal Cell Carcinoma. *Arch Dermatol.* 1995; 131(2): 157–163. doi:10.1001/archderm.1995.01690140041006.
141. Liu-Smith F, Jia J, Zheng Y. UV-Induced Molecular Signaling Differences in Melanoma and Non-melanoma Skin Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 996: 27-40. doi: 10.1007/978-3-319-56017-5_3.
142. Niculet E, Craescu M, Rebegea L, et al. Basal cell carcinoma: Comprehensive clinical and histopathological aspects, novel imaging tools and therapeutic approaches (Review). *Exp Ther Med.* 2022; 23(1): 60. doi: 10.3892/etm.2021.10982.
143. Lesiak A, Czuwara J, Kamińska-Winciorek G, et al. Basal cell carcinoma. Diagnostic and therapeutic recommendations of Polish Dermatological Society. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny.* 2019; 106(2): 107-126. doi:10.5114/dr.2019.85572.
144. Pellegrini C, Maturo MG, Di Nardo L, et al. Understanding the Molecular Genetics of Basal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(11): 2485. doi: 10.3390/ijms18112485.
145. Wu Peggy A, Robinson J. Epidemiology, pathogenesis, clinical features, and diagnosis of basal cell carcinoma. 2023 UpToDate.
146. Lesiak A, Czuwara J, Kamińska-Winciorek G, et al. Squamous cell carcinoma and Merkel-cell carcinoma. Diagnostic and therapeutic recommendations of the Polish Dermatological Society. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny.* 2019; 106(2): 127-149. doi:10.5114/dr.2019.85573.
147. Corchado-Cobos R, García-Sancha N, González-Sarmiento R, et al. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: From Biology to Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(8): 2956. doi: 10.3390/ijms21082956.

148. Marks R, Rennie G, Selwood T. The Relationship of Basal Cell Carcinomas and Squamous Cell Carcinomas to Solar Keratoses. *Arch Dermatol.* 1988; 124(7): 1039–1042. doi:10.1001/archderm.1988.01670070027013.
149. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, et al. Sunlight exposure, pigmentation factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. II. Squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol.* 1995;131(2):164-9.
150. Ortonne JP. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2002; 146 (Suppl 61): 20-3. doi: 10.1046/j.1365-2133.146.s61.6.x.
151. Ratushny V, Gober MD, Hick R, et al. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Invest.* 2012; 122(2): 464-72. doi: 10.1172/JCI57415.
152. Stratigos AJ, Garbe C, Dessinioti C, et al. European Dermatology Forum (EDF), the European Association of Dermato-Oncology (EADO) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). European interdisciplinary guideline on invasive squamous cell carcinoma of the skin: Part 1. epidemiology, diagnostics and prevention. *Eur J Cancer.* 2020; 128:60-82. doi: 10.1016/j.ejca.2020.01.007.
153. Chang MS, Azin M, Demehri S. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: The Frontier of Cancer Immunoprevention. *Annu Rev Pathol.* 2022; 17: 101-119. doi: 10.1146/annurev-pathol-042320-120056.
154. Lechowska-Mazur I, Pietrzak A. Rak kolczystokomórkowy skóry. (Cutaneous squamous cell carcinoma.). *Nowa Med.* 2005; 12(2): 51-56.
155. Zieliński T, Lewandowska Mo. Owrzodzenie Marjolina - nowotwór złośliwy rozwijający się na podłożu przewlekłych owrzodzeń i blizn. Analiza 8 przypadków. *Przegląd Dermatologiczny.* 2010; 97: 38–42.
156. Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, et al. European Association of Dermato-Oncology (EADO); European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer.* 2015; 51(14): 1989-2007. doi: 10.1016/j.ejca.2015.06.110.
157. Cañueto J, Román-Curto C. Novel Additions to the AJCC's New Staging Systems for Skin Cancer. *Actas Dermosifiliogr.* 2017; 108(9): 818-826. doi: 10.1016/j.ad.2017.05.012.
158. Ruiz ES, Karia PS, Besaw R, et al. Performance of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual, 8th Edition vs the Brigham and Women's Hospital Tumor Classification System for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Dermatol.* 2019; 155(7): 819-825. doi: 10.1001/jamadermatol.2019.0032.
159. Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2017; 18(7): 40. doi: 10.1007/s11864-017-0484-y.

160. de Jong E, Lammerts MUPA, Genders RE, et al. Update of advanced cutaneous squamous cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2022; 36 (Suppl 1): 6-10. doi: 10.1111/jdv.17728.
161. Hutchinson, L. Setting the stage for cutaneous SCC. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 63. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.2.
162. Que SKT, Zwald FO, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: Incidence, risk factors, diagnosis, and staging. *J Am Acad Dermatol*. 2018; 78(2): 237-247. doi: 10.1016/j.jaad.2017.08.059.
163. Fania L, Didona D, Di Pietro FR, et al. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Approaches. *Biomedicines*. 2021; 9(2): 171. doi: 10.3390/biomedicines9020171.
164. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe*. 1987; 8:138-140.
165. Greinert R. Skin cancer: new markers for better prevention. *Pathobiology*. 2009; 76(2): 64-81. doi: 10.1159/000201675.
166. Friedenreich CM, Ryder-Burbidge C, McNeil J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol Oncol*. 2021; 15(3): 790-800. doi: 10.1002/1878-0261.12772.
167. Rock CL, Thomson C, Gansler T, et al. American Cancer Society guideline for diet and physical activity for cancer prevention. *CA Cancer J Clin*. 2020; 70(4): 245-271. doi: 10.3322/caac.21591.
168. Patel AV, Friedenreich CM, Moore SC, et al. American College of Sports Medicine Roundtable Report on Physical Activity, Sedentary Behavior, and Cancer Prevention and Control. *Med Sci Sports Exerc*. 2019; 51(11): 2391-2402. doi: 10.1249/MSS.0000000000002117.
169. Zhao Z, Zhang Y, Guo E, et al. Periostin secreted from podoplanin-positive cancer-associated fibroblasts promotes metastasis of gastric cancer by regulating cancer stem cells via AKT and YAP signaling pathway. *Mol Carcinog*. 2023; 62(5): 685-699. doi: 10.1002/mc.23517.
170. Schwab M, Lohr S, Schneider J, et al. Podoplanin is required for tumor cell invasion in cutaneous squamous cell carcinoma. *Exp Dermatol*. 2021; 30(11): 1619-1630. doi: 10.1111/exd.14344.
171. Kawaguchi H, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, et al. Podoplanin: a novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. *J Clin Oncol*. 2008; 26(3):354-60. doi: 10.1200/JCO.2007.13.4072
172. Kreppel M, Scheer M, Drebber U, et al. Impact of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma: clinical and histopathologic correlations. *Virchows Arch*. 2010; 456(5): 473-82. doi: 10.1007/s00428-010-0915-7.

173. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984; 133(4): 1710-5.