

Rola nestyny w progresji raka gruczołu piersiowego

Badania przeprowadzono łącznie na 161 bloczkach parafinowych zawierających materiał tkankowy, pochodzących z archiwów Zakładu Patomorfologii Dolnośląskiego Centrum Onkologii we Wrocławiu oraz Zakładu Patologii Nowotworów Centrum Onkologii Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Krakowie. Do badań wykorzystano:

- 1) 11 przypadków łagodnych zmian dysplastycznych (ang. non-malignant breast tissue lesions, NBTL),
- 2) 26 przypadków przewodowych raków przedinwazyjnych (DCIS, ang. ductal carcinoma *in situ*),
- 3) 124 przypadki inwazyjnego raka przewodowego (IDC, ang. invasive ductal carcinoma).

Na skrawkach parafinowych przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne (IHC) z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko następującym markerom:

- 1) Nestynie
- 2) CD31, CD34, SOX-18 (markery naczyniowe)
- 3) Ki-67 (marker proliferacji komórkowej)

Ekspresję wyżej wymienionych antygenów oceniono przy użyciu mikroskopu świetlnego BX-41 (Olympus). Cytoplazmatyczną ekspresję nestyny w komórkach nowotworowych oraz jądrową ekspresję antygeny Ki-67 oceniono za pomocą metod półilościowych. Następnie, dla nestyny oraz antygenów naczyniowych (CD31, CD34, SOX-18) wyznaczono średnią gęstość naczyń (MVD, ang. microvessel density) oraz średnią powierzchnię naczyń (MVC, ang. microvessel count) wykazujących reakcję barwną. Otrzymane wyniki zostały skorelowane z danymi kliniczno-patologicznymi pacjentek (stopień złośliwości histologicznej, status receptorowy, obecność przerzutów w węzłach chłonnych, stopień zaawansowania klinicznego, oraz czas przeżycia całkowity i wolny od wznowy).

Aby potwierdzić wyniki badań IHC, określono poziom ekspresji nestyny za pomocą technik molekularnych (real-time PCR, Western blot, immunocytochemia, immunofluorescencja) w dwóch modelach komórkowych *in vitro*:

- 1) ludzkich linii komórek śródbłonna, izolowanych z odmiennych typów naczyń; HUVEC-SVT (śródbłonek żyły pępowinowej), HMEC-1 (śródbłonek naczyń

włosowatych skóry) oraz HEPC-CB.1 (linia wczesnych progenitorów śródbłonna, izolowana z krwi pępowinowej),

- 2) ludzkich linii raka gruczołu piersiowego, odpowiadających zróżnicowanym stopniom agresywności; MCF-7, SKBR-3 (łagodne linie nowotworowe, opowiadające typowi luminalnemu) oraz MDA-MB-231, BO2 (linie przerzutowe, odpowiadające typowi potrójnie ujemnemu).

Przeprowadzone badania IHC wykazały, że wartość Nes⁺MVD wzrasta wraz ze stopniem inwazyjności guza. Wyższe wartości Nes⁺MVD obserwowano w grupie pacjentek z inwazyjną postacią raka (IDC), niż u pacjentek ze zmianami nienowotworowymi (NBTL; $p < 0.0001$) oraz rakiem przedinwazyjnym (DCIS; $p < 0.0001$). W badaniu wykazano również, że w grupie pacjentek z IDC, wartość Nes⁺MVD była istotnie wyższa u pacjentek z przerzutami do węzłów chłonnych (N0 vs. N1-3; $p = 0.0132$), z wyższym stopniem złośliwości histologicznej (G1 vs. G2, $p = 0.0203$; G1 vs. G3, $p = 0.0072$), w wyższych stadiach zaawansowania (I+II vs. III+IV; $p = 0.0377$) oraz z rakiem potrójnie ujemnym ($p = 0.0357$). Analiza czasu przeżycia w grupie IDC wykazała, że wysoka wartość Nes⁺MVD związana była ze skróceniem całkowitego czasu przeżycia pacjentek ($p = 0.0013$) oraz szybszym nawrotem choroby ($p = 0.0091$). Dodatkowo w przypadku całkowitego czasu przeżycia, nestyna była niezależnym czynnikiem prognostycznym ($p = 0.007$). Przeprowadzona analiza korelacji wykazała związek Nes⁺MVD z gęstością naczyń nowopowstających (CD34⁺MVD; $r = 0.3280$; $p = 0.0032$), natomiast w przypadku naczyń dojrzałych (CD31⁺MVD) takich zależności nie stwierdzono ($r = 0.1563$; $p = 0.1304$). Badania poziomu ekspresji nestyny w liniach śródbłonna wykazały najwyższą ekspresję w progenitorowej linii HEPC-CB.1. Niższe poziomy ekspresji odnotowano odpowiednio w linii HMEC-1, izolowanej z mikronaczyń oraz linii HUVEC-SVT, izolowanej z dużego naczynia żylnego. Powyższe wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *International Journal of Oncology* (Nowak *et al.*, Nestin-positive microvessel density is an independent prognostic factor in breast cancer, *Int J Onc*, 2017).

Pozytywną ekspresję nestyny odnotowano w cytoplazmie komórek nowotworowych w 39 (31.5%) przypadkach IDC. Wyższe wartości wskaźnika nasilenia reakcji immunohistochemicznych (IRS, ang. immunoreactive score) wykazano w rakach niskozróżnicowanych (G2 vs. G3, $p = 0.024$) potrójnie ujemnych ($p < 0.0001$). W badaniu wykazano, że ekspresja nestyny dodatnio koreluje z indeksem proliferacyjnym komórek nowotworowych ($r = 0.25$, $p = 0.0062$) i krótszym czasem całkowitego przeżycia ($p = 0.02$).

Dodatkowo wykazano, że ekspresja nestyny w komórkach nowotworowych może być związana z nasileniem angiogenezy. Analiza statystyczna wykazała pozytywne korelacje pomiędzy ekspresją nestyny, a średnią powierzchnią naczyń w przypadku wszystkich badanych antygenów naczyniowych (Nes⁺MVC, $r=0.19$, $p=0.04$; CD31⁺MVC, $r=0.24$, $p=0.01$; CD34⁺MVC, $r=0.38$, $p=0.0002$; SOX-18⁺MVC, $r=0.27$, $p=0.005$). Badania molekularne na liniach komórkowych raka gruczołu piersiowego wykazały wyższy poziom białka nestyny w liniach przerzutujących MDA-MB-231 i BO2. Przedstawione rezultaty zostały opublikowane w czasopiśmie *International Journal of Oncology* (Nowak et al., Role of nestin expression in angiogenesis and breast cancer progression, *Int J Onc*, 2018).

Podsumowanie rezultatów badań uzyskanych przeze mnie oraz innych autorów, zostało zebrane w pracy pogładowej opublikowanej w *International Journal of Oncology* (Nowak and Dzięgiel, Implications of nestin in breast cancer pathogenesis (Review), *Int J Onc*, 2018). W pracy tej, podsumowano wartość kliniczno-prognostyczną nestyny, a także poruszono zagadnienia związane z nowotworowymi komórkami macierzystymi i procesem angiogenezy.

Role of nestin in breast cancer progression

The research was performed in total on 161 paraffin-embedded tissue blocks from the archives of the Department of Pathology of the Wrocław Lower Silesian Oncology Centre and the Department of Tumour Pathology of the Maria Skłodowska-Curie Oncology Centre, Krakow Branch. The following material was used in the study:

- 4) 11 cases of non-malignant breast tissue lesions (NBTL),
- 5) 26 cases of ductal carcinoma *in situ* (DCIS),
- 6) 124 cases of invasive ductal carcinoma (IDC).

Immunohistochemical (IHC) reactions were performed on paraffin sections using antibodies directed against:

- 4) Nestin
- 5) CD31, CD34, SOX-18 (vascular antigens)
- 6) Ki-67 (proliferation marker)

The expression of the abovementioned proteins was analysed using the optical microscope BX-41 (Olympus). The cytoplasmic expression of nestin in tumour cells and the nuclear expression of Ki-67 antigen were analyzed using semi-quantitative assessment methods. Then, the mean microvessel density (MVD) and the mean microvessel count (MVC) were assessed for nestin and other immunolabelled vascular antigens (CD31, CD34, SOX-18). The obtained results were correlated with patients' clinico-pathological data (lymph node metastasis, clinical advancement stage, malignancy grade, receptor status, overall and event-free survival).

To confirm the results of the IHC studies, the level of nestin expression was determined using molecular biology methods (real-time PCR, Western blot, immunocytochemistry, immunofluorescence) in two *in vitro* cellular models:

- 3) human endothelial cell lines isolated from various types of vessels; HUVEC-SVT (umbilical vein endothelial cells), HMEC-1 (dermal microvascular endothelial cell line) and HEPC-CB.1 (early endothelial progenitor cells isolated from cord blood),
- 4) human breast cancer cell lines representing various degrees of aggressiveness; MCF-7, SKBR-3 (benign tumour cell lines reflecting the luminal subtype) and MDA-MB-231, BO2 (metastatic cell lines reflecting the triple negative subtype).

Analysis of immunostained sections revealed that the value of Nes⁺MVD increases with tumour invasiveness. Higher values of Nes⁺MVD were observed in the group with invasive

Summary

carcinomas as compared to non-cancerous lesions (NBTL; $p < 0.0001$) or pre-invasive tumours (DCIS; $p < 0.0001$). The study demonstrated also that in the IDC group significantly higher values of Nes⁺MVD were observed among patients with lymph node metastases (N0 vs. N1-3; $p = 0.0132$), with higher malignancy grade (G1 vs. G2, $p = 0.0203$; G1 vs. G3, $p = 0.0072$), in advanced-stage disease (I+II vs. III+IV; $p = 0.0377$) and with triple negative tumours ($p = 0.0357$). The analysis of survival in the IDC group revealed that the high value of Nes⁺MVD was associated with shorter overall survival ($p = 0.0013$) and with earlier relapse ($p = 0.0091$). Moreover, in case of OS, nestin was an independent prognostic factor ($p = 0.007$). The correlation analysis revealed that Nes⁺MVD is associated with the density of newly-formed vessels (CD34⁺MVD; $r = 0.3280$; $p = 0.0032$) but not with the density of mature vessels (CD31⁺MVD, $r = 0.1563$; $p = 0.1304$). The studies on nestin expression in human endothelial cell lines demonstrated the highest nestin level in the progenitor HEPC-CB.1 cells. Lower nestin levels were observed respectively in the HMEC-1 cells isolated from microvessels and the HUVEC-SVT cells isolated from the large vein. The abovementioned results were published in the *International Journal of Oncology* (Nowak *et al.*, Nestin-positive microvessel density is an independent prognostic factor in breast cancer, *Int J Onc*, 2017).

A positive nestin expression was observed in the cytoplasm of tumour cells in 39 (31.5%) cases of IDC. Higher values of IRS were noted in poorly differentiated (G2 vs. G3, $p = 0.024$) and triple negative tumours ($p < 0.0001$). The study demonstrated that nestin expression positively correlates with the proliferation level of tumour cells ($r = 0.25$, $p = 0.0062$) and with shorter overall survival ($p = 0.02$). Additionally, it was shown that nestin expression in tumour cells might be associated with increased angiogenesis. Statistical analysis revealed positive correlations between nestin expression and the area and number of vessels expressing all investigated antigens (Nes⁺MVC, $r = 0.19$, $p = 0.04$; CD31⁺MVC, $r = 0.24$, $p = 0.01$; CD34⁺MVC, $r = 0.38$, $p = 0.0002$; SOX-18⁺MVC, $r = 0.27$, $p = 0.005$). Molecular studies on breast cancer cell lines showed higher nestin protein level in the MDA-MB-231 and BO2 metastatic cell lines. The presented results were published in the *International Journal of Oncology* (Nowak *et al.*, Role of nestin expression in angiogenesis and breast cancer progression, *Int J Onc*, 2018).

The summary of the results published by me and other authors was compiled in the review published in the *International Journal of Oncology* (Nowak and Dzięgiel, Implications of nestin in breast cancer pathogenesis (Review), *Int J Onc*, 2018). The paper summarizes the

Summary

prognostic and the clinical value of nestin, as well as the issues associated with cancer stem cells and angiogenesis.