

STRESZCZENIE

Wstęp:

Czerniak błony naczyniowej (uveal melanoma; UM) jest najczęstszym pierwotnym nowotworem oka osób dorosłych. Pomimo postępów w zakresie leczenia pierwotnego nowotworu, śmiertelność związana z UM wciąż pozostaje wysoka. W blisko połowie przypadków UM dochodzi do powstania przerzutów, co może być spowodowane trudnym do wykrycia rozsiewem we wczesnym okresie choroby. Obecnie dostępne formy terapii adiuwantowej cechuje niska skuteczność. Ich zastosowanie pozwala uzyskać średni czas przeżycia wynoszący przeciętnie zaledwie 1,07 roku (zakres: 0,59-2,50 lat) od momentu rozpoznania przerzutu UM. Poszukiwanie czynników prognostycznych i predykcyjnych w UM, szczególnie tych związanych ze szlakami sygnałowymi funkcjonującymi w komórce nowotworowej, daje szansę na zwiększenie precyzji rokowania w tym typie nowotworu, a także na określenie punktów uchwytu, stanowiących potencjalnie nowe cele terapeutyczne.

Cele pracy:

1. Usystematyzowanie dostępnych danych na temat czynników rokowniczych w UM.
2. Ocena wartości rokowniczej cech morfologicznych jąder komórek nowotworowych UM.
3. Ocena wartości rokowniczej ekspresji kinazy PLK1 w komórkach UM.

Material i metody:

Badania przeprowadzono na grupie 164 pacjentów leczonych w latach 2002-2011 z zastosowaniem pierwotnej enukleacji w Klinice Okulistyki i Onkologii Okulistycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Włączenie pacjentów do badania następowało na podstawie dostępnej dokumentacji i materiału tkankowego. Zebrane informacje obejmowały: wiek i płeć, oko zajęte procesem chorobowym, wysokość i największą średnicę podstawy guza, stratyfikację guza zgodnie z AJCC (pT oraz stage), lokalizację guza w stosunku do równika gałki ocznej, zajęcie ciała rzęskowego, pigmentację oraz kształt guza, współistnienie jaskry i/lub odwarstwienia siatkówki, podtyp histologiczny, nacieki twardówki i/lub nerwu wzrokowego, obecność martwicy w obrębie guza. Dodatkowo uwzględniono szczegółowe parametry histopatologiczne, takie jak: wskaźnik mitotyczny, obecność nacieku limfocytarnego (TILs, tumor-infiltrating lymphocytes), pseudoinkluzji jądrowych (NPIs, nuclear pseudoinclusions), bruzd wewnątrzjądrowych, wielojądrowych komórek olbrzymich oraz wylewów krwi, a także ilość barwnika w komórkach nowotworowych.

Znaczenie rokownicze cech cytomorfologicznych jąder zbadano z zastosowaniem trzech parametrów – obecności, rozmiaru i ilości jąder w preparatach guza pierwotnego UM barwionych hematoksylina i eozyną.

Immunohistochemiczną (IHC) ocenę ekspresji PLK1 wykonano z użyciem króliczego przeciwciała monoklonalnego anti-PLK1. Zastosowano barwienia kontrolne, pozytywne i negatywne. Do oceny stopnia ekspresji PLK1 w komórkach UM zastosowano półilościową skalę wg Remmele i Stegner, uzyskując jako wynik współczynnik IRS (immunoreactive score) o zakresie od 0 do 12 punktów.

Wyniki:

Pierwszym artykułem stanowiącym element rozprawy doktorskiej jest praca poglądowa, która pozwoliła na usystematyzowanie dostępnych danych na temat parametrów mających znaczenie rokownicze w tym typie nowotworu. Na tej podstawie dokonano wyboru dalszego kierunku badań i, po ich wykonaniu, przedstawiono wartość prognostyczną parametrów cytomorfologicznych jąder jąder komórkowych oraz ekspresji kinazy serynowo-treoninowej PLK1 w UM.

Druga publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej obejmuje zagadnienia związane z wartością rokowniczą cech cytomorfologicznych jąderek jąder komórkowych. Wyboru ocenianych parametrów dokonano mając na uwadze praktyczną stronę badania podczas oceny preparatów w codziennej praktyce ośrodka leczącego pacjentów z UM. Ideą było sprawdzenie, czy uwzględnienie relatywnie prostych cech – obecności, wielkości i liczebności jąderek – w preparatach histopatologicznych barwionych standardową metodą z zastosowaniem hematoksyliny i eozyny, wniesie istotne dane do oceny rokowania w UM. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że co prawda sama obecność jąderek ma niewielkie znaczenie w tym kontekście, natomiast ich większy rozmiar i większa liczba już tak. Parametry te korelowały ze znanymi wcześniej, istotnymi dla przebiegu UM czynnikami jak: większa średnica podstawy guza (oba parametry), wyższy kliniczny stopień zaawansowania (stage) (oba parametry), wyższy stopień zaawansowania guza pierwotnego (pT) (większa liczba jąderek; dla makrojąderek obserwowano podobny trend, nie osiągający jednak poziomu istotności statystycznej), zajęcie ciała rzęskowego (makrojąderka). W zakresie korelacji z parametrami histopatologicznymi stwierdzono, że obecność makrojąderek i mnogich jąderek związana jest istotnie z podtypem nabłonkowatokomórkowym guza pierwotnego, wysokim wskaźnikiem mitotycznym, pleomorfizmem, występowaniem wielojądrowych komórek olbrzymich oraz pseudoinkluzji wewnątrzjądrowych (NPIs), a także brakiem bruzd wewnątrzjądrowych. Większa zawartość barwnika w komórkach nowotworowych, którego znaczenie dla przebiegu UM podlega obecnie weryfikacji w licznych pracach, w powyższym badaniu była również związana w sposób istotny statystycznie z obecnością większych i mnogich jąderek. Zarówno występowanie makrojąderek, jak i mnogich jąderek wiązały się z istotnie krótszym przeżyciem wolnym od choroby oraz przeżyciem całkowitym w czerniaku błony naczyniowej oka.

Trzecia publikacja składająca się na rozprawę doktorską jest związana z określeniem prognostycznego znaczenia ekspresji białka PLK1. Z dostępnej literatury wynika, że w większości nowotworów, w których wykazano znaczenie prognostyczne ekspresji PLK1, zwiększona jej zawartość w komórkach nowotworowych związana była z gorszym rokowaniem. Jest to tym bardziej oczekiwane, że PLK1 jest kinazą ściśle związaną z proliferacją komórek. Tymczasem w naszym badaniu wykazaliśmy, że w przypadku UM to niska ekspresja PLK1 związana jest z niektórymi znanymi negatywnymi czynnikami rokowniczymi (większa średnica podstawy guza pierwotnego, wyższy stopień zaawansowania klinicznego – pT i stage), a także istotnie krótszym przeżyciem całkowitym (w relacji z przeżyciem wolnym od choroby obserwowaliśmy podobny trend, ale nie uzyskujący poziomu istotności statystycznej). Wyniki te są zgodne z dostępnymi w literaturze pracami analitycznymi prowadzonymi z wykorzystaniem baz tkankowych licznych nowotworów (the Cancer Genome Atlas (TCGA), the Kaplan Meier ploter), które wskazują, że w większości z nich złe rokowanie wiąże się z nadekspresją PLK1, ale są i takie, jak np. gruczolakorak odbytnicy, grasiczak czy rak płaskonabłonkowy płuc, w których jest odwrotnie. Niewątpliwie uzyskane dane, uzasadniają dalsze prace nad rolą PLK1 w przebiegu UM i ostrożność w badaniach nad potencjalnym zastosowaniem inhibitorów PLK1 w leczeniu czerniaka błony naczyniowej oka.

Wnioski:

1. Obecność makrojąderek i mnogich jąderek w jądrach komórek to negatywne czynniki prognostyczne, których obecność jest istotnie skorelowana z gorszym rokowaniem pacjentów z czerniakiem błony naczyniowej oka.
2. Ocena morfologii jąderek w rutynowym barwieniu hematoksylina i eozyna może być tanią i relatywnie prostą metodą uzyskania wiarygodnych informacji prognostycznych w UM.
3. Niska ekspresja PLK1 w komórkach nowotworowych guza pierwotnego UM jest związana z gorszą prognozą długoterminową pacjentów z czerniakiem gałki ocznej (wykazano istotnie krótszy czas przeżycia całkowitego u pacjentów z obniżoną ekspresją PLK1 w komórkach nowotworowych).

SUMMARY

Introduction:

Uveal melanoma (UM) is the most common primary eye tumour in adults. Despite advances in therapies of primary UM, the mortality rates still remain high. Almost half of the cases metastasize, which may be due to diagnostic difficulties detecting tumour spread at early stages. Currently available adjuvant therapies offer low efficacy. They are associated with the mean survival of only 1.07 year (range: 0.59 - 2.50 years) in metastatic uveal melanoma. The search for predictive and prognostic markers in UM, in particular those associated to tumour cell signaling pathways, offers a chance to improve prognostic accuracy and to identify new potential treatment targets.

Aim:

1. To systematise available information regarding prognostic factors in UM.
2. To determine prognostic value of different morphological characteristics of nucleoli detected in UM cells.
3. To determine prognostic value of polo-like kinase 1 (PLK-1) expression in UM cells.

Material and methods:

The research was carried out in 164 patients with uveal melanoma who underwent primary enucleation treated in 2002-2011 at the Department of Ophthalmology and Ocular Oncology, Jagiellonian University Medical College in Kraków. The inclusion criteria were positive health record verification and a histological diagnosis of ocular melanoma. The ascertained data included: patient age and sex, eye involved, tumour max. basal diameter and thickness, tumour stratification as per the AJCC criteria (clinical and pathologic staging, pT), tumour location relative to the equator, ciliary body involvement, tumour pigmentation and shape, concomitant glaucoma and/or retinal detachment, histology subtype, scleral and/or optic nerve infiltration, as well as the histological evidence of necrosis within the tumour. Additional detailed histological parameters have also been identified and ascertained, such as: mitotic index, the presence of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), nuclear pseudoinclusions (NPIs), nuclear grooves, multinucleated giant cells (MGCs) and haemorrhages, as well as melanoma cell pigmentation level.

Prognostic value of nucleolar cytomorphology was determined based on three parameters - nucleolar presence, nucleolar size and nucleolar count - assessed in H&E-stained primary UM specimens.

PLK-1 expression assessment was carried out using an immunohistochemical (IHC) assay utilising rabbit recombinant monoclonal PLK1 antibody. Control, positive and negative staining was carried out. The semi-quantitative immunoreactive score of Remmele and Stegner (IRS) ranging from 0 to 12 was used to assess the PLK-1 expression in uveal melanoma cells.

Results:

The first article to form a part of my doctoral dissertation is a review paper, which systematised available information regarding prognostic factors in UM. It served as guidance to inform directions of further research. Once it has been completed, prognostic value of nucleolar cytomorphology and expression of serine/threonine-protein kinase PLK-1 in UM was presented.

The second article to form a part of my doctoral dissertation discusses the prognostic value of nucleolar cytomorphology parameters. The parameters were selected to fit in the local standard operational procedure for the evaluation of UM specimens, with the view of assessment practicality. The idea was to determine whether inclusion of relatively simple assessments - the presence, size and number of nucleoli - in the assessment of H&E-stained specimens would offer significant data to inform prognosis in UM. The study demonstrated that whereas the presence of nucleoli offers little prognostic value, their size and the presence of multiple nucleoli are significant prognostic factors. There was a positive correlation between the two latter parameters and other factors of known prognostic importance in UM such as basal

tumour diameter (both prominent and multiple nucleoli), clinical stage (both prominent and multiple nucleoli), pT stage (significant correlation with multiple nucleoli, a non-significant trend for prominent nucleoli) and ciliary body involvement (prominent nucleoli). The analysis of associations with histology parameters demonstrated that the presence of prominent nucleoli and multiple nucleoli significantly correlated with the epithelioid cell melanoma subtype, high mitotic index, pleomorphism, the presence of multinucleated giant cells (MGCs) and nuclear pseudoinclusions (NPIs), as well as the absence of the nuclear grooves. The increased melanoma cell pigmentation, a parameter recently studied in numerous publications, was significantly associated with the presence of prominent and multiple nucleoli. The presence of both prominent nucleoli and multiple nucleoli was associated with a significantly shorter disease-free survival and overall survival.

The third article to form a part of my doctoral dissertation discusses the assessment of the prognostic value of polo-like kinase-1 (PLK-1) expression. The literature supports the view that in most tumours, where PLK-1 is a known prognostic factor, its increased expression is associated with poorer prognosis. It has been somehow expected, as PLK-1 is closely linked to tumour cell proliferation. However, in our study we demonstrated that in UM, it was low PLK-1 expression that correlated with other known negative prognostic factors (larger basal tumour diameter, higher pT stage and clinical stage) as well as significantly shorter overall survival (a similar trend, albeit non-significant, was also observed for disease-free survival). This remains in keeping with published reports of analyses of tumour tissue databases (e.g. the Cancer Genome Atlas (TCGA), the Kaplan Meier plotter), which indicate that whereas PLK-1 overexpression is linked to worse prognosis in majority of known tumours, there are tumours, such as rectum adenocarcinoma, thymoma or lung squamous cell carcinoma, where this correlation is positive. These findings support the need for further research into the role of PLK-1 in UM and for caution when researching possible use of PLK-1 inhibitors in treatment of UM.

Conclusions:

1. The presence of prominent and multiple nucleoli in tumour cell nuclei is a negative prognostic factor which correlates with worse prognosis in UM.
2. Nucleolar cytomorphology assessment during the routine haematoxylin and eosin staining (H&E staining) may be a cheap and relatively simple method of obtaining more prognostic information in UM.
3. Low PLK-1 expression in primary UM cells is associated with worse long-term prognosis, as patients with known reduced PLK-1 expression in tumour cells had significantly shorter overall survival.