UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

LEKARZ SYLWIA SZCZEPANIEC

Rola genów *βKlotho, FGF21* oraz *FGFR1* w raku błony śluzowej trzonu macicy.

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Łódź 2017

PROMOTOR

prof. dr hab. n. med. Andrzej Bieńkiewicz

Oddział Kliniczny Ginekologii Onkologicznej

II Katedra Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

**STRESZCZENIE**

 Wprowadzenie: Rak endometrium jest według światowych statystyk najczęstszym spośród nowotworów ginekologicznych. W Polsce w roku 2013 zachorowało na ten nowotwór 5706 kobiet a zmarły z tej przyczyny 1243 pacjentki. Porównując do roku 2011 kiedy stwierdzono 5251 nowych zachorowań i 1085 zgonów, obserwuje się ciągle rosnącą zachorowalność i umieralność. Wśród czynników ryzyka zachorowania na raka endometrium wyróżnia się wiek, w szczególności szósta dekada życia, wczesny wiek menarche oraz późny wiek menopauzy, nierództwo, cykle bezowulacyjne i przewlekłą zwiększoną podaż estrogenów w wyniku chorób nowotworowych (ziarniszczak, otoczkowiak ) lub długotrwałej niezrównoważonej progesteronem terapii estrogenami. Ponadto niezależnymi czynnikami ryzyka są otyłość, cukrzyca, inne zaburzenia metaboliczne oraz czynniki środowiskowe. Coraz więcej uwagi poświęca się roli czynników genetycznych w rozwoju raka endometrium. Jak dotąd nie wynaleziono badania, które spełniałoby kryteria skriningu i diagnostyka nadal opiera się głównie na zgłaszanych przez pacjentki dolegliwościach. Leczenie przede wszystkim ma charakter operacyjny i jego zakres oraz rokowanie dla każdej pacjentki zależy od zaawansowania klinicznego w jakim rozpoznano chorobę.

Czynniki wzrostu fibroblastów (ang. fibroblast growth factor - FGF) oraz ich receptory (ang. fibroblast growth factor receptor - FGFR), odgrywają istotną rolę w przebiegu wielu procesów komórkowych. Odpowiadają za proliferację, różnicowanie, przeżywalność i migrację komórek. Uczestniczą także w procesach angiogenezy i gojenia się ran u osób dorosłych. Zaburzenia sygnalizacji na szlaku FGF/FGFR prowadzić mogą do powstania wielu stanów patologicznych, w tym nowotworów. Nieprawidłową ekspresję receptorów FGFR, ich ligandów i koreceptorów z grupy białek Klotho, a także mutacje w kodujących je genach, wykazano m.in. w przypadku raka prostaty, pęcherza moczowego, płuc czy raka żołądka Na przestrzeni ostatnich lat dowiedziono również, że zaburzenia te, mogą stanowić istotny element w rozwoju nowotworów piersi, jajnika i endometrium.

 Cele i założenia pracy: Celem pracy jest ocena zależności między cechami kliniczno – patologicznymi raka endometrium a zakresem wartości ekspresji genów *βKlotho, FGF21* oraz *FGFR1*.

 Materiał: Badany materiał stanowiły tkanki guza nowotworowego endometrium, pobrane od 138 pacjentek leczonych operacyjnie w Oddziale Klinicznym Ginekologii Onkologicznej II Katedry Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Do niniejszego badania włączone zostały pacjentki chore na raka trzonu macicy, zakwalifikowane do leczenia chirurgicznego. Wybór leczenia i zakresu operacji dokonywany był na podstawie badania histopatologicznego materiału tkankowego pobranego przed operacją z jamy macicy oraz kwalifikacji dokonywanej przez lekarza prowadzącego a udział w niniejszym badaniu nie miał żadnego wpływu na decyzje terapeutyczne. Standardową procedurą jest przekazywanie wyciętych podczas operacji narządów i tkanek do badania histopatologicznego. Dodatkowo, u pacjentek które wyraziły zgodę na proponowane badanie, część tkanek pobranych podczas operacji, poddanych zostało kolejnym badaniom laboratoryjnym o charakterze genetycznym. Fragment materiału tkankowego uzyskany w czasie operacji był umieszczany w sterylnych pojemnikach z preparatem RNA Later (Sigma Aldrich) w celu zabezpieczenia materiału genetycznego komórek przed degradacją. Wraz z materiałem rejestrowane były podstawowe informacje dotyczące chorej tj. wiek, waga, wzrost, wywiad rodzinny dotyczący historii występowania nowotworów i ewentualnej chemio- czy radioterapii oraz wyniki standardowych oznaczeń biochemicznych i histopatologicznych.

 Metody: Analiza poziomu ekspresji genów *βKlotho*, *FGF21 i FGFR1* w nowotworowo zmienionej tkance endometrium odbywała się według protokołu obejmującego kolejno: izolowanie RNA, reakcję odwrotnej transkrypcji, reakcję PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym. Uzyskane wyniki analizowano statystycznie w odniesieniu do parametrów kliniczno-patologicznych badanego materiału. Do oceny statystycznej istotności obserwowanych zależności stosowano test niezależności chi-kwadrat. W przypadkach, gdzie założenia do wspomnianego testu nie były spełnione (liczebność przynajmniej jednego pola niższa niż 5), stosowano test Fishera dla tablic czteropolowych. Za zależności statystycznie istotne uznawano takie, dla których poziom istotności p dla wspomnianych testów był niższy od 0,05. Obliczenia statystyczne oraz wykresy zostały wykonane przy wykorzystaniu pakietu statystycznego STATISTICA12 firmy StatSoft na licencji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

 Wnioski: Istnieje silna zależność między ekspresją genów *βKlotho, FGF21 i FGFR1* a stopniem zaawansowania klinicznego FIGO. Większe wartości ekspresji wszystkich genów korelowały z niższym stopniem zaawansowania klinicznego wg FIGO. Istnieje silna zależność między ekspresją genów *βKlotho i FGFR1* a stopniem zróżnicowania histologicznego i obecnością przerzutów raka endometrium do węzłów chłonnych. Większe wartości ekspresji tych genów korelowały z występowaniem wysokozróżnicowanego raka endometrium (G1). Niższe wartości ekspresji tych genów korelowały z występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych. Stwierdzono brak zależności między ekspresją genu *FGF21* a obecnością przerzutów raka endometrium do węzłów chłonnych.

**Abstract**

Introduction: Endometrial cancer is the most common gynecological tumor according to global statistics. In Poland in 2013, 5706 women were diagnosed with endometrial cancer and 1243 patients died. Comparing to 5251 new cases and 1085 deaths in 2011, there is an ever-growing morbidity and mortality. Among the risk factors for endometrial cancer is the age, especially the sixth decade of life, early menarche age and late menopause, atypical, unvulpic cycles and chronic increased estrogen supply due to cancer (granulomatous encephalopathy) or long-term unbalanced estrogen therapy progesterone. In addition, independent risk factors are obesity, diabetes, other metabolic disorders and environmental factors. More and more attention is paid to the role of genetic factors in the development of endometrial cancer. So far, no study has been developed that meets the criteria for screening and diagnostics is still based primarily on patient complaints. Treatment is primarily of an operational nature and its scope and prognosis for each patient depends on the clinical stage in which the disease is diagnosed.

 Fibroblast growth factor (FGF) and fibroblast growth factor (FGFR), play an important role in many cellular processes. They are responsible for the proliferation, differentiation, survival and migration of cells. They also participate in the processes of angiogenesis and wound healing in adults. Signal dysfunction on the FGF / FGFR pathway can lead to many pathological conditions, including cancers. The abnormal expression of FGFR receptors, their ligands and co-receptors in the Klotho group, as well as mutations in their coding genes, have been reported for prostate, bladder, lung or gastric cancer. In recent years it has also been shown that these disorders can be an important factor in the development of breast, ovarian and endometrial cancer.

 The aim of the study: The aim of the study is to evaluate the relationship between clinical and pathological features of endometrial cancer and the range of expression values of βKlotho, FGF21 and FGFR1.

 Materials: The study material was composed of endometrium tumor tissue, collected from 138 patients treated surgically at the Department of Gynecology Gynecology II Department of Gynecology and Obstetrics Medical University of Lodz. This study included patients with endometrial cancer who were enrolled for surgery. The choice of treatment and scope of surgery was based on the histopathological examination of the tissue obtained prior to the operation from the uterine cavity and the qualification performed by the attending physician, and participation in this study had no influence on the therapeutic decision. The standard procedure is the transmission of histopathological findings to organs and tissues cut during surgery. In addition, in patients who agreed to the proposed study, some of the tissues taken during surgery were subjected to further laboratory tests of a genetic nature. The tissue piece obtained during the operation was placed in sterile RNA Later containers (Sigma Aldrich) to protect the genetic material of the cells from degradation. Along with the material were recorded basic information about the patient, ie age, weight, height, family history of cancer and possible chemotherapy and the results of standard biochemical and histopathological markers.

 Methods: Analysis of the expression levels of the βKlotho, FGF21 and FGFR1 genes in tumor-altered endometrial tissue was followed by a protocol comprising sequentially RNA isolation, reverse transcription, PCR and real-time product growth. The obtained results were analyzed statistically with respect to the clinical-pathological parameters of the examined material. The chi-squared independence test was used to evaluate the significance of observed relationships. In cases where the assumptions for the above test were not met (the number of fields is less than 5), the Fisher test for four-pole tables was used. Significant relationships were considered for which the significance level p for these tests was less than 0.05. Statistical calculations and graphs were made using STATISTICA12 statistical package from StatSoft under license of Medical University of Lodz.

 Conclusion: There is a strong correlation between the expression of the βKlotho, FGF21 and FGFR1 genes and the FIGO clinical stage. Larger expression values of all genes correlated with the lower clinical stage of FIGO. There is a strong correlation between gene expression and βKlotho FGFR1 and the degree of histological differentiation and metastatic endometrial cancer to lymph nodes. Larger expression values of these genes correlated with highdifferentiated endometrial cancer (G1). The lower expression values of these genes correlated with the occurrence of lymph node metastases. There was no correlation between expression of FGF21 gene and endometrial carcinoma of lymph nodes.