

VII. STRESZCZENIE

Czerniak jest nowotworem złośliwym powstającym w wyniku transformacji nowotworowej melanocytów. Nowotwór ten występuje głównie w skórze, ale również na błonach śluzowych czy w gałce ocznej. Mimo, iż czerniak jest coraz częściej wykrywany w coraz wcześniejszych stadiach zaawansowania wciąż jest chorobą, której przebieg obarczony jest dużym odsetkiem niepowodzeń w leczeniu. Główną przyczyną czerniaka jest narażenie na karcinogeny wpływ promieniowania UV, zarówno naturalnego jak i sztucznego. Około 10% przypadków tego nowotworu ma podłoże dziedziczne.

Główną przyczyną transformacji nowotworowej melanocytów są mutacje w genach kodujących białka regulujące proliferację, procesy różnicowania się oraz śmierć komórki. NOGO-B jest jedną z trzech znanych izoform należących do nadrodziny białek 4 grupy retikulonów (NOGO). Jest szeroko rozpowszechniona w tkankach organizmów eukariotycznych, występując głównie w postaci związanej z błoną retikulum endoplazmatycznego, gdzie bierze udział w jego powstawaniu i formowaniu. Wiele funkcji tego białka pozostaje dotychczas nieokreślonych. Najlepiej jak dotąd zbadano jego wpływ na procesy regulujące przebudowę naczyń tętniczych. Poprzez wiązanie się ze swoim receptorem NgBR, NOGO-B (*in vitro*) stymuluje powstawanie nowych kapilar z pierwotnych komórek śródbłonna, ich migrację oraz moduluje syntezę wielu cytokin. Wykazano również wzrost ekspresji NOGO-B w odpowiedzi na hipoksję komórkową. NOGO-B wykazuje także działanie pro-apoptotyczne, czego potwierdzeniem są wyniki badań przeprowadzonych na materiale raków drobnokomórkowych płuc oraz ostrej białaczki limfoblastycznej. W świetle ostatnich badań NOGO-B oraz NgBR mogą odgrywać istotną rolę w procesie progresji, wzrostu oraz angio- i limfangiogenezy. Brak jednoznacznych wyników oraz obserwowane plejotropowe funkcje NOGO-B m.in. w ww. procesach nie pozwalają na określenie dokładnej roli tego białka w progresji nowotworowej.

W związku z powyższym celem moich badań było zbadanie roli ekspresji NOGO-A/B oraz jego receptora NgBR w rozwoju i progresji czerniaka, jak również określenia znaczenia prognostycznego ww. białek.

Badania przeprowadzono na archiwalnym materiale 79 bloczków parafinowych pobranych od pacjentów z czerniakiem oraz na 41 z łagodnymi zmianami barwnikowymi. Na skrawkach parafinowych zostały przeprowadzone reakcje immunohistochemiczne (IHC) celem oceny ekspresji NOGO-A/B, NOGO-A, receptora NgBR, antygenu CD31 (markera

naczyń krwionośnych), antygenu D2-40 (markera naczyń limfatycznych), jak również została określona ekspresja białka Ki-67 jako markera proliferacji.

Wyniki badań IHC zostały skorelowane z danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów (wiek, płeć, stosowane leczenie, zaawansowanie kliniczne choroby, czas przeżycia), z wykorzystaniem programu statystycznego Prism 5.0.

Badania wykazały niskie nasilenie ekspresji NOGO-A oraz wysokie NOGO-A/B i NgBR w komórkach czerniaka. Ponadto zaobserwowano istotne statystycznie różnice w nasileniu ekspresji NOGO-A/B. Najwyższy poziom ekspresji zaobserwowano w zmianach barwnikowych, pośredni w ogniskach pierwotnych, natomiast najniższy w zmianach przerzutowych czerniaka. Zaobserwowano również ujemną korelację ekspresji NgBR w komórkach czerniaka z gęstością naczyń limfatycznych (D2-40-pozytywnych) w obszarze otaczającym ognisko pierwotne. Analiza korelacji ekspresji badanych markerów IHC wykazała istotną statystycznie ujemną korelację ekspresji NOGO-A/B z głębokością naciekania czerniaka mierzoną wg Breslowa. Ponadto, przypadki z niskim nasileniem ekspresji NOGO-A/B w komórkach czerniaka, charakteryzowały się istotnie statystycznie krótszymi przeżyciami w porównaniu do przypadków z wysoką ekspresją tych białek.

Uzyskane wyniki badań wskazują na potencjalnie proapoptotyczną rolę białka NOGO-B w komórkach czerniaka, a także ekspresja ww. białka może mieć znaczenie prognostyczne w tego typu guzach nowotworowych.

VIII. ABSTRACT

Malignant melanoma is a malignancy originating from melanocytes. This tumour occurs mainly in skin, but also in mucous membranes or in eye bulb. Although malignant melanoma is more frequently diagnosed in earlier advancement stages, it still poses a serious health problem and is associated with poor prognosis. The main cause of malignant melanoma development is exposure to natural as well as artificial carcinogenic UV radiation. About 10% of cases is associated with genetic factors.

Malignant transformation of melanocytes may be the result of mutations in genes encoding proteins regulating proliferation, cell differentiation and death. NOGO-B/RTN4B is one of three isoforms belonging to the superfamily of proteins of the type four reticulons (NOGO). This isoform is widely expressed in tissues of eukaryote, mostly bound to the membrane of endoplasmatic reticulum, where it participates in its formation and development. Many functions of this protein remain to be clarified. Until now its role in regulation of arterial remodelling is so far the best characterized. By binding to its receptor NgBR, NOGO-B (*in vitro*) stimulates the formation of new capillaries from native endothelial cells, their migration and regulates the synthesis of various cytokines. NOGO-B expression was also shown to be stimulated by tissue hypoxia. Mice lacking NOGO-A/B are characterized by normal vitality, fertility and behavior. However, in conditions of experimentally induced ischemia in limb arteries, these mice were characterized by impaired arterial remodeling due to their faster lumen obliteration. Further studies performed on animals with loss of NOGO-B expression revealed the reduction of arterio- and angiogenesis, as well as decrease of inflammation and expression of proinflammatory cytokines (e.g. angiopoietin-2), what led to slower regeneration process of damaged tissues in ischemic limbs. NOGO-B was shown to act as a pro-apoptotic factor, what is confirmed by the results of studies performed on small cell lung carcinoma and acute lymphoblastic lymphoma/leukaemia. In light of the recent research, NOGO-B and NgBR may play a significant role in progression and increase of angio- and lymphangiogenesis. However, lack of unambiguous results and the observed pleiotropic functions of NOGO-B in the above mentioned processes do not allow to define its exact role in the tumour progression.

In light with the above, the aim of my study was to evaluate the role of NOGO-B and its receptor NgBR expression in development and progression of malignant melanoma, as well as determining the prognostic significance of the above mentioned proteins.

The study was performed on 79 archival paraffin blocks obtained from patients with malignant melanoma and 41 with benign melanocytic lesions. Immunohistochemical reactions (IHC) were performed on paraffin sections aimed at determining the expression of NOGO-A/B, NOGO-A, NgBR receptor, CD31 (blood vessel marker), D2-40 (lymphatic vessel marker) and the Ki-67 proliferation antigen.

The results from IHC sections were correlated with patients clinico-pathological data (age, sex, treatment regimens, clinical advancement stage and survival time) utilizing Prism 5.0 statistical software.

Low expression intensity of NOGO-A and high of NOGO-A/B and NgBR was observed in cells of malignant melanoma. Moreover, statistically significant differences were observed in NOGO-A/B expression. Its highest expression intensity was noted in benign melanocytic lesions, intermediate in malignant melanoma primary tumours, whereas the lowest intensity was observed in its metastatic lesions. Moreover, a significantly negative correlation of NgBR expression with lymphatic vessel density (D2-40-positive) in peritumoural primary tumour area was observed. Statistical analysis revealed an inverse correlation of NOGO-A/B expression and depth of invasion measured according to Breslow. Furthermore, cases presenting low NOGO-A/B expression intensity in malignant melanoma cells were characterized by significantly shorter survival in comparison to cases with its expression.

The obtained results point to the proapoptotic role of NOGO-B in malignant melanoma cells, as well as expression of the abovementioned protein may have a prognostic significance in such tumour types.