

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalárska práca**

**Olomouc 2011**

**Adriána Petrišaková**

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Aplikace metody tkáňových mikroerejí ve studiu prognostických  
faktorů nemalobuněčného karcinomu plic**

**Bakalárska práca**

**Adriána Petrišaková**

Študijní program: Biologie

Študijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma štúdia: prezenční

**Olomouc 2011**

**Vedúci práce: MUDr. MVDr. Jozef Škarda, Ph.D.**

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne, pod vedením vedúceho bakalárskej práce MUDr. *et* MVDr. Jozefa Škardy, Ph.D. samostatne a uviedla som všetky použité pramene a literatúru.

V Olomouci dňa 4.5.2011

Adriána Petrišaková

## Súhrn

Komplex E-cadherinu a  $\beta$ -cateninu sa významnou mierou podieľa na procese medzibunkových adhézií. Uvedené proteíny sú tiež zapojené do signálnych dráh regulujúcich apoptózu. Porucha expresie uvedených proteínov je u rôznych nádorov spojovaná s nádorovou progresiou, metastázovaním a rezistenciou na protinádorovú terapiu.

Z uvedeného dôvodu sme študovali prognostický význam imunohistochemickej expresie týchto proteínov u nemalobunkového karcinómu pľúc za použitia tkanivových mikroerej. Expresiu daných proteínov sme zároveň korelovali s výsledkami testu viability bunkových línií derivovaných z primárneho tumoru.

Vzorky nemalobunkových karcinómov pľúc boli získané od pacientov operovaných na 1. chirurgickej klinike LF UP a Fakultnej nemocnice Olomouc v rokoch 1996 – 2002. Tie boli fixované vo formalíne a do parafínu zaliate. Vzorka každého prípadu bola hodnotená dvoma nezávislými patológmi. Vzorky pochádzali od 190 mužov a 11 žien, z toho 34 pacientov bolo v štádiu I a II, 104 pacientov v štádiu IIIa, 42 pacientov v štádiu IIIb a 21 pacientov v štádiu IV. Priemerná doba sledovania pacientov bola 32 mesiacov.

Analýza dát bola vykonaná pomocou počítačovej analýzy s použitím softwaru SPSS pre Windows verzie (10, 0). Expresia jednotlivých proteínov bola korelovaná s histologickým typom nádoru a výsledky testu viability primárnych nádorových buniek (MTT test) s použitím Mann-Whitney neparametrického zrovnávacieho testu. Analýza prežívania bola vykonaná pomocou Kaplan Meierovej metódy. Rozdiely prežívania boli zrovnané pomocou log rank testu (Kaplan a Meier 1958). Hodnoty  $p < 0,05$  boli považované za štatisticky signifikantné.

Neboli zistené žiadne signifikantné rozdiely v expresii týchto proteínov medzi histologickými subtypmi nemalobunkového karcinómu pľúc. Nukleárna expresia  $\beta$ -cateninu signifikantne korelovala s kratším intervalom bezpríznakového obdobia ( $p < 0,045$ ) a horším celkovým prežitím ( $p < 0,03$ ). Bola tiež zistená hraničná korelácia medzi cytoplazmatickou expresiou E-cadherinu a in vitro rezistenciou na daunorubicin ( $p = 0,0542$ ).

## Summary

Complex E-cadherin and  $\beta$  - catenin is involved in process intercellular adhesion. Those proteins are also involved in signaling pathways regulating apoptosis. Deregulation of expression of the proteins in different tumors is associated with tumor progression, metastasis and resistance to anticancer therapy.

For this reason, we studied the prognostic significance of their immunohistochemical expression in non-small cell lung cancer using tissue microarrays. Expression of these proteins was also correlated with the results of the test of cell viability of cell lines derived from primary tumor.

Non-small cell lung cancer samples were obtained from patients operated on the 1st Department of Surgery Palacky University and University Hospital Olomouc in the years 1996 – 2002.. They were fixed in formalin and embedded in paraffin. A sample of each case was evaluated by two independent pathologists. The samples were obtained from 190 men and 11 women. 34 patients were in stage I and II, 104 patients with stage IIIa, 42 patients with stage IIIb and 21 patients in stage IV. The average patient follow-up period was 32 months.

Statistical analysis was performed by computer analysis using software SPSS for Windows version (10, 0). Expression of the abouve mentioned proteins was correlated with histological tumor type and the results of the primary tumor cell viability test (MTT assay) using the Mann-Whitney nonparametric test. Survival analysis was performed using the Kaplan Meier method. Differences in survival were analyzed by log rank test (Kaplan and Meier 1958). P-values  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

There were no significant differences in the expression of these proteins within histological subtypes of NSCLC. Nuclear expression of  $\beta$ -catenin was significantly correlated with shorter disease free interval period for patients ( $p < 0.045$ ) and worse overall survival ( $p < 0.03$ ) . A marginal correlation between cytoplasmic expression of E-cadherin and in vitro resistance to daunorubicin was also observed ( $p = 0.0542$ ).

**Pod'akovanie:**

Rada by som poďakovala vedúcemu bakalárskej práce MUDr. et MVDr. Jozefovi Škardovi, PhD. za prístup, ochotu a cenné rady poskytnuté počas tvorby bakalárskej práce.

## OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY .....	9
2.1 Nemaalobunkový karcinóm pľúc .....	9
2.2 Mnohočetná lieková rezistencia (MDR).....	9
2.3 Charakteristika cadherin - cateninového komplexu .....	10
2.4 Charakteristika pacientov .....	13
3. CIELE PRÁCE.....	14
4. MATERIÁL A METODIKA .....	15
4.1 Materiál.....	15
4.2 Metódy.....	15
4.2.1 Zostavenie tkanivových mikroerejí .....	15
4.2.3 Aplikácia MTT testu ku stanoveniu in vitro viability nádorových buniek.....	17
5. VÝSLEDKY.....	18
6. DISKUSIA .....	25
7. ZÁVER.....	27
8. LITERATÚRA .....	28
9. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	31

# 1. Úvod

Hoci sa chemoterapia nádorových ochorení stala na prelome 60. a 70. rokov uznávanou terapeutickou metódou doplňujúcu chirurgiu a rádioterapiu, zostáva stále kľúčovým problémom odhad účinnosti cytostatickej liečby pri eradikácii nádoru a súčasnej miery jej toxicity pre pacienta. Definovať všetky okolnosti ovplyvňujúce účinnosť cytostatickej liečby a príčiny variabilnej odpovedi onkologických pacientov na ňu je veľmi obtiažne. V zásade ich však môžeme rozdeliť do dvoch skupín:

1. závislé na pacientovi (vek, pohlavie, renálne a pečenné funkcie, väzbová kapacita plazmatických proteínov, súbežná liečba inými medikamentmi, atď.),
2. závislé na nádore (typ, lokalizácia, rozsah, agresivita, metastatická aktivita, predchádzajúca liečba, atď.).

Jednou z najzávažnejších komplikácií protinádorovej liečby a najdôležitejšou príčinou ich zlyhania je schopnosť nádorových buniek odolávať účinkom cytotoxických látok. Malígne bunkové populácie môžu byť voči chemoterapii rezistentné už pred zahájením liečby. V tomto prípade ide o tzv. prirodzenú (primárnu) rezistenciu. Získaná (sekundárna) rezistencia vzniká až v priebehu cytostatickej liečby, kedy sa pôvodne citlivé bunky stávajú rezistentnými a účinnosť cytostatickej liečby sa znižuje. Pri strate citlivosti k určitému cytostatiku môže však byť zachovaná citlivosť k iným liečivám. Pokiaľ pri strate citlivosti k jednému prípravku vzniká súčasne rezistencia na iné, väčšinou štrukturálne príbuznú látku, hovoríme o skríženej rezistencii. Boli však popísané prípady skríženej rezistencie medzi protinádorovými liečivami líšiacimi sa ako štrukturálne, tak mechanizmom účinku. Takéto prípady rezistencie potom nazývame mnohočetná lieková rezistencia (multidrug resistance, MDR). MDR vysvetľuje prípady necitlivosti niektorých nádorov na iné druhy cytostatík, ako tých, ktoré boli použité v pôvodnej liečbe.

Mechanizmy, ktorými vzniká rezistencia nádorových buniek na protinádorovú liečbu, sú komplexnejšej povahy. Vznik rezistencie je najčastejšie viazaný na zmeny farmakokinetiky (znížená resorpcia cytostatika, urýchlenie biotransformácie, rýchlejšia inaktivácia alebo urýchlené vylučovanie) alebo zmeny cytokinetiky (zväčšovanie nádoru je sprevádzané prechodom väčšej časti nádorových buniek do kľudového stavu G<sub>0</sub>, v ktorom je citlivosť k chemoterapii obmedzená). Taktiež s pribúdajúcou nádorovou masou vznikajú spontánne mutácie buniek, čím sa zvyšuje heterogenita bunkovej populácie, ktorá umožňuje vznik bunkového klonu s odlišnou citlivosťou k liečbe. Liečba tak ničí len citlivú frakciu buniek a



dochádza k selekcii a následnému pomnoženiu rezistentnej populácie. Vôbec najčastejší spôsob vzniku rezistencie súvisí so štrukturálnymi a funkčnými zmenami bunky, ktoré zahŕňujú zníženu alebo zvýšenú expresiu či aktivitu enzýmov, porušenie intracelulárnej distribúcie cytostatika (napr. väzbou na lyzozóm), ovplyvnenie transportu cytostatika bunkovou membránou a zvýšenú intenzitu oprav DNA.

## **2. Súčasný stav riešenej problematiky**

### **2.1 Nemalobunkový karcinóm pľúc**

Nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC) je najčastejším typom rakoviny pľúc. Rozlišujeme 3 typy NSCLC: adenokarcinóm, spinocelulárny karcinóm a veľkobunkový karcinóm, ktorý má tendenciu rásť a šíriť sa rýchlejšie ako predchádzajúce 2 typy. Existuje viacero variant liečby NSCLC. Typ liečby závisí na štádiu. Prvým typom liečby býva chirurgický zákrok, kedy môže chirurg odstrániť malú časť pľúc, vykonať lobektómiu alebo pneumonektómiu. Ďalšou možnosťou liečby je chemoterapia. Často sa využíva pokiaľ sa rakovina rozšírila (stupeň IV). Tiež môže byť podaná pred chirurgickým zákrokom alebo radiačnou liečbou na zvýšenie účinnosti liečby (neoadjuvantná terapia). Adjuvantná terapia sa vykonáva po chirurgickom zákroku, kedy boli nádorové ložiská odstránené, ale v terapii sa pokračuje, pretože existuje riziko nepozorovaného pokračovania ochorenia. Radiačná terapia sa užíva spolu s chemoterapiou, kedy chirurgické odstránenie nie je možné (Alberg *et al.*, 2007).

### **2.2 Mnohočetná lieková rezistencia (MDR)**

Mnohočetná lieková rezistencia bola prvýkrát popísaná v roku 1970 na pľúcnej bunkovej línii izolovanej z čínskeho škrečka a na bunkovej línii myšej leukémie P388. Autori tu pozorovali skríženú rezistenciu aktinomycin D rezistentných buniek s vinblastinom a daunomycinom. Ďalšie pracovné skupiny preukázali, že táto skrížená rezistencia sa vzťahuje i na vinca alkaloidy, antracyklíny, etopozid (91) a dokonca i na mitomycin C (89, 115), teda pomerne hydrofóbne liečiva s mierne zásaditým charakterom.

Vzhľadom ku skutočnosti, že MDR je výraznou komplikáciou protinádorovej liečby, prebieha na tomto poli v posledných dvoch desaťročiach intenzívny výskum. Za tri desaťročia výskumu MDR bolo zistených mnoho spôsobov, akými dokážu nádorové bunky uniknúť chemoterapii a to ukázalo, že existuje rezistencia na každý účinný liek, dokonca aj na najnovšie činidlá. Preto by schopnosť predvídať a obchádzať MDR mohlo viesť k zlepšeniu chemoterapie. (Gottesman M.M., *et al.*, 2002) Boli popísané mechanizmy s ich pomocou je nádorová bunka schopná úspešne odolávať chemoterapii, rovnako ako boli identifikované cytostatiká, po ich podaní sa môže vyvinúť MDR a cytostatiká, ktoré nielen, že MDR nevyvolávajú, ale sú účinné i u nádorových buniek s genotypom MDR. Mnohočetná lieková rezistencia sa tak rozdelila do dvoch skupín. Typická (klasická) MDR je zapríčinená membránovým glykoproteínom, ktorý je produktom génu *mdr1*. Tento P-glykoproteín (Pgp) je ATP dependentná membránová pumpa exportujúca toxické látky z bunky a spôsobujúca tak zníženie intracelulárnu akumuláciu liečiva. Kompletná primárna štruktúra ľudského P-glykoproteínu bola stanovená z cDNA sekvencie. Proteín sa skladá z dvoch homológnych častí približne rovnakej dĺžky. (Chen C.J. *et al.*, 1986)

Z terapeutického hľadiska je dôležitou vlastnosťou typickej MDR možnosť jej prekonania pomocou chemosenzitorov, to je látok obnovujúcich vnímavosť MDR buniek k protinádorovej liečbe. Za všetky menujme alespoň verapamil, cyklosporin A a jeho neimunosupresívny a menej toxický derivát PSC-833 (Nosková *et al.*, 2000a).

Ako atypická MDR (at-MDR) sú súhrne označované všetky mechanizmy mnohočetnej liekovej rezistencie, na ktorých sa Pgp neúčastní. Atypická MDR môže byť spôsobená zmenou subcelulárnej distribúcie liečiva, poškodením cieľovej štruktúry liečiva, rozdielnou kapacitou DNA opravných procesov či zmenami detoxikačných metabolických dráh bunky, dereguláciou mechanizmov apoptózy, proliferácie a dereguláciou syntézy proteínov, ktoré sa zúčastňujú procesu tvorby medzibunkových adhézií. (Nosková *et al.*, 2000b). Jedným z najviac študovaných proteínových komplexov, ktorý sa zúčastňuje tvorby medzibunkových adhézií a zároveň reguluje rôzne dôležité signálne dráhy je cadherin-cateninový komplex.

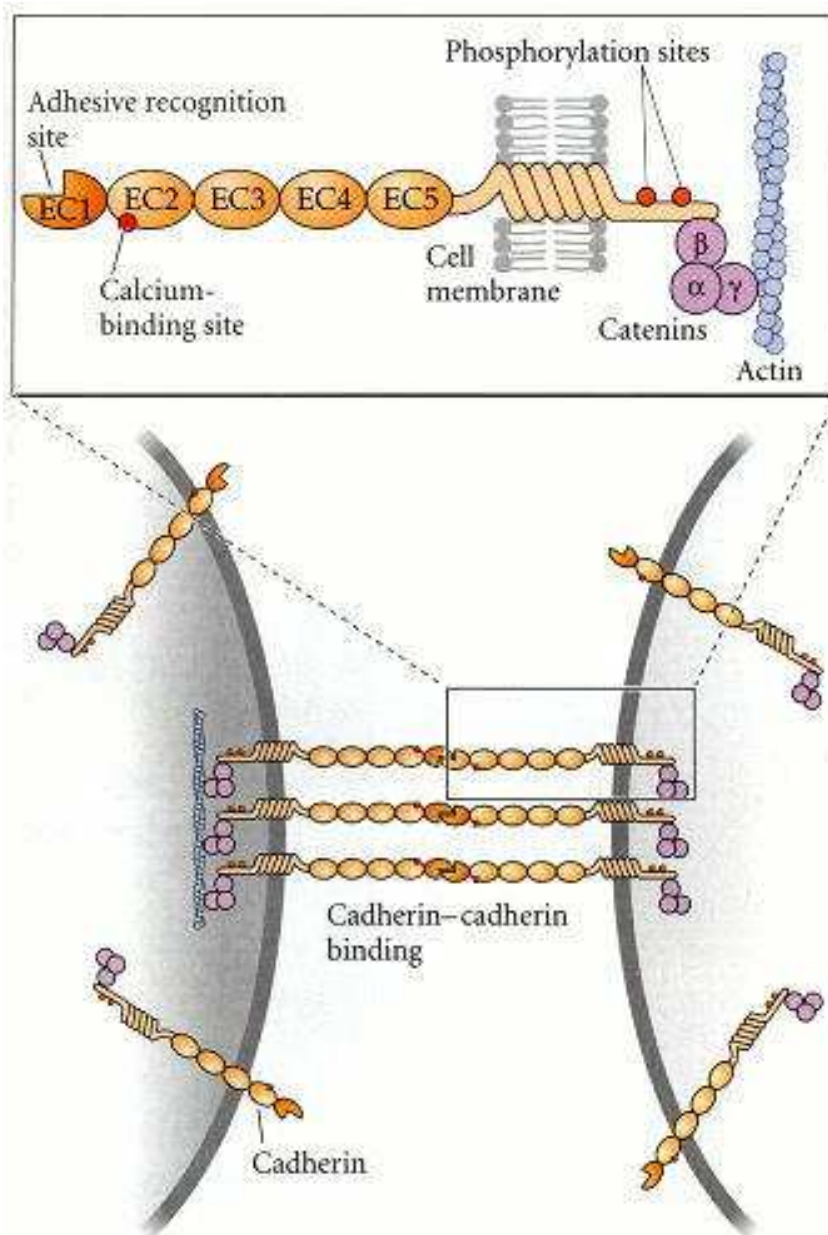
### **2.3 Charakteristika cadherin - cateninového komplexu**

$\beta$ -catenin je 92kDa multifunkčný proteín, zapojený do  $\text{Ca}^{2+}$  závislých homotypických bunkových adhézií, ktorý má 2 rozličné bunkové funkcie. Predovšetkým,  $\beta$ -catenin je

dôležitá štruktúrna zložka v normálnych epitelových a zhubných bunkách. E – cadherin a jej pripojené intracelulárne molekuly cateniny sú dôležité pre medzibunkové epitelové adhézie a bývajú často vyjadrené v nemalobunkových karcinómoch pľúc (Bremnes *et al.*, 2002). Navyše tieto cateniny hrajú dôležitú úlohu v bunkovej polarite väzbou na siete aktínových filament cytoskeletu cez  $\alpha$ -catenin ako spojník. Molekuly cateninov obsahujú 3 domény, intracelulárnu, transmembránovú a extracelulárnu doménu ( Q. Fei *et al.*, 2002).

$\beta$  – catenin môže hrať úlohu ako transkripčný trans – aktivátor niekoľkých cieľových génov. Zmeny v hladine expresii  $\beta$  – catenin proteínu a genetického usporiadania umiestnených v exone 3  $\beta$  – cateninu preukázali, že prispievajú k malígnej povahe rôznych karcinómov a pravdepodobne majú vplyv v medzibunkovej adhézii a prenose signálu. (A. Elzagheid *et al.*, 2008)

**Schéma 1: Štruktúra cadherin–cateninového komplexu** (prevzaté od Gilbert S.F., 2000)



Schématické znázornenie zapojenia cadherinu v bunkovej adhézii. Cadherin je spojený s tromi typmi cateninov. Cateniny sú asociované s aktínovými mikrofílamentami vo vnútri bunky.

## 2.4 Charakteristika pacientov :

Charakteristika pacientov je uvedená v nasledujúcej tabuľke.

Tab. I Klinické a laboratórne charakteristiky NSCLC pacientov.

		Všetci pacienti	neoCHT	I	II	IIIa	p- hodnota
n		201	49	82	37	82	
median OS (mesiace)		39,8	36,8	63,0	33,1	25,9	p<6.10 <sup>-4</sup>
median DFS (mesiace)		35,0	29,9	56,7	28,7	18,0	p<9.10 <sup>-5</sup>
Vek		60,3	57,6	61,0	60,6	59,5	p<0,45
Pohlavie	Muž	165	41	70	30	65	p<0,59
	Žena	36	8	12	7	17	
Histológia	Spinocellulárny Nádor	107	23	37	20	50	p<0,12
	Adenokarcinóm	55	8	30	9	16	
	LCC + iné	28	7	9	5	14	
NeoCHT	CHT	49	49	5	3	41	p<10 <sup>-6</sup>
	Vnímavosť	142	0	74	32	36	
Pomocná látka CHT	Pt/NVB	26	14	0	0	26	p<10 <sup>-4</sup>
	Pt/TAX	35	2	0	1	34	
	Iné	15	15	5	2	8	
NeoCHT & Adjuvant CHT		32	32	0	1	31	
Bez CHT		38	0	27	6	5	

### **3. Ciele práce:**

- Imunohistochemická detekcia E-cadherinu a  $\beta$ -cateninu nemalobunkového karcinomu pľúc na tkanivových mikroerejach
- Korelácia daných výsledkov s prežívaním a výsledkami testu viability nádorových buniek derivovaných z primárnych nemalobunkových karcinómov pľúc.

## **4. Materiál a metodika**

### **4.1 Materiál**

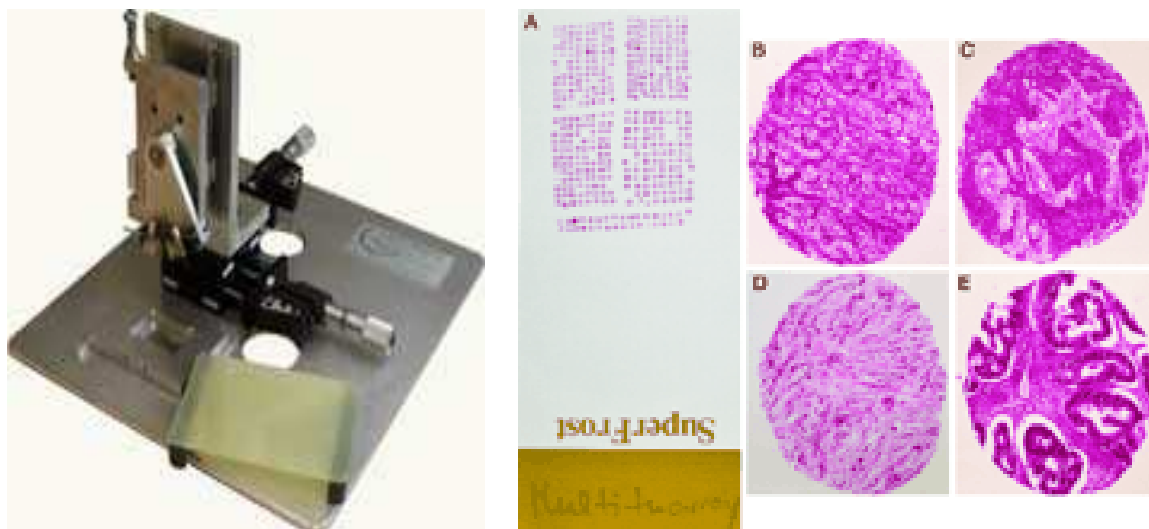
Nemalobunkové karcinómy pľúc získané od pacientov operovaných na 1. chirurgickej klinike LF UP a Fakultnej nemocnice Olomouc v rokoch 1996 – 2002 boli použité ako vzorky. Tie boli fixované vo formalíne a do parafínu zaliaté.. Vzorka každého prípadu bola hodnotená dvoma patológmi. Vzorky pochádzali od 190 mužov a 11 žien. Z toho 34 pacientov bolo v štádiu I a II, 104 pacientov v štádiu IIIa, 42 pacientov v štádiu IIIb a 21 pacientov v štádiu IV. Priemerná doba sledovania pacientov bola 32 mesiacov.

### **4.2 Metódy**

#### **4.2.1 Zostavenie tkanivových mikroerejí**

Tkanivové mikroereje boli zkonštruované z 201 vzoriek primárnych pľúcnych nádorov. Selekcia reprezentatívnych okrskov tkaniva pre odber bola vykonaná na základe vizuálneho zrovnania bloku so štandardným hematoxilínovým preparátom. Tri až päť tkanivových valčekov získaných špeciálnou punkčnou ihlou o priemere 2 mm (Beecher Instruments, Sun Prairie, USA, Kat.číslo.2067) bolo vybraných z donorového bloku a premiestené do recipientného bloku pomocou manuálneho prístroje firmy (Beecher Instruments, Sun Prairie, USA). Zároveň boli do bloku umiestnené kontrolné valčky normálneho pľúcneho tkaniva. Spracovanie rezov z recipientných blokov prebiehalo štandardným spôsobom ako u rutinných preparátov.

**Obr. 2: Ukážka zkonštruovanej tkanivovej mikroereje a použitého prístroja**



#### 4.2.2 Imunohistochemická detekcia antigénov v tkanivách

Bola použitá metóda nepriamej imunohistochemie. Vyšetrenie bolo vykonané na tkanivách fixovaných vo formalíne a zaliatych do parafínu. Rezy silné 5 $\mu$ m boli uchytené na silanizované skla (3-aminopropyl-triethoxysilan, Sigma, USA), odparafinované a zavodnené. Epitopy antigénov boli revitalizované v 10 mM citrátovom pufre (pH 6,0) v mikrovlnnom generátore po dobu 4x10 minút pri 900W. Primárne protilátky ( anti myší monoklonálny E-Cadherin klon DH 143, YBUX, anti myší monoklonálny  $\beta$  - catenin klon 17C2 ABCAM) pôsobili cez noc pri 4°C. Bol použitý detekčný systém DAKO En Vision (Dako Cytomation, Dánsko) a expresia proteínov bola vizualizovaná pomocou 3,3'-diaminobenzidinu. Na dofarbenie jadier bol použitý hematoxylin. Ako negatívny bol hodnotený preparát s nádorovým tkanivom s kompletnou stratou farbenia jadier nádorových buniek za prítomnosti vnútornej pozitívnej kontroly (normálnych epiteliálnych buniek, stromálnych buniek alebo lymfocytov). Za slabú pozitivitu bola považovaná expresia daného proteínu v 10% až 20% nádorových buniek. Dôkaz proteínu v 20% až 40% nádorových buniek bol považovaný za stredne silnú pozitivitu. Dôkaz expresie daného proteínu vo viac než 40% nádorových buniek bol považovaný za silnú pozitivitu. Tento systém hodnotenia pozitivity bol prevzatý z práce autorov Ehrmann et al., 2005.



#### 4.2.3 Aplikácia MTT testu ku stanoveniu *in vitro* viability nádorových buniek

K analýze *in vitro* senzitivity primárnych nádorových buniek derivovaných z karcinómu pľúc na cytostatika bol použitý trojdenný MTT test. Suspenzia vitálnych nádorových buniek bola získaná z dodaných vzoriek nefixovaného tkaniva použitím enzymatického trávenia a gradientovou centrifugáciou na hustotnom gradientu Ficoll-Metrizoát (1,077g/ml; Pharmacia, Švédsko). Bunky boli dvakrát premývané v RPMI 1640 [2 mM glutamin, bikarbonát sodný, penicilín (100 U/ml) a streptomycín (100 mg/ml)] (Sigma, USA). Po druhom premytí boli bunkové peleta suspendované v kultivačnom médiu [RPMI 1640 s 2 mM glutaminom bikarbonátom sodným, penicilínom (100 U/ml), a streptomycinom (100 mg/ml) (Sigma, USA), 15% fetálne hovädzie sérum (Biocom, ČR), 5 mg/ml inzulínu a 5 mg/ml transferínu] v konečnej koncentrácii 1- 2x10<sup>6</sup>/ml. 80 ml bunkovej suspenzie bolo pipetované do 96-jamkových panelov obsahujúcich 20 ml vhodne nariadeného cytostatika. Nádorové bunky boli vystavené pôsobením každého liečiva v dvoch opakovaniach a v šiestich rôznych koncentráciách po dobu troch dní pri 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Kontrolné nádorové bunky boli kultivované bez použitia cytostatik. Na záver kultivácie bolo ku každej jamke pridané 10 ml MTT (5 mg/ml) a inkubované ďalších šesť hodín. Žltá tetrazóliová soľ bola redukovaná na modrý formazan len živými bunkami. Formazanové kryštály boli rozpustené pomocou 100 ml 10% vodného roztoku do laurylsulfátu sodného (pH = 5.5) cez noc pri 37°C. Optická denzita (OD) bola meraná pri 540 nm pomocou prístroja ELISA scanneru iEMS Reader MF (Labsystem UK). Prežívanie nádorových buniek (tumor cell survival, TCS) počítame nasledovne: TCS (absorbancia v jamkách s cytostatikami/absorbancia v kontrolných jamkách) x 100. TCS50 hodnota je koncentrácia cytostatik letálne pre 50% nádorových buniek a bola vypočítaná zo získaných kriviek dávkovej závislosti. Skupinová štatistika nameraných dát bola vykonaná v programe Prisma, verzia 2.0

#### 4.2.4 Štatistické metódy

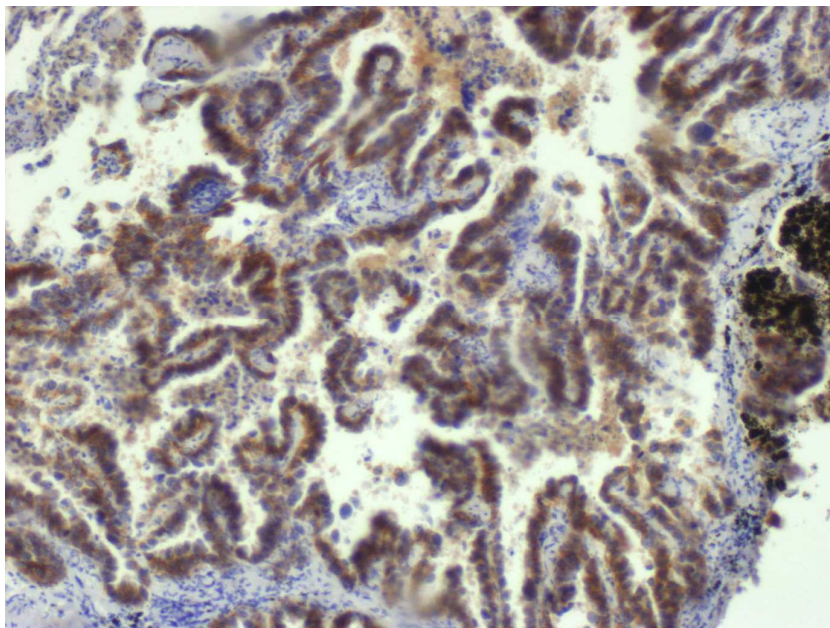
Analýza dát bola vykonaná pomocou počítačovej analýzy s použitím softwaru SPSS pre Windows verzie (10, 0). Expresia vyššie uvedených proteínov bola korelovaná s histologickým subtypom nádoru a výsledkami testu viability primárnych nádorových buniek (MTT) s použitím Kruskalova-Wallisova neparametrického zrovnávacieho testu. Analýza prežívania bola vykonaná pomocou Kaplan Meierovej metódy. Rozdiely v celkovom prežívaní pacientov a intervalom bezpríznakového obdobia pacientov s ohľadom na expresiu

vyššie uvedených proteínov boli zrovnávané pomocou log rank testu (Kaplan *et Meier*, 1958). Hodnoty  $p < 0,05$  boli považované za štatisticky významné.

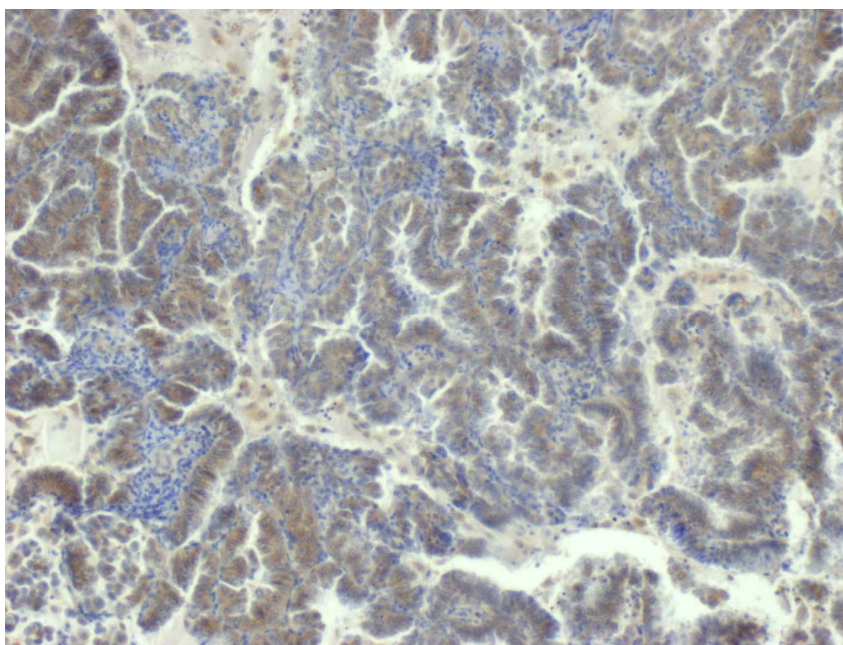
## 5. Výsledky

Študovali sme expresiu E-cadherinu a  $\beta$  - kateninu v rámci jednotlivých histologických subtypov nemalobunkového karcinómu pľúc a prognostický význam ich imunohistochemickej expresie u 201 pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc, za použitia tkanivových mikroereji. Ďalej sme korelovali expresiu daných proteínov s výsledkami testov viability buniek primárneho tumoru. Neboli zistené žiadne významné rozdiely v expresii týchto proteínov medzi histologickými subtypmi nemalobunkového karcinómu pľúc. Nukleárna expresia  $\beta$ -cateninu významne korelovala s kratším intervalom bezpríznakového obdobia ( $p < 0,045$ ) a horším celkovým prežitím ( $p < 0,03$ ). Bola tiež zistená hraničná korelácia medzi cytoplazmatickou expresiou E-cadherinu a rezistenciou na daunorubicin ( $p = 0,0542$ ).

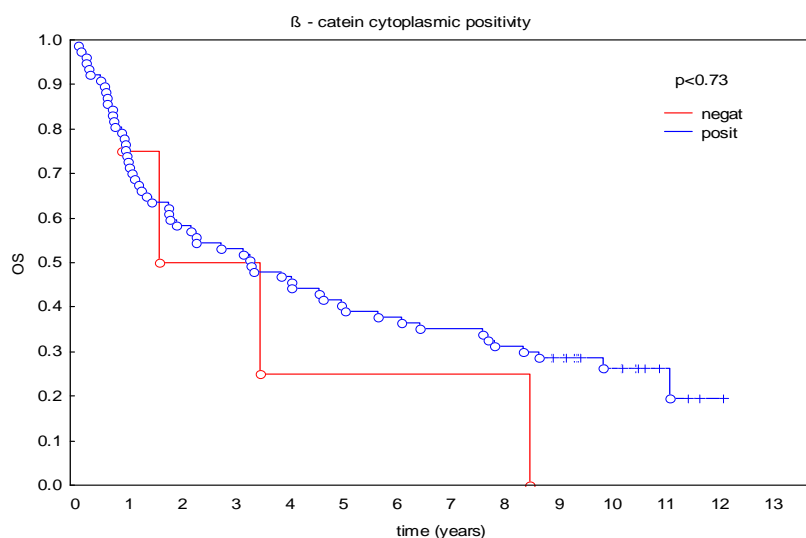
**Obr. č.3: Imunohistochemická expresia  $\beta$  – cateninu vo vzorkách adenokarcinómu pľúc  
Zväčšené 100krát.**



**Obr.č.4: Imunohistochemická expresia E – cadherinu vo vzorkách adenokarcinómu  
pľúc Zväčšené 100krát.**



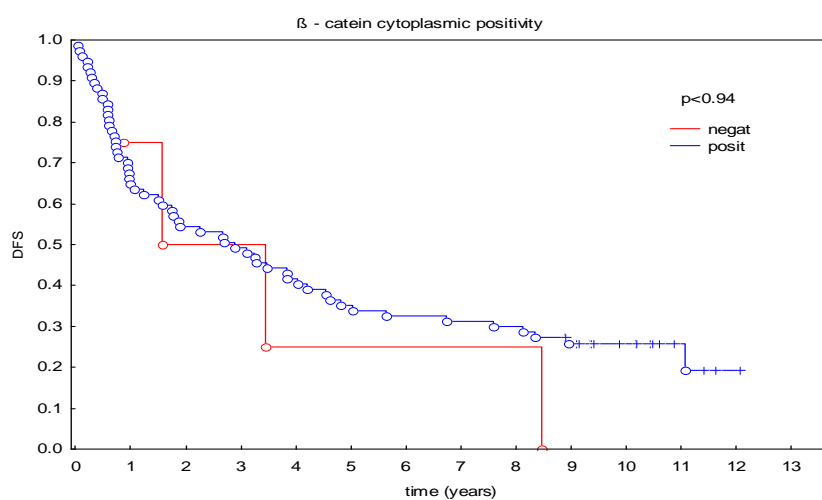
**Graf. č. 1:  $\beta$ -catenin cytoplazmatická pozitivita**



Porovnanie celkového prežitia s ohľadom na cytoplazmatickú expresiu  $\beta$  – kateninu.

(červená plná čiara- negatívni pacienti, modrá plná čiara- pozitívni pacienti).

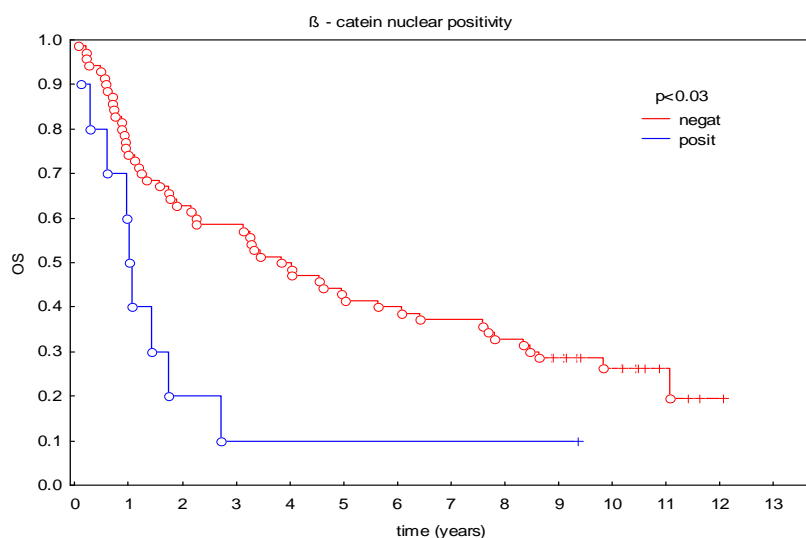
Nebola zistená signifikantná korelácia medzi celkovým prežitím a expresiou  $\beta$  – kateninu  $p<0,73$ .



Porovnanie dĺžky bezpríznakového obdobia s ohľadom na cytoplazmatickú expresiu  $\beta$  – kateninu.(červená plná čiara- negatívni pacienti, modrá plná čiara- pozitívni pacienti).

Nebola zistená signifikantná korelácia medzi dĺžkou bezpríznakového obdobia a expresiou  $\beta$  – kateninu  $p<0,94$ .

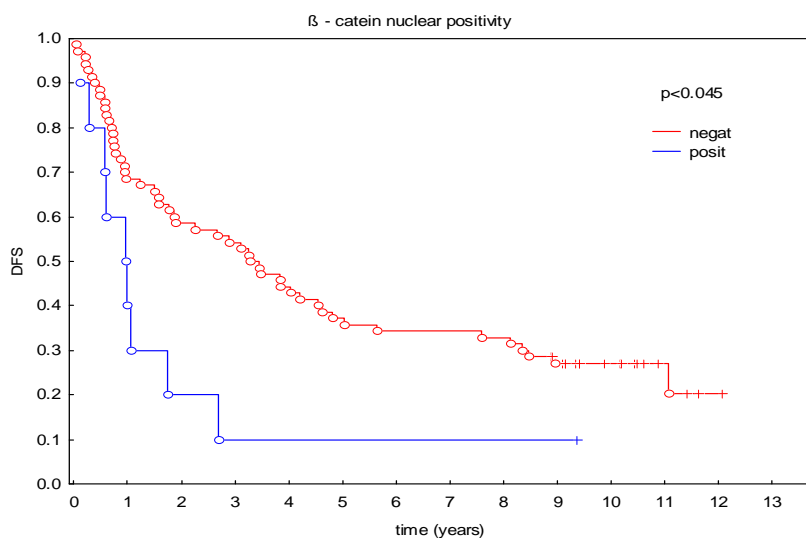
## Graf.č.2: $\beta$ -catenin jadrová pozitivita



Porovnanie celkového prežitia s ohľadom na nukleárnu expresiu  $\beta$  –cateninu.

(červená plná čiara- negatívni pacienti, modrá plná čiara- pozitívni pacienti).

Bola zistená signifikantná korelácia medzi celkovým prežitím a nukleárnou expresiou  $\beta$  – kateninu  $p < 0,03$ . Pacienti ktorí exprimujú  $\beta$  – katenin majú signifikantne horšie celkové prežitie v porovnaní s negatívnymi pacientmi.



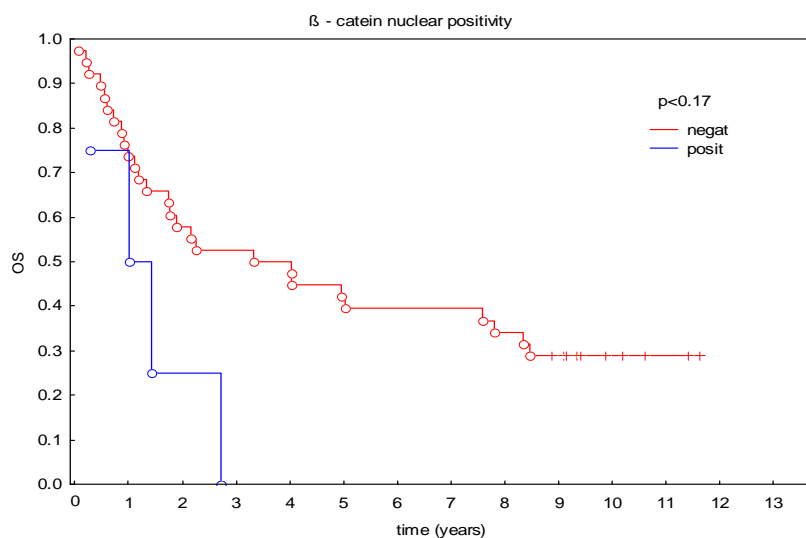
Porovnanie dĺžky bezpríznakového obdobia s ohľadom na nukleárnu expresiu  $\beta$  –cateninu.

(červená plná čiara- negatívni pacienti, modrá plná čiara- pozitívni pacienti).

Bola zistená signifikantná korelácia medzi dĺžkou bezpríznakového obdobia a nukleárnou expresiou  $\beta$  – kateninu  $p < 0,045$ . Pacienti ktorý exprimujú  $\beta$  – katenin majú signifikantne kratší interval bezpríznakového obdobia v porovnaní z negatívnymi pacientmi.

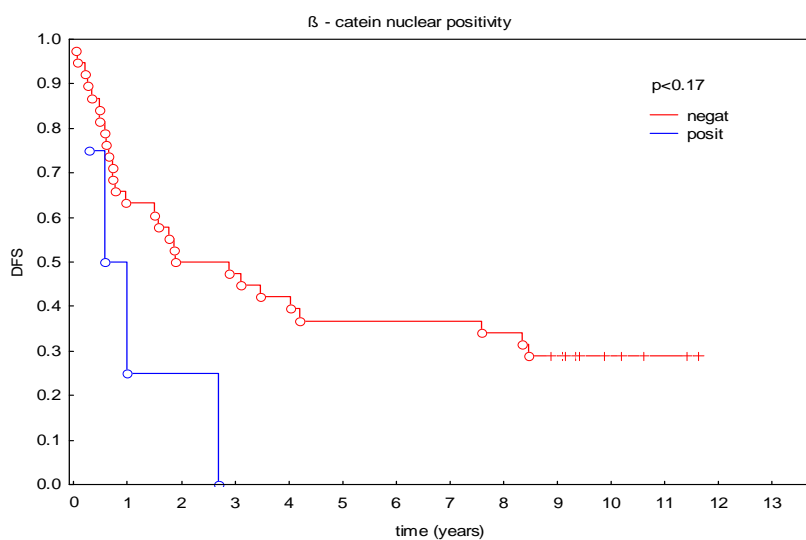
### Graf č.3: $\beta$ -catenin jadrová pozitivita

štádia III a IV



Porovnanie celkového prežitia s ohľadom na nukleárnu expresiu  $\beta$  – cateninu štádia III a IV.(červená plná čiara- negatívni pacienti, modrá plná čiara- pozitívni pacienti).

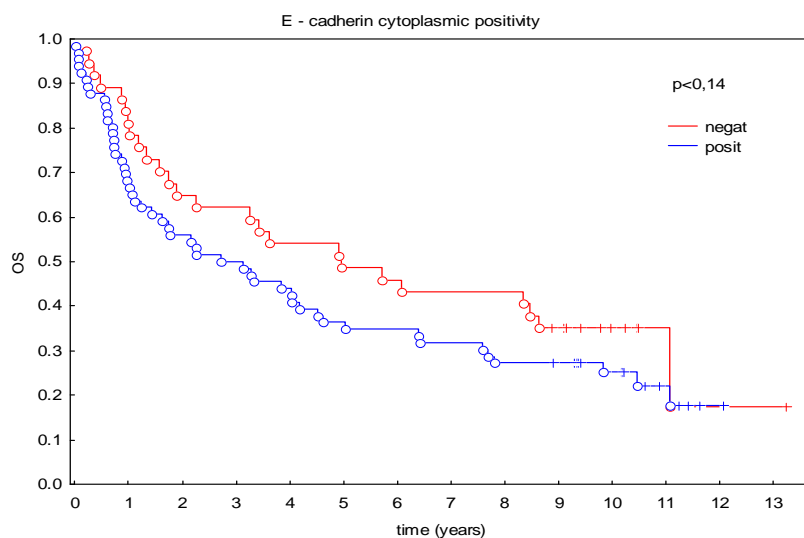
Nebola zistená signifikantná korelácia medzi celkovým prežitím a expresiou  $\beta$  – cateninu  $p < 0,17$ .



Porovnanie dĺžky bezpríznakového obdobia s ohľadom na nukleárnu expresiu  $\beta$  – cateninu pre štádium III a IV..(červená plná čiara- negatívni pacienti, modrá plná čiara- pozitívni pacienti).

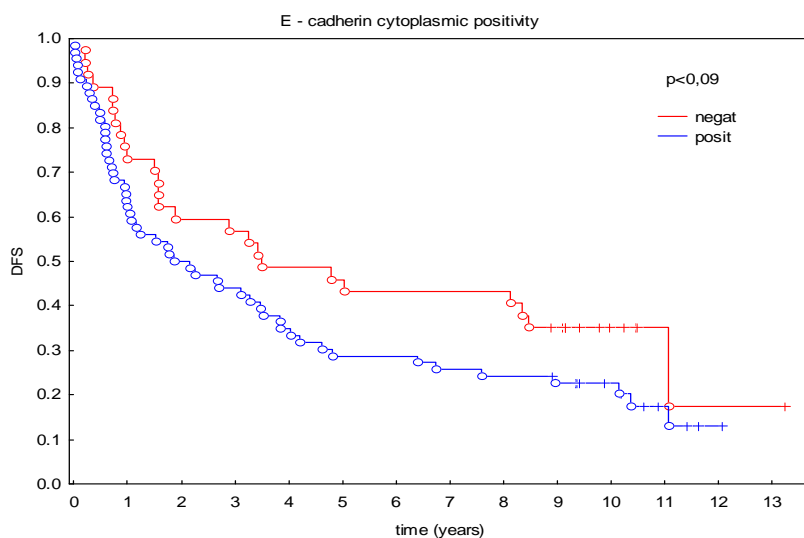
Nebola zistená signifikantná korelácia medzi dĺžkou bezpríznakového obdobia a expresiou  $\beta$  – cateninu  $p < 0,17$ .

**Graf č.4: E-cadherin cytoplazmatická pozitivita**



Porovnanie celkového prežitia s ohľadom na cytoplazmatickú expresiu E – cadherinu (červená plná čiara- negatívny pacienti, modrá plná čiara- pozitívny pacienti).

Nebola zistená signifikantná korelácia medzi celkovým prežitím a expresiou E –cadherinu  $p < 0,14$ .



Porovnanie dĺžky bezpríznakového obdobia s ohľadom na cytoplazmatickú expresiu E – cadherinu.(červená plná čiara- negatívny pacienti, modrá plná čiara- pozitívny pacienti).

Nebola zistená signifikantná korelácia medzi dĺžkou bezpríznakového obdobia a expresiou  $\beta$  – kateninu  $p < 0,09$ .

**Tab.č.II:**  $\beta$  - Catenin jadrová pozitivita

	N negatívna	N pozitívna	p-hodnota
<b>VP</b>	45	7	0.3228
<b>DAU</b>	42	6	0.1039
<b>VIN</b>	39	6	0.6427
<b>Cis.Pt</b>	52	8	0.2072
<b>TAX</b>	59	9	0.6059
<b>NVB</b>	46	8	0.1981
<b>topo</b>	31	5	0.7662
<b>Carbo.Pt</b>	45	8	0.3577
<b>TXR</b>	33	5	0.6151
<b>GMC</b>	33	6	0.5633

Neboli zistené žiadne signifikantné korelácie medzi nukleárnou pozitivitou  $\beta$  - cateninu a výsledkami in vitro viability nádorových línií derivovaných z primárnych nemalobunkových karcinómov pľúc

**Tab. III:** E-cadherin jaderná pozitivita

	N negatívna	N pozitívna	p-hodnota
<b>VP</b>	45	7	0.3228
<b>DAU</b>	42	6	0.1039
<b>VIN</b>	39	6	0.6427
<b>Cis.Pt</b>	52	8	0.2072
<b>TAX</b>	59	9	0.6059
<b>NVB</b>	46	8	0.1981
<b>topo</b>	31	5	0.7662
<b>Carbo.Pt</b>	45	8	0.3577
<b>TXR</b>	33	5	0.6151
<b>GMC</b>	33	6	0.5633

Neboli zistené žiadne signifikantné korelácie medzi nukleárnou pozitivitou E cadherinu a výsledkami in vitro viability nádorových línií derivovaných z primárnych nemalobunkových karcinómov pľúc



**Tab. IV:** E-cadherin cytoplazmatická pozitivita

	N negatívna	N pozitívna	p- hodnota
ACT.D	17	35	0.4308
VP	20	45	0.7368
<b>DAU</b>	<b>22</b>	<b>42</b>	<b>0.0542</b>
VIN	18	41	0.9199
Cis.Pt	23	52	0.6791
TAX	27	61	0.2446
NVB	19	45	0.8873
DOXO	15	33	0.5151
<b>topo</b>	<b>16</b>	<b>31</b>	<b>0.0760</b>
MIT	9	17	0.9353
Carbo.Pt	23	42	0.2692
<b>TXR</b>	<b>14</b>	<b>35</b>	<b>0.0689</b>
GMC	15	27	0.4439

Bola zistená hraničná korelácia medzi cytoplazmatickou pozitivitou E-kadherinu a výsledkami in vitro viability nádorových línií derivovaných z primárnych nemalobunkových karcinómov pľúc.

## 6. Diskusia

Je obecné známe, že komplex E-cadherinu a  $\beta$ -cateninu sa významnou mierou podieľa na procese medzibunkových adhézií. Uvedené proteíny sú tiež zapojené do signálnych dráh regulujúcich apoptózu. Porucha expresie uvedených proteínov je u rôznych nádorov spojovaná s nádorovou progresiou, metastázovaním a rezistenciou na protinádorovú terapiu. Z uvedeného dôvodu sme študovali expresiu týchto proteínov v rámci jednotlivých histologických subtypov nemalobunkového karcinómu pľúc a prognostický význam ich imunohistochemickej expresie u 201 pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc, za použitia tkanivových mikroerejí. Ďalej sme korelovali expresiu daných proteínov s výsledkami testov viability buniek primárneho tumoru. Neboli zistené žiadne významné rozdiely v expresii týchto proteínov medzi histologickými subtypmi nemalobunkového karcinómu pľúc. Nukleárna expresia  $\beta$ -cateninu významne korelovala s kratším intervalom bezpríznakového obdobia ( $p < 0,045$ ) a horším celkovým prežitím ( $p < 0,03$ ).

Obdobné výsledky dosiahli aj iní autori (Nozava *et.al.*, 2006). Bola tiež zistená hraničná korelácia medzi cytoplazmatickou expresiou E-cadherinu a rezistenciou na daunorubicin ( $p=0,0542$ ).

Vo viacerých štúdiách bola sledovaná expresia E-cadherinu a  $\beta$ -cateninu v nemalobunkových karcinómoch pľúc. Naše výsledky ukazujú, že neboli zistené žiadne signifikantné rozdiely v expresii týchto proteínov medzi histologickými subtypmi nemalobunkového karcinómu pľúc.

Shimoyama *et al.* sledoval prognostický význam imunohistochemickej expresie daných proteínov u 44 primárnych nádorov pľúc a zistil rozdielnu intenzitu imunohistochemickej expresie v prípade jak E-cadherinu a  $\beta$ -cateninu. Bolo zaznamenané, že expresia p-cad bola slabá v porovnaní k E-cad vo všetkých šiestich dobre diferencovaných adenokarcinómoch. (Y. Shimoyama *et al.*, 1989)

Bohm *et al.* skúmali rozdiely E-cadherinu v sérii 52 primárnych ľudských pľúcnych karcinómoch vrátane 36 spinocelulárnych karcinómov a 16 adenokarcinómov. Zistili zníženú expresiu daného proteínu v 25 z 36 spinocelulárnych karcinómov a neprítomnosť expresie daného proteínu v 8 vzorkách spinocelulárnych karcinómov. Naopak v ďalšej práci ktorá sledovala expresiu E-cadherinu v adenokarcinómoch bola jeho expresia pozorovaná len v 3 zo 16 prípadov. Expresia daného proteínu nekorelovala obdobne ako v našej práci so stupňom diferenciácie daných adenokarcinómov (Bohm *et al.*, 1994).

Bongiorno *et al.* opísal expresiu E-cadherinu v 52 pľúcnych adenokarcinómoch. Redukovaná alebo neprítomná expresia E-cad bola pozorovaná v 21% týchto nádoroch a variabilná intenzita expresie bola pozorovaná u 56% prípadov ( Bongiorno *et al.*, 1995).

Dôvodom, prečo sa jednotlivé výsledky líšia je odlišný súbor pacientov použitý v jednotlivých štúdiách ako aj použitie rôznych typov protilátok.

Uvedené výsledky potvrdzujú a ďalej rozširujú naše poznatky o molekulárnych mechanizmoch vývoja MDR. Zároveň potvrdzujú možný význam imunohistochemických a *in vitro* vyšetrení pre určenie individuálnej odpovede na liečbu.

## 7. Záver

Nádorové bunky môžu odolávať účinkom cytotoxických látok. Malígne bunkové populácie môžu byť rezistentné buď už pred zahájením liečby alebo v priebehu liečby. Ak pri strate citlivosti na určitý typ cytostatika dôjde k vzniku rezistencie na väčšinou štrukturálne príbuznú látku, jedná sa o skríženu rezistenciu. Mnohočetná lieková rezistencia popisuje prípady skríženej rezistencie medzi protinádorovými liečivami, ktoré sa líšili ako štrukturálne, tak aj mechanizmom účinku. MDR teda vysvetľuje prípady necitlivosti niektorých nádorov na iné druhy cytostatik, ako tie, ktoré boli použité v pôvodnej liečbe.

Komplex E-cadherinu a  $\beta$ -catenin sa podieľa na medzibunkovej adhézii a tiež reguluje apoptózu. Ak dôjde k poruche expresie týchto proteínov, tak sa u rôznych nádorov objavuje metastázovanie, nádorová progresia a tiež rezistencia na protinádorovú terapiu. Preto sme študovali expresiu týchto proteínov u jednotlivých histologických subtypov nemalobunkového karcinómu pľúc a korelovali sme expresiu proteínov s výsledkami testov viability buniek primárneho nádoru.

V našej práci neboli žiadne významné rozdiely v expresii proteínov medzi histologickými subtypmi nemalobunkového karcinómu pľúc. Nukleárna expresia  $\beta$ -catenin významne korelovala s kratším intervalom bezpríznakového obdobia ( $p=0,045$ ) a celkovým prežitím ( $p=0,03$ ). Tiež boli zistené významné korelácie medzi cytoplazmatickou expresiou E-cadherinu a rezistenciou na daunorubicin. Cytoplazmatická expresia E-cadherinu korelovala s in vitro citlivosťou nádorových línií na DAU-daunorubicin, topotecan a taxoter.

Naše výsledky sa líšili od výsledkov iných autorov, čo spôsobil odlišný súbor pacientov ako aj iný typ protilátok.

## 8. Literatúra

Alberg, A.J., Ford, J.G., Samet, J.M. (2007): American College of Chest Physicians. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 132:29S-55S

Bohm, M., Totzeck, B., Birchmeier, W., Wieland, I. (1994): Differences of E-cadherin expression levels and patterns in primary and metastatic human lung cancer: *Clin Exp Metastasis* 12: 55–62.

Bongiorno, P.F., Al-Kasspoles, M., Lee, S.W., Rachwal, WJ, Moore, J.H., Whyte, RK (1995): E-cadherin expression in primary and metastatic thoracic neoplasms and in Barrett's Esophagus. *Br J Cancer* 71:166–72.

Bremnes, R.M., Veve, R., Gabrielson, E., Hirsch F.R., Baron, A., Bemis, L., Gemmill, R.M., Drabkin, H.A., Franklin, W.A. (2002): High-Throughput Tissue Microarray Analysis Used to Evaluate Biology and Prognostic Significance of the E-Cadherin Pathway in Non-Small-Cell Lung Cancer: *Journal of Clinical Oncology* 20: 2417-2428

Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M.M., Roninson, I.B. (1986): Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells: *Cell*: 381-389

Choi, Y.S., Shim, Y.M., Kim, S.H., Son, D.S., Lee, H.S., Kim, G.Y., Han, Y., Kim, J.(2003): Prognostic significance of E-cadherin and b-catenin in resected stage I non-small cell lung cancer: *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 24: 441-449

Elzagheid, A., Buhmeida, A., Korkeila, E., Collan, Y., Syrjänen, K., Pyrhonen, S. (2008): Nuclear  $\beta$  – matenin expression as a prognostic factor in advanced colorectal carcinoma: *World J Gastroenterol*, 14(24): 3866-3871

Fei, Q., Zhang, H., Chen, X., Wang, J.C., Zhang, R., Xu, W., Zhang, Z., Zou, W., Zhang, K., Qi, Q., Wang, M., Tao S., Luo, Z. (2002): Defected expression of E-cadherin in non-small cell lung cancer: Lung Cancer 37: 147-152

Gilbert S.F. (2000): Developmental Biology, 6th edition, Sunderland (MA): Sinauer Associates

Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E.(2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters: Nat Rev Cancer 2(1):48-58.

Harvey, L., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser C.A., Krieger, M., Scott M.P., Zipursky, L., Darnel, J. (2004): Molecular Cell Biology. New York : W.H. Freedman and Company

Nosková, V., Hajdúch, M., Mihál, V., Cwiertka, K. (2000a):  
Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi, I. typická MDR. Klinická onkologie. 13(2): 4-9.

Nosková, V., Hajdúch, M., Mihál, V., Cwiertka, K. (2000b):  
Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi, II. atypická MDR. Klinická onkologie. 13(2): 10-17.

Nozawa, N., Hashimoto, S., Nakashima, Y., Matsuo, Y., Koga, T., Sugio, K., Niho, Y., Harada, M., Sueishi, K. (2006): Immunohistochemical a- and b-catenin and E-cadherin expression and their clinicopathological significance in human lung adenocarcinoma: Pathology research and practice: 639-650

Shimoyama, Y., Hirohashi, S., Hirano, S., Noguchi, M., Shimosato, Y., Takeichi, M., Abe, O. (1989): Carcinomas Cadherin Cell-Adhesion Molecules in Human Epithelial Tissues and carcinomas: Cancer Res; 49: 2128-2133

Smythe W. R., Williams J. P., Wheelock M. J., *et al.* (1999): Cadherin a catenin expression in normal human bronchial epithelium and non – small cell lung cancer, Lung cancer 24: 157 – 168

Škarda, J., Hajdúch, M., Bouchal, J., Nosková, V., Ludková, A., Džubák, P., Tichý, T., Klein, J., Koleč, V., Kolár, Z., Král, V., Mihál, V. (2000): Vzťah medzi expresiou proteínov asociovaných s liekovou rezistenciou a výsledkami in vitro cytotoxického MTT testu u pacientov s NSCLC. Klinická onkologie 2: 55 – 57

Internetové odkazy:

URL < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15112230> >

## 9. Zoznam použitých skratiek

<b>ATP</b>	Adenozíntrifosfát
<b>DAU</b>	Daunorubicin
<b>DFS</b>	Interval bezpríznakového obdobia
<b>DNA</b>	Kyselina deoxyribonukleová
<b>E – cad</b>	E – cadherin
<b>MDR</b>	Multidrug resistance-mnohočetná lieková rezistencia
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
<b>NSCLC</b>	Nonsmall cell lung cancer – nemalobunkový karcinóm pľúc
<b>OS</b>	Celkové prežívanie
<b>PgP</b>	P – glykoproteín
<b>TCS</b>	Tumor cell survival - Prežívanie nádorových buniek