

Zakład Kliniczno-Badawczy Chirurgii Transplantacyjnej  
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej  
Akademii Nauk

Mgr inż. Katarzyna Gardian

WYBRANE ELEMENTY MIKROŚRODOWISKA RAKA TRZUSTKI JAKO  
UZUPEŁNIENIE KLINICZNEJ OCENY ZAAWANSOWANIA CHOROBY.

Praca doktorska

Promotor: dr hab. n. med. Marek Durlik, prof. IMDiK

Warszawa 2015

*Rodzicom*

Badania, których wyniki przedstawiono w tej pracy były finansowane z grantu  
Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N404/0693/33

Wyniki badań przedstawione w tej pracy zostały wykorzystane w publikacjach:

1. *Gardian K, Janczewska S, Olszewski WL, Durlik M.* Analysis of pancreatic cancer microenvironment: role of macrophage infiltrates and growth factors expression. *J Cancer.* 2012;3:285-91
2. *Gardian K, Janczewska S, Durlik M.* Microenvironment elements involved in the development of pancreatic cancer tumor. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:585674
3. *Durlik M, Gardian K.* Metalloproteinase 2 and 9 activity in the development of pancreatic cancer. *Pol Przegl Chir.* 2012 Aug;84:377-82
4. *Gardian K, Durlik M.* Komórki nacieku zapalnego a rozwój raka trzustki. *Prz Gastroenterol* 2013; 8: 133–137

## Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy:.....	7
1. Założenia pracy.....	9
2. Wstęp.....	10
2.1. Rak trzustki .....	10
2.2. Czynniki ryzyka wystąpienia nowotworu trzustki.....	10
2.3. Gruczolakorak trzustki .....	13
2.3.1. Cechy makroskopowe.....	13
2.3.2. Diagnostyka i ocena stanu zaawansowania raka trzustki .....	14
2.3.3. Leczenie raka trzustki .....	16
2.4. Biologia guzów trzustki .....	19
2.4.1. Kancerogeneza.....	19
2.4.2. Mikrośrodowisko raka trzustki .....	21
3. Cel pracy.....	25
4. Materiał i metody .....	26
4.1. Pobieranie materiału od chorych.....	26
4.1.1. Utrwalanie materiału do badań .....	27
4.2. Ocena histologiczna tkanek.....	27
4.2.1. Barwienie hematoksylina-eozyna.....	27
4.2.2. Barwienie trójbarwne azan.....	27
4.2.3. Barwienie immunohistochemiczne.....	28
4.2.4. Półilościowa ocena barwienia immunohistochemicznego.....	29
4.3. Ocena ekspresji czynników wzrostu w tkance guza trzustki.....	29
4.4. Ocena nacieków komórek odpowiedzi zapalnej w tkance guza trzustki.....	30
4.5. Oznaczanie aktywności metaloproteinaz .....	30
4.5.1. Izolacja białek.....	30
4.5.2. Zymografia żelowa .....	31
4.5.3. Zymografia <i>in situ</i> .....	31
4.6. Ocena naczyń krwionośnych i limfatycznych w guzie raka trzustki.....	32
4.6.1. Mikrolimfangiografia.....	32
4.6.2. Barwienie immunohistochemiczne.....	32
4.7. Analiza statystyczna.....	33
5. Wyniki .....	34
5.1. Ocena zebranego materiału .....	34

5.2.	Ekspresja czynników wzrostu w guzie trzustki.....	36
5.2.1.	EGF i EGFR.....	36
5.2.2.	FGF2 i FGF7.....	38
5.2.3.	IGF1 i IGF-IR.....	39
5.2.4.	HGF $\alpha$ i c-Met.....	40
5.2.5.	PDGF- $\beta\beta$ .....	41
5.3.	Ocena półilościowa barwień immunohistochemicznych.....	41
5.4.	Ocena nacieków zapalnych w guzie trzustki.....	47
5.4.1.	Limfocyty T.....	47
5.4.2.	Makrofagi.....	50
5.4.3.	Neutrofile.....	52
5.5.	Aktywność metaloproteinaz w guzach trzustki.....	54
5.6.	Ocena limfangiogenezy w guzie trzustki.....	58
6.	Dyskusja wyników.....	61
6.1.	Ekspresja receptora c-Met w guzach trzustki.....	61
6.2.	Wpływ naciekających makrofagów na inwazyjność raka trzustki.....	65
6.3.	Obecność innych komórek odpowiedzi zapalnej w guzie raka trzustki.....	66
6.4.	Aktywność metaloproteinaz 2 i 9 w guzach nowotworowych trzustki.....	67
6.5.	Limfangiogeneza w guzach trzustki.....	69
7.	Podsumowanie.....	72
8.	Wnioski.....	73
9.	Bibliografia.....	74
10.	Streszczenie.....	85
11.	Abstract.....	88

### Wykaz skrótów stosowanych w pracy:

ANG	<i>angiopoetin</i> – angiopoetyna
BMI	<i>body mass index</i> – wskaźnik masy ciała
CD	<i>cluster of differentiation</i> - antygen różnicowania komórkowego
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> – zależny od cyklin inhibitor kinazy 2A
DAB	<i>3,3'-diaminobenzidine</i> - 3,3'-diaminobenzydyna
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> - kwas dezoksyrybonukleinowy
ECM	<i>extracellular matrix</i> - macierz zewnątrzkomórkowa
EDTA	<i>ethylenediamide tetraacetic acid</i> - wersenian dwusodowy
EGF	<i>epidermal growth factor</i> - czynnik wzrostu naskórka
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i> – przejście epitelialno-mezenchymalne
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i> – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym
EUS	endoskopowa ultrasonografia
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> – czynnik wzrostu fibroblastów
GDNF	<i>glial cell-derived neurotrophic factor</i> - czynnik neurotroficzny pochodzący z komórek glejowych
HEPES	kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo]etanosulfonowy
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> – czynnik wzrostu hepatocytów
HIF	<i>hypoxia induced factor</i> – czynnik indukowany hipoksją
HPF	<i>high power field</i> – pole o wysokiej rozdzielczości
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> – peroksydaza chrzanowa
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> – insulinopodobny czynnik wzrostu
IL	interleukina
LN	<i>lymph nodes</i> -węzły chłonne
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i> - kinazy aktywowane mitogenami
MMP	<i>matrix metaloproteinase</i> – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> – matrycowy/informacyjny kwas rybonukleinowy
NSCLC	<i>non-small-cell lung cancer</i> - niedrobnokomórkowy rak płuca

OR	<i>odds ratio</i> – iloraz szans
PanIN	<i>pancreatic interepithelial neoplasia</i> – trzustkowa neoplazja wewnątrznałonkowa
PBS	<i>physiological buffered saline</i> - buforowana sól fizjologiczna
PI3K	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i> - kinaza 3-fosfatydylinozytolu
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i> – przewodowy gruczolakorak trzustki
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> – płytkopochodny czynnik wzrostu
PET	pozytonowa emisyjna tomografia komputerowa
RR	<i>relative risk</i> – ryzyko względne
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> - dodecylosiarczan sodu
SPARC	<i>secreted protein acidic and rich in cysteine</i> – kwasowe białko wydzielnicze bogate w cysteinę, osteonektyna
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i> - przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji
TGF	<i>transforming growth factor</i> – transformujący czynnik wzrostu
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i> – tkankowy inhibitor metaloproteinazy
TK	tomografia komputerowa
TLR	<i>Toll-like-receptor</i> – receptor Toll-podobny
TRIS	tris(hydroksymetylo)aminometan
USG	ultrasonografia
uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i> – aktywator plazminogenu typu urokinazy
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
WHO	<i>World Health Organization</i> – Światowa Organizacja Zdrowia
WHR	<i>waist-to-hip ratio</i> – stosunek obwodu talia/biodra



## **1. Założenia pracy**

Prowadząc badania nad nowotworami poszukuje się biomarkerów, które pozwoliłyby odpowiednio wcześnie zdiagnozować chorobę, a także umożliwić precyzyjne określenie poziomu jej zaawansowania. Szczególnie intensywne prace są prowadzone w przypadku raka trzustki, który pozostaje nowotworem o największej śmiertelności, a ilość zachorowań na ten nowotwór systematycznie się zwiększa. Prowadzone dotychczas badania wyjaśniły wiele procesów związanych z tym nowotworem, jednak nadal brak wiarygodnych markerów, które umożliwiłyby monitorowanie rozwoju tej choroby<sup>1</sup>. Taki marker pozwalałby także na określenie dokładnego stopnia zaawansowania choroby i właściwego doboru terapii, a w przypadku guzów o granicznej resekcyjności wskazywałby także na zasadność zabiegów chirurgicznych. W stosowanej obecnie ocenie histopatologicznej nowotworu trzustki biologia guza jest określana za pomocą stopnia zróżnicowania histologicznego G, jednak nie oddaje on właściwego obrazu procesów zachodzących między komórkami nowotworowymi a ich otoczeniem.

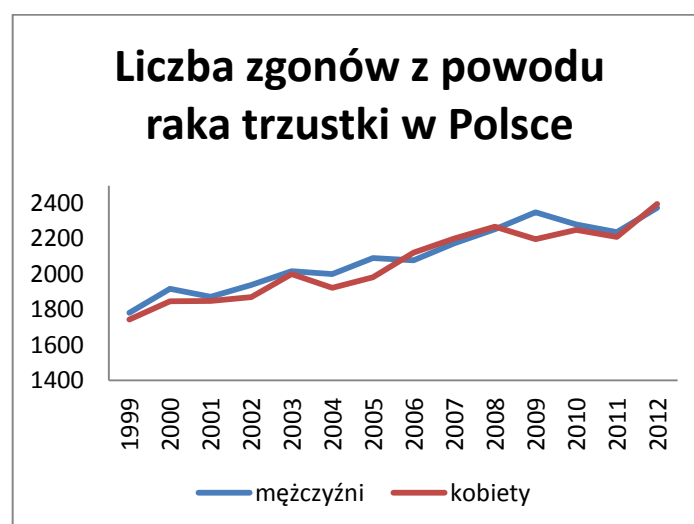
W ostatnich latach dużo uwagi poświęca się badaniom mikrośrodowiska guzów litych. Obserwacje te pozwoliły wyjaśnić wiele procesów zachodzących w czasie rozwoju nowotworu. Może ono stanowić także bogate źródło informacji zarówno diagnostycznych jak i prognostycznych.

Prowadzone przeze mnie badania wybranych elementów mikrośrodowiska guza trzustki pozwolą na określenie, które z badanych czynników mogą mieć zastosowanie w indywidualnej ocenie procesu nowotworowego.

## 2. Wstęp

### 2.1. Rak trzustki

Rak trzustki jest czwartym co do częstości nowotworem występującym zarówno u kobiet jak i u mężczyzn. Tylko 10% przypadków nowotworów trzustki występuje u osób poniżej 55 roku życia, średni wiek diagnozy to 71 lat<sup>2</sup>. W Polsce w ciągu ostatnich dziesięciu lat liczba zgonów spowodowanych rakiem trzustki zwiększyła się o 29%<sup>3</sup> (Ryc.1). Według najnowszej analizy przeprowadzonej przez WHO rak trzustki jest jednym z dwóch nowotworów, w przypadku których śmiertelność będzie w najbliższych latach wzrastać<sup>4</sup>.



Ryc.1. Wzrost liczby zgonów z powodu raka trzustki w Polsce w latach 1999-2012 (Rycina na podstawie danych Centrum Onkologii <http://85.128.14.124/krn/>)

### 2.2. Czynniki ryzyka wystąpienia nowotworu trzustki.

Palenie tytoniu jest najsilniejszym czynnikiem ryzyka zachorowania na raka trzustki. Szacuje się, że 25% przypadków raka trzustki jest związanych z paleniem papierosów. U palaczy relatywne ryzyko wystąpienia nowotworu wynosi 1,74<sup>5</sup>. Palenie jednego papierosa dziennie zwiększa to ryzyko o 2% natomiast wypalenie

jednej paczki papierosów na rok o 1%. Rzucenie palenia wydaje się najskuteczniejszą metodą zmniejszenia ryzyka zachorowania na raka trzustki, jednak faktycznie zmniejsza się ono dopiero po 10 latach od porzucenia nałogu<sup>6</sup>.

Kolejnym czynnikiem ryzyka jest otyłość - badania wykazują zwiększone prawdopodobieństwo nowotworu u osób z nadwagą<sup>7</sup>. Zwiększenie BMI o 5 jednostek zwiększa ryzyko wystąpienia raka trzustki (OR= 1,5). Wykazano również, że występowanie nadwagi w wieku 14-29 lat oraz otyłości w wieku 20-29 lat szczególnie zwiększa to ryzyko. Nadwaga i otyłości wpływają również na wiek, w którym występuje nowotwór. W porównaniu z osobami z wagą w normie, u osób otyłych rak trzustki występuje 5 lat wcześniej<sup>8</sup>. Również zwiększenie obwodu talii, a także wskaźnika WHR (waist-to-hip ratio), ma związek ze zwiększonym prawdopodobieństwem wystąpienia nowotworu<sup>9</sup>. Relatywne ryzyko dla obwodu zwiększonego o 10 cm wynosiło 1,13. Zwiększenie czynnika WHR o 0,1 powodowało wzrost RR do 1,24.

Czynnikiem wpływającym na prawdopodobieństwo wystąpienia raka trzustki jest również cukrzyca. Nowozdiagnozowana cukrzyca może być objawem tego nowotworu szczególnie u osób szczupłych, w średnim wieku i bez przypadków cukrzycy w rodzinnej historii choroby. Jednakże bezwzględne ryzyko w takich przypadkach jest niewielkie ponieważ u zaledwie 0,5% spośród nowozdiagnozowanych diabetyków obserwuje się wystąpienie raka trzustki w okresie 6-letnim<sup>10</sup>.

U pacjentów z długoletnią cukrzycą obserwuje się dwukrotne zwiększenie ryzyka wystąpienia raka trzustki. Stosowane w terapii leki mogą wpływać na prawdopodobieństwo wystąpienia tego nowotworu. W przypadku stosowania insuliny zaobserwowano zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworu, natomiast zastosowanie

metforminy jako środka hipoglikemicznego powoduje jego zmniejszenie. Wbrew pierwotnym doniesieniom metformina nie ma jednak wpływu na przeżycie u pacjentów z rakiem trzustki<sup>11</sup>. Współistnienie cukrzycy, zarówno długotrwałej jak i nowowykrytej, przyczynia się do zmniejszenia okresu przeżycia u pacjentów z PDAC, u których przeprowadzono resekcję<sup>12</sup>.

Zapalenie trzustki również może przyczyniać się do zwiększonego ryzyka wystąpienia nowotworu trzustki. Przeprowadzona analiza wykazała, że większe prawdopodobieństwo zachorowania na raka trzustki dotyczy zarówno przewlekłego zapalenia trzustki (RR= 13,3) jak i jego dziedzicznej formy (RR=69,0). Wykluczenie przypadków przewlekłego zapalenia występujących do dwóch lat przed zdiagnozowaniem nowotworu powoduje zmniejszenie relatywnego ryzyka do 5,8<sup>13</sup>. W przypadku dziedzicznego zapalenia wykazano, że szczególnie zagrożone są osoby, u których choroba występowała u ojca chorego – w takim przypadku ryzyko zachorowania było wyższe<sup>14</sup>.

Wśród chorób uwarunkowanych genetycznie sprzyjających rozwojowi nowotworu trzustki głównie wymienia się także Zespół Peutza-Jeghersa oraz mukowiscydozę.

Zespół Peutza-Jeghersa jest genetycznie uwarunkowany zespołem charakteryzujący się występowaniem plam soczewicowatych oraz obecnością polipów hamartomatycznych w przewodzie pokarmowym. Wykazano, że u osób z tym zespołem występuje 76-krotny wzrost ryzyka zachorowania w porównaniu do populacji ogólnej<sup>15</sup>.

Mukowiscydoza powoduje zaburzenia wydzielania przez gruczoły zewnątrzwydzielnicze, w tym także trzustkę, i może wywoływać stan zapalny trzustki, a w konsekwencji uszkodzenie tego narządu. Badania wykazały 5-krotny wzrost ryzyka

wystąpienia raka trzustki u chorych z tym schorzeniem oraz znaczne obniżenie wieku zachorowania – średni wiek wynosił zaledwie 35 lat<sup>16</sup>.

Dyskusyjny pozostaje wpływ alkoholu na ryzyko wystąpienia raka trzustki. Istnieje natomiast wyraźny związek między spożyciem alkoholu a występowaniem zapalenia trzustki. Alkohol powoduje uszkodzenie komórek trzustki i prowadzi do stanów zapalnych wydawało się więc, że może się także przyczyniać do rozwoju nowotworu w tym narządzie<sup>17</sup>. Prowadzone badania wykazały jednak, że przeciętne spożycie alkoholu nie zwiększa ryzyka wystąpienia raka trzustki. Prawdopodobieństwo to zwiększa się u osób nadużywających alkoholu. Jest ono szczególnie widoczne u osób spożywających więcej niż 40g alkoholu na dobę<sup>18</sup>.

### **2.3. Gruczolakorak trzustki**

#### **2.3.1. Cechy makroskopowe**

Gruczolakorak trzustki występuje w postaci guzów litych o zabarwieniu żółtawym. 2/3 guzów tworzy się w obrębie głowy trzustki. Ich rozmiar wynosi przeciętnie 1,5-5 cm i może być większy w przypadku guzów trzonu i ogona trzustki.

Nowotwór głowy trzustki może naciekać przewód żółciowy wspólny oraz główny przewód trzustkowy, którego niedrożność prowadzi do włóknistego zaniku mięszu trzustki. W dalszych stadiach nowotwór głowy trzustki może zajmować brodawkę Vatera, ścianę dwunastnicy, a także wnikać w tkankę tłuszczową zaotrzewnową i znajdujące się tam nerwy i naczynia krwionośne. W najbardziej zaawansowanych przypadkach nowotwór rozprzestrzenia się do otrzewnej oraz innych narządów<sup>19</sup>.

### 2.3.2. Diagnostyka i ocena stanu zaawansowania raka trzustki

Nie ma powszechnie dostępnej wczesnej diagnostyki raka trzustki, zwykle nowotwór ten jest diagnozowany w zaawansowanym stadium rozwoju.

Standardowo do diagnozowania raka trzustki stosuje się wielorzędową tomografię komputerową TK, według protokołu trzustkowego. Na podstawie tego badania można określić stopień rozwoju i resekcyjność nowotworu. Metodami uzupełniającymi są USG, PET często w połączeniu z TK, endoskopowa ultrasonografia EUS oraz pankreatocholangiografia wsteczna<sup>20</sup>.

Spośród molekularnych markerów za najbardziej skuteczny w przypadku raka trzustki uznawany jest antygen nowotworowy CA19-9. Meta-analizy wykazały że przy poziomie wyższym niż 37U/ml jego średnia czułość wynosi 77% a specyficzność 87%. Parametry te w przypadku CA19-9 są jednak zależne od rozmiaru guza. W przypadku zmian poniżej 3 cm średnicy czułość tego markera wynosi tylko 55%. Problemem jest również fakt, że podniesiony poziom CA19-9 występuje także u 40% pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki<sup>21,22</sup> oraz w przypadku nowotworu jelita grubego, przelyku lub raka wątrobowokomórkowego.

Oceny stopnia zaawansowania raka trzustki dokonuje się według klasyfikacji TNM (tumor, nodus, metastases) opracowanej przez Union International for Cancer Research (UICC) we współpracy z American Joint Committee on Cancer (AJCC). Opiera się on na ocenie anatomicznej zaawansowania nowotworu. Ocenie podlega guz pierwotny T (od T0 do T4), przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych N (N0-N1) oraz przerzuty odległe M (M0-M1).

System ten był w ostatnich latach uaktualniany – brano pod uwagę postęp w metodach obrazowania nowotworu oraz praktyczność klinicznego zastosowania klasyfikacji. W przypadku raka trzustki szczególnie dyskutowaną kwestią był podział

ze względu na resekcyjność guzów, ponieważ leczenie chirurgiczne ma w tym przypadku kluczowe znaczenie. W związku z tym wprowadzone zmiany dotyczyły przede wszystkim cechy T, określającej rozmiar i zakres rozprzestrzenienia się guza<sup>23</sup>. Biorąc pod uwagę cechy T,N,M ustala się stopień zaawansowania nowotworu (Tabela 1).

Stopień	Cecha T	Cecha N	Cecha M
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T2	N0	M0
<b>IIA</b>	T3	N0	M0
<b>IIB</b>	T1–3	N1	M0
<b>III</b>	T4	Każde N	M0
<b>IV</b>	Każde T	Każde N	M1

Tabela 1. Stopień zaawansowania nowotworu wg klasyfikacji TNM

Kolejne stopnie zaawansowania określa się jako:

- Operacyjne I i II
- Guzy granicznie resekcyjne III
- Nieoperacyjne IV

W przypadku guzów operacyjnych ocenia się również stopień histologicznej dojrzałości G, na podstawie którego dokonuje się podziału guzów na trzy grupy — o niskiej, średniej i wysokiej złośliwości. Stopień G1 o najmniejszej złośliwości charakteryzuje się dobrym zróżnicowaniem histologicznym (morfologicznie przypomina dojrzałą tkankę), G2 umiarkowanym zróżnicowaniem, a stopień G3 o największej złośliwości charakteryzuje się najslabszym zróżnicowaniem komórek. W ocenie uwzględnia się zróżnicowanie ognisk nowotworowych, produkcję mucyny, liczbę mitoz oraz wygląd jąder komórkowych (Tabela 2).

Stopień zróżnicowania guza	Zróżnicowanie ogniska nowotworowego	Produkcja mucyny	Liczba mitoz (na 10 HPF)	Cechy jądra komórkowego
<b>G1</b>	Dobre zróżnicowanie	Intensywna	5	Mały polimorfizm, polarne ułożenie
<b>G2</b>	Umiarkowane zróżnicowanie, struktury cylindryczne	Nieregularna	6-10	Umiarkowany polimorfizm
<b>G3</b>	Słabe zróżnicowanie, pleomorficzne struktury	Zatrzymana	>10	Znaczny polimorfizm, powiększony rozmiar

Tabela 2. Ocena dojrzałości nowotworu wg klasyfikacji Klöppel'a przyjętej przez WHO (HPF- high power field)

### 2.3.3. Leczenie raka trzustki

Pomimo wzrastającego zrozumienia biologii raka trzustki nie udało się do tej pory opracować skutecznego leczenia. Jedynym sposobem dającym nadzieję na 5-letnie przeżycie jest leczenie chirurgiczne – całkowita lub częściowa pankreatektomia. Początkowo operacje również wiązały się z wysoką śmiertelnością ze względu na wielkość urazu i związaną z tym liczbą powikłań. Rozwój technik chirurgicznych jak i wprowadzenie mniej inwazyjnych metod operacji takich jak laparoscopia, znacznie zredukowały ryzyko komplikacji i zmniejszyły obciążenie pacjenta<sup>24</sup>. Jednak nawet wśród pacjentów z guzem usuniętym chirurgicznie 5-letnie przeżycie pozostaje na poziomie 15-20%, co wskazuje na potrzebę leczenia uzupełniającego – adjuwantowego. Zastosowanie chemioterapii z użyciem 5-fluorouracylu lub gemcytabiny zwiększało przeżycie chorego, a także czas w którym nie obserwowano nowotworu. Ostatecznie głównym chemioterapeutykiem stosowanym w raku trzustki została gemcytabina ze względu na mniejszą toksyczność w stosunku do 5-fluorouracylu. Próbowano uzyskać lepsze rezultaty terapii poprzez stosowanie razem z gemcytabiną terapeutyków



celowanych. Bevacizumab jest przeciwciałem skierowanym przeciwko VEGF, uniemożliwiającym jego wiązanie z receptorem. W wielu nowotworach, jak np. w nowotworze jelita grubego, jego stosowanie przynosiło poprawę wyników leczenia<sup>25</sup>. W przypadku raka trzustki, pomimo dobrze rokujących pierwszych faz badań klinicznych leku, dalsze próby wykazały brak poprawy wyników leczenia w stosunku do leczenia gemcytabiną<sup>24,26,27</sup>. Lepsze rezultaty uzyskano stosując Erlotinib, inhibitor skierowany przeciwko EGFR. Zastosowanie tego leku razem z gemcytabiną pozwoliło przedłużyć średnie przeżycie, jednak tylko o 0,4 miesiąca<sup>28</sup>. Zwrócono również uwagę na stabilizację choroby i zwiększenie okresu wolnego od progresji. W niektórych badaniach zaobserwowano zwiększenie przeżycia o 1,5 miesiąca oraz zwiększenie rocznego przeżycia z 18% do 37,2%<sup>29</sup>.

Agresywny charakter raka trzustki i częsta obecność mikroprzerzutów skłaniają do stosowania leczenia neoadjuwantowego – stosowanego przed leczeniem chirurgicznym. Pacjenci otrzymujący ten typ leczenia mają wyższy odsetek resekcji R0, i co się z tym wiąże mniejsze prawdopodobieństwo miejscowej wznowy i dłuższe okresy całkowitego przeżycia. Stosowanie tej terapii pozwala również ocenić charakter przebiegu choroby – w przypadkach, kiedy choroba się nasila pomimo stosowanego leczenia, pacjenci nie są poddawani operacji. Leczenie neoadjuwantowe umożliwia terapię pacjentów z guzami typu „borderline”. Uznaje się, że u chorych z tej grupy powinno się zastosować najpierw chemio- i radioterapię, następnie po ocenie wyników tomografii komputerowej zdecydować o ewentualnej operacji<sup>30</sup>. W prezentowanych wynikach badań klinicznych u chorych poddanych takiemu leczeniu średnie przeżycie wynosi 40 miesięcy<sup>31</sup>.

Szczególnym wyzwaniem terapeutycznym jest leczenie raka trzustki w przypadku guzów nieoperacyjnych. Prognozy dla pacjentów w takiej sytuacji są szczególnie złe – średni okres przeżycia wynosi 3-8 miesięcy. W poszukiwaniu skutecznego rozwiązania testuje

się kombinacje dostępnych leków. Takie podejście przynosi pozytywne efekty – zastosowanie czteroskładnikowej terapii FOLFIRINOX (5-fluorouracyl, leukoworyna, oxaliplatyna, irinotekan) pozwala na wydłużenie czasu przeżycia u osób z zaawansowanym rakiem trzustki o 6 miesięcy. Zestawienie kilku silnych cytostatyków skutkuje jednak także znacznie zwiększoną toksycznością i ze względu na ten fakt terapia może być stosowana u pacjentów w dobrym stanie ogólnym<sup>32</sup>.

Nowym podejściem do leczenia raka trzustki jest także stosowanie nowych form leków, aby pokonać bariery związane z dostarczaniem leku. Nab-paclitaxel stanowi nową formę wcześniej stosowanego leku. W preparacie tym wykorzystuje się mechanizm w jaki albuminy przenikają do naczyń krwionośnych i wiązania z białkiem SPARC, umożliwiającym akumulację we wnętrzu guza<sup>33</sup>. Zastosowanie nab-paclitaxelu razem z gemcytabiną zwiększyło przeżycie z 6,7 do 8,5 miesięcy, wydłużony był również okres wolny od nawrotu choroby. Wykazano, że zastosowanie nab-paclitaxelu zwiększa również efektywność dostarczania gemcytabiny do wnętrza guza<sup>34</sup>.

Lepsze poznanie biologii raka trzustki oraz większa dostępność metod genetycznych jak i proteomicznych daje także szansę na zastosowanie spersonalizowanego leczenia. Próby takiej terapii podjęto w przypadku raka piersi i otrzymane rezultaty wskazują, że jest to właściwe podejście w sposobie leczenia nowotworów<sup>35</sup>.

## 2.4. Biologia guzów trzustki

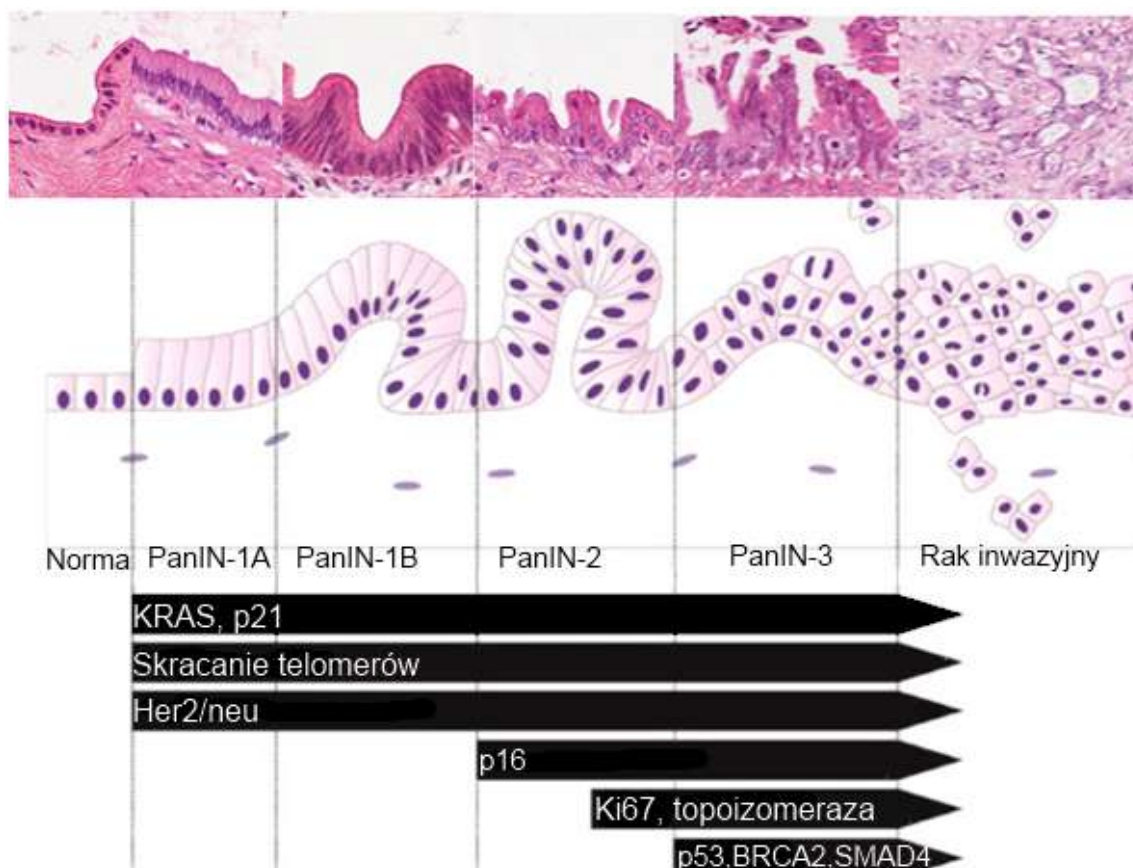
### 2.4.1. Kancerogeneza

Gruzołowy rak trzustki wywodzi się z nabłonka przewodów trzustkowych. Podobnie jak w innych nowotworach proponowany jest model zmian zachodzących stopniowo poprzez kolejne stadia neoplazji wewnątrz nabłonkowej PanIN i prowadzących do stadium inwazyjnego raka. Przemianom tym towarzyszą aktywacja onkogenów i mutacje genów supresorowych<sup>36</sup> (Ryc.2).

Aktywacji podlegają onkogeny: *KRAS*, *AKT2* oraz *EGFR*. Stała aktywacja *KRAS* jest najwcześniej obserwowaną zmianą i występuje już na pierwszym etapie rozwoju neoplazji wewnątrz nabłonkowej, a później w 90% inwazyjnych postaci gruczolakoraka trzustki<sup>37</sup>. Konstytutywna aktywacja *KRAS* skutkuje stymulacją ścieżek sygnałowych odpowiadających za kluczowe procesy umożliwiające rozwój i dalszą inwazję nowotworu<sup>38</sup>.

Mutacje pozostałych onkogenów występują w raku trzustki rzadziej, wzmacniają jednak efektywność aktywacji *KRAS*<sup>39</sup>. Amplifikacja *AKT2* jest wykrywana jedynie w mniej niż 5% przypadków, chociaż aktywację ścieżki sygnałowej Akt stwierdza się w 30-60% raków trzustki<sup>40</sup>. *EGFR* podlega amplifikacji czego efektem jest zwiększona aktywność ścieżki sygnałowej aktywowanej przez ten receptor<sup>41</sup>.

Spośród mutacji genów supresorowych najczęstsza dotyczy genu *CDKN2A/p16*. W ponad 90% przypadków jest on inaktywowany poprzez homozygotyczną delecję, mutację wewnątrzgenową związaną z utratą drugiego allelu lub epigenetycznie przez hipermetylację promotora genu<sup>42,43</sup>. Zmiany te pojawiają się już na etapie PanIN-1 a ich częstość zwiększa się wraz z postępem zmian neoplastycznych<sup>44,45</sup>.



Ryc. 2. Schemat zmian fenotypowych w nabłonku przewodów trzustkowych i towarzyszące im zmiany genetyczne. (Ilustracja na podstawie D.M. Simeone, A. Maitra (eds.), *Molecular Genetics of Pancreatic Cancer* 2013)

Mutacja powodująca utratę aktywności genu *DPC4/SMAD4/MADH4* występuje w ok. 55% przypadków raka trzustki i jest charakterystyczna dla tego rodzaju nowotworu<sup>46</sup>. Mutacja ta pojawia się dopiero w niektórych zmianach na etapie PanIN-3<sup>47</sup>.

Gen *TP53* zostaje inaktywowany przez utratę drugiego allelu w 50-75% raków trzustki<sup>48</sup>. Utrata funkcji przez ten gen występuje jednak dopiero w ostatnim stadium neoplazji wewnątrz nabłonkowej i umożliwia progresję do inwazyjnej postaci nowotworu<sup>49</sup>.

Są to zmiany stanowiące podstawę rozwoju raka trzustki, natomiast udowodniono, że u jednego pacjenta z rakiem trzustki może występować od 1 do 116 aktywnych (non silent) mutacji. Ogółem zidentyfikowano ponad 2000 mutacji, które świadczą o dużej molekularnej różnorodności nowotworu trzustki<sup>50</sup>.



Specyficzne mikrośrodowisko komórek raka trzustki w guzie składa się z obfitej tkanki włóknistej zawierającej białka macierzy zewnątrzkomórkowej, naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz komórek odpowiedzi zapalnej<sup>55</sup>. Wszystkie komórki znajdujące się w obrębie guza stanowią źródło szeregu czynników wzrostu: FGF, EGF, PDGF, HGF $\alpha$ , IGF i ich receptorów. FGF i PDGF może przyczyniać się do wzmocnienia reakcji desmoplazji w guzach trzustki. EGF i IGF1 *in vitro* zwiększają proliferację<sup>56</sup> komórek nowotworowych, a HGF $\alpha$  i jego receptor c-Met regulują ich inwazyjność i ruchliwość<sup>57,58</sup>. Co więcej każdy z tych czynników może indukować proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT), procesu ułatwiającego odrywanie się komórek nowotworowych i tworzenie przerzutów<sup>59</sup>.

Naciekające komórki odpowiedzi immunologicznej są również bogatym źródłem czynników stymulujących rozwój nowotworu, inwazyjność i tworzenie przerzutów. Szczególną rolę przypisuje się makrofagom, ich rola w mikrośrodowisku nowotworowym została szeroko opisana<sup>60</sup>. Makrofagi stanowią źródło czynników wzrostu, takich jak EGF, PDGF- $\beta\beta$ , HGF $\alpha$ , TGF  $\beta$ , które stymulują proliferację komórek. Co więcej produkują one również metaloproteinazę 9 biorącą udział w wielu kluczowych procesach takich jak angiogeneza<sup>61</sup>.

Rozróżniono dwa główne typy makrofagów, M1 i M2 różniące się drogą aktywacji. Aktywacja M1 jest wiązana z odpowiedzią skierowaną przeciwko guzowi. Ten typ makrofagów jest aktywowany przez ligandy receptorów TLR i jest źródłem prozapalnych cytokin i tlenku azotu. Makrofagi M2 mają wpływ immunosupresyjny i mogą również brać udział w procesie gojenia ran. Ich aktywacja jest stymulowana przez IL-4 i IL-13<sup>62</sup>. Są one źródłem angiogennych czynników jak VEGF, ANG1 i ANG2 oraz proteaz: aktywatora plazminogenu uPA i metaloproteinaz . W ten sposób przyczyniają

się do angiogenezy i uwalniania komórek nowotworowych co prowadzi do progresji nowotworu i tworzenia przerzutów<sup>63</sup>.

Ostatnio również rola neutrofilów w mikrośrodowisku guza była przedmiotem badań<sup>64</sup>. Również w tym przypadku stwierdzono, że pod wpływem mikrośrodowiska neutrofile mogą uzyskiwać fenotyp sprzyjający rozwojowi guza. Analogicznie do klasyfikacji makrofagów opisano fenotypy N1 i N2 neutrofilów. Nabycie cech szkodliwego fenotypu jest stymulowane przez TGF- $\beta$ , a jego zahamowanie powoduje re-polaryzację do fenotypu N1<sup>65</sup>. Co więcej stwierdzono, że elastaza neutrofilowa również ma udział w promowaniu rozwoju guza. W przypadku raka piersi i płuc wysoki poziom elastazy został powiązany z gorszym rokowaniem<sup>66</sup>.

Ważną rolę w mikrośrodowisku guzów nowotworowych pełnią enzymy proteolityczne, które mogą przebudowywać podścielisko guza, biorą również udział w aktywacji wielu białek i w ten sposób uczestniczą w regulacji proliferacji i apoptozy komórek. Należą do nich metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej MMP stanowiące grupę 20 proteaz, wśród których wyróżnia się 4 klasy: kolagenazy, żelatynazy, stromeolizyny i MMP związane z błoną komórkową. Biorą one udział w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej przez co są istotnym elementem takich procesów jak angiogeneza, migracja komórek i tworzenie się przerzutów<sup>67</sup>.

Metaloproteinazy 2 i 9 zaliczające się do grupy żelatynaz są szczególnie istotne, ponieważ ich substratem jest kolagen IV wchodzący w skład błony podstawnej. Jego degradacja umożliwia i ułatwia migrację komórek nowotworowych. Podwyższoną ekspresję tych MMP stwierdzono w wielu nowotworach<sup>68</sup>. W raku piersi podwyższony poziom MMP9 był widoczny w guzach zaawansowanych, z odległymi przerzutami. Stwierdzono również podwyższoną ekspresję MMP2, ale brak było wyraźnej korelacji

z czynnikami prognostycznymi<sup>69</sup>. Również w nowotworze przelyku stwierdzono, że metaloproteinazy 2 i 9 odgrywają istotną rolę w inwazyjności<sup>70</sup>. W przypadku raka trzustki również zaobserwowano zwiększoną ekspresję metaloproteinaz. W badaniu przeprowadzonym na 6 liniach komórkowych wykazano, że zwiększona ekspresja i aktywność MMP2 są związane z większym potencjałem inwazyjnym komórek raka trzustki<sup>71</sup>. Również w badaniu przeprowadzonym na guzach trzustki potwierdzono zwiększoną ekspresję MMP2 i MMP9 zarówno na poziomie mRNA jak i białek<sup>72</sup>.

Ważnym elementem jest unaczynienie guza nowotworowego i związane z tym angiogeneza i limfangiogeneza. Odpowiedzialne za te procesy są przede wszystkim czynniki wzrostu z rodziny VEGF. Czynniki VEGF A i jego receptor VEGFR2 jest odpowiedzialny za tworzenie naczyń krwionośnych, natomiast VEGF C i jego receptor VEGFR3/Flt4 pełnią kluczową rolę w procesie limfangiogenezy. Naczynia pozwalają na dostarczenie substancji niezbędnych do rozwoju guza, ale stanowią również drogę rozsiewu nowotworowego. Odkrycie markerów komórek śródbłonna limfatycznego Lyve-1, Prox-1 i podoplaniny pozwoliły na ocenę procesu limfangiogenezy w guzach nowotworowych. Dyskusyjna pozostaje rola naczyń limfatycznych i limfangiogenezy w tworzeniu przerzutów. W przypadku niektórych nowotworów, jak nowotwór żołądka oraz czerniak, istnieje wyraźna zależność między występowaniem naczyń limfatycznych w guzie i przerzutów do węzłów chłonnych<sup>73,74</sup>, jednak w przypadku gruczolaka trzustki nie jest to jednoznaczne.



### **3. Cel pracy**

Celem pracy jest ocena następujących elementów mikrośrodowiska raka trzustki:

- poziomu wytwarzania czynników wzrostu
- komórek nacieku zapalnego
- lokalnej aktywności metaloproteinaz 2 i 9
- limfangiogenezy

oraz określenie zależności kliniczno-patologicznego stopnia zaawansowania nowotworu od ocenianych czynników

## 4. Materiał i metody

### 4.1. Pobieranie materiału od chorych

Próbki tkanek zostały pobrane od 36 pacjentów poddanych resekcji trzustki metodą Whipple'a ze względu na zdiagnozowany nowotwór trzustki. Byli to chorzy obojga płci z rozpoznaniem za pomocą ultrasonografii, kontrastowej tomografii komputerowej i/lub obrazowania w rezonansie magnetycznym rakiem nieendokrynnym trzustki. Chorzy nie byli wcześniej objęci chemio- i radioterapią. Protokół pobierania tkanek był zatwierdzony przez komisję bioetyczną CSK MSWiA (nr 25/2007).

Grupa chorych składała się z 14 kobiet i 22 mężczyzn, średni wiek wynosił 66 lat (przedział wiekowy 48-85 lat).

Ocena histopatologiczna guzów została przeprowadzona w Zakładzie Patomorfologii CSK MSWiA w Warszawie, stanowiąc podstawę podziału na następujące grupy (Tabela 3):

T (guz pierwotny)		M (przerzuty odległe)	
<b>T1</b>	3	<b>M0</b>	33
<b>T2</b>	6	<b>M1</b>	3
<b>T3</b>	25	<b>Ocena histologicznego stopnia różnicowania</b>	
<b>T4</b>	2		
<b>N (okoliczne węzły chłonne)</b>		<b>G1</b>	4
<b>N0</b>	13	<b>G2</b>	16
<b>N1</b>	23	<b>G3</b>	16

Tabela 3. Ocena histopatologiczna badanych guzów trzustki wg. Klasyfikacji TNM.

#### **4.1.1. Utrwalanie materiału do badań**

Do badań zostały wykorzystane tkanki pobrane z ogniska pierwotnego raka trzustki. W celu izolacji białek fragmenty guzów były umieszczane w sterylnych probówkach Eppendorf i przechowywane w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do momentu użycia. Wycinki o wymiarach  $5 \times 5 \times 5 \text{ mm}$  były zamrażane przez 45 sek. w acetonie z suchym lodem do temperatury  $-70^{\circ}\text{C}$ , a następnie przechowywane w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Preparaty do dalszych badań były krojone na skrawki grubości  $5 \mu\text{m}$  w kriostacie ( Leica CM1850 UV, Nussloch, Niemcy ).

#### **4.2. Ocena histologiczna tkanek**

##### **4.2.1. Barwienie hematoksylina-eozyna.**

Skrawki umieszczano na szkiełkach podstawowych i nawadniano w szeregu malejących stężeń alkoholu etylowego (100% - 10 min., 96% - 5 min., 70% - 5 min.), płukano w  $\text{H}_2\text{O}$  destylowanej przez 5 min następnie barwiono hematoksyliną (5-7 minut) i eozyną (10 minut). Następnie preparaty odwadniano w szeregu rosnących stężeń alkoholu etylowego ( 70%, 96% 2x3min, 100% 2x3min). Preparaty suszono i zatapiano w Leica CV Mount.

##### **4.2.2. Barwienie trójbarwne azan.**

Skrawki umieszczano na szkiełkach podstawowych i nawadniano w szeregu malejących stężeń alkoholu etylowego (100% - 10 min., 96% - 5 min., 70% - 5 min.), płukano w  $\text{H}_2\text{O}$  destylowanej przez 5 min. Następnie preparaty umieszczano w alkoholu anilinowym ( 0,1% aniliny w 90% alkoholu etylowym). Po kilkakrotnym przepłukaniu 70% alkoholem etylowym preparaty barwiono azokarminem przez 45 minut

w temperaturze 56-60°C. Po zakończeniu barwienia preparaty przepłukano wodą destylowaną, alkoholem anilinowym i alkoholem z kwasem octowym. Następnie na skrawki nakropiono 5% kwas fosfowolframowy i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu inkubacji preparaty przepłukano wodą destylowaną i poddano barwieniu oranżem w anilinie przez 30 minut. Procedurę zakończono odwadnianiem w szeregu rosnących stężeń alkoholu etylowego ( 70%, 96% 2x3min, 100% 2x3min). Preparaty suszono i zatapiano w Leica CV Mount.

#### **4.2.3. Barwienie immunohistochemiczne**

Do barwień z użyciem przeciwciał mysich i króliczych użyto zestawu The Dako REAL™ EnVision™ Detection System (Dako, Glostrup, Denmark). Skrawki na szkiełkach utrwalano przez 10 min w acetonie, a następnie inkubowano przez 5 min z blokerem Dual Endogenous Enzyme Block, powodującego hamowanie endogennej peroksydazy, enzymów o typie peroksydazy oraz fosfatazy alkalicznej. Po przepłukaniu skrawków roztworem TRIS pH=7,6 przeprowadzano inkubację z odpowiednim przeciwciałem przez 25 min. Kolejnym etapem była reakcja z odczynnikiem Dako REAL™ EnVision™/HRP zawierającym dekstran skoniugowany z peroksydazą i wtórnymi przeciwciałami kozimi przeciwko immunoglobulinom króliczym i mysim przez 25 min w temperaturze pokojowej po której następowała reakcja z chromogenem (tetrachlorowodorek 3,3'-diaminobenzyny w rozpuszczalniku organicznym) Dako REAL™ DAB+ Chromogen przez 3 min. Preparaty dobarwiano w hematoksylinie i zatapiano w Leica CV Mount.

#### 4.2.4. Półilościowa ocena barwienia immunohistochemicznego

Do oceny półilościowej wybierano 5 pól po obserwacji całego preparatu pod powiększeniem 40x. Pola te analizowano pod powiększeniem 200x – obliczano całkowite pole zabarwionego obszaru używając oprogramowania MicroImage (Olympus, Japan). Na tej podstawie wyznaczano średni poziom ekspresji badanego czynnika w preparacie.

#### 4.3. Ocena ekspresji czynników wzrostu w tkance guza trzustki.

Ekspresję czynników wzrostu w tkance guza trzustki badano stosując metodę immunohistochemiczną. Do barwień z użyciem przeciwciał mysich i króliczych użyto zestawu The Dako REAL™ EnVision™ Detection System. Postępowano według receptury podanej przez producenta stosując przeciwciała odpowiednie do oznaczanych czynników lub komórek. Lista przeciwciał jest przedstawiona w tabeli 4.

Przeciwciało	Stężenie	Rodzaj przeciwciała
EGF (Z-19)	1:30	królicze antyludzkie
EGFR (EGF-R2)	1:30	mysie antyludzkie
FGF2 (H-131)	1:100	królicze antyludzkie
FGF7 (H-73)	1:50	królicze antyludzkie
IGF1 (H-70)	1:50	królicze antyludzkie
IGF1R $\beta$ (C-20)	1:50	królicze antyludzkie
HGF $\alpha$ (H-145)	1:75	królicze antyludzkie
c-Met (C-12)	1:75	królicze antyludzkie
PDGF B (N-30)	1:25	królicze antyludzkie

Tabela 4. Przeciwciała użyte do oznaczenia czynników wzrostu i ich receptorów.

#### 4.4. Ocena nacieków komórek odpowiedzi zapalnej w tkance guza trzustki.

Oceny nacieków komórek odpowiedzi zapalnej dokonano za pomocą immunohistochemii według podanego wcześniej protokołu. Przeciwciała wykorzystane do oznaczeń zostały zawarte w Tabeli 5.

Przeciwciało	Stężenie	Rodzaj przeciwciała	Znakowane komórki
CD3 (F7.2.38)	1:200	mysie antyludzkie	limfocyty T
CD68 (EBM11)	1:250	mysie antyludzkie	makrofagi
CD56 (123C3)	1:250	mysie antyludzkie	komórki NK
Elastaza (NP57)	1:350	mysie antyludzkie	neutrofile

*Tabela 5. Przeciwciała użyte do oznaczenia nacieków komórek odpowiedzi zapalnej w tkance guza trzustki.*

#### 4.5. Oznaczanie aktywności metaloproteinaz

##### 4.5.1. Izolacja białek

Białka były izolowane z tkanki guzów za pomocą zestawu Total Protein Extraction Kit (Milipore, Billerica, USA). 100mg tkanki guza rozdrabniano i umieszczano w 250µl buforu lizującego (HEPES (pH 7.9), MgCl<sub>2</sub>, KCl, EDTA, sukroza, glicerol, deoksycholan sodu, NP-40, ortowanad sodu) ) i inkubowano 5 min w temperaturze 0°C. Następnie tkanki poddawano homogenizacji mechanicznej w homogenizatorze Tissue Lyser (Qiagen). Po zakończonej homogenizacji otrzymane homogenaty wirowano w temperaturze 4°C przy prędkości 11000 obrotów przez 20 min. W ten sposób uzyskiwano supernatant, w którym stężenie białka było określane za pomocą metody Bradforda wykorzystując Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay (Bio-Rad Laboratoires, Hercules, USA). Roztwór białka był inkubowany z odczynnikiem zawierającym barwnik coomassie G-250, metanol oraz kwas

fosforowy przez 10 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie przeprowadzano pomiar z użyciem spektrofotometru Nano Drop. Stężenie białka było określane na podstawie wykonanej wcześniej krzywej wzorcowej.

#### **4.5.2. Zymografia żelowa**

10µg całkowitej mieszaniny wyizolowanych białek rozcieńczonych buforem Zymogram Sample Buffer (Bio-Rad Laboratoires, Hercules, USA) w stosunku 2:1 poddawano elektroforezie na 7,5% żelu poliakrylamidowym zawierającym 0,1% żelatyny (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Następnie żel przepłukiwano dwukrotnie po 30 min. 2.5% roztworem Triton X-100 w celu usunięcia SDS. Kolejnym etapem była inkubacja w buforze aktywującym (50 mM pH 7,5 TRIS, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2 M NaCl) przez 20 godz. w 37°C. Aktywność żelatynaz była uwidoczniana przez barwienie żelu 0,5% roztworem Commasie blue przez 1 godzinę i odbarwienie roztworem zawierającym 40% metanolu i 10% kwasu octowego. W celu oceny aktywności wybarwiony żel poddano archiwizacji i analizie przy użyciu MicroImage (Olympus, Japan).

#### **4.5.3. Zymografia *in situ***

Analizę przeprowadzono na skrawkach tkanek o grubości 5 µm. Po ich wysuszeniu skrawki poddano działaniu roztworu żelatyny skoniugowanej z barwnikiem fluorescencyjnym DQ™ Gelatin From Pig Skin, Fluorescein Conjugate (Invitrogen, Carlsbad, USA) w buforze aktywującym (50 mM pH 7,5 TRIS, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2 M NaCl). Po nawarstwieniu roztworu preparaty umieszczono w ciemnym pudełku na wilgotnej ligninie i inkubowano przez 2 godziny w 37°C. Po zakończeniu inkubacji preparaty zostały przepłukane roztworem PBS (3x5min).

#### **4.6. Ocena naczyń krwionośnych i limfatycznych w guzie raka trzustki.**

##### **4.6.1. Mikrolimfangiografia**

Analizę prowadzono na bazie procedur wcześniej wykorzystywanych w naszym zakładzie<sup>75</sup>. Fragment tkanki guza trzustki nastrzykiwano stopniowo, pod małym ciśnieniem 1 ml zawiesiny barwnika Paris Blue w chloroformie. Tak przygotowaną tkankę utrwalano w 5% formalinie przez 24 godziny. Kolejnym etapem było stopniowe odwadnianie po 24 godziny w roztworach alkoholu etylowego o kolejnych stężeniach: 60% 70%, 80%; następnie 48 godzin w roztworze 96% i 24 godziny w 100% alkoholu etylowym. Następnie odwodnioną tkankę umieszczano w salicylanie metylu. Po upływie 3 dni tkanka była cięta na skrawki i analizowana pod mikroskopem świetlnym przy powiększeniu 100x.

##### **4.6.2. Barwienie immunohistochemiczne**

Do identyfikacji antygenów na komórkach śródbłonna limfatycznego zastosowano przeciwciała skierowane przeciw antygenom człowieka: Prox 1, Lyve1, podoplaniny (RELIATech, Wolfenbüttel, Niemcy) VEGF C, VEGFR3 (flt4) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz). Aby odróżnić śródbłonki krwionośne od chłonnych zidentyfikowano również cząsteczki adhezyjne CD 31 oraz czynnik v.Willebrandta FVIII (Dako, Glostrup, Dania)(Tabela 6).



Przeciwciało	Stężenie	Rodzaj przeciwciała
Lyve1(102-PA50)	1:100	królicze antyludzkie
Prox1(102-PA30S)	1:100	królicze antyludzkie
Podoplanina (101-M40)	1:100	mysie antyludzkie
VEGF C (H-190)	1:100	królicze antyludzkie
VEGFR3(flt4) (C-20)	1:75	królicze antyludzkie
CD31(M0823)	1:350	mysie antyludzkie
FVIII (M0616)	1:500	mysie antyludzkie

*Tabela 6. Przeciwciała użyte do oceny naczyń krwionośnych i limfatycznych występujących w guzie raka trzustki.*

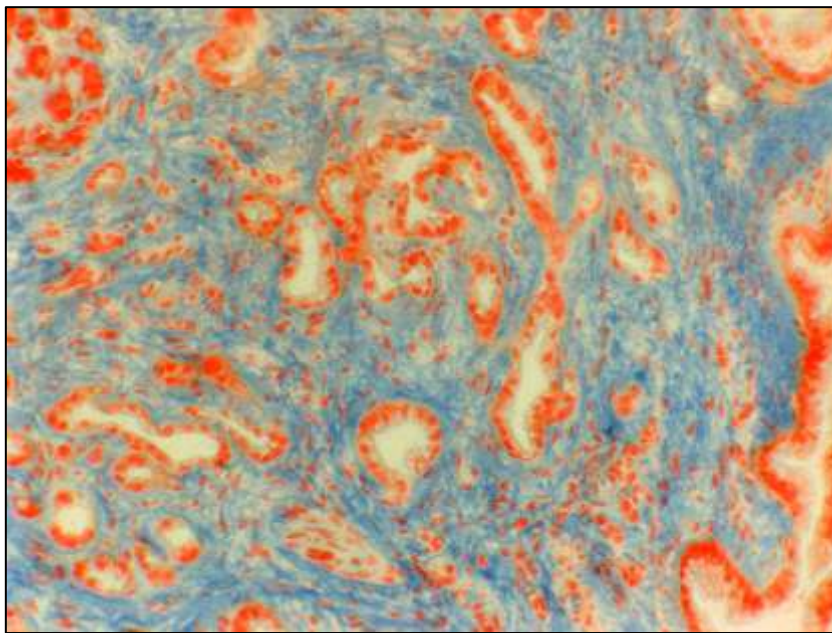
#### 4.7. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Wartości w grupach różniących się inwazyjnością N0 i N1 analizowano z użyciem testu U Manna-Whitneya. Grupy o różnym stopniu zróżnicowania porównano za pomocą testu Kruskal-Wallisa. Obliczenia wykonano w programie Statsoft Statistica v.9.0. Poziom istotności statystycznej został określony jako  $p < 0,05$ . Wyniki przedstawiano podając wartości średnie i odchylenia standardowe.

## 5. Wyniki

### 5.1. Ocena zebranego materiału

W badanych guzach widoczna była silna reakcja desmoplastyczna otaczająca ogniska nowotworowe. W preparatach barwionych metodą Azan można było zaobserwować, że otoczenie komórek nowotworowych zbudowane jest głównie z włókien kolagenowych (Ryc. 4).



*Ryc. 4. Tkanka guza trzustki – barwienie Azan, włókna kolagenowe – kolor niebieski, x100.*

W niektórych guzach oprócz ognisk nowotworowych można było również zaobserwować obecność ognisk neoplazji wewnątrz nabłonkowej (Ryc.5).



*Ryc. 5. Guz trzustki – barwienie HE, widoczne ognisko neoplazji wewnątrzprążkowej.*

W 28% guzów (n=10) stwierdzono naciekanie naczyń przez komórki nowotworowe. Częściej obserwowano naciekanie pni nerwowych – 70% przypadków (n=25). Wokół nacieczonych nerwów często występowały nacieki komórek mononuklearnych ( Ryc. 6).



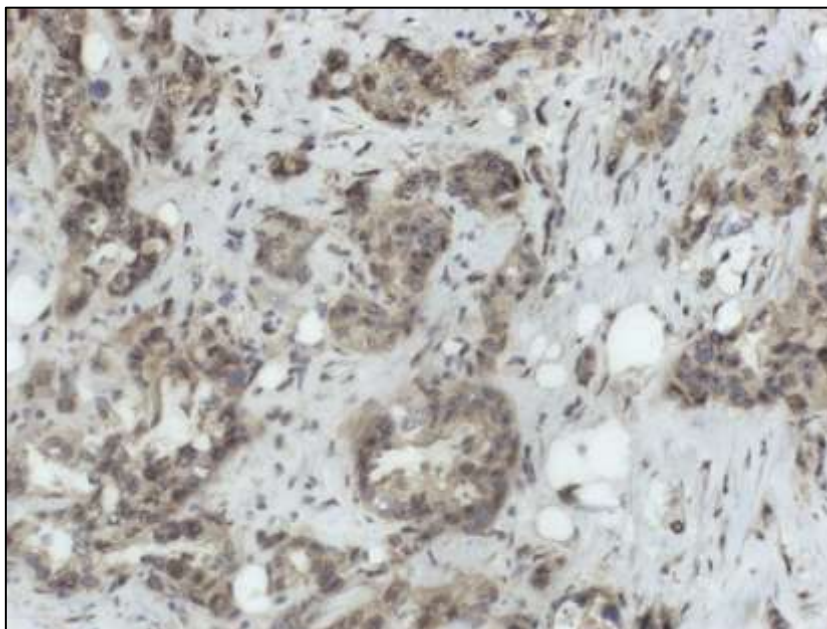
*Ryc. 6. Naciekanie pni nerwowych przez komórki nowotworowe w guzie trzustki.*

## **5.2. Ekspresja czynników wzrostu w guzie trzustki**

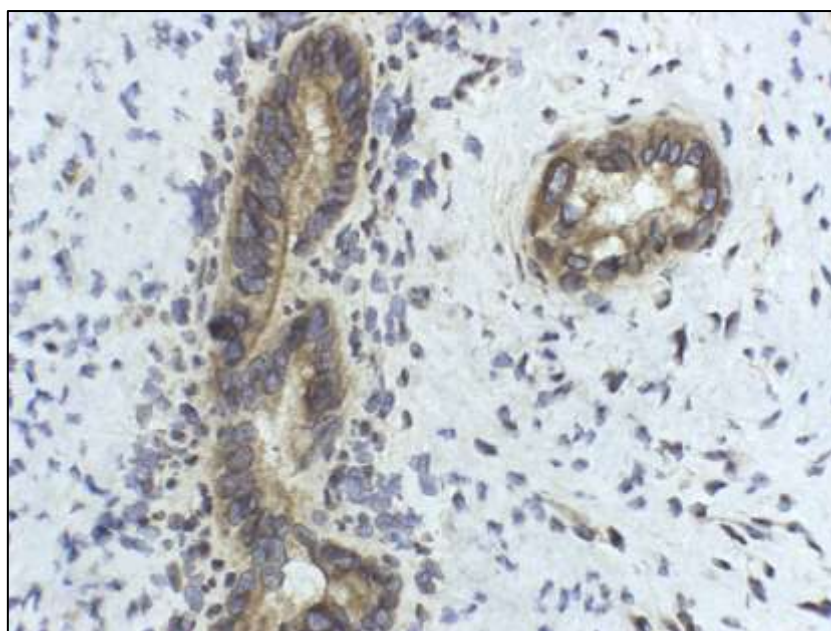
W celu stwierdzenia obecności czynników wzrostu tkanki z 36 guzów trzustki zostały zbadane immunohistochemicznie. Wykazano ekspresję czynników wzrostu we wszystkich badanych przypadkach. Czynniki wzrostu były wydzielane głównie przez komórki nowotworowe, ale także przez komórki podścieliska (IGF-IR $\beta$ ). Po ocenie ilościowej ekspresji czynników wzrostu, wartości zostały porównane ze względu na stopień zróżnicowania histologicznego G oraz występowanie przerzutów do węzłów chłonnych N.

### **5.2.1. EGF i EGFR**

Immunoreaktywność EGF była słaba do umiarkowanej w cytoplazmie komórek nowotworowych (Ryc. 7). Ekspresja EGFR była również obecna w cytoplazmie komórek nowotworowych: od umiarkowanej do silnej (Ryc. 8). Poza tym słabą ekspresję EGFR można było zaobserwować również w prawidłowych komórkach przewodów trzustkowych.



*Ryc. 7. Ekspresja EGF w guzie trzustki x200 (kolor jasnobrązowy).*

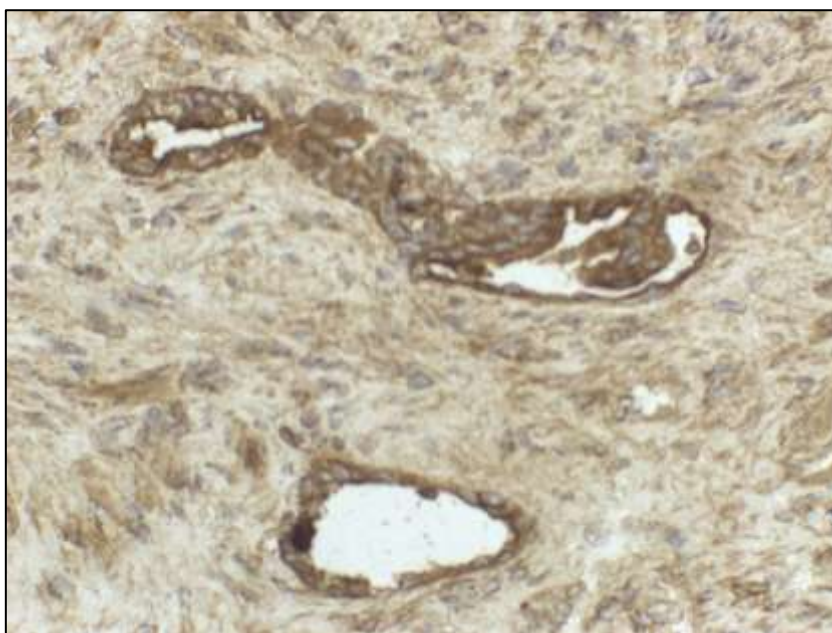


*Ryc. 8. Ekspresja EGFR w guzie trzustki x200 (kolor jasnobrązowy).*

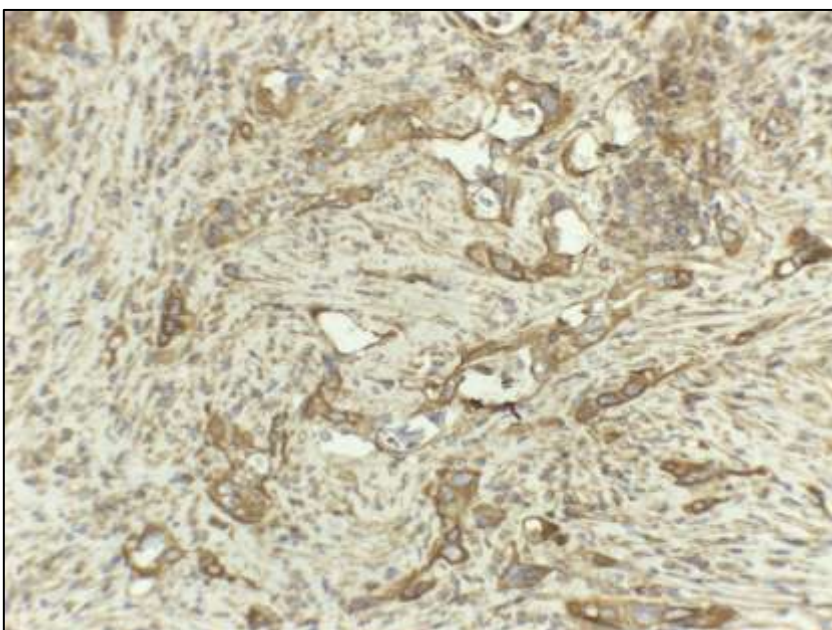


### 5.2.2. FGF2 i FGF7

Silna ekspresja FGF2 oraz FGF7 była obserwowana w cytoplazmie i błonie komórkowej komórek neoplastycznych. Również komórki podścieliska ekspresjonowały badane białka (Ryc. 9,10).



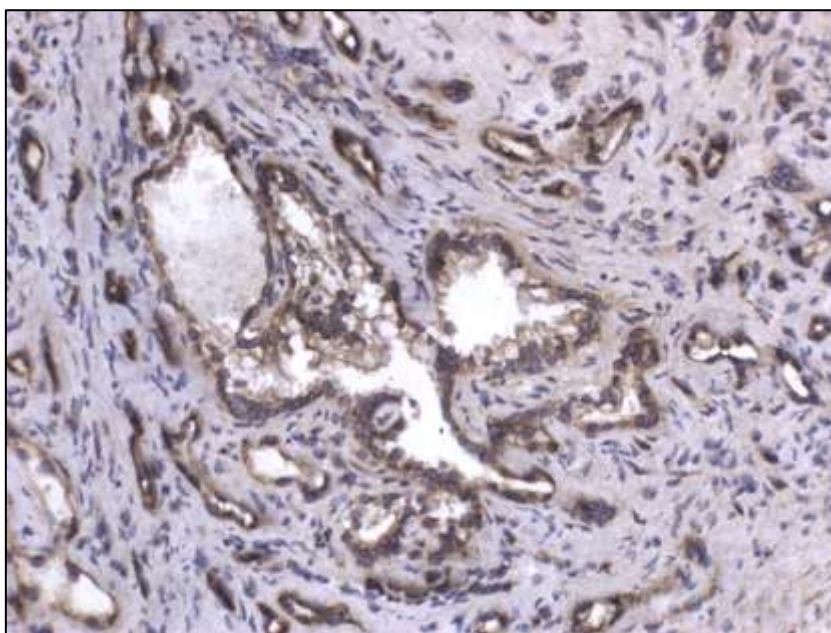
Ryc. 9. Ekspresja FGF2 w guzie trzustki x200(kolor brązowy).



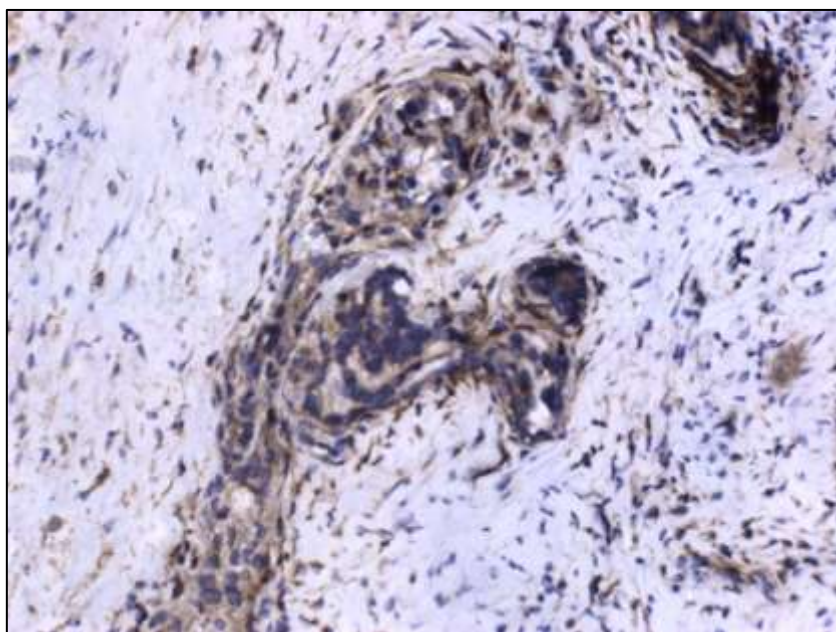
Ryc. 10. Ekspresja FGF7 w guzie trzustki x200(kolor brązowy).

### 5.2.3. IGF1 i IGF-IR

Cytoplazmatyczne barwienie dla IGF1 oraz IGF-IR $\beta$  było umiarkowane do silnego w komórkach raka. Pozytywna reakcja dla IGF-IR $\beta$  była obecna również w komórkach podścieliska (Ryc. 11,12).



Ryc. 11. Ekspresja IGF1 w guzie trzustki x200(kolor brązowy).

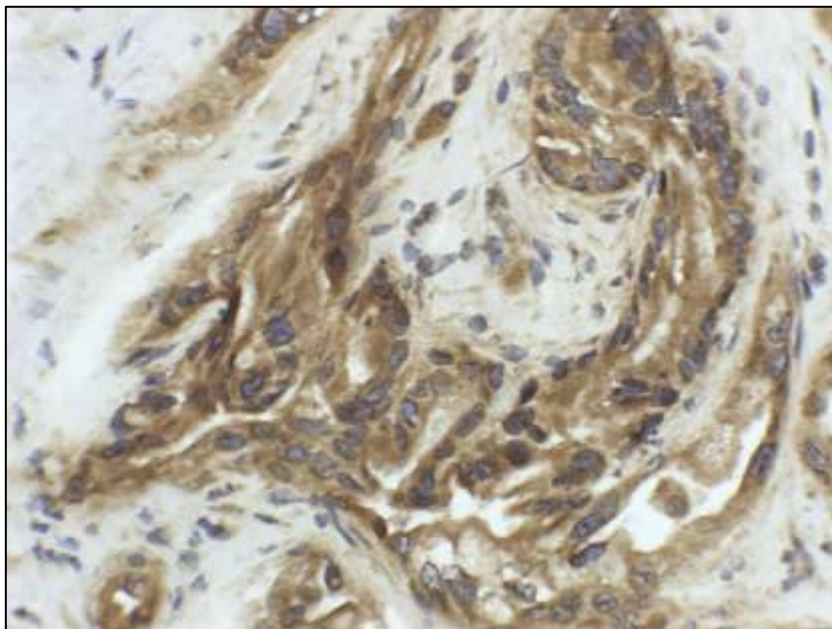


Ryc. 12. Ekspresja IGF-IR $\beta$  w guzie trzustki x200(kolor jasnobrązowy).

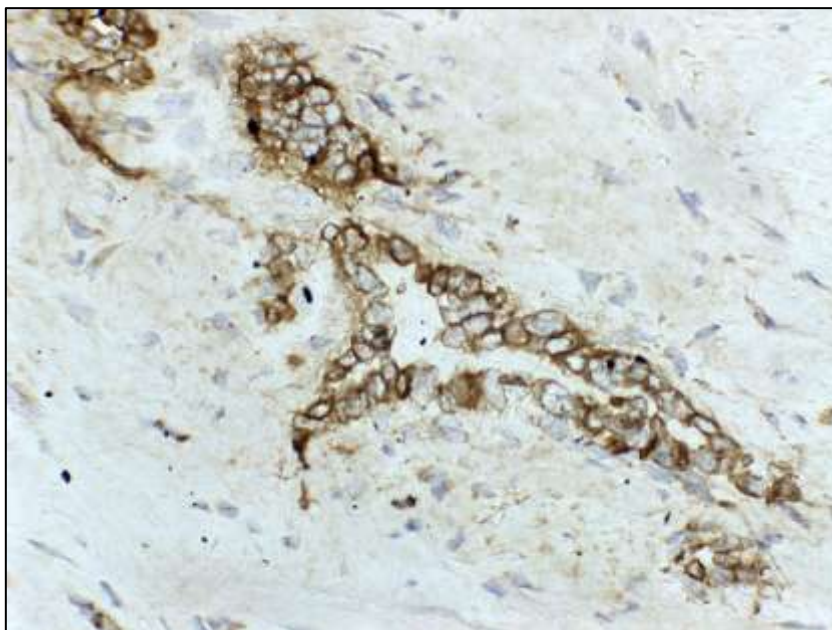


#### 5.2.4. HGF $\alpha$ i c-Met

Barwienie cytoplazmatyczne i błon w przypadku HGF $\alpha$  było silne w komórkach nowotworowych, podczas gdy dla c-Met było umiarkowane do silnego (Ryc. 13, 14).



*Ryc. 13. Ekspresja HGF $\alpha$  w guzie trzustki x200 (kolor brązowy).*

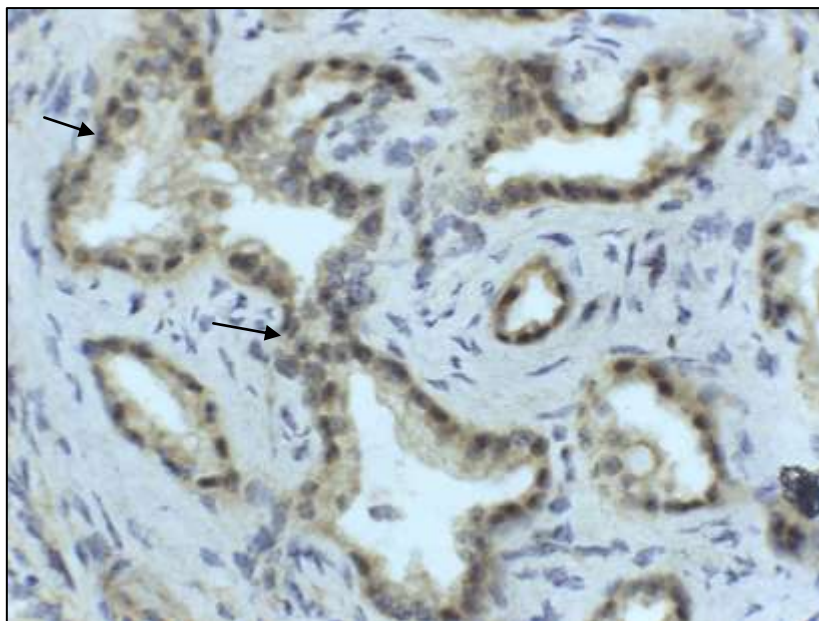


*Ryc. 14. Ekspresja c-Met w guzie trzustki x200 (kolor brązowy).*



### 5.2.5. PDGF- $\beta\beta$

Nasilenie ekspresji PDGF- $\beta\beta$  było umiarkowane do silnego w cytoplazmie komórek nowotworowych (Ryc. 15). W 6 przypadkach zaobserwowano również zabarwienie jądra komórek raka.



Ryc. 15. Ekspresja PDGF- $\beta\beta$  w guzie trzustki x200 (kolor brązowy). Widoczne zabarwienie jąder komórkowych (strzałki).

### 5.3. Ocena półilościowa barwień immunohistochemicznych

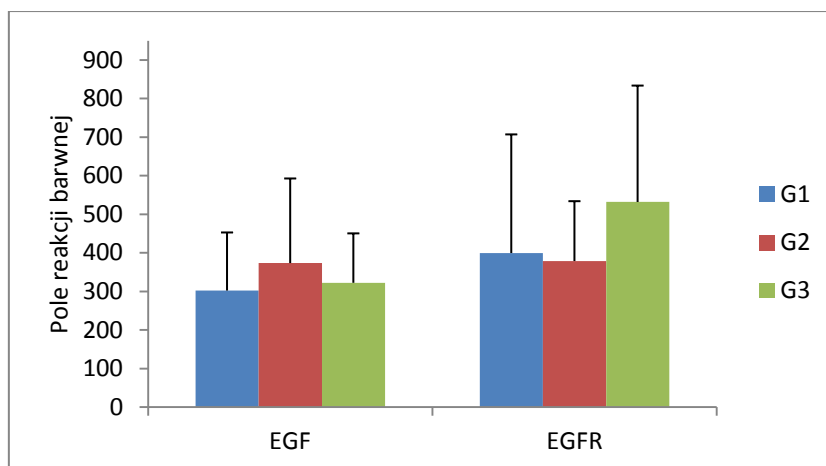
Poziom ekspresji oznaczono za pomocą programu MicroImage mierząc pole zabarwienia.

Średnie wartości ekspresji  $\pm$ SD poszczególnych czynników przedstawia Tabela 7.

Poziom ekspresji w grupach o różnym stopniu zróżnicowania histologicznego dla EGF nie różnił się znacząco. Dla EGFR poziomy ekspresji były zbliżone, jedynie dla grupy G3 poziom był wyższy (Ryc. 16)

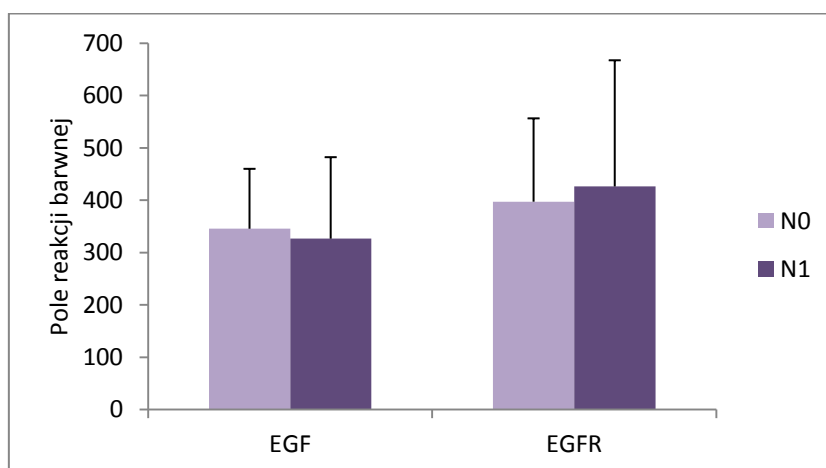
Dane kliniczne	n=36	EGF	EGFR	FGF2	FGF7	IGF1	IGFR	PDGF-ββ	HGFα	c-Met
Zróźnicowanie guza										
G1	4	302,16 ±150,64	399,31 ±307,63	381,38 ±100,00	332,64 ±131,53	406,83 ±196,02	372,06 ±215,00	333,97 ±45,06	233,06 ±130,00	352,61 ±143,79
G2	16	373,36 ±219,40	378,60 ±155,28	709,60 ±206,77	655,90 ±280,05	410,44 ±180,63	500,71 ±311,51	378,68 ±176,01	555,40 ±225,34	697,56 ±150,46
G3	16	322,21 ±128,20	537,71 ±307,87	680,48 ±310,49	755,62 ±276,17	410,82 ±190,18	484,98 ±108,54	366,77 ±286,83	482,71 ±127,27	1200,39 ±310,15
p		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	<b>p&lt;0,05</b>
Przerzuty LN										
N0	13	345,34 ±114,45	396,99 ±159,21	704,00 ±268,41	611,36 ±287,10	446,43 ±194,92	450,54 ±195,38	369,78 ±194,8	521,74 ±189,20	817,52 ±523,7
N1	23	326,39 ±155,67	426,09 ±241,11	653,75 ±254,25	578,74 ±296,50	392,28 ±182,68	527,44 ±195,38	398,12 ±200,50	549,65 ±220,39	714,34 ±478,00
p		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tabela 7. Zestawienie średniej ekspresji czynników wzrostu i ich receptorów w badanych guzach trzustki. Wartości zostały porównane ze względu na zróźnicowanie histologiczne guza oraz występowanie przerzutów do węzłów chłonnych.



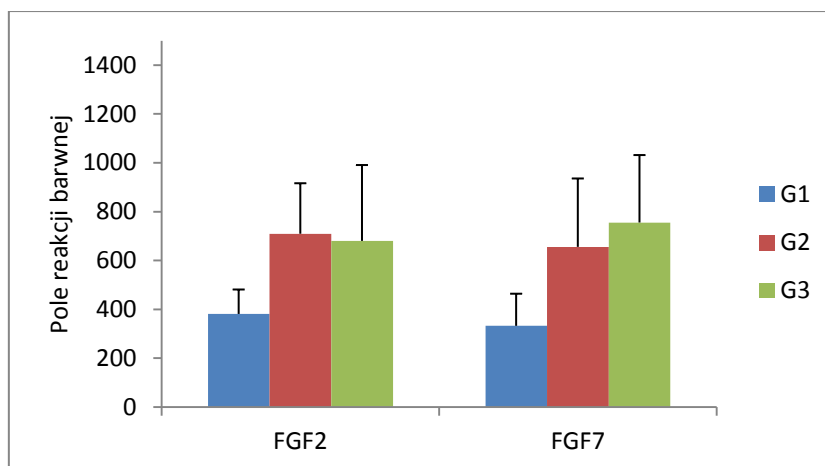
Ryc. 16. Porównanie poziomu ekspresji EGF i EGFR w grupach o różnym stopniu zróżnicowania histologicznego. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm SD$

Nie zaobserwowano znaczących różnic w ekspresji czynnika EGF i jego receptora w guzach dających przerzuty do węzłów chłonnych i nie powodujących przerzutowania (Ryc.17).



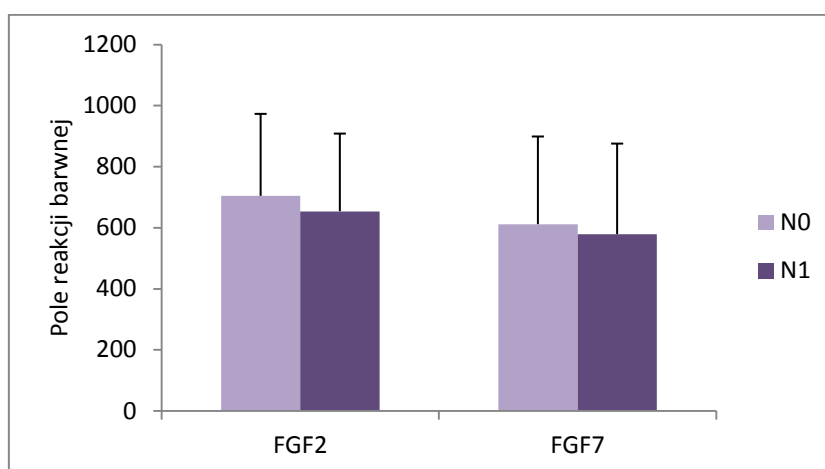
Ryc. 17. Porównanie poziomu ekspresji EGF i EGFR w grupach N0 i N1. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm SD$

Oceniając poziom ekspresji między grupami G1, G2 i G3 można zaobserwować, że poziom FGF2 jak i FGF7 w guzach o najwyższym stopniu zróżnicowania jest niższy niż w pozostałych dwóch grupach (Ryc. 18). Tendencja ta była wyraźna dla obu czynników, jednak nie była ona znamienne statystycznie.



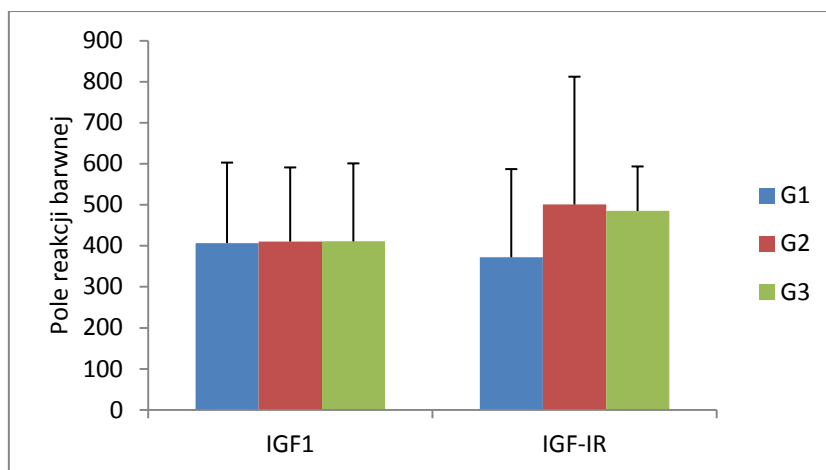
*Ryc. 18. Porównanie poziomu ekspresji FGF2 i FGF7 w grupach o różnym stopniu zróżnicowania histologicznego. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm$ SD*

Porównując grupy pod względem występowania przerzutów do węzłów chłonnych można było zaobserwować, że poziom ekspresji zarówno FGF2 jak i FGF7 był zbliżony (Ryc. 19).



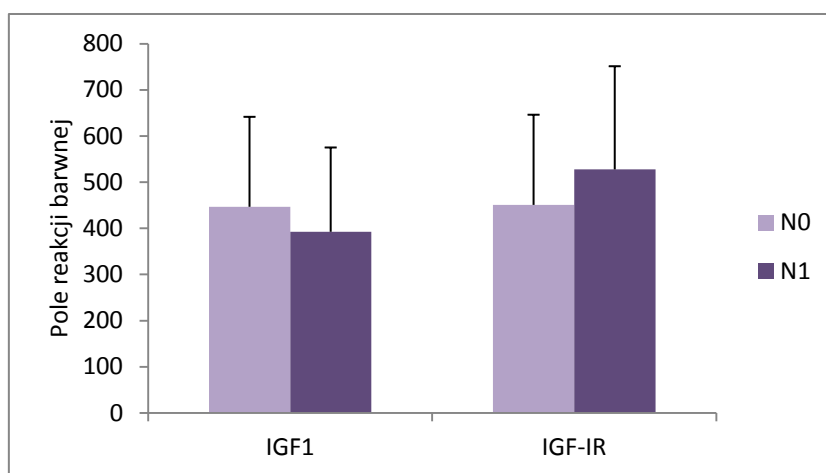
*Ryc. 19. Porównanie poziomu ekspresji FGF2 i FGF7 w grupach N0 i N1. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm$ SD*

Porównanie poziomu ekspresji czynnika IGF1 nie wykazało istotnych różnic pomiędzy stopniami zróżnicowania histologicznego. Dla IGF-IR średnia ekspresja receptora była nieznacznie wyższa w grupach G2 i G3 (Ryc. 20).



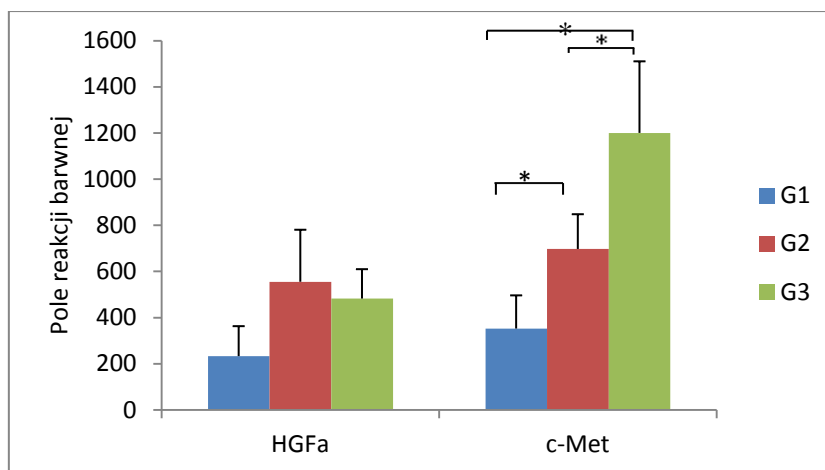
Ryc. 20. Porównanie poziomu ekspresji IGF i IGFR w grupach o różnym stopniu zróżnicowania histologicznego.

Podobnie w grupach N0 i N1 wartości ekspresji dla IGF1 i IGF-IR $\beta$  były zbliżone i nie było między nimi różnicy istotnej statystycznie. (Ryc. 21).



Ryc. 21. Porównanie poziomu ekspresji IGF1 i IGF-IR $\beta$  w grupach N0 i N1. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm$ SD

Poziom ekspresji dla obu czynników był wyraźnie niższy w grupie G1 dla czynnika HGF $\alpha$  wynosił ona  $233,06 \pm 130$ , dla jego receptora:  $352,61 \pm 143,79$ . Dla receptora c-Met w kolejnych grupach poziom ekspresji wyraźnie wzrastał. Różnica między poszczególnymi stopniami zróżnicowania histologicznego była istotna statystycznie ( $p < 0,05$ ) (Ryc. 22).

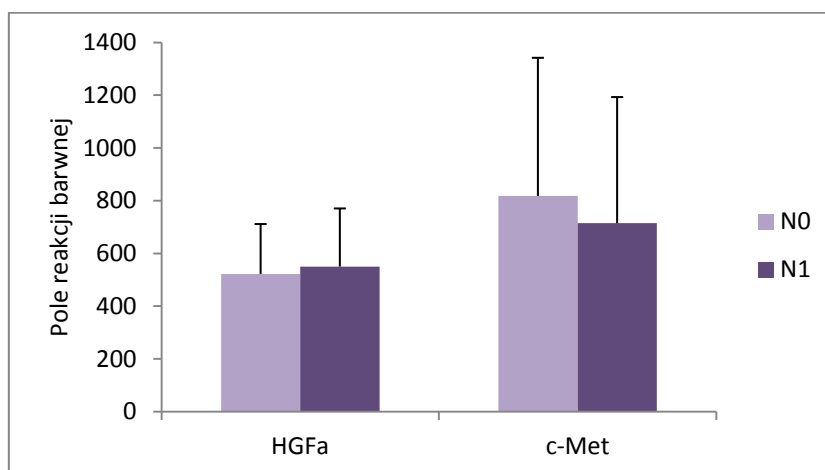


Ryc. 22. Porównanie poziomu ekspresji HGFα i c-Met w grupach o różnym stopniu zróżnicowania histologicznego. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm SD$ , \* $p < 0,05$

Natomiast w grupach N0 i N1 nie zaobserwowano różnic w poziomie ekspresji HGFα.

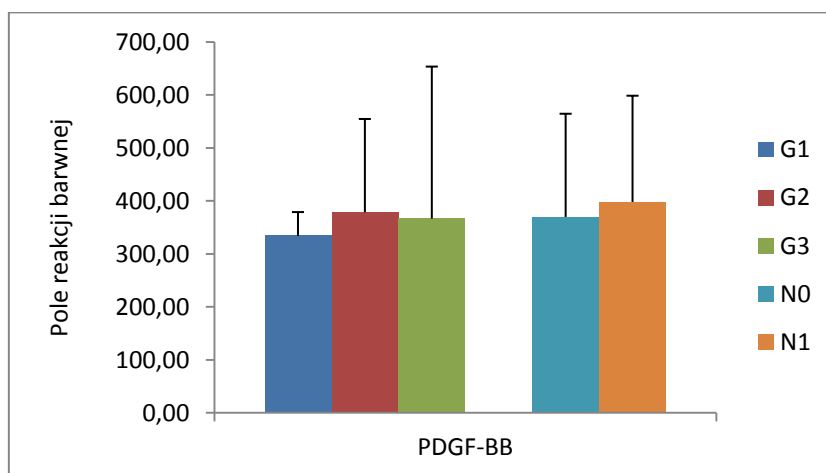
Dla receptora c-Met wartość ekspresji w guzach N0 była nieznacznie wyższa niż

w guzach dających przerzuty do węzłów chłonnych (Ryc. 23).



Ryc. 23. Porównanie poziomu ekspresji HGFα i c-Met w grupach N0 i N1. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm SD$

Półilościowe porównanie ekspresji wykazało brak różnic w poziomie PDGF-ββ pomiędzy badanymi grupami, zarówno jeśli chodzi o stopnie zróżnicowania jak i ze względu na występowanie przerzutów do węzłów chłonnych (Ryc. 24).



Ryc. 24. Porównanie poziomu ekspresji PDGF- $\beta\beta$  w badanych grupach. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm SD$

#### 5.4. Ocena nacieków zapalnych w guzie trzustki

W preparatach zaobserwowano liczne nacieki limfocytów i makrofagów. Obecna była również silna ekspresja elastazy neutrofilowej, nie zauważono natomiast nacieków komórek NK (Tabela 8).

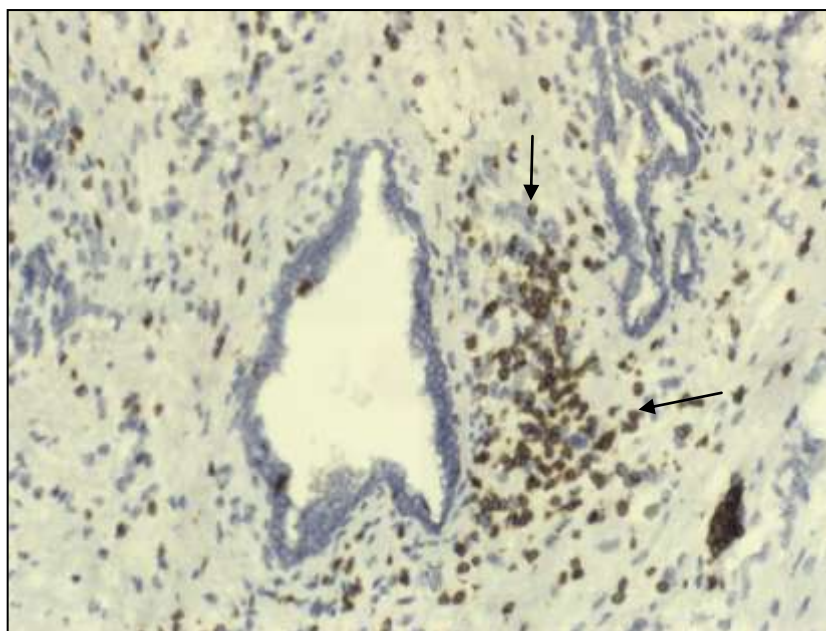
##### 5.4.1. Limfocyty T

Nacieki limfocytów były obecne w tkance guza. Ich skupiska występowały wokół ognisk nowotworowych oraz nacieczonych pni nerwowych. W kilku przypadkach można było zaobserwować szczególnie liczne nacieki limfocytów wokół wysp Langerhansa (Ryc. 25).

Dane kliniczne	n=36	CD3	CD68	elastaza
<b>Zróźnicowanie guza</b>				
G1	4	203,62±60,87	280,66±73,55	177,5±38,9
G2	16	269,05±100,67	362,36±111,37	202,80±71,83
G3	16	250,02±79,89	365,14±189,13	215,91±94,44
p		NS	NS	NS
<b>Przerzuty LN</b>				
N0	13	246,79±67,86	260,17±104,33	207,79±113,11
N1	23	254,23±94,73	402,83±141,64	210,74±75,68
p		NS	<b>p&lt;0,05</b>	NS
<b>Naciekanie nerwów</b>				
obecne	25	283,88±74,65	370,34±171,83	206,93±76,87
brak	11	273,21±66,77	127,55±69,92	218,01±109,74
p		NS	<b>p&lt;0,05</b>	NS
<b>Naciekanie naczyń</b>				
obecne	10	264,37±79,45	352,16±178,05	221,93±72,42
brak	26	271,08±68,82	241,56±145,91	203,11±90,44
p		NS	NS	NS

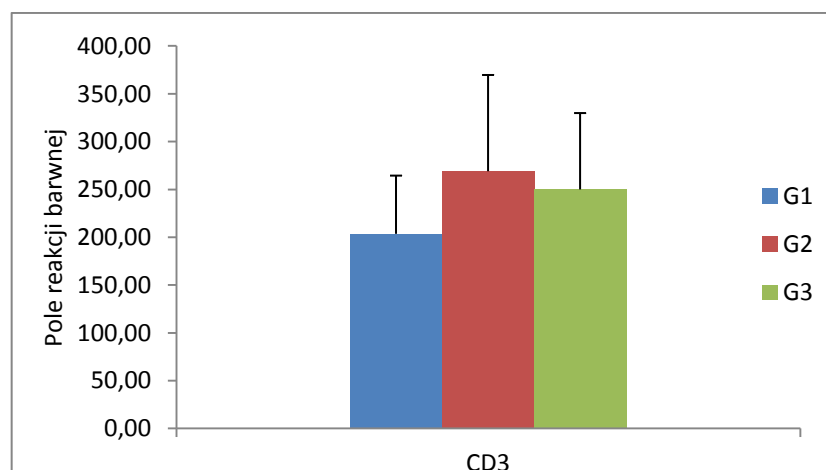
Tabela nr 8. Nacieki odpowiedzi zapalnej a cechy patomorfologiczne guzów trzustki.





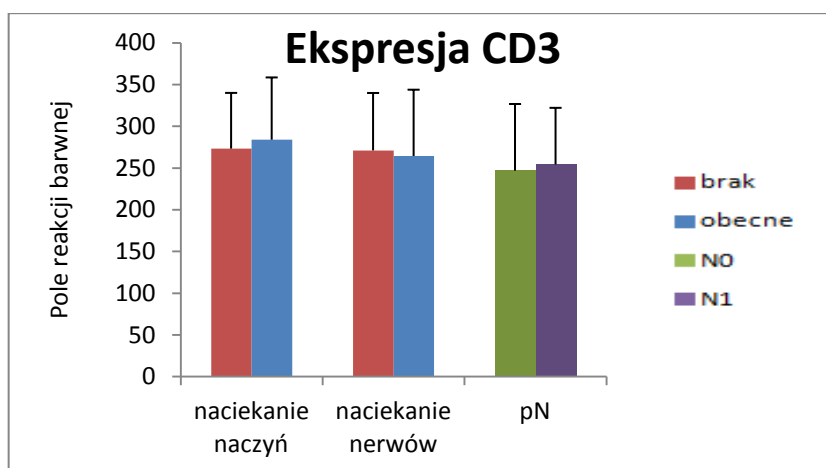
Ryc. 25. Naciekanie limfocytów wokół ognisk nowotworowych w tkance guza trzustki, x200.

Porównanie ilościowe nie wykazało istotnych różnic w ekspresji markera CD3 między badanymi grupami. Poziom ekspresji był zbliżony niezależnie od stopnia zróżnicowania guza trzustki (Ryc. 26).



Ryc. 26. Porównanie poziomu ekspresji CD3 w grupach G1, G2 i G3. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm$ SD

Nacieki limfocytów nie miały również wpływu na inwazyjność nowotworu. Poziom ekspresji różnił się minimalnie w przypadku guzów z naciekaniem naczyń lub nerwów a guzów bez tych zjawisk. Również porównując grupy ze względu na obecność przerzutów do węzłów chłonnych nie zaobserwowano istotnej różnicy (Ryc. 27).

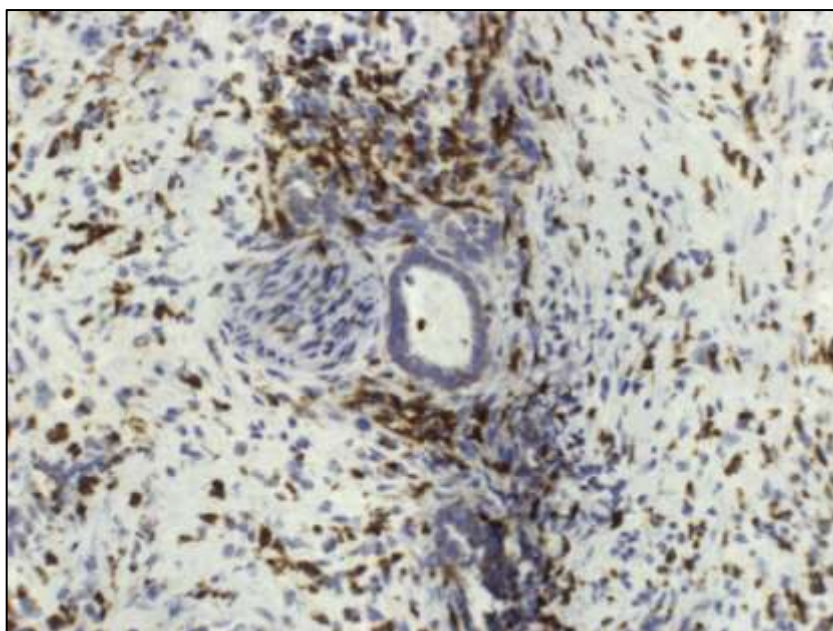


Ryc. 27. Porównanie poziomu ekspresji CD3 w badanych grupach. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm$ SD

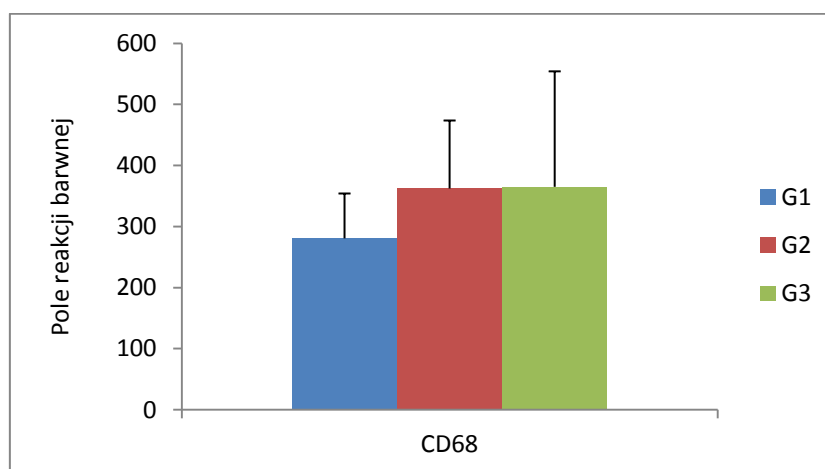
#### 5.4.2. Makrofagi

Makrofagi licznie naciekały tkankę guzów trzustki. Podobnie jak w przypadku limfocytów można było je zaobserwować wokół ognisk nowotworowych i pni nerwowych nacieczonych przez komórki nowotworowe.

Porównanie ilościowej ekspresji CD68 nie wykazało istotnych różnic między guzami o różnym stopniu zróżnicowania. Najniższa ekspresja była w grupie guzów G1, w pozostałych dwóch grupach wartości były zbliżone (Ryc. 29).



Ryc. 28. Naciek makrofagów wokół nerwu z inwazją komórek nowotworowych (kolor brązowy).



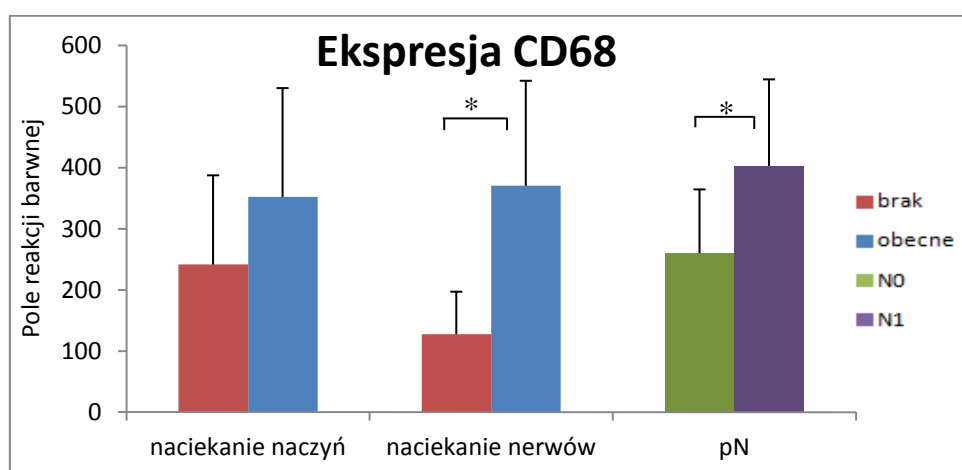
Ryc. 29. Porównanie poziomu ekspresji CD68 w grupach o różnym stopniu zróżnicowania histologicznego. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm SD$

Porównując wyniki w grupach pod względem występowania przerzutów do węzłów chłonnych (N0 i N1) stwierdzono, że liczba makrofagów w tkance guza jest wyższa w grupie z przerzutami do węzłów chłonnych i jest to różnica istotna

statystycznie. Średnia ekspresja CD68 w grupie z przerzutami do węzłów chłonnych wynosiła  $402,83 \pm 141,64$  natomiast w grupie N0  $260,17 \pm 104,33$  ( $p < 0,05$ ).

Obecność makrofagów była również zwiększona w przypadku naciekanie pni nerwowych przez komórki nowotworowe. W przypadku występowania tego zjawiska ekspresja CD68 wynosiła  $370,34 \pm 171,83$  natomiast gdy nie obserwowano inwazji komórek nowotworowych poziom CD68 wynosił  $127,55 \pm 69,92$  ( $p < 0,05$ ).

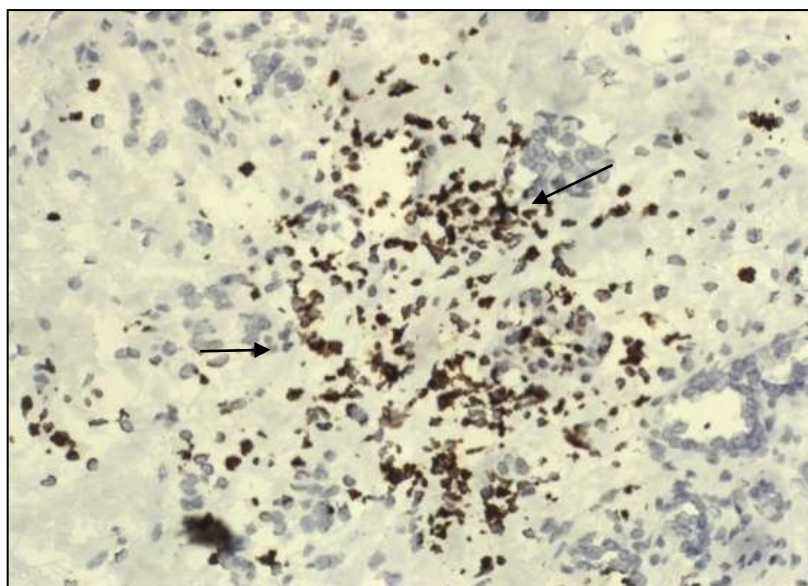
W grupie guzów z naciekaniami naczyń zaobserwowano lekko zwiększoną infiltrację makrofagów w porównaniu z guzami bez naciekania (Ryc. 30).



Ryc. 30. Porównanie poziomu ekspresji CD68 w badanych grupach. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm SD$ , \*  $p < 0,05$

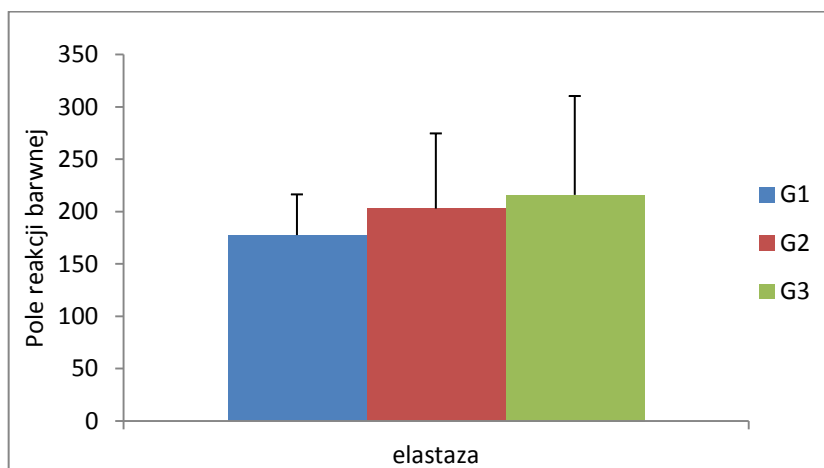
#### 5.4.3. Neutrofile

Neutrofile występowały w tkance guza jednak nie tworzyły tak licznych skupisk jak makrofagi lub limfocyty. Często można było je zaobserwować na granicy guz-  
obrzeże.



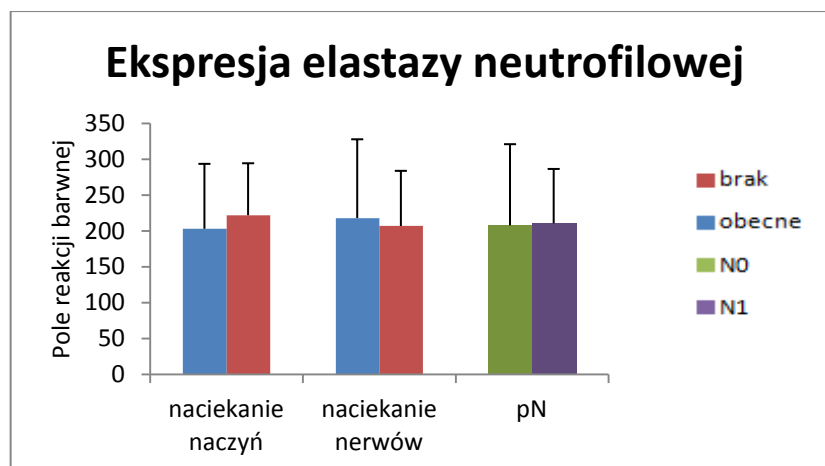
Ryc. 31. Neutrofile w tkance nowotworowego guza trzustki (kolor brązowy).

Porównanie ekspresji elastazy neutrofilowej nie wykazało istotnych różnicy między grupami G1, G2 i G3 (Ryc.32).



Ryc. 32. Porównanie poziomu ekspresji elastazy neutrofilowej w grupach o różnym stopniu zróżnicowania histologicznego. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm$ SD

Nie zaobserwowano również różnic w podziale ze względu na inwazyjność: dla naciekania naczyń, a także naciekania nerwów oraz występowania przerzutów do węzłów chłonnych (Ryc. 33).

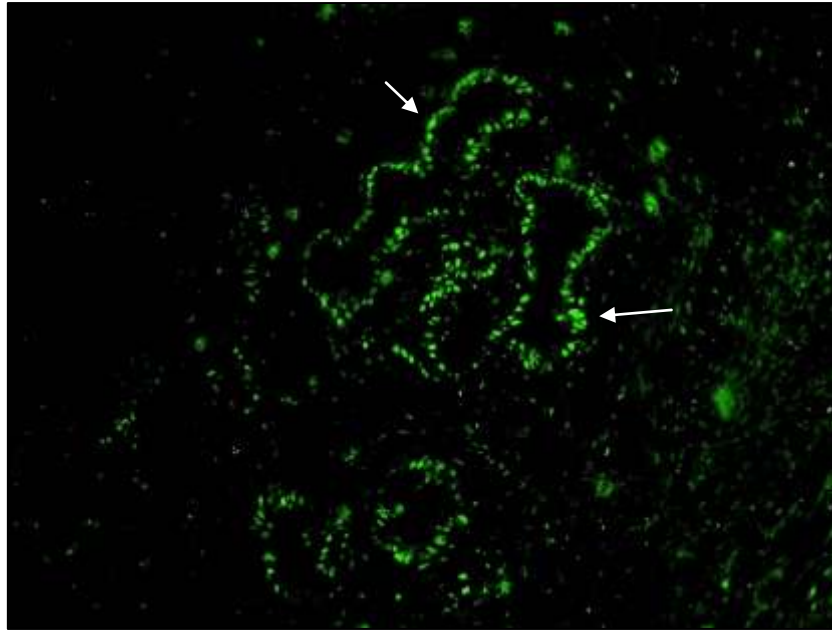


Ryc. 33. Porównanie poziomu ekspresji elastazy neutrofilowej w grupach ze względu na naciekanie naczyń oraz nerwów oraz występowanie przerzutów do węzłów chłonnych. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm$ SD

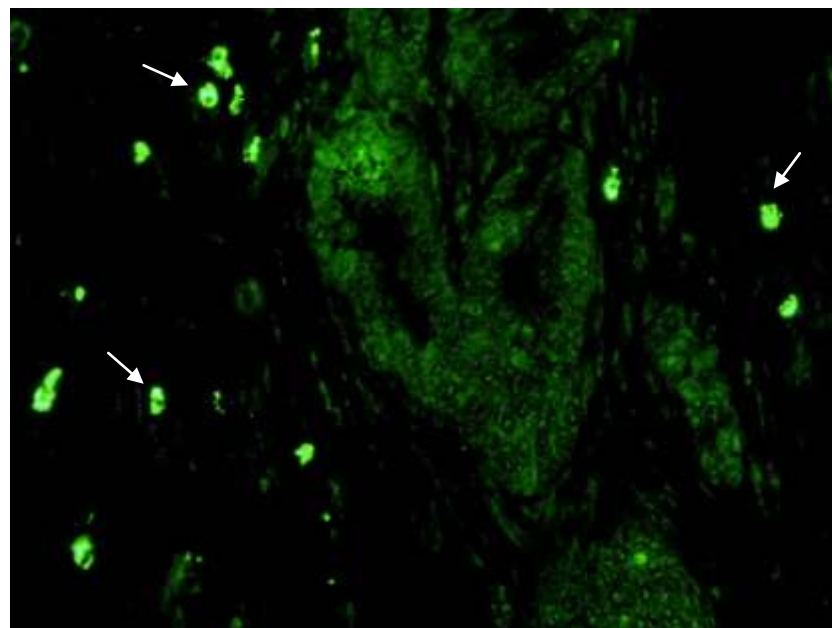
### 5.5. Aktywność metaloproteinaz w guzach trzustki.

Lokalizację obszaru aktywności metaloproteinaz 2 i 9 określono przy pomocy zymografii *in situ*. Obszar aktywności enzymatycznej został zidentyfikowany poprzez trawienie żelatyny znakowanej fluoroscencyjnie. Aktywność żelatynolityczna została stwierdzona w komórkach nowotworowych oraz naciekających makrofagach (Ryc. 34,35).





*Ryc. 34. Aktywność metaloproteinaz w guzie trzustki – aktywność w komórkach nowotworowych.*



*Ryc. 35. Aktywność metaloproteinaz w guzie trzustki – makrofagi(zaznaczone strzałkami).*

Dane kliniczne	MMP2	MMP9
Zróźnicowanie guza		
G1	3,27±3,6	0
G2	16,57±13,9	20,35±13,9
G3	13,6±12,2	25,6±6,39
p	p<0,05	NS
Przerzuty LN		
N0	6,54±3,57	13,81±10,61
N1	16,06±12,01	24,93±8,13
p	NS	NS

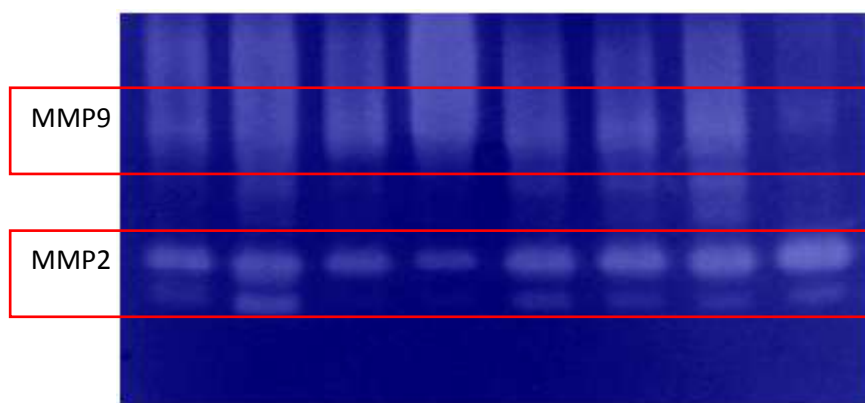
*Tabela 9. Zestawienie aktywności metaloproteinaz 2 i 9 w guzach trzustki w podziale na podgrupy ze względu na stopień zróźnicowania histologicznego i występowanie przerzutów do węzłów chłonnych.*

Aktywność żelatynolityczna była zbadana w izolatach białkowych z fragmentów guzów trzustki (Ryc. 36). Aktywna forma MMP2 (62 kDa) była obecna w 88% przypadków, a MMP9 (83 kDa) w 38% przypadków. W 6 przypadkach nie określono czy występuje aktywność metaloproteinaz ze względu na słabe zróźnicowanie obszaru trawienia na żelu.

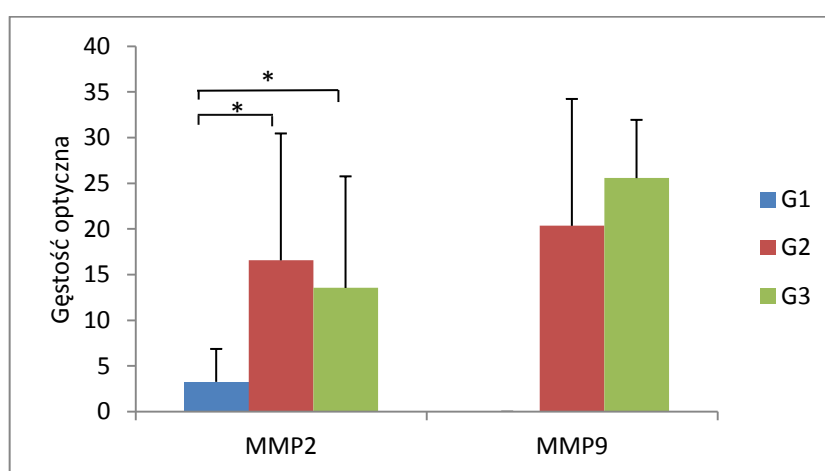
Nie zaobserwowano aktywności metaloproteinazy 9 dla grupy G1. W grupie G2 aktywność MMP9 występuje w 7/13 przypadkach a w G3 tylko w 4/13. Obecność aktywnej formy MMP2 w grupie G1 stwierdzono w 3/4 guzach, w 9/13 przypadkach dla grupy G2 i w 10/13 guzach w grupie G3.

Porównując aktywność mierzoną densytometrycznie można stwierdzić, że aktywność metaloproteinazy 2 w grupie guzów o najwyższym stopniu zróźnicowania jest znacząco niższa niż w grupie G2 i G3 (p<0,05). Dla metaloproteinazy 9 różnica między grupami G2 i G3 nie była istotna statystycznie (Ryc.37).

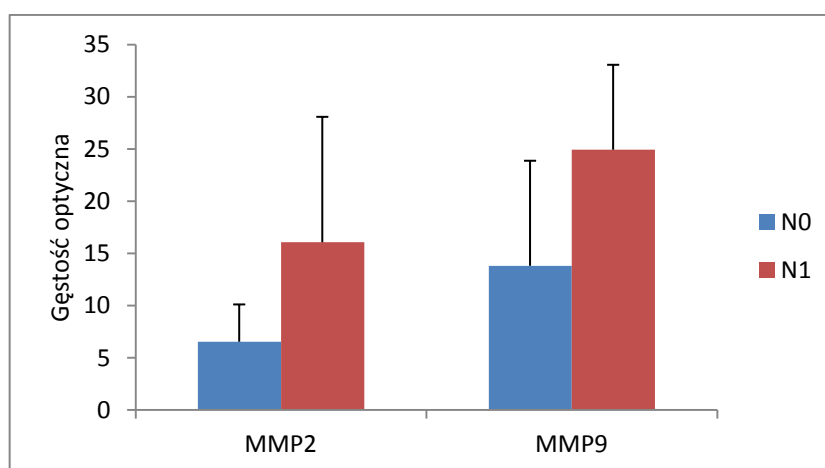




Ryc. 36. Analiza aktywności metaloproteinaz w zymografii żelowej



Ryc. 37. Aktywność metaloproteinazy 2 i 9 w grupach różniących się zróżnicowaniem histologicznym guza. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm$ SD, \*  $p < 0,05$



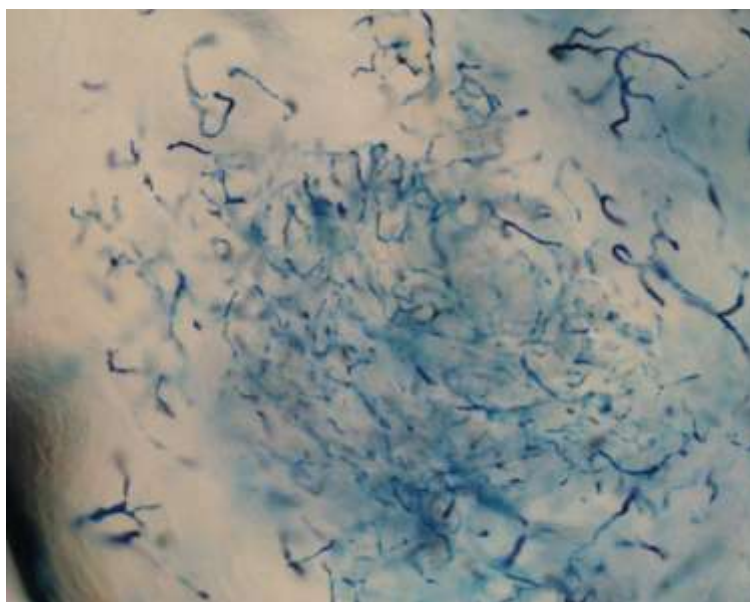
Ryc.38. Aktywność metaloproteinazy 2 i 9 w grupach ze względu na występowanie przerzutów do węzłów chłonnych. Wyniki badań przedstawione jako średnie arytmetyczne  $\pm$ SD

Aktywność obu badanych metaloproteinaz była wyższa w guzach nowotworowych dających przerzuty do węzłów chłonnych. Aktywność metaloproteinazy 2 stwierdzono w 7/10 guzów z grupy N0 i w 15/20 guzów z grupy N1.

Aktywność MMP9 stwierdzono w 3/10 przypadkach z grupy N0 i 8/20 guzów N1. Aktywność była wyższa niż w przypadku MMP2

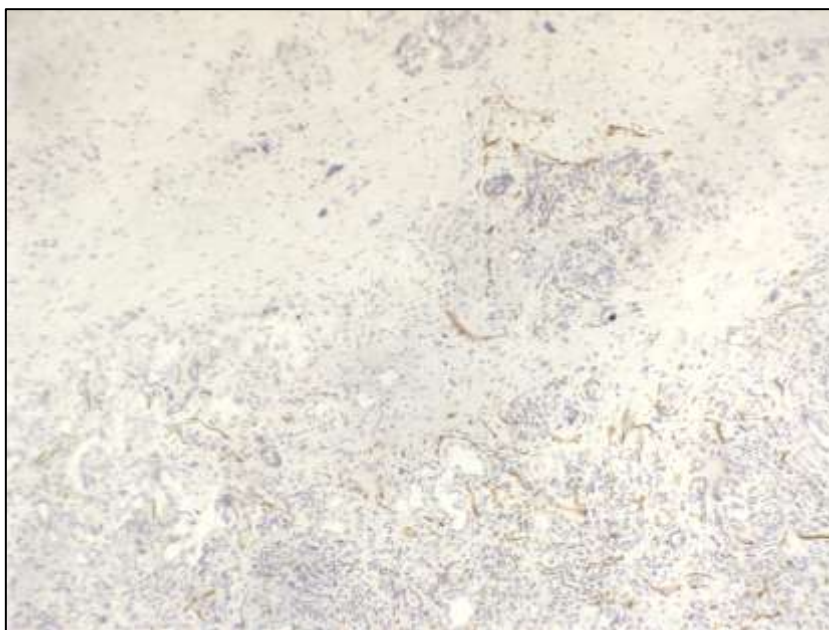
### **5.6. Ocena limfangiogenezy w guzie trzustki**

Po przeprowadzeniu oceny preparatów mikrolimfangiograficznych stwierdzono jedynie występowanie naczyń żylnych (Ryc. 39), a także małych, wypełnionych płynem przestrzeni międzykomórkowych. W centrum guza nie stwierdzono struktur, które mogłyby odpowiadać naczyniom limfatycznym. Poszerzone naczynia limfatyczne można było obserwować jedynie w preparatach z obrzeża guza. W niektórych preparatach znaleziono błękitny barwnik między włóknami kolagenowymi.



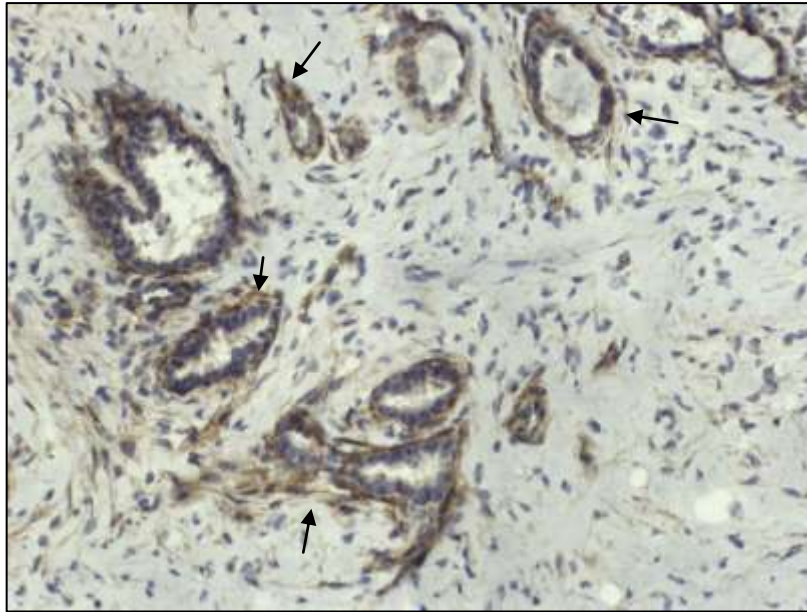
*Ryc. 39. Obraz naczyń żylnych uzyskany w limfangiografii, x100.*

Obserwacje te potwierdziła analiza immunohistochemiczna. Nie stwierdzono ekspresji markera śródbłonna limfatycznego Prox1, natomiast podoplanina była wydzielana przez komórki podścieliska i komórki nowotworowe. Obecność markera Lyve-1 stwierdziłam w 60% guzów, w komórkach tworzących struktury bez światła (Ryc. 40).

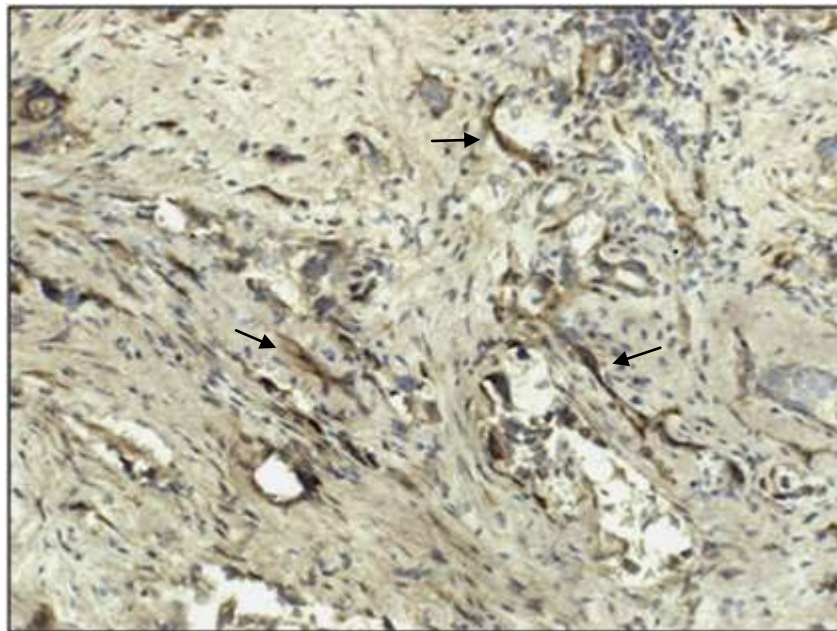


*Ryc. 40. Barwienie LYVE-1 na granicy guz-obrzeże, x100. Naczynia limfatyczne zostały wybarwione na kolor brązowy.*

VEGF C był obecny w 80% preparatów, również w zapadniętych naczyniach limfatycznych, jak też w pojedynczych prawidłowych naczyniach na obrzeżu guza . VEGFR3(flt4), receptor dla VEGF C, był ekspresjonowany przez komórki nowotworowe oraz sporadycznie przez komórki podścieliska (Ryc. 41,42).



*Ryc. 41. Barwienie Flt4 w guzie raka trzustki, x200. Strzałkami zaznaczono ogniska nowotworowe z ekspresją receptora (kolor brązowy).*



*Ryc. 42. Barwienie VEGF C w guzie trzustki x 200. Strzałkami oznaczono miejsca ekspresji czynnika.*

## 6. Dyskusja wyników

Wyniki prowadzonych badań wykazały dużą różnorodność składu mikrośrodowiska guza nowotworowego trzustki. Zaobserwowałam ekspresję wszystkich badanych przeze mnie czynników wzrostu przez komórki nowotworowe, a także w niektórych przypadkach, przez komórki podścieliska. Widoczne były również liczne nacieki komórek układu immunologicznego, przede wszystkim makrofagów i limfocytów. W części badanych guzów aktywne były metaloproteiny 2 i 9, które mogą brać udział w przebudowie macierzy międzykomórkowej oraz aktywacji czynników wzrostu. Zaobserwowałam wyraźną różnicę w aktywności pomiędzy guzami o wysokim stopniu zróżnicowania a guzami z grup G2 i G3. Prowadzone analizy wykazały również słabe unaczynienie guzów nowotworowych trzustki. Naczynia krwionośne były liczne, ale drobne i tworzyły chaotyczną sieć. W centrum guza brak było aktywnego procesu limfangiogenezy, występujące tam naczynia były zapadnięte. Prawidłowo wykształcone naczynia występowały sporadycznie jedynie na obrzeżu guza.

### 6.1. Ekspresja receptora c-Met w guzach trzustki.

Badając ekspresję czynników wzrostu tylko dla receptora c-Met stwierdziłam istotną statystycznie różnicę w poziomie ekspresji między guzami o różnym stopniu zróżnicowania. Nie było natomiast istotnej różnicy w ekspresji c-Met między guzami dającymi przerzuty do węzłów chłonnych i guzami nie dającymi przerzutów.

Obecność receptora c-Met wykazano wcześniej w kilku liniach nowotworowych gruczolaka trzustki zarówno wywodzących się z guza pierwotnego, jak również

z przerzutów. W porównaniu z prawidłowymi komórkami przewodów trzustkowych stwierdzono znaczącą nadekspresję tego receptora w komórkach nowotworowych<sup>76</sup>.

W niektórych badaniach wykazano związek nadekspresji receptora c-Met ze stanem zaawansowania nowotworu i występowania przerzutów do węzłów chłonnych, ale nie stopniem zróżnicowania nowotworu<sup>77</sup>.

Analiza ilościowa wykazała stopniowy wzrost ekspresji tego receptora wraz ze zmniejszaniem się stopnia zróżnicowania komórek w guzie. W guzach o stopniu G3 najwięcej jest komórek niezróżnicowanych, co może mieć wpływ na ekspresję receptora c-Met. Jest to receptor, który odgrywa istotną rolę na etapie embriogenezy i organogenezy, a rozwój i inwazyjność guza nowotworowego odwzorowuje te procesy<sup>57,78</sup>. Analogicznie jak w przypadku embriogenezy, a także regeneracji narządów, w nowotworze połączenia międzykomórkowe ulegają zerwaniu i komórki migrują do otaczającego ich środowiska. W przypadku nowotworów wykazano również udział receptora c-Met w procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego<sup>58</sup>. Komórki mezenchymalnego pochodzenia są głównym źródłem HGF $\alpha$ , który w sposób parakryny oddziałuje na komórki nabłonkowe ekspresjonujące receptor c-Met. Jak pokazują badania, komórki nowotworu trzustki również są źródłem czynnika HGF $\alpha$ , który może w sposób autokryny powodować ciągłą aktywność tego receptora<sup>79</sup>.

W przypadku tego ligandu, tak jak w przypadku receptora c-Met, można było zaobserwować zwiększony jego poziom w badanych guzach o zmniejszonym stopniu zróżnicowania.

W przypadku nowotworu płuc zaobserwowano, że nadekspresja c-Met była związana z konstytutywną aktywnością tego receptora, niezależną od ligandu. Jednak tylko



nadekspresja c-Met i HGF $\alpha$  powodowała zwiększenie potencjału przerzutowania komórek<sup>80</sup>.

Wysoki poziom ekspresji receptora c-Met może również wynikać z silnego niedotlenienia, jakim charakteryzuje się mikrośrodowisko raka trzustki. Jak wykazano we wnętrzu guza nowotworowego trzustki poziom tlenu wynosi 0–5,3 mmHg, podczas gdy w prawidłowej trzustce średni poziom tlenu to 24–92,7 mmHg<sup>81</sup>. Stan niedotlenienia powoduje zwiększenie ekspresji czynnika HIF1 $\alpha$ , który z kolei powoduje zwiększenie ekspresji receptora c-Met<sup>82</sup>, jednak nie jest to jedyny czynnik regulujący poziom tego receptora w tych warunkach<sup>83,92</sup>. Przeprowadzone ostatnio badania wykazały, że również hamowanie ścieżki sygnałowej VEGF, powoduje zwiększenie ekspresji receptora c-Met i jego udział w tworzeniu przerzutów do węzłów chłonnych<sup>84</sup>. Stwierdzono również, że komórki z wysoką ekspresją tego receptora mają zwiększony potencjał rakotwórczy. Sugerowano, że może on być markerem nowotworowych komórek macierzystych<sup>85</sup>.

Szczególne role receptora c-Met wynika z faktu, iż jego aktywacja pociąga za sobą różnorodne odpowiedzi komórkowe. Aktywuje on szereg ścieżek sygnałowych takich jak MAPK, JNK, PI3K-Akt a także czynnik transkrypcyjny STAT.

Wykazano, że ścieżka sygnałowa c-Met oddziałując z EGFR, ERB2 oraz IGF-IR $\beta$  może wpływać na chemiooporność raka trzustki. Jest to receptor, którego udział w tworzeniu lekooporności jest udowodniony w przypadku terapii celowanych skierowanych przeciwko EGFR, HER2, VEGF, BRAF.

Bevacicumab, działający przeciwko VEGF, dawał pozytywne rezultaty u osób z glejakiem. Zaobserwowano jednak, pojawiającą się oporność na ten lek. Dalsze badania wykazały, że nadekspresja c-Met jest związana z hamowaniem działania tego terapeutycznego<sup>86</sup>.

Lapatinib, stosowany w leczeniu nowotworu żołądka, jest środkiem działającym zarówno na HER2 jak i na EGFR. Wstępne badania z użyciem tego terapeutyku wykazały obiecujące rezultaty, jednak zaobserwowano również występującą chemiooporność związaną z tym lekiem. HGF $\alpha$  i c-Met pośredniczyły w niwelowaniu wpływu lapatinibu poprzez aktywowanie ścieżki sygnałowej HGF $\alpha$ /c-Met i przywracanie prawidłowego cyklu komórkowego<sup>87</sup>.

W przypadku raka płuc powyższa ścieżka sygnałowa redukowała podatność komórek nowotworowych na działanie inhibitora EGFR. Działanie to mogło być przywrócone poprzez zastosowanie przeciwciała neutralizującego HGF $\alpha$ <sup>88</sup>. Również w przypadku trzech innych inhibitorów EGFR zastosowanie inhibitora c-Met pozwala odwrócić mechanizm tworzący oporność na ten lek<sup>89</sup>.

Ostatnio opublikowano również badania, w których wykazano, że w przypadku przewodowego raka trzustki zastosowanie inhibitora c-Met pozwala na uzyskanie lepszych wyników leczenia gemcytabiną poprzez zahamowanie procesu jej dezaktywacji<sup>90</sup>.

Obserwacje te wskazują, że określenie poziomu ekspresji c-Met może pozwalać na przewidywanie efektywności terapii. Próby takiej oceny były przeprowadzone dla inhibitorów receptora c-Met. W przypadku raka przełyku amplifikacja c-Met charakteryzuje agresywną postać tego nowotworu i stanowi jednocześnie wskazanie do zastosowania crizotinibu, będącego inhibitorem tego receptora<sup>91</sup>.

Oznaczenie poziomu ekspresji receptora c-Met okazało się być użytecznym sposobem przewidywania efektów terapii w raku żołądka i oraz NSCLC. Przeprowadzone analizy wykazały, że oznaczanie poziomu za pomocą immunohistochemii może być stosowane w tych przypadkach jako biomarker. W obu przypadkach stwierdzono, że wysoka



ekspresja tego receptora wiąże się również z gorszymi rokowaniami dotyczącymi przeżycia<sup>92,93</sup>.

## 6.2. Wpływ naciekających makrofagów na inwazyjność raka trzustki.

Badanie obecności nacieków zapalnych w tkance guzów nowotworowych wykazało wyraźny związek z inwazyjnością nowotworu. Liczniejsze nacieki występowały w przypadku występowania przerzutów do węzłów chłonnych oraz naciekania nerwów przez komórki nowotworowe.

Odpowiedź immunologiczna jest elementem mikrośrodowiska guzów, ponieważ są one “niegojącą się raną”<sup>94</sup>. Komórki naciekające guz mogą ulegać wpływowi komórek nowotworowych i zmieniać swoją polaryzację w kierunku fenotypu promującego rozwój guza. Badania wskazują, że limfocyty, makrofagi oraz komórki żerne są źródłem czynników promujących angiogenezę i limfangiogenezę. Liczba komórek VEGF-A i VEGF-C pozytywnych jest związana z występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych<sup>95</sup>. Ponieważ są one również źródłem proteaz uczestniczą w przebudowie zrębu guza i umożliwiają tworzenie nowych naczyń. Wpływają także na molekuly adhezyjne i ułatwiają migrowanie komórek<sup>67</sup>.

W tkance NSCLC Naciekające makrofagi CD68+ korelują z ekspresją mezenchymalnych białek oraz ze stopniem zróżnicowania, ale nie z występowaniem przerzutów. Przedstawione badania sugerowały również, że obecność makrofagów ma wpływ na komórki nowotworowe znajdujące się w ich sąsiedztwie<sup>96</sup>

Makrofagi same mogą być źródłem MMP9, co obserwowałam, ale mogą też stymulować komórki nowotworowe do ekspresji tego enzymu i zwiększenia inwazyjności komórek. Zależność taką wykazano na liniach komórkowych z guzów pierwotnych jak i z miejsc przerzutowania. W warunkach niedotlenienia stopeń

inwazyjności jest uzależniony od równowagi między wydzielaniem MMP9 a poziomem jej inhibitora TIMP3<sup>97</sup>.

Liczba naciekających makrofagów może się różnić między guzami – w niektórych guzach można stwierdzić intensywne naciekanie a w innych pojedyncze komórki. W badanych guzach ekspresja CD68 była znacząco wyższa w grupie N1 niż w grupie N0. Natomiast według badań Kurahara i wsp. jedynie wysoka liczba makrofagów o polaryzacji M2 była związana z występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych<sup>98</sup>.

Molekularny mechanizm naciekania nerwów przez komórki nowotworowe nie został jeszcze wyjaśniony<sup>99</sup>. Obserwowano wzrost liczby makrofagów wokół nerwów nacieczonych przez komórki nowotworowe. Według niektórych badaczy wiąże się to z wydzielaniem przez makrofagi czynnika GDNF i aktywację ścieżki sygnałowej MAPK and PI3K w komórkach nowotworowych<sup>100</sup>.

### **6.3. Obecność innych komórek odpowiedzi zapalnej w guzie raka trzustki.**

W moich badaniach sprawdzałam również wpływ obecności limfocytów T, neutrofilii i komórek NK na rozwój nowotworu. Limfocyty T występowały licznie w badanych przeze mnie guzach. Ich skupiska były widoczne wokół ognisk nowotworowych i pni nerwowych z naciekiem nowotworowym. Analiza ilościowa nie wykazała jednak istotnego związku nacieków limfocytów ze stopniem dojrzałości histologicznej ani inwazyjnością. Obecne w tkance guzów były również neutrofile, ale także w ich wypadku brak było wyraźnego wpływu na rozwój i inwazyjność nowotworu.

W piśmiennictwie obecność limfocytów T w tkance guzów nowotworowych łączy się z lepszymi rokowaniami dla pacjentów, także w przypadku raka trzustki<sup>101</sup>. Jednak według niektórych badaczy większość komórek T występujących wewnątrz guza

wykazuje naiwny fenotyp<sup>102</sup>. Udowodnili oni, że w tkance guzów trzustki komórki o działaniu immunosupresyjnym przeważają nad komórkami aktywnie działającymi przeciwnowotworowo. Przedstawione ostatnio wyniki wskazują, że lepszym wskaźnikiem prognostycznym jest stosunek liczby aktywnych komórek do liczby komórek hamujących obronę przeciwnowotworową<sup>103</sup>.

Reid i wsp. badał komórki występujące w przypadkach neoplazji trzustkowej i stwierdził, że w przypadku gruczolakoraka trzustki nie występują nacieki neutrofilii<sup>104</sup>. W badanych przeze mnie guzach takie nacieki występowały, chociaż nie były tak liczne jak nacieki makrofagów i limfocytów. Prowadzone wcześniej badania wskazywały raczej na udział elastazy w rozwoju guza poprzez aktywację ścieżki sygnałowej PDGFR-PI3K<sup>105</sup>. Może to wskazywać na to, że neutrofile znajdujące się w badanych przeze mnie guzach wykazywały fenotyp N1.

Nie zaobserwowałam natomiast naciekania komórek NK. W przypadku innych nowotworów - niedrobnokomórkowego raka płuc oraz raka jelita grubego<sup>106,107</sup> komórki NK były obecne w tkance guza i wykazywały zdecydowaną aktywność przeciwnowotworową przez bezpośrednie działanie lub poprzez produkcję cytokin np. INF- $\gamma$ <sup>108</sup>.

#### **6.4. Aktywność metaloproteinaz 2 i 9 w guzach nowotworowych trzustki.**

Wykazałam w swoich badaniach, że aktywność metaloproteinaz 2 i 9 jest wyższa w guzach o mniejszym stopniu zróżnicowania i w przypadku występowania przerzutów do węzłów chłonnych, chociaż różnica ta nie była istotna statystycznie.

Metaloproteiny ze względu na swoją rolę w procesach przebudowy są atrakcyjnym celem terapeutycznym<sup>109</sup>. Wielokrotnie wykazywano ich związek z rozwojem nowotworu i gorszymi rokowaniami u pacjentów<sup>110,111,112</sup>.

W gruczolakoraku trzustki Pryczynicz i wsp. nie stwierdzili istotnych różnic w ekspresji MMP9 między różnymi stopniami zróżnicowania histologicznego<sup>113</sup>. Wykazali jednak, że nadekspresja MMP9 ma związek z zajęciem węzłów chłonnych i odległymi przerzutami. W naszych badaniach nie stwierdziliśmy wyraźnego związku z przerzutowaniem do węzłów chłonnych, chociaż poziom aktywności zarówno MMP2 i MMP9 był wyższy w grupie N1. We wcześniejszych pracach aktywność metaloproteiny 9 była wiązana jedynie z częstszym występowaniem przerzutów do wątroby<sup>114</sup>. Zwiększona ekspresja MMP9 była także wiązana z procesem angiogenezy w guzach trzustki i obecnością nacieków makrofagalnych. Brak aktywności tej metaloproteiny w grupie G1 może wskazywać, że MMP9 ulega aktywacji dopiero w przypadku większego zaawansowania nowotworu.

Niektórzy badacze wykazywali, że ekspresja MMP9 była wiązana z dłuższym przeżyciem. Miało to miejsce nie tylko w przypadku nowotworu trzustki, ale również nowotworu piersi i nowotworu jelita sugerując ochronną rolę metaloproteiny 9 poprzez jej udział w generowaniu inhibitorów angiogenezy.

Jak wykazaliśmy forma aktywna MMP2 występuje we wszystkich stopniach zróżnicowania histologicznego, co może wskazywać na jej udział w rozwoju raka trzustki. W prawidłowej trzustce nie obserwowano obecności MMP2, natomiast pojawia się ona zarówno w przewlekłym zapaleniu trzustki jak i nowotworze. We wcześniejszych badaniach nie stwierdzono zwiększonej ekspresji metaloproteiny 2 w tkance nowotworowej trzustki i nie została znaleziona korelacja między ekspresją a żadnym z kryteriów histologicznych<sup>72</sup>. Natomiast badania przeprowadzone na

liniach komórkowych raka trzustki (IMIM-PC1; IMIM-PC2; PANC-1) wykazały dobrą korelację między aktywnością MMP2 a potencjałem inwazyjnym. Komórki te lepiej przemieszczały się w Matrigelu niż komórki nie wykazujące zwiększonej ekspresji i aktywności metaloproteinaz<sup>71</sup>. Badano również aktywność MMP2 w soku trzustkowym i wykazano, że pomiar ten może być użyteczny w diagnozowaniu raka trzustki<sup>115</sup>.

W niektórych badaniach wysoką ekspresję nabłonkowego MMP2 wiązano z zaawansowanym stopniem nowotworu, niskim stopniem zróżnicowania i krótszym okresem przeżycia<sup>116</sup>.

W ostatnich badaniach potwierdzono obecność metaloproteinaz 2 i 9 w tkance trzustki z przewlekłym zapaleniem jak również nowotworowej. W tkance guzów stężenia obu metaloproteinaz były znacząco wyższe. Wyższe stężenia MMP9 wiązano z większym stopniem zaawansowania nowotworu. Poziom MMP9 był również istotnie wyższy, jeśli występowały przerzuty do węzłów chłonnych. Dobrze zróżnicowane guzy miały niższy poziom MMP2 w porównaniu z guzami G3. Natomiast dla MMP9 wykazano odwrotny stosunek. Różnice te jednak również nie były istotne statystycznie<sup>117</sup>.

### **6.5. Limfangiogeneza w guzach trzustki**

Badanie unaczynienia wykazało obecność drobnych naczyń krwionośnych w tkance guza. Analiza pod kątem obecności naczyń limfatycznych, wykazała, że występują one sporadycznie na granicy guza. Wewnątrz guza jego struktura oraz silna reakcja desmoplastyczna uniemożliwia tworzenie prawidłowych naczyń poprzez zwiększoną sztywność tkanki. Można obserwować jedynie nieliczne, zapadnięte naczynia. Podobne obserwacje pojawiły się w kilku innych badaniach. Tam, gdzie

dysponowano odpowiednim materiałem wykazano, że naczynia limfatyczne z obrzeża guza można powiązać z występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych<sup>118,119</sup>. We wcześniejszych doniesieniach pojawia się także obserwacja dotycząca tkanki otaczającej guz, w której również można obserwować występowanie licznych, prawidłowych naczyń limfatycznych.

Wczesne przerzuty do węzłów chłonnych są cechą charakterystyczną nowotworu trzustki. Wykazano również, że lifmadenektomia - zabieg usunięcia okolicznych węzłów chłonnych - ma istotny wpływ na przeżycie pacjentów<sup>120</sup>. Wcześniej wykazywano także, że proces limfangiogenezy nie jest konieczny do występowania przerzutów do węzłów chłonnych. Według niektórych badaczy inwazja komórek nowotworowych tą drogą może odbywać się z wykorzystaniem istniejących już wcześniej naczyń limfatycznych<sup>121</sup>. Wykazano również, że ablacja naczyń limfatycznych wewnątrz guza nie ma wpływu na tworzenie się przerzutów do węzłów chłonnych<sup>122</sup>.

Aby zbadać proces limfangiogenezy w guzach trzustki oznaczałam czynnik VEGF C i jego receptor VEGFR3/Flt4. Są to kluczowe elementy w procesie tworzenia naczyń limfatycznych i ich ekspresja była łączona z występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych. W badanych przeze mnie guzach zaobserwowałam ekspresję receptora Flt4 jak i jego ligandu, ale nie przekładało się to na proces tworzenia naczyń. Dzieje się tak zapewne ze względu na silną reakcję desmoplastyczną. Brak było ekspresji markerów Prox1 i podoplaniny w komórkach śródbłonka limfatycznego. Można było zaobserwować ekspresję podoplaniny w komórkach podścieliska. Według wcześniejszych badań wydzielanie tego białka przez fibroblasty jest łączone z gorszym rokowaniem<sup>123</sup>. Prox1 jest czynnikiem, który jest obecny w prawidłowej tkance trzustki, a także jest on niezbędny do jej prawidłowego rozwoju w okresie

embrionalnym<sup>124</sup>. Zahamowanie jego ekspresji prowadzi do przedwczesnego dojrzewania komórek zrazikowych a także nieprawidłowego wykształcenia przewodów trzustkowych<sup>125</sup>. Brak ekspresji Prox-1 jest charakterystyczny dla niektórych nowotworów, sugeruje się nawet, że może być markerem występowania nowotworu<sup>126</sup>. Wysoka ekspresja szeregu czynników wzrostu, które mogą uczestniczyć w procesie limfangiogenezy np. EGF, PDGF- $\beta\beta$  i VEGF C, nie była wystarczająca do powstania nowych naczyń wewnątrz badanych guzów<sup>127,128</sup>.

Obecność prawidłowych naczyń na obrzeżu guza powoduje wzrost ciśnienia przepływu płynu śródmiąższowego, co z kolei oddziałuje na komórki i macierz zewnątrzkomórkową. Zwiększone ciśnienie powoduje aktywację fibroblastów, zwiększoną produkcję kolagenu. Następuje także wzrost ekspresji TGF $\beta$  i modyfikacja odpowiedzi immunologicznej. Czynniki te hamują działania komórek NK, neutrofilów i makrofagów skierowane przeciwko nowotworowi. Na tej podstawie można stwierdzić, że brak prawidłowego unaczynienia guza również może się przyczyniać do rozwoju nowotworu.

## 7. Podsumowanie

1. Poziom ekspresji receptora c-Met zależy od stopnia zróżnicowania guza i wzrasta wraz ze zmniejszającą się dojrzałością histologiczną tkanki ( $p < 0,05$ ).
2. Obecność makrofagów jest zwiększona w guzach dających przerzuty do węzłów chłonnych a także w przypadku występowania inwazji komórek nowotworowych do pni nerwowych.
3. Aktywność metaloproteinaz 2 i 9 zwiększa się w guzach o większej złośliwości, a także w guzach dających przerzuty do węzłów chłonnych. Metaloproteinaza 2 wpływa na rozwój nowotworu od wczesnych etapów jego rozwoju, jej wysoka aktywność wiąże się z większą agresywnością nowotworu ( $p < 0,05$ ). Również aktywność metaloproteinazy 9 wiąże się z bardziej zaawansowanym procesem choroby.
4. Wewnątrz guzów trzustki nie stwierdza się obecności prawidłowych naczyń limfatycznych. Pomimo ekspresji czynników związanych z procesem limfangiogenezy silna reakcja desmoplastyczna uniemożliwia prawidłowe wykształcenie naczyń. Pojedyncze prawidłowe naczynia obserwuje się jedynie na obrzeżu guza.



## 8. Wnioski

1. Ocena ekspresji receptora c-Met może być użytecznym markerem rozwoju raka trzustki.
2. Nacieki makrofagów pozwalają ocenić potencjał inwazyjny gruczolakoraka trzustki. Na podstawie ich obecności w tkance guza można określić prawdopodobieństwo wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych.
3. Oznaczenie aktywności metaloproteinaz 2 i 9 może służyć do oceny progresji nowotworu trzustki, jednak nie może być niezależnym markerem.
4. Limfangiogeneza w guzach trzustki nie ma związku z rozwojem nowotworu trzustki.
5. Obserwacja mikrośrodowiska guzów trzustki może być cennym uzupełnieniem w diagnostyce raka trzustki oraz w planowaniu terapii.

## 9. Bibliografia

- <sup>1</sup> Singh P., Srinivasan R., J. Dev Wig; Major Molecular Markers in Pancretic Ductal Adenocarcinoma and Their Roles in Screening, Diagnosis, Prognosis and Treatment, *Pancreas* 2011; 40: 644-652
- <sup>2</sup> Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 2011; 61:69–90
- <sup>3</sup> Raporty na podstawie danych Centrum Onkologii <http://85.128.14.124/krn/>
- <sup>4</sup> Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Ann of Oncol* 2014; 25:1650-6
- <sup>5</sup> Duell E.J. Epidemiology and Potential Mechanisms of Tobacco Smoking and Heavy Alcohol Consumption in Pancreatic Cancer. *Mol Cancer* 2012; 51: 40–52
- <sup>6</sup> Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393:535–545
- <sup>7</sup> Berrington de Gonzalez A., Sweetland S, Spencer E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer *Br. J. Cancer* 2003; 89:519–523
- <sup>8</sup> Li D, Morris JS, Liu J, Hassan MM, Day RS, Bondy ML, Abbruzzese JL. Body Mass Index and Risk, Age of Onset, and Survival in Patients With Pancreatic Cancer. *JAMA* 2009; 301:2553-2562
- <sup>9</sup> Berrington de González A, Spencer E, Bueno-de-Mesquita H et al. Anthropometry, Physical Activity, and the Risk of Pancreatic Cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:879-885
- <sup>10</sup> Trent D, Magruder J, Elahi D, Andersen D. Diabetes and pancreatic cancer: chicken or egg. *Pancreas* 2011; 40:339-351
- <sup>11</sup> Li D, Yeung SC, Hassan MM, Konopleva M, Abbruzzese JL. Anti-diabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2009; 137:482–488
- <sup>12</sup> Chu CK, Mazo AE, Goodman M, Egnatashvili V, Sarmiento JM, Staley CA, Galloway JR, Adsay NV, Jacobs S, Kooby DA. Preoperative Diabetes Mellitus and Long-Term Survival After Resection of Pancreatic Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2010; 17:502–513
- <sup>13</sup> Raimondi SI, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010; 24:349-58

- <sup>14</sup> Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK Jr, Perrault J, Whitcomb DC. Hereditary Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:442-446
- <sup>15</sup> Korsse SE, Harinck F, van Lier MG, Biermann K, Offerhaus GJ, Krak N, Looman CW, van Veelen W, Kuipers EJ, Wagner A, Dekker E, Mathus-Vliegen EM, Fockens P, van Leerdam ME, Bruno MJ. Pancreatic cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome patients: a large cohort study and implications for surveillance. *J Med Genet* 2013; 50:59–64.
- <sup>16</sup> Maisonneuve P, Marshall BC, Lowenfels AB. Risk of pancreatic cancer in patients with cystic fibrosis. *Gut* 2007; 56:1327-1328
- <sup>17</sup> Herreros-Villanueva M, Hijona E, Bañales JM, Cosme A, Bujanda L. Alcohol consumption on pancreatic diseases. *World J Gastroenterol.* 2013; 19: 638-647
- <sup>18</sup> Tramacere I, Scotti L, Jenab M, Bagnardi V, Bellocco R, Rota M, Corrao G, Bravi F, Boffetta P, La Vecchia C. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *Int. J. Cancer* 2010; 126: 1474–1486
- <sup>19</sup> Hamilton S.R., Aaltonen L.A. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. *IARC Press*, Lyon 2000
- <sup>20</sup> Krzakowski M (red.); Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych. *Polska Unia Onkologii* Gdańsk 2011
- <sup>21</sup> Herreros-Villanueva M, Gironella M, Castells A. Molecular markers in pancreatic cancer diagnosis. *Clinica Chimica Acta* 2013; 418: 22–29
- <sup>22</sup> Talar-Wojnarowska R, Gasiorowska A, Olakowski M, Lekstan A, Lampe P, Malecka-Panas E. Clinical value of serum neopterin, tissue polypeptide-specific antigen and CA19-9 levels in differential diagnosis between pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Pancreatology* 2010; 10:689-94
- <sup>23</sup> Katz MH, Hwang R, Fleming JB, Evans DB; Tumor-Node-Metastasis Staging of Pancreatic Adenocarcinoma. *CA Cancer J Clin* 2008; 58:111–125
- <sup>24</sup> Venkat R, Edil BH, Schulick RD, Lidor AO, Makary MA, Wolfgang CL. Laparoscopic Distal Pancreatectomy Is Associated With Significantly Less Overall Morbidity Compared to the Open Technique. *Annals of Surgery* 2012; 255: 1048-59
- <sup>25</sup> Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, Sutherland S, Schrag D, Hurwitz H, Innocenti F, Mulcahy MF, O'Reilly E, Wozniak TF, Picus J, Bhargava P, Mayer RJ, Schilsky RL, Goldberg RM. Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo

in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303) *J Clin Oncol.* 2010;28:3617-22

<sup>26</sup> Kindler HL, Friberg G, Singh DA, Locker G, Nattam S, Kozloff M, Taber DA, Karrison T, Dachman A, Stadler WM, Vokes EE. Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer *J Clin Oncol.* 2005;23:8033-40

<sup>27</sup> Van Cutsem E, Vervenne WL, Bennouna J, Humblet Y, Gill S, Van Laethem JL, Verslype C, Scheithauer W, Shang A, Cosaert J, Moore MJ. Phase III trial of bevacizumab in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer *J Clin Oncol.* 2009; 1;27:2231-7

<sup>28</sup> Moore MJ, Goldstein D, Hamm J. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group *J Clin Oncol.* 2007; 20;25:1960-6

<sup>29</sup> Yang ZY, Yuan JQ, Di MY, Zheng DY, Chen JZ, Ding H, Wu XY, Huang YF, Mao C, Tang JL. Gemcitabine Plus Erlotinib for Advanced Pancreatic Cancer: A Systematic Review with Meta-Analysis *PLoS ONE* 8: e57528.

<sup>30</sup> Evans DB, Varadhachary GR, Crane CH et al. Preoperative gemcitabine-based chemoradiation for patients with resectable adenocarcinoma of the pancreatic head *J Clin Oncol.* 2008; 26:3496-502

<sup>31</sup> Heinemann V, Haas M, Boeck S. Neoadjuvant treatment of borderline resectable and non-resectable pancreatic cancer. *Annals of Oncology* 2013; 0: 1–8

<sup>32</sup> Conroy T, Desseigne F, Ychou et al. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 2011; 364:1817-25

<sup>33</sup> Al-Batran SE, Geissler M, Seufferlein T, Oettle H. Nab-Paclitaxel for Metastatic Pancreatic Cancer: Clinical Outcomes and Potential Mechanisms of Action *Oncol Res Treat.* 2014;37:128-34

<sup>34</sup> Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med.* 2013 ;369:1691-703

<sup>35</sup> Kalia M. Personalized oncology: Recent advances and future challenges. *Metabolism.* 2013; 62:S11-14

<sup>36</sup> Gnani A, Licchetta A, Scarpa A, Azzariti A, Brunetti AE, Simone G, Nardulli P, Santini D, Aieta M, Delcuratolo S, Silvestris N. Carcinogenesis of Pancreatic Adenocarcinoma: Precursor Lesions *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14: 19731-19762

- <sup>37</sup> Klimstra, D. S. & Longnecker, D. S. K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. *Am. J. Pathol.* 1994; 145:1547–1550
- <sup>38</sup> Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 761–774
- <sup>39</sup> Eser S, Schnieke A, Schneider G, Saur D. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2014; 111:817-22
- <sup>40</sup> Ruggeri BA, Huang L, Wood M, Cheng JQ, Testa JR. Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas *Mol Carcinog* 21:81–86
- <sup>41</sup> Korc M, Chandrasekar B, Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Berger HG. Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J. Clin. Invest.* 1992; 90, 1352–1360
- <sup>42</sup> Hustinx S, Leoni LM, Yeo CJ, Brown PN, Goggins M, Kern SE, Hruban RH, Maitra A. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia:evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod Pathol* 2005;18:959–963
- <sup>43</sup> Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122:135–140
- <sup>44</sup> Wilentz RE, Geradts J, Maynard R, Offerhaus GJ, Kang M, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res.* 1998 ;58:4740-4.
- <sup>45</sup> Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong SM, Yu J, Borges M, Hruban RH, Maitra A, Kinzler K, Vogelstein B, Goggins M. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 2012; 142:730–733
- <sup>46</sup> Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996; 271:350–353
- <sup>47</sup> Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that *DPC4* inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* 2000; 60, 2002–2006

- <sup>48</sup> Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 2008; 321:1801–1806
- <sup>49</sup> Maitra AI, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* 2003;16:902–912
- <sup>50</sup> Cowley MJJ, Chang DK, Pajic M, Johns AL, Waddell N, Grimmond SM, Biankin AV. Understanding pancreatic cancer genomes *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2013; 20:549–556
- <sup>51</sup> Fidler J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:453-8
- <sup>52</sup> Chung HW, Lim JB. Role of the tumor microenvironment in the pathogenesis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014; 21;20:1667-80
- <sup>53</sup> Naora H. Heterotypic Cellular Interactions in the Ovarian Tumor Microenvironment: Biological Significance and Therapeutic Implications. *Front Oncol*. 2014; 4:18
- <sup>54</sup> Shibata D. Cancer. Heterogeneity and Tumor History. *Science* 2012; 336:304-305
- <sup>55</sup> Tod J, Jenei V, Thomas G, Fine D. Tumor-stromal interactions in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2013; 13:1-7
- <sup>56</sup> Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The Role of the IGF System in Cancer Growth and Metastasis: Overview and Recent Insights *Endocrine Reviews* 2007; 28:20–47
- <sup>57</sup> Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11:834-48
- <sup>58</sup> Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 26:188-202
- <sup>59</sup> Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD, Stanger BZ. EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation. *Cell* 2012; 148:349–361
- <sup>60</sup> Qian BZ, Pollard J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010; 141:39-51
- <sup>61</sup> Pollard J. W. Tumour-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:71-78

- <sup>62</sup> Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling. *J Pathol* 2013; 229:176–185
- <sup>63</sup> Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets *Nat Rev Immunol.* 2011; 11:723-37
- <sup>64</sup> Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity *Nat Rev Immunol.* 2011; 11:519-31
- <sup>65</sup> Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- $\beta$ : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 2009;16:183–194
- <sup>66</sup> Yamashita J, Ogawa M, Shirakusa T. Free-form neutrophil elastase is an independent marker predicting recurrence in primary breast cancer. *J Leukoc Biol.* 1995; 57:375-8
- <sup>67</sup> Egebal M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression, *Nature Rev Cancer* 2002; 2:161-174
- <sup>68</sup> Gialeli Ch., Theocharis A, Karamanos. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS Journal* 2011; 278:16–27
- <sup>69</sup> Sullu Y, Demirag GG, Yildirim A, Karagoz F, Kandemir B. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. *Pathol Res Pract* 2011 ; 207:747-53
- <sup>70</sup> Koyama H, Iwata H, Kuwabara Y, Iwase H, Kobayashi S, Fujii Y. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oesophageal carcinoma; a study using in situ zymography; *Eur J Cancer.* 2000; 36:2164-70
- <sup>71</sup> Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, Hendler SF, Menke A, Boeck W, Wagner M, Wilda M, Friess H, Büchler M, Adler G, Gress TM. Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Int J Cancer* 2000; 85:14-20
- <sup>72</sup> Jones LE, Humphreys MJ, Campbell F, Neoptolemos JP, Boyd MT. Comprehensive Analysis of Matrix Metalloproteinase and Tissue Inhibitor Expression in Pancreatic Cancer: Increased Expression of Matrix Metalloproteinase-7 Predicts Poor Survival. *Clin. Cancer Res* 2004; 10:2832-45.
- <sup>73</sup> Lee K, Park do J, Choe G, Kim HH, Kim WH, Lee HS. Increased intratumoral lymphatic vessel density correlates with lymph node metastasis in early gastric carcinoma *Ann Surg Oncol* 2010; 17:73 – 80

- <sup>74</sup> *Straume O, Jackson DG, Akslen LA.* Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9:250 – 256
- <sup>75</sup> *Stańczyk M., Olszewski W.L., Gewartowska M., Domaszewska – Szostek A.* Lack of functioning lymphatics and accumulation of tissue fluid/lymph in interstitial "lakes" in colon cancer tissue, *Lymphology* 2010; 43:158 – 167
- <sup>76</sup> *Di Renzo MF, Poulsom R, Olivero M, Comoglio PM, Lemoine NR.* Expression of the Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor in Human Pancreatic Cancer *Cancer Res* 1995;55:1129-1138
- <sup>77</sup> *Zhu GH, Huang C, Qiu ZJ, Liu J, Zhang ZH, Zhao N, Feng ZZ, Lv XH.* Expression and prognostic significance of CD151, c-Met, and integrin alpha3/alpha6 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig Dis Sci.* 2011; 56:1090–1098
- <sup>78</sup> *Birchmeier C, Gherardi E.* Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* 1998; 8:404-10
- <sup>79</sup> *Ide T, Kitajima Y, Miyoshi A, Ohtsuka T, Mitsuno M, Ohtaka K, Koga Y, Miyazaki K.* Tumor-stromal cell interaction under hypoxia increases the invasiveness of pancreatic cancer cells through the hepatocyte growth factor/c-Met pathway. *Int J Cancer.* 2006;119:2750-9.
- <sup>80</sup> *Navab R, Liu J, Seiden-Long I, Shih W, Li M, Bandarchi B, Chen Y, Lau D, Zu YF, Cescon D, Zhu CQ, Organ S, Ibrahimov E, Ohanessian D, Tsao MS.* Co-overexpression of Met and Hepatocyte Growth Factor Promotes Systemic Metastasis in NCI-H460 Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells, *Neoplasia* 2009; 11: 1292–1300
- <sup>81</sup> *Koong AC, Mehta VK, Le QT, Fisher GA, Terris DJ, Brown JM, Bastidas AJ, Vierra M.* Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000, 48:919-22
- <sup>82</sup> *Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G.* Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nature Reviews Cancer* 2012; 12, 89-103
- <sup>83</sup> *Ide T, Kitajima Y, Miyoshi A, Ohtsuka T, Mitsuno M, Ohtaka K, Miyazaki K.* The hypoxic environment in tumor-stromal cells accelerates pancreatic cancer progression via the activation of paracrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling. *Ann Surg Oncol.* 2007;14:2600-7



- <sup>84</sup> Sennino BI, Ishiguro-Oonuma T, Schriver BJ, Christensen JG, McDonald DM. Inhibition of c-Met Reduces Lymphatic Metastasis in RIP-Tag2 Transgenic Mice *Cancer Res* 2013;73:3692-3703.
- <sup>85</sup> Li C, Wu JJ, Hynes M, Dosch J, Sarkar B, Welling TH, Pasca di Magliano M, Simeone DM. c-Met is a marker of pancreatic cancer stem cells and therapeutic target. *Gastroenterology*. 2011;141:2218-2227.e5.
- <sup>86</sup> Jahangiri A, De Lay M, Miller LM, Carbonell WS, Hu YL, Lu K, Tom MW, Paquette J, Tokuyasu TA, Tsao S, Marshall R, Perry A, Bjorgan KM, Chaumeil MM, Ronen SM, Bergers G, Aghi MK. Gene expression profile identifies tyrosine kinase c-Met as a targetable mediator of antiangiogenic therapy resistance. *Clin Cancer Res*. 2013;19:1773-83
- <sup>87</sup> Chen CT, Kim H, Liska D, Gao S, Christensen JG, Weiser MR. MET activation mediates resistance to lapatinib inhibition of HER2-amplified gastric cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2012;11:660-9
- <sup>88</sup> Okazaki T, Javle M, Tanaka M, Abbruzzese JL, Li D. Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity. *Clin Cancer Res*. 2010;16:320-9.
- <sup>89</sup> Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yamada T, Koizumi H, Nakamura T, Matsumoto K, Mukaida N, Nishioka Y, Sone S, Nakagawa T, Uenaka T, Yano S. Met kinase inhibitor E7050 reverses three different mechanisms of hepatocyte growth factor-induced tyrosine kinase inhibitor resistance in EGFR mutant lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18:1663-71
- <sup>90</sup> Avan A, Caretti V, Funel N, Galvani E, Maftouh M, Honeywell RJ, Lagerweij T, Van Tellingen O, Campani D, Fuchs D, Verheul HM, Schuurhuis GJ, Boggi U, Peters GJ, Würdinger T, Giovannetti E. Crizotinib Inhibits Metabolic Inactivation of Gemcitabine in c-Met–driven Pancreatic Carcinoma *Cancer Res*; 2013; 73: 6745–56.
- <sup>91</sup> Lennerz JK, Kwak EL, Ackerman A, Michael M, Fox SB, Bergethon K, Lauwers GY, Christensen JG, Wilner KD, Haber DA, Salgia R, Bang YJ, Clark JW, Solomon BJ, Iafrate AJ. MET amplification identifies a small and aggressive subgroup of esophagogastric adenocarcinoma with evidence of responsiveness to crizotinib. *J Clin Oncol*. 2011;29:4803-10
- <sup>92</sup> Rodig S, Sequist L, Schiller J.H. An exploratory biomarker analysis evaluating the effect of the c-MET inhibitor tivantinib (ARQ 197) and erlotinib in NSCLC patients in a

randomized, double-blinded phase 2 study Proceedings of the 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2012; Chicago, IL. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2012;72(8 Suppl):Abstract nr 1729. doi:1538-7445.AM2012-1729

<sup>93</sup> Oliner K, Tang R, Anderson A, Lan Y, Iveson T, Donehower R, Jiang Y, Dubey S, Loh E. Evaluation of MET pathway biomarkers in a phase II study of rilotumumab (R, AMG 102) or placebo (P) in combination with epirubicin, cisplatin, and capecitabine (ECX) in patients (pts) with locally advanced or metastatic gastric (G) or esophagogastric junction (EGJ) cancer *J Clin Oncol* 30, 2012 (suppl; abstr 4005)

<sup>94</sup> Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):46-54

<sup>95</sup> Esposito I, Menicagli M, Funel N, Bergmann F, Boggi U, Mosca F, Bevilacqua G, Campani D. Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2004; 57:630-6

<sup>96</sup> Puolakkainen P, Koski A, Vainionpää S, Shen Z, Repo H, Kemppainen E, Mustonen H, Seppänen H. Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer*. 2012;12:35.

<sup>97</sup> Puolakkainen P, Koski A, Vainionpää S, Shen Z, Repo H, Kemppainen E, Mustonen H, Seppänen H. Anti-inflammatory macrophages activate invasion in pancreatic adenocarcinoma by increasing the MMP9 and ADAM8 expression. *Med Oncol*. 2014;31:884.

<sup>98</sup> Kurahara H, Takao S, Maemura K, Mataka Y, Kuwahata T, Maeda K, Sakoda M, Iino S, Ishigami S, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S. M2-polarized tumor-associated macrophage infiltration of regional lymph nodes is associated with nodal lymphangiogenesis and occult nodal involvement in pancreatic cancer. *Pancreas*. 2013 42:155-9.

<sup>99</sup> Demir IE, Friess H, Ceyhan GO. Nerve-cancer interactions in the stromal biology of pancreatic cancer. *Front Physiol*. 2012;3:97

<sup>100</sup> Cavel OI, Shomron O, Shabtay A, Vital J, Trejo-Leider L, Weizman N, Krelin Y, Fong Y, Wong RJ, Amit M, Gil Z. Endoneurial macrophages induce perineural invasion of pancreatic cancer cells by secretion of GDNF and activation of RET tyrosine kinase receptor. *Cancer Res*. 2012; 72:5733-43

<sup>101</sup> Tewari N, Zaitoun AM, Arora A, Madhusudan S, Ilyas M, Lobo DN. The presence of tumour-associated lymphocytes confers a good prognosis in pancreatic ductal

adenocarcinoma: an immunohistochemical study of tissue microarrays. *BMC Cancer* 2013; 13:436

<sup>102</sup> *RH Vonderheide, LJ Bayne.* Inflammatory networks and immune surveillance of pancreatic carcinoma *Curr Opin Immunol* 2013; 25:200–205

<sup>103</sup> *Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y, Hiraoka N.* Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 2013; 108, 914–923

<sup>104</sup> *Reid MD, Basturk O, Thirabanjasak D, Hruban RH, Klimstra DS, Bagci P, Altinel D, Adsay V.* Tumor-infiltrating neutrophils in pancreatic neoplasia. *Mod Pathol.* 2011; 24: 1612–1619

<sup>105</sup> *Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, Stolz DB, Land SR, Marconcini LA, Kliment CR, Jenkins KM, Beaulieu KA, Mouded M, Frank SJ, Wong KK, Shapiro SD.* Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nature Med.* 2010; 16:219–223

<sup>106</sup> *Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, André P, Dieu-Nosjean MC, Alifano M, Régnard JF, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Cremer I.* Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res.* 2011; 71:5412–5422

<sup>107</sup> *Halama N, Braun M, Kahlert C, Spille A, Quack C, Rahbari N, Koch M, Weitz J, Kloor M, Zoernig I, Schirmacher P, Brand K, Grabe N, Falk CS.* Natural killer cells are scarce in colorectal carcinoma tissue despite high levels of chemokines and cytokines. *Clin. Cancer Res.* 2011;17: 678–689

<sup>108</sup> *Ménard C, Blay JY, Borg C, Michiels S, Ghiringhelli F, Robert C, Nonn C, Chaput N, Taïeb J, Delahaye NF, Flament C, Emile JF, Le Cesne A, Zitvogel L.* Natural killer cell IFN- $\gamma$  levels predict long-term survival with imatinib mesylate therapy in gastrointestinal stromal tumor-bearing patients. *Cancer Res.* 2009; 69:3563–3569

<sup>109</sup> *Qin Y, Liu XJ, Li L, Liu XJ, Li Y, Gao RJ, Shao RG, Zhen YS.* MMP-2/9-oriented combinations enhance antitumor efficacy of EGFR/HER2-targeting fusion proteins and gemcitabine. *Oncol Rep.* 2014;32:121-30

<sup>110</sup> *Chen J, Chen LJ, Zhou HC, Yang RB, Lu Y, Xia YL, Wu W, Hu LW.* Prognostic value of matrix metalloproteinase-9 in gastric cancer: a meta-analysis. *Hepatogastroenterology.* 2014;61:518-24.

- <sup>111</sup> Min KW, Kim DH, Do SI, Kim K, Lee HJ, Chae SW, Sohn JH, Pyo JS, Oh YH, Kim WS, Lee SY, Oh S, Choi SH, Park YL, Park CH. Expression patterns of stromal MMP-2 and tumoural MMP-2 and -9 are significant prognostic factors in invasive ductal carcinoma of the breast. *APMIS*. 2014. doi: 10.1111/apm.12285.
- <sup>112</sup> Ekinci T, Ozbay PO, Yiğit S, Yavuzcan A, Uysal S, Soylu F. The correlation between immunohistochemical expression of MMP-2 and the prognosis of epithelial ovarian cancer. *Ginekol Pol*. 2014;85:121-30.
- <sup>113</sup> Poczynicz A, Guzińska-Ustymowicz K, Dymicka-Piekarska V, Czyżewska J, Kemon A. Expression of matrix metalloproteinase 9 in pancreatic ductal carcinoma is associated with tumor metastasis formation. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45:37-40.
- <sup>114</sup> Matsuyama Y, Takao S, Aikou T. Comparison of Matrix Metalloproteinase Expression Between Primary Tumors With or Without Liver Metastasis in Pancreatic and Colorectal Carcinomas. *J Surg Oncol* 2002; 80: 105-10.
- <sup>115</sup> Yokoyama M, Ochi K, Ichimura M, Mizushima T, Shinji T, Koide N, Tsurumi T, Hasuoka H, Harada M. Matrix Metalloproteinase-2 in Pancreatic Juice for Diagnosis of Pancreatic Cancer. *Pancreas* 2002; 24: 344-47.
- <sup>116</sup> Juuti A, Lundin J, Nordling S, Louhimo J, Haglund C. Epithelial MMP-2 expression correlates with worse prognosis in pancreatic cancer. *Oncology*. 2006;71:61-8.
- <sup>117</sup> Lekstan A, Lampe P, Lewin-Kowalik J, Olakowski M, Jablonska B, Labuzek K, Jedrzejowska-Szypulka H, Olakowska E, Gorka D, Filip I, Dranka-Bojarowska D. Concentrations and activities of metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors (TIMPS) in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *J Physiol Pharmacol*. 2012;63:589-99.
- <sup>118</sup> Kurahara H, Takao S, Shichi H, Maemura K, Mataka Y, Sakoda M, Hayashi T, Kuwahata T, Minami K, Ueno S, Natsugoe S. Significance of lymphangiogenesis in primary tumor and draining lymph nodes during lymphatic metastasis of pancreatic head cancer. *J Surg Oncol* 2010; 102:809 – 815
- <sup>119</sup> Sipos B, Kojima M, Tiemann K, Klapper W, Kruse ML, Kalthoff H, Schniewind B, Tepel J, Weich H, Kerjaschki D, Klöppel G. Lymphatic spread of ductal pancreatic adenocarcinoma is independent of lymphangiogenesis. *J Pathol* 2005; 207:301 – 312
- <sup>120</sup> Fujii T. Extended lymphadenectomy in pancreatic cancer is crucial. *World J Surg*. 2013;37(8):1778-81

- <sup>121</sup> Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK. Lymphatic Metastasis in the Absence of Functional Intratumor Lymphatics. *Science*, 2002; 296, 1883
- <sup>122</sup> Wong SY, Haack H, Crowley D, Barry M, Bronson RT, Hynes RO. Tumor-Secreted Vascular Endothelial Growth Factor-C Is Necessary for Prostate Cancer Lymphangiogenesis, but Lymphangiogenesis Is Unnecessary for Lymph Node Metastasis. *Cancer Res* 2005;65:9789-9798.
- <sup>123</sup> Shindo K, Aishima S, Ohuchida K, Fujiwara K, Fujino M, Mizuuchi Y, Hattori M, Mizumoto K, Tanaka M, Oda Y. Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts enhances tumor progression of invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Mol Cancer*. 2013; 12:168
- <sup>124</sup> Elsir T, Smits A, Lindström MS, Nistér M. Transcription factor PROX1: its role in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31:793-805.
- <sup>125</sup> Westmoreland JJ, Kilic G, Sartain C, Sirma S, Blain J, Rehg J, Harvey N, Sosa-Pineda B. Pancreas-specific deletion of Prox1 affects development and disrupts homeostasis of the exocrine pancreas. *Gastroenterology*. 2012; 142:999-1009.
- <sup>126</sup> Miettinen M, Wang ZF. Prox1 transcription factor as a marker for vascular tumors- evaluation of 314 vascular endothelial and 1086 nonvascular tumors. *Am J Surg Pathol*. 2012; 36:351-9
- <sup>127</sup> Bracher A, Cardona AS, Tauber S, Fink AM, Steiner A, Pehamberger H, Niederleithner H, Petzelbauer P, Gröger M, Loewe R. Epidermal growth factor facilitates melanoma lymph node metastasis by influencing tumor lymphangiogenesis. *J. Invest. Dermatol*. 2013; 133: 230–238.
- <sup>128</sup> Miyazaki H, Yoshimatsu Y, Akatsu Y, Mishima K, Fukayama M, Watabe T, Miyazono K. Expression of platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  is maintained by Prox1 in lymphatic endothelial cells and is required for tumor lymphangiogenesis. *Cancer Sci*. 2014;105:1116-23

## 10. Streszczenie

Rak trzustki jest czwartym co do częstości nowotworem występującym zarówno u kobiet jak i u mężczyzn. Tylko 10% przypadków nowotworów trzustki występuje u osób poniżej 55 roku życia, średni wiek diagnozy to 71 lat. W Polsce w ciągu ostatnich dziesięciu lat liczba zgonów spowodowanych rakiem trzustki zwiększyła się o 29%. Według najnowszej analizy przeprowadzonej przez WHO rak trzustki jest jedynym z dwóch nowotworów, w przypadku których śmiertelność będzie w najbliższych latach wzrastać. Prowadzone dotychczas badania wyjaśniły wiele procesów związanych z tym nowotworem, jednak nadal brak wiarygodnych markerów, które umożliwiłyby monitorowanie rozwoju tego nowotworu. Taki marker pozwalałby także na określenie dokładnego stopnia zaawansowania choroby i właściwego doboru terapii, a w przypadku guzów o granicznej resekcyjności wskazywałyby także na zasadność zabiegów chirurgicznych.

W stosowanej obecnie ocenie histopatologicznej nowotworu trzustki biologia guza jest określana za pomocą stopnia zróżnicowania histologicznego G, jednak nie oddaje on właściwego obrazu procesów zachodzących między komórkami nowotworowymi a ich otoczeniem.

W ostatnich latach dużo uwagi poświęca się badaniom mikrośrodowiska guzów litych. Obserwacje te pozwoliły wyjaśnić wiele procesów zachodzących w czasie rozwoju nowotworu. Zmiany zachodzące w takim mikrośrodowisku powodują, że może to być bogate źródło informacji zarówno diagnostycznych jak i prognostycznych.

Celem pracy była ocena następujących elementów mikrośrodowiska raka trzustki: wytwarzania czynników wzrostu, komórek nacieku zapalnego, lokalnej aktywności enzymatycznej a także procesu limfangiogenezy. Następnie określono zależność kliniczno-patologicznego stopnia zaawansowania nowotworu od ocenianych czynników.

Materiał do badań stanowiły fragmenty ogniska pierwotnego pobrane od 36 pacjentów. Grupa chorych składała się z 14 kobiet i 22 mężczyzn, średni wiek wynosił 66 lat (przedział wiekowy 48-85 lat).

Nasze badania wykazały wysoką ekspresję badanych czynników wzrostu i ich receptorów: EGF i EGFR, FGF2, FGF7, IGF1 i IGF-IR, PDGF-BB, HGF $\alpha$  i c-Met.

Jedynie w przypadku receptora c-Met wykazano, że poziom jego ekspresji zależy od stopnia zróżnicowania guza i wzrasta wraz ze zmniejszającą się dojrzałością histologiczną tkanki ( $p < 0,05$ ).

W badanych guzach można było zaobserwować liczne nacieki limfocytów oraz makrofagów. Obecne były również neutrofile, natomiast brak było komórek NK. Analiza wykazała, że obecność makrofagów jest zwiększona w guzach dających przerzuty do węzłów chłonnych a także w przypadku występowania inwazji komórek nowotworowych do pni nerwowych.

Za pomocą zymografii żelowej i zymografii in situ określono aktywność metaloproteinazy 2 i 9. Aktywność tych enzymów zwiększa się w guzach o większej złośliwości, a także w guzach dających przerzuty do węzłów chłonnych.

Metaloproteinaza 2 uczestniczy w rozwoju nowotworu od wczesnych etapów jego rozwoju, jej wysoka aktywność wiąże się z większą agresywnością nowotworu ( $p < 0,05$ ).

Również aktywność metaloproteinazy 9 wiąże się z bardziej zaawansowanym procesem choroby.

Wewnątrz guzów trzustki nie można stwierdzić obecności prawidłowych naczyń limfatycznych. Pomimo ekspresji czynników związanych z procesem limfangiogenezy silna reakcja desmoplastyczna uniemożliwia prawidłowe wykształcenie naczyń.

Pojedyncze prawidłowe naczynia można obserwować jedynie na obrzeżu guza.

Na podstawie naszych badań można stwierdzić, że obserwacja mikrośrodowiska raka trzustki stanowi cenne uzupełnienie oceny kliniczno-patologicznej. Szczególnie takie elementy jak poziom ekspresji receptora c-Met, liczba naciekających makrofagów czy aktywność metaloproteinazy 2 mogą być użyteczne w określeniu agresywności nowotworu i jego potencjału inwazyjnego.



## **11. Abstrakt:**

Pancreatic cancer is the fourth most common cancer occurring both in women and men. Only 10% of pancreatic cancer cases occur in people under 55 years of age, the average age of diagnosis is 71 years. In Poland, in the past ten years, the number of deaths from pancreatic cancer was increased by 29%. According to the latest WHO analysis cancer of the pancreas is one of the two cancers for which the mortality rate will rise in the next few years. The studies that have been made during last twenty years have clarified many of the processes associated with this cancer, but still no reliable markers were nominated that would allow monitoring of the development of this cancer. Such a marker would also allow to determine the exact stage of the disease and the proper selection of therapy, and in the case of borderline tumors also indicate the legitimacy of surgical procedures. In the currently used histopathological evaluation of the tumor, biology of pancreatic cancer is determined by the histological grade G, but it does not reflect a correct picture of the processes occurring between tumor cells and their environment. In recent years, much attention is paid to research of solid tumors microenvironment. These observations helped explain many of the processes of cancer development and progression. Tumor microenvironment can be a valuable source of information for both diagnostic and prognostic purposes. The aim of the study was to evaluate the following elements of the microenvironment of pancreatic cancer: the expression of growth factors, infiltrating inflammatory cells, local enzymatic activity as well as the process of lymphangiogenesis. Then the dependence of clinical and pathological staging of the assessed factors was determined. Pancreatic tumor tissue samples were collected from 36 patients who underwent surgical resection due to pancreatic cancer. Tissues were collected based on the protocol approved by the Bioethics Committee of Warsaw Medical University. Tumors were classified

according to TNM staging and tumor grade. Group of patients consisted of 14 women and 22 men, mean age was 66 years (age range 48-85 years).

Our research showed high expression of the chosen growth factors and their receptors: EGF and EGFR, FGF2, FGF7, IGF-1 and IGF-IR, PDGF-BB, HGF $\alpha$  and c-Met. Only in the case of c-Met receptor it has been shown that the level of expression depends on the grade of differentiation of the tumor and increases with decreasing differentiation of tumor tissue ( $p < 0.05$ ).

In the studied tumors numerous infiltrates of lymphocytes and macrophages could be observed. Neutrophils were also present, however, there was no NK cells. Analysis showed that the presence of macrophages is increased in tumors giving metastasis to lymph nodes and in the case of the perineural invasion of cancer cells.

Using gel zymography and in situ zymography activity metalloproteinase 2 and 9 was determined. The activity of the enzymes increases with higher grade tumors and in tumors giving metastasis to lymph nodes. Metalloproteinase 2 is involved in tumor formation from the early stages of its development, the high activity associated with a more aggressive tumor ( $p < 0.05$ ). Also the activity of metalloproteinase 9 was associated with more advanced disease process.

Inside pancreatic tumors the presence of normal lymphatic vessels cannot be determined. Despite the expression of growth factors related to the process of lymphangiogenesis strong desmoplastic reaction prevents formation of vessels. Single, proper lymphatic vessels might be seen at the edge of the tumor.

Based on our research it can be said that evaluation of pancreatic tumor environment is valuable complement of clinical rating of tumor. Particularly such elements like the expression level of c-Met, the number of infiltrating macrophages or activity of

metalloproteinase 2 may be useful in determination of the aggressiveness of the tumor and its invasive potential.