

Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Wydział Lekarski

Magdalena Ciążyńska

**Rola wybranych białek zaangażowanych w proces fotodestrukcji
skóry w patogenezie raka podstawnokomórkowego**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

dr hab. n. med. Aleksandra Lesiak

Łódź 2016

STRESZCZENIE

Rak podstawnokomórkowy (*basal cell carcinoma*, BCC) jest najczęstszym nowotworem skóry i zarazem najczęstszym nowotworem, który występuje wśród ludzi rasy białej. Mimo, że BCC bardzo rzadko daje przerzuty i równie rzadko zagraża życiu pacjenta, ze względu na liczbę stwierdzanych przypadków tego raka oraz jego lokalizację obejmującą głównie skórę twarzy i szyi, stanowi istotny problem społeczno-ekonomiczny. BCC cechuje się naciekaniem trójwymiarowym z niszczeniem sąsiednich struktur, dlatego może być przyczyną poważnych deformacji tkanek i defektów kosmetycznych, zwłaszcza w miejscach widocznych, mających istotny wpływ na jakość życia chorych.

BCC często występuje również na ramionach, plecach oraz grzbiecie rąk. Fakt ten wiąże się z intensywną ekspozycją tych partii ciała na promieniowanie słoneczne jako najważniejszy czynnik rozwoju zarówno zjawiska fotoimmunosupresji jak i fotokancerogenezy. W świetle nowych powszechnie praktykowanych form zachowań społecznych sprzyjających narażeniu na promieniowanie UV (*ultraviolet radiation*, UVR) oraz częstemu korzystaniu z solariów, użyteczne wydaje się poszukiwanie coraz to nowych metod prewencyjnych jak i terapeutycznych zachorowalności na BCC.

Szacuje się, że częstość jego występowania w ostatnich latach wzrasta bardzo dynamicznie, szczególnie u osób młodych. Jednak większość prowadzonych badań epidemiologicznych odnosi się do całej grupy nieczerniakowych raków skóry (*non melanoma skin cancer*, NMSC). Tworzone krajowe rejestry chorób nowotworowych nie uwzględniają osobnego podziału nowotworów skóry na ich poszczególne typy. Jedynie czerniak otrzymał swój osobny kod w klasyfikacji ICD-10, przez co prowadzone wykazy częstości występowania tej konkretnej jednostki są najbardziej zbliżone do faktycznych danych. Powszechnie wiadomo, że BCC stanowi ok. 80% wszystkich przypadków NMSC. Jednak ze względu na wspólne ujęcie w prowadzonych indeksach tej jednostki razem chociażby z rakiem kolczystokomórkowym skóry (*squamous cell carcinoma*, SCC) czy też innymi rzadkimi chorobami nowotworowymi w obrębie skóry, trudno jest dokładnie oszacować wartość faktycznych zachorowań na BCC. Dane formułowane dla całej grupy NMSC ze względu na odmienną etiologiczną, genetyczną, kliniczną jak i różne rokowanie są trudne do interpretacji.

Mimo licznych badań naukowych, etiologia rozwoju BCC wciąż pozostaje niejasna. Wiadome jest, że powstanie nowotworu wymaga interakcji wielu czynników, zarówno wewnątrz jak i zewnątrzkomórkowych. W aspekcie nowotworów skóry istotnym

zagadnieniem jest wpływ promieniowania ultrafioletowego na poziom ekspresji białek, które uczestniczą w procesach regulacji cyklu komórkowego, których zaburzenie może predysponować do rozwojów nowotworów skóry.

Według naszej wiedzy w piśmiennictwie niewiele jest informacji dotyczących znaczenia ekspresji TGF- β , Smad, MMP, katepsyny K, progeryny w pochodzeniu i rozwoju BCC, najczęstszego nowotworu złośliwego w populacji europejskiej. Brak jest również krajowych, epidemiologicznych, porównawczych danych dotyczących BCC. Dlatego podjęto się próby przeprowadzenia badań, których celem była:

- Retrospektywna analiza danych epidemiologicznych BCC pacjentów z Kliniki Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z lat 1999-2015, ze szczególnym uwzględnieniem wieku, płci pacjentów, lokalizacji oraz podtypu nowotworu.
- Ocena ekspresji białek: TGF- β , Smad, MMP, katepsyny K, progeryny w biopsjach z rozpoznaniem histopatologicznym BCC oraz w materiałach pobranych ze skóry niezmięnionej chorobowo zdrowych ochotników.
- Ocena ekspresji białek TGF- β , Smad, MMP, katepsyny K, progeryny w grupie osób zdrowych poddanych ekspozycji na zróżnicowane dawki promieniowania ultrafioletowego.

Materiał badawczy stanowiły 953 osoby rasy kaukaskiej (538 kobiet, 415 mężczyzn, średnia wieku – 66,15 lat). Grupę A stanowiło 890 pacjentów (504 kobiety, 386 mężczyzn, średnia wieku – 66 lat), którzy w latach 1999-2015 byli leczeni w Klinice Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z powodu raka podstawnokomórkowego. Z grupy A wyłoniono 22 pacjentów (grupa A1, 12 kobiet, 10 mężczyzn, średnia wieku – 64 lata) z rozpoznaniem histopatologicznym BCC w latach 2013-2015, u których pobrano wycinki skóry ze zmian chorobowych w celu analizy ekspresji białek. Grupę B stanowiącą 63 zdrowych ochotników (34 kobiety, 29 mężczyzn), podzielono na cztery podgrupy w zależności od schematu naświetlań jakimi byli poddani:

- B1: grupa nienaświetlana, stanowiąca grupę kontrolną – 22 osoby
- B2: ochotnicy poddani miejscowej ekspozycji (skóra pośladka 10x10cm) na rumieniotwórczą dawkę 3MED (*minimal erythrema dose*, MED) – 13 osób
- B3: ochotnicy, u których całe ciało zostało naświetlone przewlekłymi i nierumieniotwórczymi dawkami UVB przez 10 kolejnych dni ($10 \times 0,7\text{MED}$) – 14 osób

- B4: ochotnicy poddani przez 10 kolejnych dni naświetlaniom przewlekłymi i nierumieniotwórczymi dawkami UVB ($10 \times 0,7\text{MED}$) z następującą, pojedynczą, miejscową aplikacją rumieniotwórczą dawką 3MED (skóra pośladka 10x10cm) – 14 osób

Miejsцем naświetlanym dawką rumieniotwórczą, z której następnie został pobrany wycinek w celu określenia ekspresji białek, była skóra pośladka.

Oceny ekspresji wymienionych powyżej białek w bioptatach skóry dokonano przy użyciu metody Western blot. U wszystkich uczestników badania z grupy A1 oraz z grupy B przeprowadzono szczegółową analizę czynników ryzyka przewlekłej ekspozycji na działanie naturalnych bądź też sztucznych źródeł promieniowania ultrafioletowego oraz występowania oparzeń słonecznych w wywiadzie. U tych osób dokonano również oceny fototypu skóry wg skali Fitzpatricka.

Analizę statystyczną wykonano na podstawie programu *STATISTICA*. Dla wszystkich wykorzystanych testów statystycznych przyjęto poziom istotności $p < 0,05$.

W analizie retrospektywnej danych epidemiologicznych BCC w badanych latach wykazano utrzymującą się tendencję wzrostową częstości zachorowań na BCC. Analizując jednak trend występowania ilości nowych przypadków BCC w ostatnich pięciu latach, można zauważyć, że liczba ta nieco zmniejszyła się w stosunku do roku 2010 i od 2012 roku utrzymuje się na stałym poziomie. Wykazano również, iż wśród obu płci najczęstszym typem BCC był podtyp guzkowy (*nodular BCC*, nBCC), a kolejnym pod względem częstości podtyp powierzchniowy (*superficial BCC*, sBCC). Najczęstszą lokalizacją sBCC był tułów, natomiast nBCC nieowłosiona skóra głowy. Wykazano, że sBCC występuje znacząco częściej w młodszej grupie wiekowej niż nBCC.

Wykazano istotnie statystycznie wyższą ekspresję zarówno TGF- β jak i białka Smad2 w preparatach ze stwierdzonym BCC, w stosunku do bioptatów skóry zdrowej pobranej od grupy kontrolnej. Jednocześnie nieco niższa, ale nieistotna statystycznie ekspresja tych białek w grupie poddanej ostrej i krótkotrwałej ekspozycji na UVB w stosunku do grupy ze stwierdzonym BCC, sugeruje o szybkiej dysregulacji ścieżki TGF- β /Smad pod wpływem ostrej i krótkiej ekspozycji, która predysponuje do rozwoju zmian nowotworowych.

W badaniu własnym, stwierdzono także istotne różnice w poziomie ekspresji MMP-1,-3,-9 pod wpływem zastosowania różnych dawek promieniowania UVB oraz w materiale z rozpoznanym BCC. Stwierdzono ponadto, iż do istotnego statystycznie zwiększenia ekspresji MMP-1 jak i MMP-3 w stosunku do grupy kontrolnej wystarczają już nawet subrumieniotwórcze dawki promieniowania UV, z jakimi mamy do czynienia

przebywając w warunkach plenerowych w godzinach popołudniowych, bez wywołania rumienia na skórze. W badaniach własnych nie stwierdzono wzrostu ekspresji MMP-8 zarówno w komórkach BCC jak i w grupach naświetlanych, a poziom tego białka jest mniejszy w grupie naświetlanej w stosunku do grupy kontrolnej.

Stwierdzono znaczny wzrost ekspresji katepsyny K we wszystkich badanych przypadkach BCC w stosunku do grupy kontrolnej. W żadnej z analizowanych grup nie stwierdzono braku obecności tej proteiny. Skóra zdrowa wykazała najniższą ekspresję katepsyny K, a jej wzrost obserwowany był wraz ze stosowaną ekspozycją na promieniowanie UVB. Podobnie jak w przypadku MMP-1 i -3, wykazano, iż istotnie statystycznie zmiany w ekspresji tej proteiny są wywoływane przy zastosowaniu dawki subrumieniotwórczej UVB w porównaniu do grupy kontrolnej.

We wszystkich poddanych analizie bioptatach stwierdzono ekspresję progeryny, która była istotnie statystycznie wyższa we wszystkich przypadkach BCC w stosunku do pozostałych próbek. Wykazaliśmy, iż ekspozycja skóry na subrumieniotwórcze dawki UVB nieznacznie wpływa na ekspresję progeryny, co przemawia za faktem, iż za jej gwałtowny wzrost stwierdzony pod wpływem promieniowania słonecznego odpowiedzialne jest głównie promieniowanie UVA i rumieniotwórcze dawki promieniowania UVB.

Analiza danych wykazała znaczące statystycznie różnice w ekspresji TGF- β , Smad2, MMP-1,-3,-9, katepsyny K, progeryny w BCC w porównaniu z grupą kontrolną. Świadczy to o udziale tych protein w procesie skórnej kancerogenezy. Ostra i rumieniotwórcza ekspozycja na promieniowanie UVB powoduje zmiany w ekspresji białek TGF- β , Smad2, MMP-1,-3,-9, katepsyny K, progeryny jakie obserwujemy w przebiegu BCC. Przemawia to za faktem, iż nawet jednorazowe, ostre oparzenie jest wielkim obciążeniem dla skóry, które generuje zmiany jakie obserwujemy w przebiegu BCC.

Poznanie roli białek oraz aktywacji ich ekspresji pod wpływem UVB w powstawaniu BCC może w przyszłości umożliwić włączenie celowanej terapii ukierunkowanej molekularnie, co w świetle rozwoju technik biochemicznych staje się coraz bardziej realne i jest już wykorzystywane w terapii innych nowotworów złośliwych, w tym również nowotworów skóry.

Wnioski:

- 1) Retrospektywna analiza danych chorych na BCC z Kliniki Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi potwierdza istnienie utrzymującego się wysokiego trendu zapadalności na BCC wśród obu płci.

- 2) Zwiększona ekspresja białek TGF- β , Smad2, MMP-1,-3,-9, katepsyny K, progeryny w grupie osób z rozpoznaniem BCC, w porównaniu z grupą kontrolną, świadczy o udziale tych protein w procesie skórnej kancerogenezy.
- 3) Zmiany ekspresji białek TGF- β , Smad2, MMP-1,-3,-9, katepsyny K, progeryny pod wpływem ekspozycji na przewlekłe i nierumieniotwórcze dawki promieniowania UVB przemawiają za ich udziałem w procesie fotodestrukcji skóry. Obserwowany wysoki poziom ekspresji tych białek pod wpływem ostrej dawki UVB potwierdza, iż nawet jednorazowa ekspozycja skóry prowadząca do wystąpienia oparzenia ma zdolność do deregulacji mechanizmów obronnych skóry prowadzących do rozwoju raka podstawnokomórkowego.
- 4) Zwiększony poziom ekspresji białek TGF- β , Smad2, MMP-1,-3,-9, katepsyny K, progeryny w grupie osób poddanych ostrej i rumieniotwórczej ekspozycji na promieniowanie UVB w porównaniu z grupą poddaną przewlekłemu naświetlaniu niskimi dawkami nierumieniotwórczymi z następową ekspozycją na ostrą dawkę UVB świadczy o tendencji do występowania zjawiska fotoadaptacji na poziomie molekularnym.

SUMMARY

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common malignant neoplasm of the skin, that affects patients with low skin phototype. In recent years, the incidence rates of BCC were increasing. However, BCC is not life threatening and mortality rates associated with BCC are very low, the tissue invasion may induce considerable functional and cosmetic problem, especially due to the fact that the majority of lesions are located on face and neck.

BCC lesions are also often localized on shoulders, trunk and upper limbs. The fact that most lesions are located on sun exposed skin confirms the essential role of ultraviolet radiation in photoimmunosuppression and photocarcinogenesis of skin. Due to the facts, that nowadays people are spending more and more time outdoors, so they are often exposed to skin radiation as well as solariums are becoming very popular, it is crucial to seek for new kind of prevention methods and new therapies for BCC treatment.

Furthermore, the incidence of BCC is rising especially in younger population, which results in many scientific studies on its pathogenesis and new treatment. However, most epidemiological researches include all non-melanoma skin cancers (NMSC). Unfortunately, no reliable statistics about the incidence of BCC exists in Poland due to the lack of an efficient cancer registry system. It is known that BCC represents 80% of all NMSC cases. However, due to the fact that BCC is grouped together with other skin cancers, such as squamous cell carcinoma (SCC) and other rare skin cancers, it is not possible to present the reliable incidence rates of BCC. The incident rates of NMSC are difficult to interpret due to differences of etiology, genetics and other factors individual for each subtype.

In spite of numerous scientific research, the etiology of BCC still remains unknown. It is known that the development of tumor consists of various factors both intra- and extracellular. The ultraviolet radiation impacts the expression of particular proteins in skin.

Nevertheless, the available literature does not present clear information how ultraviolet radiation affects the level of expression of particular proteins, that are responsible for skin cancer development. Still, there is a lack of information how TGF- β , Smad, cathepsin K, progerin and metalloproteinases contribute to BCC development. What is more, there are no national clear and reliable incident rates of BCC.

The aim of the study is to evaluate the role of expression of particular proteins in basal cell carcinoma's development. What is more, the goal of the thesis is to perform a research that evaluates the role of short and acute ultraviolet radiation (UVR) as well as the chronic UVR

on expression of particular proteins in comparison to the healthy control group of people and patients with diagnosed BCC.

In order to achieve those goals, the following research has been performed:

- Retrospective analysis that included all cases of BCC which were diagnosed and treated in the Department of Dermatology and Venereology, Medical University of Lodz during the sixteen-year period from 1999 to 2015 with consideration of patients' gender, age and the localization and subtype of cancer.
- Evaluation of expression of proteins such as: TGF- β , Smad, cathepsin K, progerin and metalloproteinases in skin biopsies from patients suffering from BCC in comparison to healthy patients.
- Evaluation of proteins' expression such as: TGF- β , Smad, cathepsin K, progerin and metalloproteinases in skin biopsies of healthy group of patients that were exposed to short and acute ultraviolet radiation as well as the chronic UVR.

The study group consists of 953 Caucasians: 890 patients (group A) with histologically confirmed BCC cases (386 males and 504 females, average age 66) that were diagnosed at the Dermatology and Venerology Department in Łódź and 63 healthy individuals (group B), as a control group, divided according to gender and age (29 males, 34 females). From group A 22 patients (10 males and 12 females) have been chosen (group A1) with diagnosed BCC in years 2013-2015 in order to evaluate the expression of particular proteins in skin biopsies. Healthy volunteers from group B have been divided into subgroups that were exposed to various doses of ultraviolet radiations:

- B1: control healthy group that were not exposed to any radiation – 22 persons
- B2: volunteers that were exposed to short and acute ultraviolet radiation (3MED) – 13 persons
- B3: volunteers that were exposed to chronic ultraviolet radiation (10 x 0,7MED) – 14 persons
- B4: volunteers that were firstly exposed to chronic ultraviolet radiation (10 x 0,7MED) with the following of short and acute ultraviolet radiation (3MED) – 14 persons

The skin that was exposed to ultraviolet radiation and biopsied was the skin on buttock.

The expression of chosen proteins in the skin specimens was assessed applying Western blot method. Each research participant from group A1 and group B has been examined in details how he or she has been exposed to ultraviolet radiation previously. What is more,

those participants have been examined which skin prototype is present according to Fitzpatrick scale.

Statistical analysis was performed using *STATISTICA* software. The results were considered statistically significant at the significance level $p < 0.05$. The distinct increase in BCC incident rates was observed to 2010 and from 2012 the incidence rates are on the same level. Statistically significant correlation was observed between histopathological types of BCC and the localization of the lesions. The superficial type predominates on photoprotected areas especially on the trunk while the nodular type occurs mainly on facial areas. No statistically significant correlation was observed between histopathological subtypes of BCC and gender. We found a significant increase in incidence for superficial BCC among middle-age patients while nodular type was observed more frequently among elderly subjects.

Statistically significant increase of expressions both TGF- β and Smad2 have been obtained in skin biopsies with diagnosed BCC in comparison to healthy skin biopsies collected from control group. What is more, slight but not statistically significant decrease of expression of those proteins in skin biopsies gathered from group of volunteers exposed to short and acute UVB in comparison to biopsies with diagnosed BCC has been observed. This fact indicates that short and acute exposition to UVB radiation has a crucial role in dysregulation of TGF- β /Smad pathway that leads to carcinogenesis.

Performed research has shown significant differences in the level of expression of MMP-1,-3,-9 in skin biopsies exposed to various doses of UVB radiation as well as in biopsies with diagnosed BCC. Moreover, even low chronic doses of UVB radiation could lead to increase the expression of MMP-1 and MMP-3 with the statistical significance in comparison to healthy skin. The performed study does not indicate the increase of expression of MMP-8 neither in BCC biopsies nor in skin biopsies from radiated areas. What is more, the expression of this protein is lower in comparison to skin biopsies from healthy control group.

Increased level of expression of cathepsin K has been observed in all skin biopsies diagnosed with BCC in comparison to healthy skin. Expression of this protein has been detected in all analyzed samples. The lowest expression of cathepsin K was observed in healthy skin biopsies and increased as doses of UV radiation increased. Statistically significant increase of protein expression has been observed in skin biopsies exposed to chronic UV radiation similarly to effects seen in MMP-1 and MMP-3.

All skin biopsies presented expression of progerin. What is more, the statistically significant increase of expression was observed in biopsies with diagnosed BCC in comparison

to other samples. The research presents that exposure to chronic UVB radiation not significantly impacts the expression of progerin. Thus, the rapid increase of progerin's expression in skin exposed to natural sunlight is mainly caused by UVA radiation as well as short and acute UVB radiation.

The results present the statistically significant difference in expression of TGF- β , Smad2, MMP-1,-3,-9, cathepsin and progerin in lesions with BCC in comparison to healthy skin. This is the evidence of important role of those proteins in the carcinogenesis process. What is more, short and acute exposure to ultraviolet radiation introduces changes of expression of TGF- β , Smad2, MMP-1,-3,-9, cathepsin and progerin similar to ones observed in BCC lesions. Thus, there is an evidence that even very short, non-recurrent and acute exposure to ultraviolet radiation affects skin and could have an impact on BCC development.

The obtained results could present better understanding of skin carcinogenesis and could facilitate the development of targeted therapy for this kind of malignancy. Early diagnosis of BCC development could be done by analysis of proteins' expression and its correlation to ultraviolet exposure.

Conclusions:

- 1) Retrospective analysis of patients diagnosed with BCC in the Department of Dermatology and Venereology, Medical University of Lodz confirms the high incidence rates of BCC in Poland.
- 2) The evaluated expression of TGF- β , Smad2, MMP-1,-3,-9, cathepsin and progerin in lesions with BCC in comparison to healthy patients confirms the important role of those proteins in skin carcinogenesis.
- 3) Short and acute exposure to ultraviolet radiation increases the expression of proteins such as TGF- β , Smad2, MMP-1,-3,-9, cathepsin and progerin that is similar to changes observed in BCC. Thus, it is confirmed that even short and non-recurrent acute exposure to ultraviolet radiation could lead to BCC development.
- 4) Evaluated level of expression of the following proteins: TGF- β , Smad2, MMP-1,-3,-9, cathepsin and progerin in skin biopsies exposed to short and acute exposition to UV radiation in comparison to biopsies exposed to chronic exposure to UV radiation with following exposure to short and acute UVB indicates the tendency to occurrence of photoadaptation phenomenon.