

Mgr Aneta Wnęk

Streszczenie

Naczyniaki wczesnodziecięce to najczęściej występujące łagodne guzy okresu niemowlęcego o unikalnym przebiegu klinicznym. Rozrosty te należą do grupy anomalii naczyniowych o różnorodnym spektrum kliniczno-patologicznym. W większości nie wymagają terapii i ulegają samoistnej regresji stanowiąc jedynie defekt estetyczny, w postaci zniekształceń skórnych występujących po zaniku. W niektórych naczyniakach, zwłaszcza w przypadku zmian olbrzymich stanowią poważny problem kliniczny, związany z upośledzeniem czynności życiowych lub powstawaniem owrzodzeń. Metod leczenia naczyniaków wczesnodziecięcych jest wiele, w których najczęstsze zastosowanie ma farmakologia, interwencja chirurgiczna lub laseroterapia. Zazwyczaj stosuje się metody skojarzone. Przełomem w terapii tych guzów stało się zastosowanie w 2008 roku propranololu, blokera- β -receptorów charakteryzującego się wysoką skutecznością i bardzo dobrą tolerancją w porównaniu z zastosowanymi wcześniej metodami leczenia farmakologicznego. Pomimo wysokiej efektywności mechanizm działania propranololu na naczyniaki pozostaje nadal niejasny. Dotychczas poznany jest efekt naczynioruchowy propranololu polegający na wywołaniu skurczu naczyń w kapilarach naczyniaka, zmniejszając przepływ krwi i powodujący jego zblednięcie. Dostępne wyniki badań wskazują, również, że może on jednocześnie hamować angiogenezę oraz pobudzać apoptozę w komórkach naczyniaka. Istnieją pojedyncze prace sugerujące, że propranolol wpływa na naczyniaki poprzez zmniejszenie ekspresji czynników wzrostu VEGF i bFGF oraz poziomu ekspresji proteaz. Przypuszcza się również, że lek pobudza wybrane receptory aktywując degradację komórek śródbłonna naczyń kapilarnych, dzięki czemu przyspiesza proces apoptozy. Zachwianie równowagi zjawiska zaprogramowanej śmierci komórek może powodować różnego rodzaju zaburzenia patologiczne w komórce, które mogą mieć wpływ na powstawanie naczyniaków lub nowotworów. Niezbędnymi czynnikami utrzymującymi homeostazę w organizmie regulującymi proces apoptozy są białka proapoptotyczne i antyapoptotyczne. Kluczowym przedstawicielem białek antyapoptotycznych jest białko Bcl-2, które wykazuje właściwości hamujące białka proapoptotyczne, a także funkcje stabilizujące błonę komórkową. Z grupy białek proapoptotycznych najlepiej poznanym jest Bax. Białko to przyspiesza replikację materiału genetycznego. Wśród regulatorów apoptozy na uwagę zasługuje również Kaspaza3. Enzym ten odgrywa centralną rolę w zjawisku zaprogramowanej śmierci komórek poprzez kondensację chromatyny, degradację DNA oraz rozkład wielu substratów. Pomimo wieloletnich badań, wiedza w zakresie etiopatogenezy naczyniaków oraz mechanizmu działania propranololu na proces apoptozy jest nadal niedostateczna. Fakty te stały się inspiracją dla autora pracy do podjęcia badań, których celem były:

- 1) Ocena ekspresji wybranych białek regulujących proces apoptozy: Bax, Bcl-2, oraz Kaspazy3 w naczyńniakach wczesnodziecięcych.
- 2) Analiza ekspresji wybranych białek w poszczególnych fazach ewolucji naczyńniaków wczesnodziecięcych.
- 3) Ocena potencjalnego wpływu propranololu na ekspresję badanych białek regulujących proces apoptozy: Bax, Bcl-2, oraz Kaspazy3 w naczyńniakach wczesnodziecięcych.

Materiał do badań pochodził z Kliniki Chirurgii i Onkologii Dziecięcej UM w Łodzi i Kliniki Chirurgii i Urologii Dzieci i Młodzieży UM w Gdańsku. Badaniem objęto 71 wycinków z naczyńniaków wczesnodziecięcych z usuniętych operacyjnie od dzieci obu płci w wieku 1 do 60 miesięcy. Średni wiek dzieci wynosił 21,7 miesięcy ($\pm 13,7$). Badania zostały wykonane w Zakładzie Patomorfologii Rozwojowego USK nr 4 w Łodzi. Grupę leczoną propranololem stanowiło 27 wycinków z naczyńniaków w wieku średnim 25,5 miesięcy ($\pm 15,6$). Okres leczenia trwał średnio 8,8 ($\pm 4,4$). Grupę porównawczą stanowiły 44 wycinki z usuniętych operacyjnie naczyńniaków u dzieci nieleczonych propranololem w wieku średnim 19,4 miesięcy ($\pm 12,0$).

Wszystkie wycinki naczyńniaków, zarówno dla grupy leczonej i nieleczonej, zostały utrwalone i zatopione w bloczkach parafinowych, a następnie posłużyły do sporządzenia rutynowych preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną (H+E). W celu zbadania ekspresji białek regulujących proces apoptozy Bax, Bcl-2 i Kaspazy3 zostały przeprowadzone przy pomocy badań immunohistochemicznych, z zastosowaniem systemu detekcyjnego PowerVision według metody immunoperoksydazowej, z użyciem pierwotnych, mysich przeciwciał monoklonalnych. Dodatkowo wykonano badanie markerem GLUT1 w celu potwierdzenia rozpoznania naczyńniaka wczesnodziecięcego.

Ocenię obrazu immunohistochemicznego poddawano każdorazowo 1000 komórek śródbłonna naczyń w obrębie zmiany (naczyniaka). Za dodatnią ekspresję przyjmowano brązowe zabarwienie jądra komórkowego w badaniach immunoekspresji białka Bax oraz brązowe zabarwienie cytoplazmy w badaniach Bcl-2 i Kaspazy3. Wybraną metodę interpretacji barwień immunohistochemicznych zastosowano również do analizy grupy porównawczej. Wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu następujących testów: test U Manna-Whitney'a, testu Kruskala Wallisa, test niezależności Chi2 Pearsona. Analizy wykonywano za pomocą pakietu statystycznego Statistica 12.

Analizie poddano grupę 71 dzieci z naczyńniakami, 27 z nich stanowiło grupę leczoną propranololem, pozostałe 44 wycinki z naczyńniaków grupę porównawczą. Z uwagi na fakt, iż końcowemu badaniu poddano tylko najbardziej miarodajne odczyny pod względem jakościowym i ilościowym liczba preparatów jest zróżnicowana w zależności od rodzaju badanego białka. Porównanie poziomów ekspresji białek w naczyńniakach leczonych i nieleczonych propranololem wykazywało na przeciętnie wyższe wartości ekspresji białka Bax ($p=0,013$) oraz niższe wartości białka Bcl-2 w naczyńniakach leczonych ($p=0,015$). Analizując grupę leczoną ekspresja białka Bax w

25 preparatach wynosiła 47,1% ($\pm 14,7$), natomiast w grupie nieleczonej kształtowała się na poziomie 39,4% ($\pm 11,5$). W przypadku białka Bcl-2 w 26 wycinkach z naczynek leczonych średnia i odchylenie standardowe wyniosło 28,4% ($\pm 7,7$). Tymczasem w grupie nieleczonej poziom ekspresji Bcl-2 wyniósł 33,7% ($\pm 8,1$). Rozkłady poziomów ekspresji Kaspazy3 ($p=0,758$) nie różniły się istotnie między leczonymi 25,8% ($\pm 9,6$) i nieleczonymi naczynekami 25,3% ($\pm 9,5$). Uzyskane przez autora wyniki ekspresji Bax i Bcl-2 mogą wskazywać na potencjalne działanie propranololu na proces apoptozy. Obecność wyższej ekspresji białka Bax w grupie leczonej i stosunkowo niższej ekspresji białka Bcl-2 świadczy o silnym działaniu proapoptotycznym inaktywującym działanie antyapoptotyczne. Dodatkowo przeprowadzono analizę zmian ekspresję powyższych białek w zależności od fazy aktywności guzów, wieku dziecka oraz czasu leczenia. Znamienność statystyczną pozostałych czynników zaobserwowano jedynie w przypadku analizy białka Bcl-2 w całej grupie analizowanej łącznie, w której ekspresja białka znacząco zmniejszała się wraz z wiekiem oraz okresem podawania propranololu. Uzyskane wyniki oraz przeprowadzona analiza statystyczna pozwoliła na sformułowanie następujących wniosków:

- ✓ Komórki naczynek wczesnodziecięcych wykazują ekspresję wszystkich badanych białek regulujących proces apoptozy Bax Bcl-2 i Kaspazy3.
- ✓ Ekspresja białka Bcl-2 zmienia się w zależności od fazy rozwoju naczynek wczesnodziecięcych. Wysoka ekspresja białka Bcl-2 wiąże się z okresem proliferacji zmiany.
- ✓ Potencjalnym mechanizmem działania propranololu w naczynekach wczesnodziecięcych jest aktywacja procesu apoptozy w utkaniu guza poprzez nasilenie ekspresji białka Bax i zmniejszenia ekspresji białka Bcl-2.

Abstract

Infantile hemangiomas are the most common benign tumours in childhood. They are characterized by unique clinical course and presentation: in some cases they present a serious - problem or only leave cosmetic defects on a patient. These neoplasms are heterogeneous both clinically and pathologically. The majority of them do not require treatment and undergo spontaneous regression leaving only a cosmetic defect. However, some can be a serious condition impairing bodily functions or causing ulcerations, especially in the case of large tumours. Among many methods used in treating infantile hemangiomas, the most commonly used are pharmacotherapy, laser, and surgical treatments. These methods are frequently combined. The therapy of infantile hemangiomas was revolutionized in 2008 by introduction of propranolol. This drug has proven to be highly effective and very well tolerated compared to previous pharmacological methods (steroids, interferon, chemotherapy). However, the mechanism of its influence on hemangiomas remains unclear. So far, it has been discovered that propranolol causes constriction of the tumour's capillaries thus reducing its blood flow and causing it to pale. Research suggests it can both inhibit angiogenesis and stimulate apoptosis in hemangioma cells. There are isolated papers suggesting that propranolol acts on the hemangiomas by reducing the expression of VEGF, bFGF and proteases. It is also suspected that the drug activates specific receptors and triggers the degradation of capillaries' endothelial cells, which accelerates apoptosis. Imbalance in apoptotic processes leads to various morphological disorders in the cells and may induce the formation of hemangiomas and neoplasms. The key factors that maintain cell homeostasis are pro- and anti-apoptotic proteins. In the former group, Bax protein remains best described to date. It speeds up DNA replication. In turn, one of the most important anti-apoptotic agents is Bcl-2 protein. It stabilizes the cell's membrane and suppresses pro-apoptotic activity of other proteins. Caspase-3 is also a worth-mentioning regulator of apoptosis. This enzyme plays its key role by causing the condensation of chromatin and degradation of DNA as well as other substrates. Despite years of research, our knowledge of hemangioma's etiopathogenesis and the mechanism of propranolol's influence on apoptosis remains insufficient. This has inspired the following study, of which the aim was:

- ✓ Evaluating the expression of chosen apoptosis-regulating proteins in infantile hemangiomas: Bax, Bcl-2 and Caspase3.
- ✓ Analysing the expression of chosen proteins in the phases of proliferation and involution of infantile hemangiomas.

- ✓ Assessing the potential influence of propranolol on the expression of proteins regulating apoptosis: Bax, Bcl-2 and Caspase3 in infantile hemangiomas.

Material for the study came from the Department of Pediatric Surgery and Oncology of the Medical University of Lodz and the Department of Pediatric Surgery and Adolescent Surgery and Urology of the Medical University of Gdansk. The study involved 71 samples from surgically removed infantile hemangiomas from children of both sexes, aged 1 to 60 months. The average age of the children was 21.7 months (± 13.7). The samples were examined in the Department of Developmental Pathology of Medical University of Lodz. The study was based on 27 samples treated with propranolol for an average of 8.8 months, aged 25.5 \pm 15.6 months. The control group was comprised of 44 samples from hemangiomas surgically excised from children aged 19.4 \pm 12 months not treated with propranolol. Samples from both groups were preserved and embedded in paraffin and were used to create hematoxylin and eosin-stained specimens. The expression of Bax, Bcl-2 and Caspase3 proteins was analyzed by immunohistochemistry with *PowerVision Poly-HRP anti-Mouse IHC Detection system*. GLUT1 marker testing was also performed to confirm the diagnosis of infantile hemangioma.

When assessing immunohistochemistry we analyzed 1000 cells from vascular endothelium within the lesion (hemangioma) at a time. Cells displaying brown-stained nucleus were considered Bax-positive and those with brown-stained cytoplasm Bcl-2- and Caspase-3-positive in respective immunoexpression studies. The same interpretation was applied to the samples from the control group. The data were analyzed with U Mann-Whitney's test, Kruskal Wallis' test and Pearson's χ^2 test. All the tests were performed using Statistica 12.

We analyzed samples from 71 children with hemangiomas, out of which 27 were treated with propranolol and 44 made up the control group. Given that only the most reliable specimens were used for final examination, their number varies depending on the studied protein. Comparison of levels of protein expression in tumours treated and not treated with propranolol showed moderately higher levels of Bax ($p=0.013$) and lower levels of Bcl-2 protein expression in hemangiomas that received the treatment ($p=0.015$). Bax expression in 25 specimens after propranolol treatment was 47.1% (± 14.7) and in the control group 39.45% (± 11.5). As for Bcl-2, in 26 specimens the expression was 28.4% (± 7.7) and in the control group 33.7% (± 8.1). In both groups the average expression of Bcl-2 and Bax were

insignificantly higher in the proliferating than the involuting phase. The levels of caspase-3 expression ($p=0,758$) did not vary significantly between the treated 25,8% ($\pm 9,6$) and not treated group 25,3% ($\pm 9,5$).

We also analyzed the expression of said proteins depending on the tumour's growth phase, the child's age and duration of treatment. The mean expression of Bcl-2 protein was significantly higher than in the proliferative phase of involution. The results were only statistically significant for the expression of Bcl-2 protein's expression in the whole group. Its mean expression level was markedly higher in the proliferative phase than during involution and decreased with children's age and the duration of propranolol therapy. Presented results and statistical analysis allowed us to draw the following conclusions:

- ✓ The proteins regulating the programmed cell death - Bax, Bcl-2 and Caspase3 - are expressed in the infantile hemangioma cells.
- ✓ The expression of Bcl-2 changes with the progression of the tumor. High level of expression is related to hemangioma's proliferation.
- ✓ A potential mechanism of propranolol's action in infantile hemangiomas is activating apoptosis in the tumour's tissue by increasing Bax expression and decreasing Bcl-2 expression.