

lek. Joanna Radzikowska

**Ocena wybranych markerów nowotworowych komórek macierzystych
oraz angiogenezy w mięsakach prążkowanokomórkowych u dzieci**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Antoni Krzeski

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Wojciech Kukwa

Klinika Otorynolaryngologii Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego
Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscyplin Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2020

STRESZCZENIE

Wstęp

Mięsak prążkowanokomórkowy (RMS, ang. *rhabdomyosarcoma*) jest nowotworem złośliwym tkanek miękkich, rozwijającym się z nieodróżnionej embrionalnej tkanki mezenchymalnej. Stanowi 4,5% wszystkich nowotworów złośliwych u dzieci i jest najczęściej rozpoznawanym mięsakiem tkanek miękkich w tej grupie wiekowej. Postęp w dziedzinie onkologii, lepsze zrozumienie biologii i podłoża genetycznego RMS oraz współpraca międzynarodowych grup badawczych przyczyniły się do radykalnej poprawy rokowania u dzieci z RMS. Na przestrzeni ostatnich kilku dekad prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia całkowitego wzrosło z 25% do ponad 70%. Strategia leczenia oparta jest na terapii skojarzonej, a wybór protokołu terapeutycznego jest poprzedzony stratyfikacją ryzyka uwzględniającą stopień zaawansowania w momencie rozpoznania, stadium kliniczne według klasyfikacji chirurgiczno-patologicznej, wariant histopatologiczny oraz umiejscowienie guza pierwotnego. Pomimo agresywnego leczenia skojarzonego, modyfikowanego na podstawie programów badawczych prowadzonych na dużych grupach pacjentów, wykorzystania zaawansowanych technik operacyjnych, nowoczesnych metod radioterapii i coraz doskonalszych chemioterapeutyków, nie obserwuje się dalszej istotnej poprawy wskaźników przeżycia. Ograniczone powikłaniami możliwości intensyfikacji leczenia konwencjonalnego oraz słabe rokowanie w przypadkach pacjentów ze wznową lub uogólnioną chorobą nowotworową w momencie rozpoznania, uzasadniają konieczność poszukiwania nowych, bezpieczniejszych metod terapii celowanej. Coraz większe zainteresowanie w świecie medycyny zyskuje teoria zakładająca istnienie populacji nowotworowych komórek macierzystych (CSC, ang. *cancer stem cell*). Liczne badania prowadzone *in vitro* oraz *in vivo* wskazują, iż to właśnie ta niewielka populacja komórek, zdolnych do różnicowania i samoodnowy, odgrywa istotną rolę w procesie inicjacji i progresji nowotworu. Strategie walki z chorobą nowotworową wymierzone w markery powierzchniowe CSC, szlaki sygnałowe regulujące procesy samoodnowy i różnicowania, transportery błonowe odpowiedzialne za usuwanie leków cytotoksycznych z komórki, mechanizmy oporności na sygnały indukujące apoptozę, czy też w oddziaływania CSC z elementami niszy są aktualnie przedmiotem intensywnych badań. Obiecujące wydaje się również leczenie antyangiogenne, niszczące strukturę naczyniową mikrośrodowiska CSC. Ocena gęstości mikronaczyń, na

podstawie ekspresji markerów śródbłonka naczyniowego, będąca wyznacznikiem nasilenia angiogenezy nowotworowej, pozwala skuteczniej selekcjonować pacjentów do terapii antyangiogennej oraz monitorować efekty leczenia.

Cel

Celem pracy była ocena wybranych markerów nowotworowych komórek macierzystych oraz markerów angiogenezy w mięsakach prążkowanokomórkowych u dzieci.

Material i metody

Projekt badawczy miał charakter wieloośrodkowy, materiałem badawczym były archiwalne skrawki tkankowe, a dane kliniczne zgromadzono retrospektywnie na podstawie dostępnej dokumentacji medycznej. Badaniami objęto 49 pacjentów poniżej 18. roku życia, z rozpoznaniem RMS, leczonych w latach 2000-2016 w Klinice Chirurgii Dzieci i Młodzieży Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie oraz w Klinice Onkologii Instytutu „Pomnika-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie. Grupę badaną stanowiło 19 dziewcząt i 30 chłopców. Średnia wieku wynosiła 5,76 lat. W 17 przypadkach lokalizację guza oceniono jako korzystną rokowniczo. U 28 pacjentów rozpoznano zarodkowy wariant histopatologiczny, u pozostałych 21 pacjentów – pęcherzykowy. W momencie rozpoznania 17 pacjentów prezentowało przerzuty odległe, u 15 stwierdzono 3. stopień zaawansowania klinicznego, u dwojga – 2. stopień, a u pozostałych 15 pacjentów – 1. stopień. Spośród parametrów klinicznych w analizie uwzględniono: wiek, płeć, wielkość i lokalizację guza pierwotnego, podtyp histopatologiczny, cechę T, N i M, stopień zaawansowania klinicznego według klasyfikacji TNM dla RMS, a także przeżycie całkowite.

Za pomocą metod immunohistochemicznych oceniono ekspresję markerów nowotworowych komórek macierzystych: CD24, CD44, CD133 i ALDH1A1. Wartość ekspresji wyrażono przy użyciu uznanej półilościowej skali IRS. Gęstość mikronaczyń wyliczono na podstawie ekspresji markerów śródbłonka naczyniowego: CD31, CD34, CD105, zgodnie z procedurą opracowaną przez Weidnera.

Do analizy statystycznej wykorzystano program SAS 9.4. Przeprowadzono analizę opisową. Do wykazania istotności różnic zastosowano testy nieparametryczne U Manna-Whitneya, ANOVA Kruskala-Wallisa oraz Chi-kwadrat. Współzależność badanych cech wykazano za pomocą korelacji rang Spearmana. W analizie przeżycia uwzględniono 42 pacjentów z RMS, 7 żyjących pacjentów wyłączono z analizy z uwagi na okres obserwacji krótszy niż 5 lat. Prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia oceniono metodą Kaplana-

-Meiera, natomiast do poszukiwania niezależnych czynników wpływających na przeżycie pacjentów z RMS zastosowano model proporcjonalnego hazardu Coxa.

Wyniki

Ekspresję markerów CSC: CD24, CD44, CD133 i ALDH1A1 wykazano w badanej grupie odpowiednio u: 83,7%, 55,1%, 81,6% i 100% pacjentów. Wartość ekspresji wszystkich ocenianych markerów CSC była istotnie statystycznie większa w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej. Wartość medianowa gęstości mikronaczyń na podstawie ekspresji cząsteczki CD105 (MVD/CD105) wynosiła 107,14 i była najmniejsza w porównaniu do MVD/CD31 (142,86) oraz MVD/CD34 (168,37). Gęstość MVD/CD105, w przeciwieństwie do pozostałych analizowanych markerów angiogenezy, była istotnie statystycznie większa w tkaniu RMS w porównaniu do gęstości mikronaczyń w grupie kontrolnej. Wartości MVD/CD105 były istotnie statystycznie większe u pacjentów z wariantem pęcherzykowym RMS ($Z = -2,08$; $p = 0,037$). Wykazano również istotną statystycznie zależność pomiędzy MVD a występowaniem przerzutów odległych, w odniesieniu do wszystkich ocenianych markerów śródbłonna naczyniowego. Nie zaobserwowano natomiast żadnej istotnej zależności pomiędzy ekspresją wybranych markerów CSC a analizowanymi czynnikami klinicznymi i patomorfologicznymi.

Prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia w badanej grupie wyniosło 52%. Analizą Kaplana-Meiera potwierdzono istotne statystycznie mniejsze prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia u pacjentów z pęcherzykowym wariantem histopatologicznym, z występowaniem przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych oraz z występowaniem przerzutów odległych, a także u pacjentów z zaawansowaną chorobą nowotworową. Zaobserwowano również wyższe prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia u pacjentów w grupie wiekowej 1-9 lat.

Posługując się modelem proporcjonalnego hazardu Coxa, wykazano istotne statystycznie większe ryzyko wystąpienia zgonu w podgrupie pacjentów z występowaniem przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych ($HR = 11,51$), u pacjentów, którzy nie ukończyli 1. roku życia ($HR = 7,97$) oraz u pacjentów w wieku 10 lat i starszych ($HR = 6,22$). Minimalnie większe ryzyko zgonu stwierdzono ponadto u pacjentów z wyższymi wartościami MVD/CD105 ($HR = 1,009$). Nie zaobserwowano istotnego statystycznie wpływu na ryzyko wystąpienia zgonu w odniesieniu do markerów CSC oraz MVD/CD31 i MVD/CD34. Nie stwierdzono również istotnej korelacji pomiędzy ekspresją markerów CSC a gęstością mikronaczyń.

Wnioski

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają występowanie ekspresji markerów nowotworowych komórek macierzystych: CD24, CD44, CD133 oraz ALDH1A1 w utkaniu mięsaka prążkowanokomórkowego u dzieci. Wykazanie istotnych statystycznie wyższych wartości MVD/CD105 w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej sugeruje przydatność CD105 jako markera identyfikującego naczynia nowotworowe w RMS u dzieci. Analizą korelacji potwierdzono również zależność między MVD/CD105 a niekorzystnym rokowniczo pęcherzykowym wariantem histopatologicznym. Wykazano też istotną korelację wyższych wartości MVD/CD105, MVD/CD31 i MVD/CD34 z występowaniem przerzutów odległych w momencie rozpoznania RMS. Przeprowadzona analiza nie potwierdziła natomiast żadnych istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją wybranych markerów nowotworowych komórek macierzystych a czynnikami klinicznymi i patomorfologicznymi o znaczeniu prognostycznym dla RMS u dzieci. Analiza przeżycia z uwzględnieniem ekspresji markerów CSC, gęstości mikronaczyń oraz wybranych parametrów klinicznych i patomorfologicznych stanowi mały dowód potwierdzający, że MVD/CD105 jest niezależnym czynnikiem ryzyka zgonu u dzieci z RMS. Większe ryzyko zgonu potwierdzono też w przypadku występowania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych w momencie rozpoznania, jak również w grupie pacjentów poniżej 1. roku życia oraz w wieku 10 lat i starszych. Na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdzono prognostycznego znaczenia ekspresji żadnego z ocenianych markerów nowotworowych komórek macierzystych. Nie wykazano również istotnych statystycznie wzajemnych korelacji pomiędzy ekspresją CSC a gęstością mikronaczyń. Konieczne są jednak dalsze badania, na większych grupach pacjentów, według wystandaryzowanych metod badawczych, które by precyzyjniej określiły znaczenie markerów CSC i gęstości mikronaczyń u dzieci z RMS.

Joanna Kordikowska

KIEROWNIK
Kliniki Otorynolaryngologii
Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego

prof. dr. hab. n. med. Antoni Krzeski

A. Krzeski

[Signature]
dr hab. n. med. Wojciech Kukwa
specjalista otoryngolog
7459392