



## Општи подаци и протокол истраживања

**Назив Пројекта :** КОРЕЛАЦИЈА ЛОКАЛНЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ТИМИДИЛАТ-СИНТАЗЕ И ЕНДОГЛИНА (CD 105) И СИСТЕМСКИХ ВРЕДНОСТИ ЕНДОГЛИНА И TGF- $\beta$  У БОЛЕСНИКА СА КОЛОРЕКТАЛНИМ КАРЦИНОМОМ

**Кључне речи :** колоректални карцином, тимидилат-синтаза, ендоглин (CD 105), TGF-  $\beta$

## Предмет, садржај и циљ истраживања

### Сажетак

Према подацима из најновије Globocan базе података од 2008 (доступна на интернету од јуна 2010-те године) колоректални карцином (CRC) се по инциденци обољевања налази на трећем месту код мушкараца (иза карцинома плућа и простате), а на другом месту код жена (иза карцинома дојке).

Предмет истраживања ове студије је утврђивање значаја корелације клиничко - морфолошких параметара и нивоа локалне експресије тимидилат-синтазе (ТС) и ендоглина (CD 105), системских вредности ендоглина (CD 105) и TGF-а са патохистолошким карактеристикама, макроскопским манифестацијама, локализацијом, полом, старосном доби у болесника са CRC, у циљу изналажења фактора који би могли да предвиде туморски одговор на примењену терапију и тиме се омогући индивидуализација третмана и циљана антитуморска терапија.

Истраживање ће бити спроведено као клиничко-експериментална студија која ће обухватити патохистолошки материјал 128 пацијената након хируршке ресекције, серум крви 40 пацијената, преоперативно и 20 пацијената, преоперативно и постоперативно. Патохистолошки материјал ће бити имунохистохемијски анализиран ради утврђивања нивоа експресије ТС и ендоглина (CD 105), а ниво вредности ендоглина (CD 105) и TGF-а у серуму одредиће се ELISA методом. Подаци о полу, старости болесника, локализацији тумора, TNM стадијуму болести, патохистолошким параметрима биће коришћени из онколошких протокола Центра за патолошко-анатомску дијагностику, Клиничког Центра „Крагујевац“.

Очекује се да ће резултати показати да је експресија ТС и ендоглина (CD 105) у болесника са CRC значајно повезана са стадијумом болести. Високе вредности могу да предвиде изостанак одговора на терапију са 5-Флуороурацилом (5-ФУ) у узапредовалој болести. До сада је извршена евалуација великог броја различитих маркера за CRC, али само мали број је препорука за клиничку праксу. Очекујемо да ће се кроз коекспресију ова два маркера пружити могућност за дефинисање прогностичког алгорита чиме ће се унапредити индивидуализација антитуморског терапијског третмана у болесника са CRC.



### Циљ истраживања:

Основни циљ ове студије је идентификација прогностичких параметара чиме се може избећи нефокусиран приступ у досадашњој примени постоперативне хемиотерапије и омогућити индивидуализација антитуморског третмана.

У складу са основним циљем поставили смо и посебне циљеве:

**Циљ 1.** Испитати присуство и ниво експресије ТС у туморском ткиву пацијената оболелих од CRC

**Циљ 2.** Испитати присуство и ниво експресије ендоглина (CD 105) у туморском ткиву пацијената оболелих од CRC

**Циљ 3.** Одредити ниво ендоглина (CD 105) у серуму пацијената оболелих од CRC, преоперативно и постоперативно

**Циљ 4.** Одредити ниво TGF-а у серуму пацијената оболелих од CRC, преоперативно и постоперативно

### Актуелност истраживања:

Колоректални карцином почиње на слузокожи одакле се директно шири кроз све слојеве црева, најчешће у околна ткива и органе. Метастатско ширење обезбеђује добро развијена мрежа лимфних путева и крвних судова, која почиње у субмукози. Брзина раста CRC варира, а једна студија је показала да време потребно за удвостручење туморске масе у просеку износи 620 дана (1).

Све веће интересовање научне јавности усмерава се на испитивања клиничко-морфолошких параметара и појаве експресије појединих туморских маркера као значајних фактора у развоју онкогенезе (2). Велики значај се придаје биомаркерима на основу чијег се присуства или одсуства може предвидети одговор на постоперативну хемиотерапију. Један од маркера хемиосензитивности је ТС за који је показано да корелира са резистенцијом на 5-ФУ (3). ТС је ензим укључен у биосинтезу ДНК и главни циљ за терапију 5-ФУ, чији је механизам деловања преко инхибиције ТС (4,5). Мета анализе указују да високе вредности ТС предвиђају лош исход (6).

Један од значајних фактора у развоју неоплазије је неоангиогенеза (7,8). Folkman је 1971 године први поставио хипотезу да је раст тумора завистан од туморске ангиогенезе (9,10). Wigchov и други немачки патолози су још пре једног века запазили да поједини хумани тумори поседују много крвних судова под претпоставком да доприносе расту и развоју малигних тумора и претпоставио да би стратегија анти-ангиогенезе била ефикасна у лечењу карцинома (11). Ангиогенеза као сложен процес резултат је деловања стимулативних и инхибиторних фактора. Формирање нових крвних судова је од суштинског значаја за раст тумора, снабдевање кисеоником и хранљивим материјама, за елиминацију отпадних продуката метаболизма, паракрину стимулацију и пут ширења тумора (12).

Густина туморске микроциркулације (MVD, енг. "microvessel density") говори о броју крвних судова по јединици површине. MVD се може одредити употребом имунохистохемијских маркера који се вежу за различите компоненте ендотелних ћелија. Ендоглин (CD 105) је део рецепторског комплекса за TGF – бета 1 и 3 молекула који су



бифункционални регулатори ћелијског раста и стимулишу пролиферацију мезенхималних, инхибишу пролиферацију епителних ћелија, присутни су у туморској ангиогенези (13). Различите студије су доказале да је сензитивнији и специфичнији од досад употребљаваних маркера. Према досадашњим сазнањима ендоглин (CD 105) је коришћен као маркер у детекцији ендотелних ћелија у инвазивном тумору, представља идеалну мету за примену антиангиогенетске терапије и добар је прогностички показатељ.

Патохистолошке карактеристике ресецираног сегмента код болесника са CRC остају уз квалитет хируршке ресекције, најснажнији предиктор постоперативног исхода, али су потребна додатна истраживања како би се прецизно дефинисали критеријуми за процену важних прогностичких параметара и елиминисале варијације.

У овој студији ће се испитивати корелација нивоа експресије специфичног маркера туморске ангиогенезе ендоглина (CD 105), ТС са клиничко-морфолошким параметрима и разлика у вредностима ендоглина (CD 105) и TGF-а у серуму, преоперативно и постоперативно у болесника са CRC.

#### **Предмет и опис истраживања:**

##### **А) МАТЕРИЈАЛ:**

У овој студији користиће се:

1) Постоперативни материјал добијен хируршком ресекцијом CRC од 128 пацијената, мушког и женског пола, са Хируршке Клинике, Клиничког Центра „Крагујевац“ у периоду од 1. јануара 2007. до 31. децембра 2009 год.

2) Преоперативни и постоперативни серум 20 пацијената оболелих од CRC, за период од 1.06.2012 до 1.08.2012 год. ће се анализирати квантитативном ELISA методом у Центру за молекулску медицину и испитивање матичних ћелија на Факултету медицинских наука у Крагујевцу.

Критеријум за укључивање у овом истраживању биће патохистолошки верификована дијагноза колоректалног карцинома епителног порекла (аденокарциноми).

##### **Б) МЕТОДЕ:**

За болеснике са CRC који су примарно лечени хируршки биће испитивана имунохистохемијска експресија ТС, ендоглина (CD105) и преоперативно и постоперативно ће се одређивати ниво системске вредности ендоглина (CD 105) и TGF-а за одређен број пацијената.

Узорковање крви вршиће се у јутарњим часовима, преоперативно, када ће се узети 10 ml венске крви и десетог постоперативног дана у истој количини, након чега ће се одредити ниво ендоглина (CD 105) и TGF-а квантитативном ELISA методом у Центру за молекулску медицину и испитивање матичних ћелија на Факултету медицинских наука у Крагујевцу.

##### **ИМУНОХИСТОХЕМИЈА**

Процедура имунохистохемијског бојења подразумева поступке демаскирања антигена, блокирања ендogene пероксидазе, инкубирања препарата са примарним антисерумом и поступак извођења имунохистохемијске методе – LSAB+ (14).



За детекцију ТС примениће се антителио ТС 106 и за ендоглин антителио CD 105 са високо сензитивном специфичном стрептавидин – биотин имунохистохемијском методом (LSAB+) у којој је стрептавидин обележен пероксидазом.

Процена резултата експресије ТС ће се заснивати на одређивању интензитета бојења:

А) 0 – одсутна и 1 – слаба експресија

0,1 тумачиће се као негативан налаз

Б) 2 – умерена и 3 – јака експресија

2, 3 тумачиће се као позитиван налаз (15).

### **MVD**

MVD (eng. „microvessel density“) се може одредити употребом имунохистохемијских маркера који се вежу за различите компоненте ендотелних ћелија. За процену степена ангиогенезе у овој студији биће коришћена имунохистохемијска анализа са антителиом ендоглин ( CD 105 ) који је маркер ендотелних ћелија.

Анализа ће бити вршена бројањем крвних судова у зони са њиховом највећом густином („hot spots“). Користиће се препоруке које је дао Weinder о величини видног поља и начину бројања. Места највеће густине крвних судова ће бити одређена на малом микроскопском увећању (x40) ( 16,17). Након тога бројање појединачних крвних судова радиће се на средњем микроскопском увећању (x200) уз величину видног поља од 0,12 до 1 мм<sup>2</sup>. У резултате ће се убрајати комплетни крвни судови и трачци ендотелних ћелија и појединачне ендотелне ћелије. Лумен крвних судова није потребан као ни присуство еритроцита. Бројање ће спровести два испитивача, а уколико је разлика већа од 10 % , биће укључен и трећи испитивач (18).

Средња вредност резултата добијених бројањем у 3 видна поља биће коначан резултат за испитаника.

Након добијених података о броју крвних судова за сваког болесника понаособ, израчунаће се медијана у односу на коју ће болесници бити подељени у две групе: болесници са ниским степеном ангиогенезе ( број крвних судова у туморском ткиву мањи од вредности медијане) и болесници са високим степеном ангиогенезе ( број крвних судова у туморском ткиву већи од вредности медијане).

### **ELISA**

Узорак крви из кубиталне вене за сваког пацијента понаособ, узет преоперативно и 10-ог постоперативног дана биће центрифугирана 10 минута на 300 G, а затим остављена на -20°C до извођења анализе. Концентрације CD105 и TGF- у серуму биће одређиване комерцијалним ELISA сетовима према упутству произвођача.

Стандарди ће пре употребе бити растворени у PBS-у (pH 7.2), тако да ће почетне концентрације бити 2000 pg/mL. Направљени штокови е серијски 7 пута бити двоструко разблажени у растварачу (енгл. Reagent Diluent-у), да би се добила стандардна крива за 7 тачака. Оптичка гусина ће бити мерена у сваком бунарчету, помоћу Microplate reader-а.



Све измерене вредности ће бити умањене за вредности апсорбанци слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда направиће се стандардна крива, а помоћу ње израчунати вредности за сваки појединачан узорак.

### Статистичка обрада података

За поређење средњих вредности променљиве двеју и више популација користиће је Man-Vitnjev и Kraskal-Valisov тест. Испитивање разлике између вредности пре и после помоћу Wilcoxon-овог теста. Испитивање зависности две описне променљиве испитиваће се помоћу Hi-kvadrat i Fišerovog теста. Испитивање утицаја више променљивих на бинарну променљиву помоћу мултиваријанте бинарне логистичке регресије.

Значење испитиваних варијабли ( појединачно и у комбинацији) приказаће се након статистичке обраде добијених резултата код 128 пацијената помоћу комерцијалног пакета SPSS верзија 13.

### Значај истраживања

Испитивање више од једног маркера, у овом случају ТС и ендоглина (CD 105), може послужити за боље разумевање туморске прогресије и одређивање прогнозе у појединачном случају.

Обзиром да у прегледаној литератури до сада нисмо пронашли податке о системским вредностима ендоглина (CD 105) и TGF-а пре- и постоперативно, очекујемо да ће ово истраживање указати на значајност у разликама њихових вредности.

Резултати овог истраживања би могли да укажу на потенцијални ризик за развој метастаза које су значајне у планирању лечења.

Очекујемо да ће се на основу резултата овог истраживања доћи до јасно дефинисаних параметара који би применом у клиничкој пракси омогућили фокусирано спровођење антитуморског третмана.

### Временски оквир

Истраживање ће се спровести у периоду од две године.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Mahmoud N, Rombeau J, Ross HM, Fry RD. Colon and Rectum. In: Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL, editors. Sabiston Textbook of Surgery. 17th ed. International edition: Elsevier; 2004
2. Shutter J, Atkins KA, Gharthey K, Hertzog TJ. Clinical applications of immunohistochemistry in gynecological malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17, 311–315.
3. Lehman NL. Future potential of thymidylate synthase inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11: 1775–1787.
4. Danenberg PV. Thymidylate synthetase—a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1977;473:73–92.
5. Danenberg PV. Pharmacogenomics of thymidylate synthase in cancer treatment. *Front Biosci* 2004;9:2484–94.
6. Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2004 Feb 1;22(3):529-36.
7. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011-1027.
8. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006;312:549-560.
9. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine* 1995;1:27-31.
10. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med*, 1971; 333: 1182-6.
11. Ide A.G., Beker N.H., Warren S.L. Vascularization of the Brown Peare rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *AM J. Roentgenol.* 1939;42:891-9
12. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995;333:1757-1763.
13. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 19027–30
14. Smith G, Carey F.A, Beattie J. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer. *PNAS* 14: 9433-9438, 2002.
15. Ricciardiello L, Ceccarelli C, Angiolini G, Pariali M, Chieco P, Paterini P, Biasco G, Martinelli GN, Roda E, Bazzoli F. High thymidylate synthase expression in colorectal cancer with microsatellite instability: implications for chemotherapeutic strategies. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun 1;11(11):4234-40.
16. Borre M et al. Microvessel density predicts survival in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *Br J Urol.*, 1998; 78: 940-944.
17. Weidner N et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol*, 1993, 143: 401-409.
18. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor incancer. *Am J Pathol* 1995;147:9-19.