

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

**Warianty transkrypcyjne genów *PTGS1* i *PTGS2*
u chorych z brodawczakiem odwróconym nosa
i zatok przynosowych**

lek. Jolanta Chmielecka-Rutkowska

Promotor: prof. dr hab. n. med. Wioletta Pietruszewska

Łódź 2023

7. STRESZCZENIE

Wstęp

W ostatnich latach najczęściej rozpoznawanym nowotworem łagodnym nosa i zatok przynosowych jest brodawczak odwrócony (BO). Jego etiologia i patogenezą pomimo rozwoju genetyki i licznych badań molekularnych jest nadal niejasna. Diagnostyka brodawczaka odwróconego stanowi wyzwanie dla lekarza, ponieważ jego objawy nie są charakterystyczne i często sugerują występowanie przewlekłego zapalenia zatok przynosowych, dlatego w pierwszej kolejności jest on tak rozpoznawany i leczony. Trudności w leczeniu przewlekłych zapaleń zatok przynosowych, szczególnie zatoki szczękowej oraz nietypowy ich przebieg powinien być wskazaniem do poszerzenia diagnostyki i weryfikacji histopatologicznej oraz nasunąć podejrzenie brodawczaka odwróconego jamy nosa i zatok. W piśmiennictwie istnieje wiele dowodów, że przewlekłe zapalenie zatok przynosowych z polipami nosa (PZZPzPN) może mieć wpływ na rozwój brodawczaka odwróconego. Cechą charakterystyczną BO jest jednak jednostronność zmian, co często odróżnia go od chorób zapalnych. Rozpoznanie BO często stawiane jest na podstawie wyniku badania histopatologicznego po leczeniu chirurgicznym z powodu przewlekłego zapalenia zatok przynosowych. Przez ostatnie dziesięciolecie obserwujemy wzrost zachorowań na brodawczaka odwróconego. Uważa się, że mają na to wpływ wzrastająca częstość zakażeń wirusem brodawczaka ludzkiego, zanieczyszczenie środowiska naturalnego, palenie papierosów, ekspozycja zawodowa, w tym głównie narażenie na czynniki chemiczne oraz niezależnie czynniki genetyczne. Podstawowym leczeniem brodawczaka odwróconego jest całkowita resekcja guza. Wybór rodzaju zabiegu uzależniony jest od wielkości guza, jego umiejscowienia, zajęcia otaczających tkanek oraz doświadczenia chirurga. Powodzenie operacji zależy od wyboru optymalnego zakresu zabiegu chirurgicznego, który powinien zapewniać wolny od guza margines i możliwie najmniejsze zniszczenie nosa i zatok przynosowych. Można to osiągnąć dzięki dokładnej analizie obrazu tomografii komputerowej zatok przynosowych często uzupełnionej o rezonans magnetyczny zatok. Pomimo dołożenia wszelkiej staranności w diagnostyce i leczeniu pacjentów z BO wznowy są spotykane stosunkowo często oraz istnieje ryzyko wystąpienia transformacji złośliwej. Pomimo rozwoju medycyny eksperymentalnej i klinicznej, a także technik operacyjnych, nasza wiedza na temat tej choroby jest wciąż niewystarczająca.

Ważną kwestią w diagnostyce jest wciąż zapotrzebowanie na biomarker wskazujący na występowanie brodawczaka odwróconego i jego złośliwą transformację, przyspieszający

wczesne rozpoznanie choroby oraz pozwalający na podjęcie właściwego leczenia. W ocenie podłoża chorób nowotworowych podkreśla się między innymi rolę cyklooksygenazy-1 i cyklooksygenazy-2. Dotychczas nie przeprowadzono badań polegających na próbie identyfikacji wariantów transkrypcyjnych genów cyklooksygenazy-1 (*PTGS1*) i cyklooksygenazy-2 (*PTGS2*) obecnych u pacjentów z brodawczakiem odwróconym.

Cele pracy

- 1 Identyfikacja wariantów transkrypcyjnych genów cyklooksygenazy-1 (*PTGS1*) i cyklooksygenazy-2 (*PTGS2*) u pacjentów z brodawczakiem odwróconym oraz u pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych
- 2 Ocena ekspresji znanych wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* u pacjentów z brodawczakiem odwróconym w porównaniu do pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych z polipami nosa
- 3 Ocena ekspresji nowych, dotychczas nieopisywanych wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* u pacjentów z brodawczakiem odwróconym w porównaniu do pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych z polipami nosa
- 4 Analiza związku między obecnością znanych i nowych wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* a przebiegiem klinicznym brodawczaka odwróconego
- 5 Próba wytypowania wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* odpowiedzialnych za powstanie fenotypu brodawczaka odwróconego

Material i metody

Badanie przeprowadzono łącznie u 286 pacjentów: 80 pacjentów z brodawczakiem odwróconym jam nosa i zatok przynosowych (BO) i 206 pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych z polipami nosa (PZZPzPN).

Analizie poddano znane warianty transkrypcyjne genów *PTGS1* i *PTGS2* (NM_08059, NM_000962, NM_000963) oraz nowe, hipotetycznie obecne u ludzi warianty transkrypcyjne (NM_001271165.1, NM_001271368.1, NM_001271166.1, AY_151286, BQ_722004). Wykorzystano dotychczas dostępne w bazach bioinformatycznych dane odnośnie opisanych izoform genów *PTGS1* i *PTGS2*. Analiza w czasie rzeczywistym znanych jak i nowych transkryptów genów *PTGS1* i *PTGS2* została przeprowadzona w genetycznym analizatorze

7900HT Real Time PCR. Analiza regionu kodującego genów *PTGS1* i *PTGS2* przeprowadzona została metodą bezpośredniego sekwencjonowania mRNA z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie nukleotydów z zastosowaniem jednego startera oligonukleotydowego. Tak otrzymana mieszanina została oczyszczona metodą precypitacji w etanolu z dodatkiem EDTA i poddana kapilarowej elektroforezie za pomocą automatycznego analizatora genetycznego ABI-PRISM310 (AppliedBiosystems, USA).

Wyniki

W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano potwierdzenie współwystępowania wszystkich badanych wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* zarówno u pacjentów z brodawczakiem odwróconym oraz chorych z przewlekłym zapaleniem zatok z polipami nosa. Na podstawie wyników stwierdzono występowanie istotnych korelacji pomiędzy wszystkimi badanymi wariantami transkrypcyjnymi genów *PTGS1* i *PTGS2* u pacjentów w grupie z brodawczakiem odwróconym, szczególnie zaznaczoną pomiędzy wariantami COX2.1 i COX2.2. Podobnie, w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych z polipami nosa stwierdzono występowanie istotnych korelacji, jednakże poziomy istotności były niższe a siła korelacji mniejsza. Zwraca uwagę, że ekspresja wszystkich wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* była niższa w brodawczaku odwróconym w porównaniu z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych.

W kolejnym etapie przeprowadzono analizę dotyczącą zależności pomiędzy badanymi wariantami transkrypcyjnymi genów *PTGS1* i *PTGS2* a cechami klinicznymi brodawczaka odwróconego. Stwierdzono istnienie zależności między ekspresją wariantów transkrypcyjnych genów *PTSG1* i *PTSG2* u pacjentów z BO z: paleniem tytoniu, stopniem zaawansowania nowotworu, wystąpieniem wznovy guza oraz z liczbą zabiegów związanych z obecnością wznovy lub guza resztkowego.

Wykazano, że osoby palące charakteryzują się niższą ekspresją wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* poza wariantem COX1.2. Ekspresja badanych genów była istotnie niższa u pacjentów z wyższym stopniem zaawansowania brodawczaka odwróconego (T3 i T4) w porównaniu do guzów T1 i T2. Wykazano, że u pacjentów z niższą ekspresją wariantów transkrypcyjnych COX1.1, COX1.2 i COX2.1 istotnie częściej występowała wznova. Ponadto u pacjentów z niższą ekspresją COX1.1, COX1.2, COX1.4 i COX2.3 czas przeżycia bez wznovy był istotnie krótszy a pacjenci z obecnymi wariantami COX1.1, COX1.2 mieli 4,5-krotnie a w przypadku COX2.3 4-krotnie większą szansę

wystąpienia wznowy. Ekspresja wariantów transkrypcyjnych genów *PTSG1* i *PTSG2* była niższa u pacjentów, u których przeprowadzono dwa lub więcej zabiegów z powodu wznowy nowotworu. Zależności te były istotne statystycznie dla COX1.1 i COX 1.2.

Analiza własna wykazała brak istotnej korelacji pomiędzy ekspresją poszczególnych wariantów transkrypcyjnych genów *PTSG1* i *PTSG2* a płcią, wiekiem, nasileniem objawów w skali VAS oraz wystąpieniem transformacji złośliwej w obrębie brodawczaka odwróconego.

Wnioski

1. Zidentyfikowano warianty transkrypcyjne genów cyklooksygenazy-1 (*PTGS1*) i cyklooksygenazy-2 (*PTGS2*) obecne u chorych z brodawczakiem odwróconym
2. Zarówno u chorych z brodawczakiem odwróconym jak i w grupie kontrolnej z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych z polipami nosa współwystępują znane warianty transkrypcyjne genów *PTGS1* i *PTGS2*
3. U pacjentów z brodawczakiem odwróconym jak i z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych współwystępują nowe, dotychczas nieopisywane warianty transkrypcyjne genów *PTGS1* i *PTGS2*
4. W kształtowaniu się fenotypu brodawczaka odwróconego mają znaczenie znane i nowe warianty genów *PTGS1* i *PTGS2* jednak nieokreślona jest ich rola co do ochronnego charakteru czy promowania bardziej agresywnego przebiegu choroby
5. Obniżona ekspresja badanych wariantów transkrypcyjnych genów *PTGS1* i *PTGS2* sprzyja występowaniu brodawczaka odwróconego, jego większemu zaawansowaniu klinicznemu w chwili rozpoznania oraz częstszemu występowaniu wznowy. Nie można jednak jednoznacznie określić ich ochronnego charakteru co wskazuje na konieczność kontynuacji badań w tym zakresie.

8. SUMMARY

Introduction

In recent years, inverted papilloma (IP) is the most frequently diagnosed benign tumor of the nose and paranasal sinuses. Its etiology and pathogenesis, despite the development of genetics and numerous molecular studies, is still unclear. The diagnosis of inverted papilloma is a challenge for the doctor, because its symptoms are not characteristic and often suggest the presence of chronic rhinosinusitis, which is why it is diagnosed and treated in the first place. Difficulties in the treatment of chronic inflammation of the paranasal sinuses, especially the maxillary sinus, and their atypical course should be an indication for extended diagnostics and histopathological verification and raise the suspicion of inverted papilloma of the nasal and sinus cavities. There is ample evidence in the literature that chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) may affect the development of inverted papilloma. However, IP is characterized by one-sidedness of changes, which often distinguishes it from inflammatory diseases. The diagnosis of IP is often made on the basis of histopathological findings after surgical treatment for chronic rhinosinusitis. Over the last decades, we have seen an increase in the incidence of the disease for inverted papilloma. It is believed that this is due to the increasing incidence of human papillomavirus infections, environmental pollution, smoking, occupational exposure, mainly exposure to chemical agents and independently genetic factors. The primary treatment for inverted papilloma is complete resection of the tumor. The choice of the type of surgery depends on the size of the tumor, its location, the involvement of surrounding tissues, and the experience of the surgeon. The success of the operation depends on the selection of the optimal surgical scope, which should provide a tumor-free margin and the least possible destruction of the nose and paranasal sinuses. This can be achieved through a thorough analysis of the computed tomography image of the paranasal sinuses, often supplemented by magnetic resonance imaging of the sinuses. Despite all due diligence in the diagnosis and treatment of patients with IP, recurrences are relatively frequent and there is a risk of malignant transformation. Despite the development of experimental and clinical medicine, as well as surgical techniques, our knowledge of this disease is still insufficient.

An important issue in the diagnosis is still the need for a biomarker indicating the presence of inverted papilloma and its malignant transformation, accelerating the early

diagnosis of the disease and allowing for appropriate treatment. In the assessment of the background of neoplastic diseases, the role of cyclooxygenase-1 is emphasized and cyclooxygenase-2. So far, no studies have been conducted to identify transcriptional variants of the cyclooxygenase-1 (*PTGS1*) genes and cyclooxygenase-2 (*PTGS2*) present in inverted papilloma patients.

Aim of study

1. Identification of transcriptional variants of cyclooxygenase-1 (*PTGS1*) genes and cyclooxygenase-2 (*PTGS2*) in patients with inverted papilloma and in patients with chronic rhinosinusitis.
2. Evaluation of the expression of known transcriptional variants of the *PTGS1* and *PTGS2* genes in patients with inverted papilloma compared to patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps.
3. Evaluation of the expression of new, previously undescribed transcription variants of the *PTGS1* and *PTGS2* genes in patients with inverted papilloma compared to patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps.
4. Analysis of the relationship between the presence of known and new transcriptional variants of the *PTGS1* and *PTGS2* genes and the clinical course of inverted papilloma.
- 5 An attempt to select transcriptional variants of the *PTGS1* and *PTGS2* genes responsible for the inverted papilloma phenotype.

Material and methods

The study was conducted in a total of 286 patients: 80 patients with inverted papilloma of the nose and paranasal cavities (BO) and 206 patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP).

Known transcription variants of the *PTGS1* and *PTGS2* genes (NM_08059, NM_000962, NM_000963) and new, hypothesized transcription variants present in humans (NM_001271165.1, NM_001271368.1, NM_001271166.1, AY_151286) were analyzed, BQ_722004). Data on the described isoforms of the *PTGS1* and *PTGS2* genes, available so far in bioinformatics databases, were used. Real-time analysis of known and novel *PTGS1* and *PTGS2* gene transcripts was performed on the 7900HT Real Time PCR genetic analyzer. Analysis of the coding region of the *PTGS1* and *PTGS2* genes was performed

by direct mRNA sequencing using fluorescently labeled nucleotides using a single oligonucleotide primer. The mixture thus obtained was purified by precipitation in ethanol with the addition of EDTA and subjected to capillary electrophoresis using an automatic genetic analyzer ABI-PRISM310 (AppliedBiosystems, USA).

Results

As a result of the conducted research, confirmation was obtained of the coexistence of all tested transcriptional variants of the *PTGS1* and *PTGS2* genes, both in patients with inverted papilloma and patients with chronic sinusitis with nasal polyps. Based on the results, significant correlations were found between all the tested transcript variants of the *PTGS1* and *PTGS2* genes in patients in the inverted papilloma group, particularly pronounced between the COX2.1 and COX2.2 variants. Similarly, in the group of patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps, significant correlations were found, however, the levels of significance were lower and the strength of the correlation was lower. He points out that the expression of all transcriptional variants of the *PTGS1* and *PTGS2* genes was lower in inverted papilloma compared to chronic rhinosinusitis.

In the next stage, an analysis of the relationship between the studied transcriptional variants of the *PTGS1* and *PTGS2* genes and the clinical features of inverted papilloma was performed. A relationship was found between the expression of transcriptional variants of *PTGS1* and *PTGS2* genes in patients with IP with: smoking, cancer stage, tumor recurrence and the number of procedures associated with the presence of a recurrence or residual tumor.

Smokers have been shown to have lower expression of transcriptional variants of the *PTGS1* and *PTGS2* genes, except for the COX1.2 variant. The expression of the studied genes was significantly lower in patients with a higher stage of inverted papilloma (T3 and T4) compared to T1 and T2 tumors. It was shown that patients with lower expression of COX1.1, COX1.2 and COX2.1 transcript variants had significantly more relapses. Moreover, in patients with lower expression of COX1.1, COX1.2, COX1.4 and COX2.3, the recurrence-free survival time was significantly shorter, and patients with the current variants of COX1.1, COX1.2 had a 4.5-fold, and in the case of COX2.3, a 4-fold greater chance of recurrence. Expression of transcriptional variants of the *PTGS1* and *PTGS2* genes was lower in patients who had two or more surgeries for recurrence. These relationships were statistically significant for COX1.1 and COX 1.2.

Own analysis showed no significant correlation between the expression of individual transcriptional variants of the *PTGS1* and *PTGS2* genes and gender, age, severity of symptoms in the VAS scale and the occurrence of malignant transformation within the inverted papilloma.

Conclusions

1. Cyclooxygenase-1 (*PTGS1*) gene transcription variants identified and cyclooxygenase-2 (*PTGS2*) present in patients with inverted papilloma
2. Both in patients with inverted papilloma and in the control group chronic rhinosinusitis with nasal polyps coexist with known transcription variants of the *PTGS1* and *PTGS2* genes
3. Patients with inverted papilloma and chronic rhinosinusitis coexist with new, undescribed transcription variants of *PTGS1* and *PTGS2* genes
4. In the formation of the inverted papilloma phenotype, they have a known meaning and new variants of the *PTGS1* and *PTGS2* genes, however, their role as to the protective nature or promoting a more aggressive course of the disease is undetermined
5. Reduced expression of the studied transcription variants of the g *PTGS1* and *PTGS2* enes favors the occurrence of inverted papilloma, its greater clinical advancement at the time of diagnosis and more frequent recurrence. However, it is impossible to clearly define their protective nature, which indicates the need to continue research in this area.