

## 8. STRESZCZENIE

Aby ocenić zmiany nowotworowe należy równocześnie rozważyć różne aspekty. Po pierwsze, wewnętrzną biologię guza, czyli cechy histologiczne i molekularne. Mogą one wywoływać agresywny fenotyp czy też wpływać na wyniki terapii. Po drugie, ważna jest odpowiedź gospodarza. Dlatego też jest nieprawdopodobne, żeby pojedynczy biomarker dawał zadawalające informacje prognostyczne odnośnie leczenia. Zapewne analiza wielu czynników będzie użyteczna w ocenie wyników badań i stosowania odpowiedniej terapii.

Zbadano już wiele możliwych czynników prognostycznych w raku endometrium. Oceniano zwykle jedynie marker. Nie badano relacji do innych czynników, które wpływają na zachowanie biologiczne. Grupa markerów molekularnych może być bardzo przydatna w scharakteryzowaniu nowotworów. Badania analizujące ekspresję takiej grupy markerów mogą być istotne w doborze terapii. Pobrany materiał biologiczny może być wykorzystany przed leczeniem celem identyfikacji biomarkerów. Pozwalają one przewidzieć wrażliwość i/lub oporność na dany lek lub określenie cech molekularnych raka, który ma być leczony. Być może pozwoli to na zaproponowanie procedur ułatwiających skuteczne postawienie diagnozy.

Celem pracy była analiza wartości prognostycznych wybranych markerów raka endometrium, badanych w biopsjach tkankowych, bowiem markery te mogą być źródłem naszej wiedzy o zachowaniu nowotworu.

Żeby osiągnąć stawiane cele, postanowiłam określić ekspresję izoform VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D, reprezentujących kluczowe czynniki wzrostu śródbłonna naczyń a także receptorów R1, R2 i R3, dla których ligandami są powyższe izoformy VEGF. Ponadto, oceniłam ekspresję innych czynników, których udział w procesie nowotworzenia jest prawdopodobny.

Dodatkowym celem tej pracy było zbadanie prawdopodobnego związku ekspresji tych markerów w raku endometrium z czynnikami prognostycznymi, takimi jak stopień i stadium rozwoju guza.

Do badań wybrano preparaty dotyczące raków endometrium pobrane od osób, wymagających leczenia chirurgicznego. W każdym przypadku oceniano zmiany nowotworowe w różnych stopniach zróżnicowania komórkowego. Były to preparaty w stadium: G1, G2 i G3.

Z bloczków parafinowych zostały przygotowane preparaty. Posłużyły one do wykonania zaplanowanych prac barwień immunohistochemicznych z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał.

Podjęłam próbę wykazania, czy istnieją różnice ilościowe w rozkładzie badanych białek w ludzkich rakach endometrium. Ponadto, celem pracy było wykazanie czy istnieje związek między ekspresją badanych białek i czynników wzrostowych a typem i charakterem histopatologicznym nowotworów. Uzyskane wyniki przedstawiono w załączonej poniżej tabeli.

Białko	Rak endometrium			
	Kontrola	G1	G2	G3
VEGF-A	62,2 ± 5,4	115,7 ± 10,3	150,3 ± 12,8	180,6 ± 11,4
VEGF-B	-	105,26 ± 9,9	149,4 ± 12,0	113,7 ± 11,8
VEGF-C	-	-	-	-
VEGF-D	-	120,6 ± 9,4	152,3 ± 13,0	169,4 ± 15,3
R1	50,2 ± 5,0	112,7 ± 10,1	130,6 ± 10,9	154,4 ± 13,7
R2	110,7 ± 7,4	138,9 ± 10,6	142,3 ± 12,3	173,7 ± 14,1
R3	66,1 ± 5,9	125,5 ± 8,8	144,1 ± 13,7	175,3 ± 15,6
NRP-1	-	91,2 ± 6,5	173,5 ± 14,1	162,5 ± 15,7
NRP-2	-	178,3 ± 11,4	171,6 ± 16,7	197,3 ± 17,4
	śródbłonek			
	-	95,7 ± 7,7	110,8 ± 9,2	135,5 ± 12,8
	nowotwór			
Endoglina	125,3 ± 10,4	180,2 ± 15,6	137,7 ± 14,7	195,2 ± 16,0
	śródbłonek			
	-	87,2 ± 7,7	109,7 ± 8,3	196,6 ± 13,7
	nowotwór			
HOXA-5	112,47 ± 9,84	162,01 ± 13,16	-	-
EDIL-3	110,6 ± 9,2	144,1 ± 11,4	168,1 ± 12,5	173,7 ± 15,8

Na podstawie przeprowadzonych badań można wysunąć następujące wnioski:

1. W endometrium zmienionym nowotworowo wraz ze spadkiem zróżnicowania komórkowego ekspresja izoform VEGF-A i D szybko powiększa się, podczas gdy ekspresja izoformy B nie zmienia się. Ekspresja izoformy C we wszystkich preparatach była śladowa. Oznaczać to może, że limfangiogeneza jest zakłócona.
2. Receptory dla VEGF w tkance nowotworowej endometrium mają wyższą ekspresję w porównaniu do kontroli, jednakże receptor R1 zachowuje stałą ekspresję, niezależnie od zróżnicowania komórkowego. Zauważa się narastającą ekspresję receptora R3 w miarę spadku zróżnicowania komórkowego. Wynika z tego, że limfangiogeneza może się odbudowywać, podczas gdy angiogeneza zachowuje status quo.
3. Ekspresja NRP-1 i NRP-2 rosła wraz ze spadkiem zróżnicowania komórkowego. Oznaczać to może, że jest to szlak uzupełniający limfangiogenezę.
4. Ekspresja endogliny rosła w populacji komórek nowotworowych, co może oznaczać rosnący udział tego peptydu we wzroście guza.
5. Można przyjąć, że EDIL-3 biorąc udział w angiogenezie wraz ze wzrostem ekspresji pełni ważną rolę w przebudowie i rozwoju ściany naczynia.
6. Utrata ekspresji HOXA-5 poprzez związek z p53 może sugerować ważną jego rolę w tworzeniu się guzów.

**Słowa kluczowe:** rak endometrium; stadia zróżnicowania komórkowego; czynniki angiogenne i angiogeneza; neuropiliny; endoglina; HOXA-5; EDIL-3.

## 9. ABSTRACT

Evaluation of neoplastic lesions requires consideration of multiple aspects. First to be investigated is the internal biology of a tumour, i.e. histological and molecular features. Those may effect in aggressive phenotype or affect the therapeutic outcome. The next major question is the host response. Therefore, it is unlikely for a single biomarker to bring sufficient prognostic information regarding the regimen. Evaluation of multiple factors seems then helpful for assessment of the outcome and in selection of appropriate therapies.

In endometrial cancer, several potential prognostic factors have already been investigated. Usually, the marker itself was evaluated while relations to other factors contributing to biological behaviour were not comprised. The group of molecular markers may prove highly valuable when characterizing tumours. Studies evaluating expression of that group of markers may assist selection of therapies. The biological material taken prior to treatment may be used to identify such biomarkers. Those make it possible to forecast sensitivity and/or resistance to a particular drug or to define molecular features of the tumour to be treated. This is likely to offer procedures enhancing successful diagnosis.

The objective of the present study was to evaluate the prognostic value of some selected markers of endometrial cancer, tested through tissue biopsy, as such markers may extend our knowledge of the tumour behaviour.

To accomplish this, I decided to evaluate expression of VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D isoforms, representing key factors of the vascular endothelial growth, as well as R1, R2 and R3 receptors, the ligands of which are the named VEGF isoforms. I also evaluated expression of some other factors, likely to have a role in the neoplastic process.

Another aim of the study was to investigate any possible relation between expression of those markers in the endometrial cancer with prognostic factors, such as tumour grade and stage.

Selected for the tests were endometrial cancer preparations from patients requiring surgical treatment. In all cases, the lesions were evaluated at different stages of cellular differentiation; the preparations corresponded to G1, G2 and G3 grades.

Preparations were made from paraffin blocks. They were then used for the scheduled immunohistochemical staining with specific antibodies.

The study was an attempt to show any possible quantitative differences in distribution of the evaluated proteins in human endometrial cancer. The objective was also to prove any relations between expression of the investigated proteins and growth factors and the tumour type and histopathological profile. Results are presented in the table below.

Protein	Endometrial cancer			
	Control	G1	G2	G3
VEGF-A	62.2 ± 5.4	115.7 ± 10.3	15.3 ± 12.8	180.6 ± 11.4
VEGF-B	-	105.26 ± 9.9	149.4 ± 12.0	113.7 ± 11.8
VEGF-C	-	-	-	-
VEGF-D	-	120.6 ± 9.4	152.3 ± 13.0	169.4 ± 15.3
R1	50.2 ± 5.0	112.7 ± 10.1	130.6 ± 10.9	154.4 ± 13.7
R2	110.7 ± 7.4	138.9 ± 10.6	142.3 ± 12.3	173.7 ± 14.1
R3	66.1 ± 5.9	125.5 ± 8.8	144.1 ± 13.7	175.3 ± 15.6
NRP-1	-	91.2 ± 6.5	173.5 ± 14.1	162.5 ± 15.7
NRP-2	- endothelium	178.3 ± 11.4	171.6 ± 16.7	197.3 ± 17.4
	- tumour	95.7 ± 7.7	110.8 ± 9.2	135.5 ± 12.8
Endoglin	125.3 ± 10.4 endothelium	180.2 ± 15.6	137.7 ± 14.7	195.2 ± 16.0
	- tumour	87.2 ± 7.7	109.7 ± 8.3	196.6 ± 13.7
HOXA-5	112.47 ± 9.84	162.01 ± 13.16	-	-
EDIL-3	110.6 ± 9.2	144.1 ± 11.4	168.1 ± 12.5	173.7 ± 15.8

The following may be concluded following the investigations carried out:

1. In neoplastic endometrium, expression of VEGF-A and D isoforms elevates rapidly along the decrease in cellular differentiation, while expression of isoform B remains unchanged. Trace expression of isoform C was observed in all preparations. This may point to impaired lymphangiogenesis.
2. VEGF receptors in the endometrial cancer tissues show higher expression as compared to the controls, however the level of R1 receptor remains unchanged regardless of cellular differentiation. Growing expression of R3 receptor is observed along the

decrease in cellular differentiation. This is indicative of remodeled lymphangiogenesis while angiogenesis preserves its status quo.

3. Expression of NRP-1 i NRP-2 increased along the decrease in cellular differentiation. This may point to a pathway supplementing lymphangiogenesis.
4. Expression of endoglin was elevated in the population of tumour cells, which may indicate a role of that peptide in the tumour growth.
5. As EDIL-3 has a role in angiogenesis, it may be assumed that along with elevated expression it takes an important part in the vascular wall remodeling and development.
6. The loss of HOXA-5 expression when binding p53 may suggest an important role in tumour formation.

**Key words:** endometrial cancer; cellular differentiation stages; angiogenic factors and angiogenesis; neuropilins; endoglin; remodeled lymphangiogenesis; HOXA-5; EDIL-3.