

Słowa kluczowe: rak jajnika, biomarkery, ilościowy PCR, immunohistochemia

Wstęp

Rak jajnika charakteryzuje się największą śmiertelnością spośród wszystkich nowotworów ginekologicznych. Wysoka śmiertelność pacjentek jest związana z późnym rozpoznaniem choroby: nowotwór ten wykrywany jest najczęściej w III i IV stopniu zaawansowania wg. skali FIGO. Przyczyną tego zjawiska jest brak wczesnych objawów choroby oraz nieswoisty charakter późnych objawów, które często są mylone z innymi schorzeniami. Pięcioletni wskaźnik przeżycia chorych diagnozowanych w I-II stopniu zaawansowania wynosi ok. 80%, w przypadku chorych w III-IV stopniu spada on do 15%. Najczęstszym typem histologicznym jest typ surowiczny, który stanowi ok. 70% wszystkich przypadków.

Punktem wyjścia do badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej był eksperyment z użyciem mikromacierzy DNA, w wyniku którego zidentyfikowano dwa podtypy molekularne niskozróżnicowanego raka surowiczego jajnika, charakteryzujące się odmiennym profilem ekspresji określonej grupy genów. Co ważne, zidentyfikowane podtypy molekularne raka jajnika wykazują korelację z czasem przeżycia. Pacjentki z wyższą ekspresją tej grupy genów miały krótszy całkowity czas przeżycia niż pacjentki z niższą ekspresją tych genów.

Większość genów zidentyfikowanej sygnatury prognostycznej jest związana ze strukturą i funkcją macierzy zewnątrzkomórkowej, adhezją oraz ruchliwością komórek. W związku z tym założono, że ich podwyższona ekspresja może przyczyniać się do nabywania przez komórki nowotworowe fenotypu inwazyjnego i przerzutowego. Założono też, że wśród genów wchodzących w skład tej sygnatury mogą znajdować się potencjalne markery prognostyczne. Do dalszych badań wybrano kilkanaście genów, które spełniały przynajmniej jedno kryterium: wykazywały wysoką różnicę poziomu ekspresji pomiędzy podtypami molekularnymi raka jajnika i/lub istniały przesłanki literaturowe wskazujące na istotną rolę tych genów/białek w procesie nowotworzenia.

Cele

Celem pracy była weryfikacja przydatności wybranych genów jako potencjalnych markerów prognostycznych w raku jajnika, na co złożyło się kilka celów szczegółowych:

- weryfikacja ekspresji wybranych genów w materiale od wyjściowej grupy pacjentek (tej samej, która była analizowana metodą mikromacierzy DNA) za pomocą ilościowej reakcji PCR (qRT-PCR). Była to walidacja techniczna eksperymentu mikromacierzowego.
- walidacja wyników w materiale od niezależnej grupy pacjentek. Celem tego eksperymentu było sprawdzenie, czy wybrane geny zachowują się w sposób uniwersalny także w innych grupach przypadków.
- analiza ekspresji wybranych genów na poziomie białka za pomocą immunohistochemii, na niezależnej grupie preparatów parafinowych raka jajnika i próba potwierdzenia korelacji poziomu ekspresji tych genów z czasami przeżycia.

- analiza statystyczna wyników uzyskanych za pomocą immunohistochemii określająca związek ekspresji badanych genów z innymi cechami kliniczno-patologicznymi i molekularnymi.

Material i metody

Ocenę ekspresji genów będących przedmiotem niniejszej pracy przeprowadzono w trzech seriach próbek raka jajnika. W dwóch pierwszych seriach próbek ekspresję genów oceniano za pomocą ilościowej reakcji PCR, a w trzeciej za pomocą immunohistochemii.

Pierwsza seria obejmowała próbki, które analizowano wcześniej za pomocą mikromacierzy DNA (58 guzów). Druga seria próbek pochodziła od niezależnej grupy pacjentek (33 przypadki). W obu przypadkach był to materiał pobrany w czasie pierwotnej operacji cytoredukcyjnej, zamrożony i przechowywany w ciekłym azocie (temp. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) w celu ochrony komórkowego RNA przed degradacją. Wykorzystano wyłącznie materiał od pacjentek, które nie otrzymały chemioterapii neoadjuwantowej, aby wyeliminować wpływ leków cytotoksycznych na profil ekspresji genów w guzie. W preparatach pooperacyjnych przygotowanych do izolacji RNA zredukowano metodą makrodissekcji komponentę podścieliska i ogniska nekrozy tak, aby łącznie nie przekraczały one 15%.

Trzecia seria próbek (108 przypadków) były to wycinki raków jajnika utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie, które wykorzystano do analizy immunohistochemicznej.

Materiał tkankowy wykorzystany w niniejszej pracy został zebrany w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie i udostępniony, wraz z danymi kliniczno-patologicznymi, w ramach współpracy przez prof. dr hab. Jolantę Kupryjańczyk. Tkanki wykorzystane jako kontrole reakcji IHC zostały udostępnione dzięki uprzejmości dr Ewy Zembali-Nożyńskiej oraz dr Ewy Małuseckiej (Zakład Patologii Nowotworów oraz Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział Gliwice).

Wyniki

Spośród 16 genów, których poziom ekspresji oceniano za pomocą RT-qPCR, 8 genów wykazało statystycznie znamiennej korelację z całkowitym czasem przeżycia (OS) lub czasem przeżycia wolnym od choroby (DFS), przynajmniej w jednej grupie pacjentek. Gen *DSPG3* wykazywał znamienność zarówno w odniesieniu do OS jak i DFS w obu grupach pacjentek. Geny *CLASP1* oraz *LOX* wykazywały znamienność w odniesieniu do OS i DFS w wyjściowej grupie pacjentek oraz do DFS w niezależnej grupie pacjentek. Gen *POSTN* był znamienny względem OS i DFS w niezależnej grupie pacjentek. Natomiast poziom ekspresji genu *MFAP5* oraz *COL11A1* korelował z OS w wyjściowej grupie pacjentek, a genu *PLAU* - w niezależnej grupie pacjentek. Nie potwierdzono natomiast korelacji z OS i DFS dla genu *FN1*.

Do dalszych badań za pomocą immunohistochemii (IHC) wybrano cztery geny/białka: CLASP1, MFAP5, FN1 i POSTN. Za pomocą analizy metodą Kaplana-Meiera wykazano, że wyższa ekspresja FN1 koreluje z krótszym OS (test log-rank $p=0,003$), nie wykazano takiego związku w odniesieniu do DFS. Podobną korelację wykazano dla ekspresji POSTN w podścielisku guza (test log-rank $p=0,04$). Natomiast nie wykazano korelacji względem OS czy DFS dla CLASP1 i MFAP5. Co ciekawe, stwierdzono występowanie zależności pomiędzy lokalizacją anatomiczną badanego wycinka guza

a odczynem dla FN1. W preparatach, w których obserwowano struktury otrzewnej częściej obserwowano odczyn średni bądź silny dla FN1, w porównaniu do pozostałych preparatów (test χ^2 , $p=0,024$). Podobną zależność wykazano dla POSTN w podścielisku (test χ^2 , $p=0,032$). Obecność struktur otrzewnej świadczy o pochodzeniu wycinka z miejsca przerzutu, co wydaje się potwierdzać znaczenie FN1 i POSTN w tworzeniu przerzutów w raku jajnika.

Ponadto za pomocą analizy metodą Kaplana-Meiera wykazano znaczenie prognostyczne takich cech jak obecność choroby resztkowej, angioinwazja, martwica oraz aktywność mitotyczna komórek guza.

Dla czynników, które okazały się znamienne w analizie metodą Kaplana-Meiera względem OS oraz DFS wyznaczono modele regresji jednoczynnikowej proporcjonalnego ryzyka Coxa. Potwierdzono wartość prognostyczną (w odniesieniu do OS) takich cech jak ekspresja FN1, ekspresja POSTN w podścielisku guza, obecność choroby resztkowej, angioinwazja oraz martwica. Te czynniki, które okazały się istotne statystycznie uwzględniono w analizie wieloczynnikowej i zastosowano metodę krokowej eliminacji zmiennych w celu wyznaczenia modelu. W modelu wieloczynnikowym stwierdzono niezależny wpływ na OS takich czynników jak choroba resztkowa, martwica, angioinwazja oraz ekspresja FN1 w odniesieniu do OS. Natomiast niezależny wpływ na DFS wykazano dla takich cech jak angioinwazja, martwica oraz choroba resztkowa.

Podsumowanie

Spośród analizowanych genów/białek fibronektyna okazała się niezależnym czynnikiem prognostycznym w surowicznym raku jajnika względem całkowitego czasu przeżycia, obok takich cech jak choroba resztkowa, angioinwazja oraz martwica. Wyższa ekspresja FN1, obecność choroby resztkowej i angioinwazji oraz brak martwicy zwiększa ryzyko zgonu pacjentek chorych na zaawansowanego raka jajnika. Natomiast niezależnymi czynnikami prognostycznymi w odniesieniu do czasu wolnego od choroby są angioinwazja, martwica oraz choroba resztkowa. Obecność choroby resztkowej i angioinwazji oraz brak martwicy zwiększa ryzyko nawrotu u pacjentek chorych na zaawansowanego raka jajnika. Periostyna może mieć znaczenie prognostyczne w raku jajnika (analiza jednoczynnikowa). Dla białek CLASP1 oraz MFAP5 nie wykazano znaczenia prognostycznego w badanej grupie przypadków. Powyższe badania pozwoliły zidentyfikować potencjalne biomarkery. Jednakże potrzebna jest dalsza analiza na większej grupie pacjentek, aby potwierdzić te wstępne wyniki.