

Związek między ekspresją białka HSP90 a całkowitym przeżyciem i kliniczno-patologicznymi cechami pacjentów z rakiem żołądka

Relationship between HSP90 protein expression and overall survival and clinicopathological outcomes in gastric cancer patients

Wkład autorów:
A – Projekt badań
B – Zbieranie danych
C – Analiza statystyczna
D – Interpretacja danych
E – Przygotowanie manuskryptu
F – Analiza literatury
G – Zbieranie funduszy

Cemil Yüksel^{1ABDE}, Salih Burak Gündoğdu^{2BD}, Batuhan Bakırarar^{3C}, Ayşe Yılmaz Çiftçi^{4BCEF}, Mesut Tez^{5ABDF}, Barış Doğu Yıldız^{5ABDF}

¹Clinic of Surgical Oncology, Mersin City Training and Research Hospital, Mersin, Turkey

²Clinic of Gastrointestinal Surgery, Health Science University Ankara City Hospital, Ankara, Turkey

³Ankara University, School of Medicine, Department Biostatistics, Ankara, Turkey

⁴Clinic of Pathology, Health Science University Ankara City Hospital, Ankara, Turkey

⁵Clinic of General Surgery, Health Science University Ankara City Hospital, Ankara, Turkey

Historia artykułu: Otrzymano: 24.08.2021 Zaakceptowano: 10.02.2022 Opublikowano: 11.02.2022

STRESZCZENIE:

Wstęp: Rak żołądka to często występujący problem zdrowotny, który cechuje się wysoką chorobowością i śmiertelnością. Główną metodą jego leczenia jest zabieg operacyjny. W ostatnim czasie przeprowadzono badania, w których analizowano cechy biologiczne i genetyczne raka żołądka, ale wciąż nie wyczerpały one tematu.

Cel: Celem niniejszego badania jest ocena kliniczno-patologicznej i prognostycznej roli ekspresji białek szoku termicznego (HSP90) u pacjentów z resekcyjnym rakiem żołądka.

Metody: Jednośrodkowe, retrospektywne badanie kliniczne przeprowadzono w oddziale chirurgii ogólnej miejscowego szpitala klinicznego. Wzięło w nim udział 54 pacjentów poddanych radykalnej operacji raka żołądka pomiędzy 2011 a 2014 rokiem.

Wyniki: Próbki do badania histopatologicznego utrwalone w formalinie i parafinie poddano ponownej ocenie po wybarwieniu w kierunku HSP90, następnie oceniono ekspresję HSP90. Jedynie u 39 (72,2%) pacjentów stwierdzono ekspresję białka HSP90. Spośród nich 17 (31,5%) wykazywało niską ekspresję, 13 (24,1%) umiarkowaną, a 9 (10,5%) silną. Ekspresja HSP90 nie miała istotnego znaczenia dla przeżywalności pacjentów poddanych radykalnej resekcji raka żołądka, chociaż związek ten był bliski poziomu istotności statystycznej. Siła ekspresji również nie miała istotnego statystycznie znaczenia dla całkowitego przeżycia.

Wnioski: W literaturze można znaleźć różne doniesienia na temat ekspresji HSP90 u pacjentów z rakiem żołądka. Niektóre z nich potwierdzają prognostyczną rolę tego białka, inne zaś nie. Niniejsze badanie cechuje się kilkoma ograniczeniami. Nie uwzględniono w nim zmian przerzutowych, badanie obejmuje pacjentów jedynie z naszego ośrodka, ich liczba jest niewielka, a w pracach uczestniczył tylko jeden patomorfolog. Jest to pierwsze badanie poświęcone temu zagadnieniu, przeprowadzone w tej populacji. Można przeprowadzić dalsze badania mające na celu ocenę tego związku, aby w ten sposób odkryć nowe sposoby leczenia raka żołądka.

SŁOWA KLUCZOWE: białka szoku cieplnego, gastrektomia, nowotwory żołądka, przeżycie

ABSTRACT:

Introduction: Gastric cancer is a highly prevalent public health problem with high morbidity and mortality. Its primary treatment is surgery. Recently, studies involving biological parameters and genetics in gastric cancer have been emerging but with many blind spots.

Aim: Our study aims to investigate the clinicopathological and prognostic significance of heat shock proteins (HSP90) expression in patients with resectable gastric cancer.

Methods: Single-center retrospective clinical study conducted at the General Surgery Department of the local training and research hospital. Our study involves 54 patients who had curative surgery for gastric cancer between 2011 and 2014.

Results: Pathological specimens fixed in formalin and paraffin were re-evaluated with HSP90 staining and expression of HSP90 was evaluated. It was found that only 39 (72.2%) patients showed HSP90 expression. Seventeen (31.5%) of those showed mild, 13 (24.1%) had moderate, and 9 (10.5%) severe expression. HSP90 expression did not have a significant effect on survival in patients who underwent curative resection for gastric cancer, although statistically close. The effect of expression and intensity on overall survival was not statistically significant either.

Conclusions: There are various reports in literature on HSP90 expression in gastric cancer – some find it to be a prognostic factor, some not. There is a number of limitations of our study as we did not include metastatic tumors, the number of patients was low, the

study involved only our patients and a single pathologist. This is the first study carried out in our population on this subject. Further studies could be done to evaluate this particular relationship in an effort to possibly identify novel treatments in gastric cancer.

KEYWORDS: gastrectomy, gastric neoplasms, heat shock proteins, survival

WYKAZ SKRÓTÓW

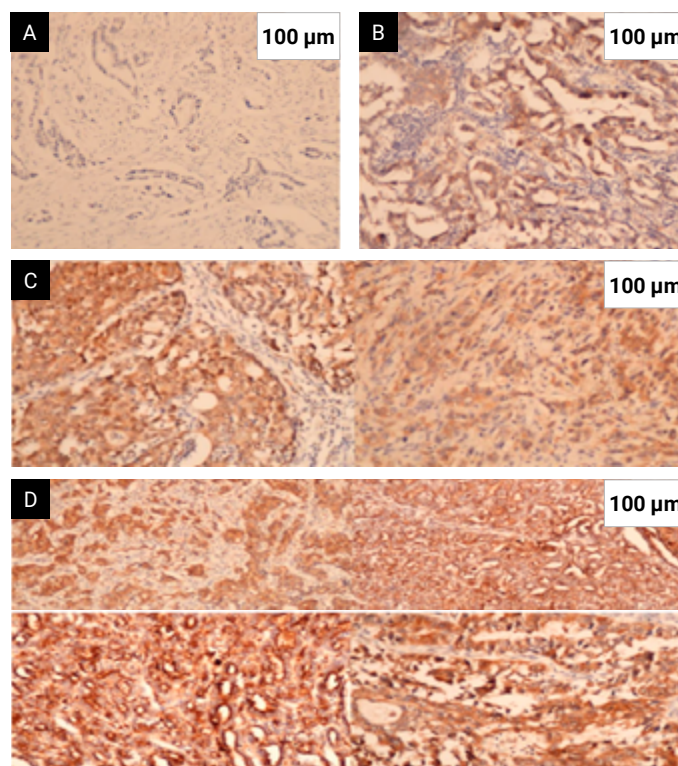
Ca 19-9 – antygen nowotworowy
CEA – antygen karcinoembrionalny
EDTA – kwas wersenowy
HSP – białko szoku cieplnego
RDW – rozpiętość rozkładu wielkości krwinek czerwonych
SD – odchylenie standardowe
TNM – klasyfikacja do oceny stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu: T – guz (ang. *tumor*), N – przerzuty do węzłów chłonnych (ang. *node*) i M – przerzuty odległe (ang. *metastasis*)

WPROWADZENIE

Pośród wszystkich nowotworów rak żołądka zajmuje czwarte miejsce pod względem częstotliwości występowania, a drugie pod względem śmiertelności [1]. Charakteryzuje się on niepomyślnym rokowaniem i niskim przeżyciem długoterminowym. Wskaźnik 5-letniego przeżycia, nawet po przeprowadzeniu skutecznej operacji, wynosi około 35%, a w wybranych grupach pacjentów, po zastosowaniu leczenia adjuwantowego, sięga 40%. Białka opiekuńcze lub białka szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins*; HSP), po raz pierwszy opisane w 1962 roku, są grupą białek produkowanych przez komórki w odpowiedzi na narażenie na wysoką temperaturę (42–46°C) [2]. Poza temperaturą do wzrostu ich poziomu może prowadzić wiele innych czynników, takich jak: etanol, arsen, zakażenie, zapalenie, toksyny, głód, niedotlenienie, odwodnienie i nowotwory. Z tego powodu są one również nazywane „białkami stresu” i stanowią element odpowiedzi organizmu na stres.

W warunkach fizjologicznych białka szoku cieplnego zapobiegają rozpadowi białek, umożliwiają nowo syntetyzowanym białkom nabycie struktur trzeciorzędowych, oddzielają od siebie źle połączane i rozpadające się białka, zapewniają prawidłowe fałdowanie białek oraz przenoszenie ich z rybosomów do miejsc docelowych [3]. Istnieje wiele różnych form HSP, z których każda znajduje się w innym miejscu komórki (Tab. I.). Białka szoku cieplnego ulegają nadmiernej ekspresji w komórkach nowotworowych i odgrywają rolę w progresji tych zmian. Ich działanie obejmuje hamowanie mechanizmów przeciwnowotworowych oraz przyspieszanie ekspresji genów odpowiedzialnych za przerzuty. Ponadto wzrost poziomu białek szoku cieplnego prowadzi do oporności na leczenie [4]. W przypadku raka żołądka za tego rodzaju działania odpowiedzialne jest białko HSP90. Z tego powodu jest ono obiecującym celem działania leków przeciwnowotworowych w terapii raka żołądka.

Ostatnio przyjęto strategię terapeutyczną, zakładającą blokowanie białek szoku cieplnego przez oddziaływanie na wiążącą ATP domenę HSP90 [5]. Po zahamowaniu HSP90 w komórkach nowotworowych dochodzi do zniszczenia białek odpowiedzialnych za ich autonomiczny wzrost oraz zaangażowanych w ochronę komórek guza. Białka szoku cieplnego mogą być również wykorzystywane do tworzenia szczepionek. Nieznana jest ekspresja HSP90



Ryc. 1. Wycinki żołądka po barwieniu hematoksyliną-eozyną. (A) komórki nowotworowe bez ekspresji HSP90 w powiększeniu x100; (B) komórki nowotworowe o niskiej ekspresji HSP90 w powiększeniu x100; (C) komórki nowotworowe o umiarkowanej ekspresji HSP90 w powiększeniu x100; (D) komórki nowotworowe o silnej ekspresji HSP90 w powiększeniu x100.

u pacjentów z rakiem żołądka w naszej populacji. Celem badania była ocena kliniczno-patologicznej i prognostycznej roli ekspresji HSP90 u pacjentów z resekcyjnym rakiem żołądka.

MATERIAŁY I METODY

Badanie zostało przeprowadzone w Oddziale Chirurgii Ogólnej naszego szpitala za zgodą Komisji Bioetycznej (numer zgody: 622/2015) w październiku 2015 roku. Objęło ono łącznie 54 pacjentów poddanych radykalnej operacji z powodu raka żołądka pomiędzy 2011 a 2014 rokiem. Retrospektywnej analizie poddano dokumentację medyczną pacjentów, wyniki badań patomorfologicznych oraz opis zabiegu. Do badania włączono pacjentów z pierwotnym rakiem żołądka poddanych radykalnej operacji. Z badania wykluczono pacjentów z rakiem w 4. stadium zaawansowania, z guzami nieresekcyjnymi, otrzymujących terapię neoadjuwantową, operowanych w trybie pilnym (perforacja, krwawienie, itp.) oraz z przerzutami. Po dobraniu grupy pacjentów uzyskano bloczki parafinowe z wycinkami tkanek z archiwum Zakładu Patologii. Następnie przeprowadzono barwienie immunohistochemiczne.

Barwienie immunohistochemiczne

Barwienie immunohistochemiczne przeprowadzono za pomocą aparatu *Leica Bond* (New Castle, Wielka Brytania), pobierając z wybranych bloczków parafinowych skrawki o grubości 3 mm.

Tab. I. Białka szoku cieplnego i ich lokalizacja w komórce.

RODZAJ	LOKALIZACJA	FUNKCJA
HSP27	Cytoplazma	Hamowanie agregacji białek, wzrost komórek i ich różnicowanie
HSP60	Cytoplazma	Hamowanie agregacji białek mitochondrialnych, zwijanie się białek
HSP70	Cytoplazma	Hamowanie agregacji białek, zwijanie się białek
HSP75	Mitochondria	Nieznana
HSP94	Retikulum endoplazmatyczne	Kontrola jakości białek
HSP90	Cytoplazma	Hamowanie agregacji białek, stabilizacja białek i ich przenoszenie

HSP – białka szoku cieplnego.

Po deparafinizacji skrawki podgrzewano przez 20 minut w roztworze na bazie kwasu etylenodiaminotetraoctowego (Bond Epitope Retrieval Solution 2, New Castle, Wielka Brytania). Blokowanie peroksydazy (10 minut) przeprowadzono za pomocą zestawu *Bond Polymer Refine Detection*. Próbkę przez 20 minut inkubowano z przeciwciałami przeciwko HSP90 (HSP90, mysie przeciwciało poliklonalne, Ab13492, klon: AC88 Abcam, Cambridge, Wielka Brytania) w roztworze o stężeniu 1:100. Inkubację prowadzono przez 10 minut w post primerze, 10 minut w polimerazie, 10 minut w diaminobenzydynie-chromogenie oraz przez 5 minut w hematoksylinie w celu wybarwienia. Po każdym kolejnym etapie wycinki płukano. Po osuszeniu alkoholem przez 2 minuty inkubowano je w ksylenie, a następnie pokrywano preparatem Entellan. Za kontrolę dodatnią służyła tkanka jąder. Jeśli wybarwieniu uległo więcej niż 5% komórek guza, próbkę uznawano za dodatnią pod kątem białek szoku cieplnego. Stanowiło to kryterium pozwalające stwierdzić obecność ekspresji HSP90. Dodatkowo intensywność ekspresji określono, używając do tego celu 3-stopniowej skali. Klasyfikowano ją jako niską (+), umiarkowaną (++) lub silną (+++) [6] (Ryc. 1.). Wszystkie próbki poddane barwieniu immunohistochemicznemu były oceniane przez jednego patomorfologa.

Analiza statystyczna

Do analizy danych wykorzystano oprogramowanie IBM SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, Stany Zjednoczone). Zmienne ilościowe wyrażono jako średnie $\pm$ odchylenie standardowe i mediany (minimum–maksimum), zaś zmienne jakościowe jako liczbę pacjentów (procent). Do porównania zmiennych ilościowych z dwiema kategoriami jakościowymi zastosowano test t-Studenta, jeśli spełnione były założenia rozkładu normalnego, a jeśli nie – test U Manna-Whitneya. Do porównania dwóch zmiennych jakościowych wykorzystano testy chi-kwadrat i test dokładny Fishera. Analizę przeżycia przeprowadzono z zastosowaniem metody Kaplana-Meiera dla zmiennych jakościowych, zaś do określenia istotności różnic między grupami wykorzystano test *log-rank*. Wartość *p* mniejszą niż 0,05 uznano za istotną statystycznie.

WYNIKI

Gastrektomię z limfadenektomią D2 przeprowadzono u 54 pacjentów z rakiem żołądka. Średni czas trwania obserwacji wynosił 40,8 miesiąca. W opisanej grupie było 29 (53,7%) mężczyzn i 25 kobiet (46,3%). Średnia wieku pacjentów $\pm$ odchylenie

Tab. II. Zmienne opisowe dotyczące pacjentów.

ZMIENNA		
Wiek	Średnia $\pm$ SD	61,80 $\pm$ 11,54
	Mediana (Min.–Max.)	61,00 (33,00–89,00)
Wielkość nowotworu (cm)	Średnia $\pm$ SD	7,24 $\pm$ 4,26
	Mediana (Min.–Max.)	6,00 (2,00–25,00)
Węzły chłonne łącznie	Średnia $\pm$ SD	25,36 $\pm$ 14,68
	Mediana (Min.–Max.)	25,00 (2,00–68,00)
Wielkość węzłów chłonnych (cm)	Średnia $\pm$ SD	1,57 $\pm$ 0,72
	Mediana (Min.–Max.)	1,50 (0,60–4,50)
Czas przeżycia (miesiące)	Średnia $\pm$ SD	30,64 $\pm$ 21,94
	Mediana (Min.–Max.)	23,00 (3,00–90,00)
Płeć	Mężczyźni	29 (53,7)
	Kobiety	25 (46,3)
Zajęcie układu chłonnego i krwionośnego	Tak	36 (66,7)
	Nie	17 (31,5)
Stadium T w klasyfikacji TNM	1	6 (11,1)
	2	4 (7,4)
	3	44 (81,5)
	0	15 (27,7)
Stadium N w klasyfikacji TNM	1	15 (27,7)
	2	6 (11,1)
	3	18 (33,5)
Stopień zaawansowania klinicznego	1	7 (13,0)
	2	11 (20,4)
	3	36 (66,6)
	Nie	15 (27,8)
Ekspresja HSP	Tak	39 (72,2)
	Nie	15 (27,8)
Nawroty	Tak	3 (5,6)
	Nie	51 (94,4)
Przerzuty	Tak	17 (31,5)
	Nie	37 (68,5)
Siła ekspresji HSP	Niska	17 (43,5)
	Umiarkowana	13 (33,3)
	Silna	9 (23,2)

SD – odchylenie standardowe, Max. – maximum, Min. – minimum

standardowe oraz mediana wieku wynosiły odpowiednio $60,8 \pm 11,38$ i $60,00$ ($33,00$ – $89,00$). Średni czas przeżycia wynosił $30,64 \pm 21,94$ (3–90) miesięcy. U 7 pacjentów (13%) rak był w 1. stopniu zaawansowania, u 11 (20,3%) w 2., zaś u 36 (66,7%) w 3. stopniu zaawansowania. Spośród wszystkich guzów 14 zlokalizowanych było we wpuszcie, 17 w trzonie żołądka, a 26 w jamie odźwiernikowej. U żadnego z pacjentów nie stosowano przed zabiegiem terapii neoadjuwantowej. Wszyscy pacjenci, biorący udział w badaniu, mieli postawioną diagnozę gruczolakoraka żołądka. U 36 pacjentów stwierdzono zajęcie układu chłonnego i krwionośnego, zaś u 17 do niej nie doszło. U 1 pacjenta nie udało się określić, czy doszło do zajęcia układu chłonnego i krwionośnego. U 14 chorych (25,9%) nie doszło do powstania przerzutów do węzłów chłonnych, zaś u 40 (74,1%) stwierdzono obecność zmian przerzutowych w węzłach.

W klasyfikacji TNM u 6 pacjentów (11,1%) wielkość guza T określono jako T1, u 4 (7,4%) jako T2, zaś u 44 (81,5%) jako T3. U żadnego z nich nie doszło do powstania przerzutów odległych. Jeśli chodzi o rodzaj przeprowadzonego zabiegu, to u 22 chorych (40,7%) wykonano gastrektomię całkowitą, zaś u 32 (59,3%) gastrektomię prawie całkowitą (subtotalną). W okresie obserwacji pooperacyjnej do nawrotu choroby doszło u 3 pacjentów (5,6%), natomiast u 51 (94,4%) nawrót nie wystąpił. U 17 (31,5%) doszło do powstania przerzutów w okresie obserwacji pooperacyjnej, zaś u 37 (68,5%) przerzutów nie stwierdzono. W okresie obserwacji pooperacyjnej 23 pacjentów zmarło, a 31 przeżyło. W Tab. II. przedstawiono zmienne opisowe dotyczące badanej grupy pacjentów.

Spośród 54 pacjentów 39 (72,2%) wykazywało ekspresję HSP90; nie stwierdzono zaś jej u 15 (27,8%). Uporządkowanie ekspresji HSP90 pod względem jej intensywności pokazało, że w grupie 39 pacjentów 17 (31,5%) wykazywało łagodną ekspresję, 13 (24,1%) umiarkowaną, zaś 9 (10,5%) silną. Analiza związku między cechami demograficznymi pacjentów, wynikami badania histopatologicznego i kliniczno-patologiczną charakterystyką pacjentów a ekspresją HSP90 nie wykazała istotnej statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją HSP90 a: płcią, lokalizacją guza, zajęciem układu krwionośnego i chłonnego, stadium T, wielkością guza, zajęciem węzłów chłonnych, stopniem zaawansowania klinicznego, nawrotowością ani przerzutami w okresie obserwacji ($p > 0,05$). Analizie poddano również rozpiętość rozkładu wielkości krwinek czerwonych (RDW), ponieważ wzrasta ona w przypadku stanu zapalnego i w nowotworach złośliwych. Nie wykazano jednak istotnego statystycznie związku pomiędzy RDW a ekspresją HSP90 ($p = 0,522$). Badano również, czy HSP jest w jakiś sposób związane z hipoalbuminemią, będącą markerem niepomyślnego rokowania i złego stanu odżywienia, ale nie wykazano pomiędzy nimi istotnej zależności ($p = 0,736$). Nie udało się wykazać także istotnego związku między HSP a markerami nowotworowymi, będącymi wskaźnikami złego rokowania ($p = 0,724/0,108$). Czas przeżycia pacjentów niewykazujących ekspresji HSP wynosił $39,60 \pm 24,33$ miesiąca, zaś $27,59 \pm 20,47$ miesiąca u pacjentów wykazujących ekspresję HSP, co oznacza, że pacjenci z ekspresją HSP cechowali się krótszym czasem przeżycia. Związek ten osiągnął jednak poziom istotności statystycznej przy p wynoszącym 0,052 (Tab. III., IV.).

Analizie poddano: wpływ cech demograficznych pacjentów, wyników badania histopatologicznego i kliniczno-patologicznej charakterystyki pacjentów na czas przeżycia. Analiza jednoczynnikowa nie wykazała istotnego statystycznie związku między: wiekiem,

Tab. III. Związek między HSP a zmiennymi jakościowymi.

ZMIENNE		HSP				WARTOŚĆ P
		NIE		TAK		
		N	%	N	%	
Płeć	Mężczyźni	7	46,7	22	56,4	0,758 ^a
	Kobiety	8	53,3	17	43,6	
Zajęcie układu chłonnego i krwionośnego	Tak	14	93,3	22	57,8	0,845 ^b
	Nie	1	6,7	16	42,2	
Stadium T w klasyfikacji TNM	1	2	15,4	4	9,7	0,402 ^b
	2	0	0,0	4	9,7	
	3	11	84,6	33	80,6	
Stadium N w klasyfikacji TNM	0	5	33,3	10	25,6	0,715 ^b
	1	3	20,0	12	30,7	
	2	1	6,7	5	12,8	
	3	6	40,0	12	30,9	
Stopień zaawansowania klinicznego	1	2	13,3	5	12,9	0,832 ^b
	2	2	13,3	9	23,0	
	3	11	73,4	25	64,1	
Nawroty	Tak	2	13,3	1	2,6	0,986 ^b
	Nie	13	86,7	38	97,4	
Przerzuty	Tak	6	40,0	11	28,3	0,90 ^a
	Nie	9	60,0	28	71,7	
RDW	≤ 13.4	5	33,3	9	23,1	0,522 ^b
	> 13.4	10	66,7	30	76,9	
Poziom albumin	Prawidłowy	11	78,6	27	67,5	0,736 ^b
	Niski	3	21,4	13	32,5	
Stężenie CEA	Prawidłowe	11	73,3	30	76,9	0,724 ^b
	Wysokie	4	26,7	9	23,1	
Stężenie CA 19-9	Prawidłowe	10	66,7	34	87,1	0,108 ^b
	Wysokie	5	33,3	5	12,9	
Przerzuty do węzłów chłonnych	Nieobecne	5	33,3	8	21,6	0,497 ^b
	Obecne	10	66,7	31	79,4	

^aTest chi-kwadrat, ^bTest dokładny Fishera

HSP – białka szoku cieplnego, RDW – rozpiętość rozkładu wielkości krwinek czerwonych, CEA – antygen karcynoembrionalny, Ca 19-9 – antygen nowotworowy

płcią, stadium T, lokalizacją guza, zajęciem układu krwionośnego i chłonnego, stopniem zróżnicowania zmiany i wielkością guza a czasem przeżycia ($p > 0,05$). HSP nie było związane z przerzutami czy nawrotem stwierdzonym w okresie obserwacji ani ze stadium N w klasyfikacji TNM, ale zmienne te w sposób istotny statystycznie skorelowane były z czasem przeżycia, a wyliczone dla nich wartości p wynosiły odpowiednio: 0,004/0,005/0,042. Analiza wieloczynnikowa wykazała, że przerzuty są istotnym statystycznie czynnikiem rokowniczym w okresie obserwacji ($p < 0,05$).

Ekspresja HSP90 nie miała istotnego wpływu na czas przeżycia pacjentów poddanych zabiegowi radykalnej gastrektomii z powodu raka żołądka, choć związek ten był bliski poziomu istotności statystycznej ($p = 0,052$). Wpływ ekspresji i jej siły na całkowity

Tab. IV. Związek pomiędzy HSP a zmiennymi ilościowymi.

ZMIENNE	HSP				WARTOŚĆ p
	NIE		TAK		
	ŚREDNIA ± SD	MEDIANA (MIN.–MAX.)	ŚREDNIA ± SD	MEDIANA (MIN.–MAX.)	
Wielkość guza (cm)	6,07 ± 2,31	5,00 (3,50–10,00)	7,64 ± 4,71	6,25 (2,00–25,00)	0,383 ^b
Węzły chłonne łącznie	19,07 ± 11,25	15,00 (5,00–35,00)	27,56 ± 15,21	26,00 (2,00–68,00)	0,053 ^a
Wielkość węzłów chłonnych (cm)	1,60 ± 0,68	1,50 (0,60–3,20)	1,55 ± 0,74	1,50 (0,70–4,50)	0,638 ^b
Czas przeżycia (miesiące)	39,60 ± 24,33	32,00 (3,00–82,00)	27,59 ± 20,47	21,50 (5,00–90,00)	0,052 ^b

^atest t-Studenta, ^btest U Manna-Whitneya

HSP – białka szoku cieplnego, SD – odchylenie standardowe, Max. – maksimum, Min. – minimum

Tab. V. Związek pomiędzy przeżyciem a ekspresją/siłą ekspresji HSP90.

		ŚMIERTELNOŚĆ				WARTOŚĆ P
		ZGON		PRZEŻYCIE		
		N	%	N	%	
Ekspresja HSP90	Dodatnia	14	60,8	25	80,6	0,098
	Ujemna	9	39,2	6	19,4	
Siła ekspresji HSP90	Niska	7	50,0	10	40,0	0,095
	Umiarkowana	2	14,2	11	44,0	
	Silna	5	35,8	4	16,0	

HSP – białka szoku cieplnego

współczynnik przeżycia również nie osiągnął poziomu istotności statystycznej ($p = 0,098/0,095$) (Tab. V.) (Ryc. 2.).

DYSKUSJA

Istnieje wiele czynników wpływających na rokowanie w przypadku raka żołądka. Są nimi czynniki związane z samym pacjentem, nowotworem oraz zastosowanym leczeniem. Do tych pierwszych zaliczyć należy: płeć, wiek, spożywanie alkoholu, palenie papierosów oraz otyłość, zaś czynniki związane z nowotworem to: jego lokalizacja, typ, zasięg inwazji, złośliwość histologiczna, stopień zróżnicowania zmiany, rozmiar oraz zajęcie układu krwionośnego i chłonnego [7]. Na rokowanie wpływa również to, czy operacja miała charakter radykalny, czy w prawidłowy sposób wycięto węzły chłonne, a także stosowanie przedoperacyjnej i pooperacyjnej terapii neoadjuwantowej. W ostatnim czasie, poza wymienionymi czynnikami, analizowano również związek nowotworu z różnymi innymi parametrami biologicznymi i genetycznymi. Nadal istnieje jednak wiele aspektów dotyczących tych dwóch czynników, które wymagają wyjaśnienia i przeprowadzenia dalszych badań. Oczywiście jest, że kiedy tylko uda się je wyjaśnić, uzyskamy informacje, które zmienią lub umocnią nasze przekonania dotyczące raka żołądka i schematów jego leczenia.

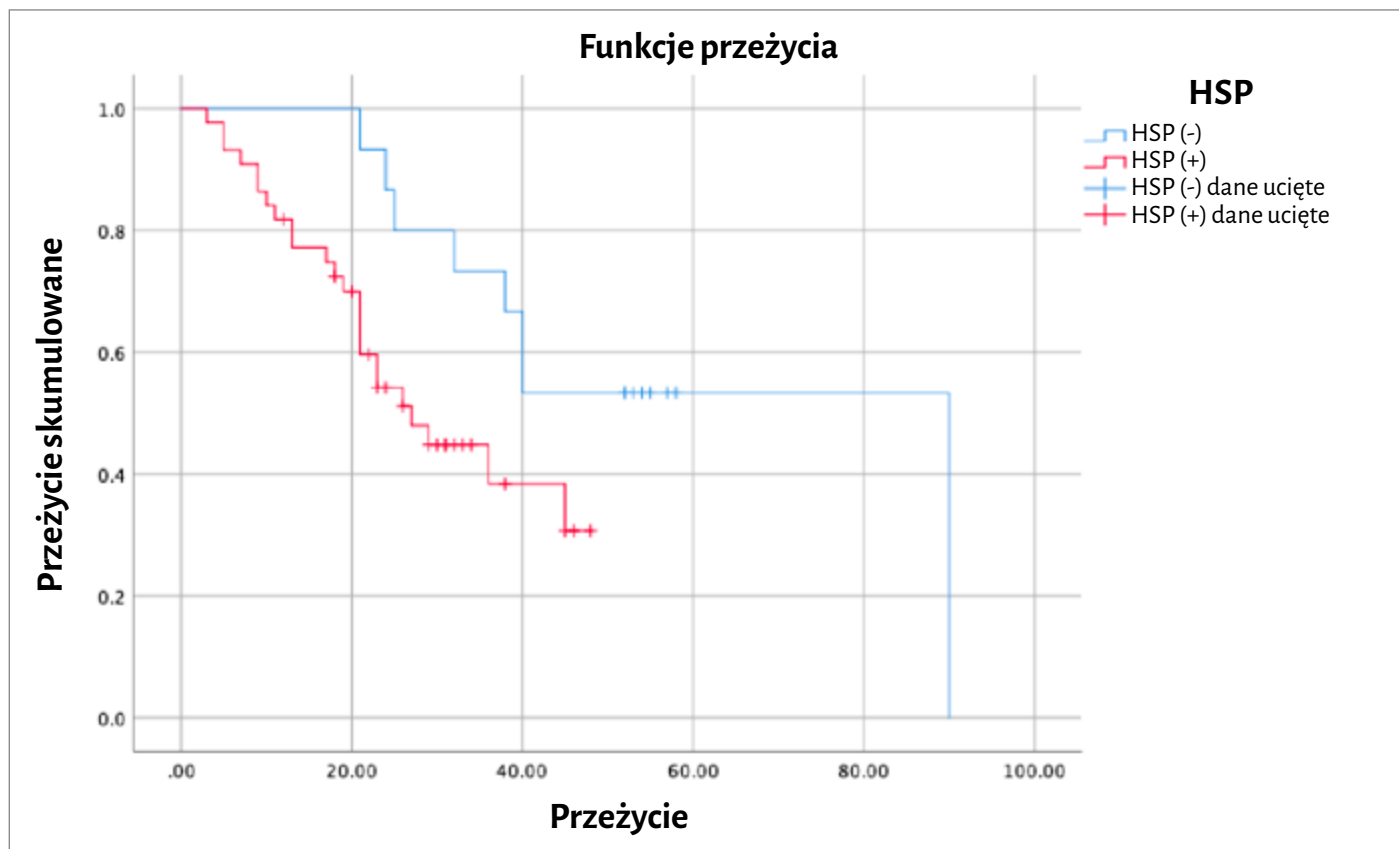
HSP podlega silnej ekspresji w komórkach zarodkowych i embryonalnych, zaś niskiej w komórkach starzejących się. Synteza białek nasila się w czasie proliferacji komórkowej, a ta wymaga dużej

aktywności HSP [8]. W komórkach nowotworowych ekspresja HSP90 odgrywa istotną rolę w homeostazie białek w warunkach niedotlenienia lub w kwaśnym środowisku. Ponadto białka HSP umożliwiają komórkom nowotworowym przetrwanie mimo mutacji genetycznych zagrażających ich życiu. Ekspresja HSP90 jest bardziej nasiloną w wielu guzach litych i nowotworach hematologicznych. Chociaż w niektórych publikacjach wykazano, że wzrasta ona w przypadku nowotworów: żołądka [6, 9–12], trzustki [13], płuc [14], piersi [15], raka wątrobowokomórkowego [16], trzonu macicy [17], prostaty [18], jelita grubego [19] oraz nowotworów podścieliskowych przewodu pokarmowego [20], związek ekspresji HSP90 z rokowaniem u pacjentów z rakiem żołądka nadal budzi kontrowersje [9, 21].

W badaniach prowadzonych w ciągu ostatnich 20–30 lat podkreślano, że HSP może stanowić potencjalny cel terapeutyczny. Uważa się, że zahamowanie ekspresji HSP90 może prowadzić do skutecznego zapobiegania progresji nowotworu, choć nie jest ono w stanie zatrzymać apoptozy. Celem niniejszego badania była analiza związku między ekspresją HSP90 i jej siłą a cechami demograficznymi, kliniczno-patologicznymi i czasem przeżycia pacjentów poddanych zabiegowi radykalnej gastrektomii z powodu raka żołądka. Oceniano również czynniki wpływające na przeżycie pacjentów z badanej grupy.

Nasze badanie nie wykazało statystycznie istotnego związku między ekspresją HSP90 i siłą ekspresji HSP90 a cechami demograficznymi, kliniczno-patologicznymi i czasem przeżycia pacjentów. Analiza jednoczynnikowa pokazała, że stadium N w klasyfikacji TNM, a także przerzuty i nawroty stwierdzone w okresie obserwacji, są czynnikami o znaczeniu prognostycznym u pacjentów z rakiem żołądka, podczas gdy analiza wieloczynnikowa wykazała, że jedynie przerzuty pełnią rolę prognostyczną u tych pacjentów. W przeprowadzonym przez nas badaniu ekspresję HSP90 stwierdzono u 18 pacjentów poniżej 60. roku życia oraz 21 pacjentów powyżej 60. roku życia. Zgodnie z danymi literaturowymi, w naszym badaniu nie stwierdzono istotnej statystycznej korelacji między wiekiem a ekspresją HSP90 [6, 9, 22]. Mimo że w dostępnych badaniach stosunek mężczyzn do kobiet wynosił 2:1, w naszym badaniu był on inny ze względu na włączenie do niego jedynie tych pacjentów, których poddano zabiegowi radykalnej gastrektomii. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach, w niniejszej pracy nie wykazano istotnego statystycznie związku pomiędzy płcią a ekspresją HSP90 [6, 23].

Wang i wsp. [11] opublikowali pracę, w której wspomnieli o statystycznie istotnej korelacji pomiędzy: nasiloną ekspresją HSP90 a wielkością guza (> 5 cm), jego lokalizacją, stadium T3 lub T4 w klasyfikacji TNM, przerzutami do węzłów chłonnych oraz 3. i 4. stopniem zaawansowania zmiany. Nie zaobserwowano istotnej statystycznie korelacji z wiekiem, płcią ani stopniem zróżnicowania zmiany. W naszym badaniu uzyskaliśmy podobne wyniki w odniesieniu do płci i wieku. W tym samym badaniu wykazano istnienie statystycznie istotnej korelacji między HSP90 a inwazyjnością raka żołądka i jego skłonnością do dawania przerzutów. Z drugiej strony rokowanie dla pacjentów wykazujących ekspresję HSP90 było gorsze, wobec czego stwierdzono, że HSP90 jest czynnikiem o istotnym znaczeniu rokowniczym dla pacjentów z rakiem żołądka. W naszym badaniu nie wykazano, by ekspresja HSP90 odgrywała rolę w rokowaniu. Chociaż pacjenci wykazujący ekspresję HSP cechowali się krótszym czasem przeżyciem i większymi rozmiarami guza, to zależność ta nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej. Ponadto silniejszą ekspresję HSP stwierdzono



Ryc. 2. Analiza Kaplana-Meiera.

u pacjentów ze zmianami o wyższym stopniu zaawansowania w klasyfikacji TNM, choć zależność ta nie była istotna statystycznie.

Giaginis i wsp. [6] badali ekspresję HSP90, określając jej nasilenie jako łagodne, umiarkowane lub silne. Nie zaobserwowano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją HSP90 a kliniczno-patologicznymi cechami pacjentów. Wykazano, że siła ekspresji jest związana jedynie z wielkością guza, ale poziom istotności statystycznej osiągnęła zależność pomiędzy ekspresją HSP90 a czasem przeżycia, co sprawia, że HSP90 można uznać za czynnik prognostyczny. W naszym badaniu wykazano jednak, że siła ekspresji HSP90 nie może być czynnikiem rokowniczym. Wysoka ekspresja HSP90 była związana z dłuższym czasem przeżycia pacjentów z rakiem żołądka bez przerzutów do węzłów chłonnych, podobnie jak ekspresja HSP90 była skorelowana z długim całkowitym czasem przeżycia u pacjentów z nowotworami o wysokim stopniu zróżnicowania i bez przerzutów odległych. Już samo to wskazuje, że HSP90 nadal budzi wiele kontrowersji.

Berezowska i wsp. [9] wykazali istotną statystycznie zależność pomiędzy stopniem zaawansowania klinicznego zmiany w klasyfikacji TNM a ekspresją HSP90, ale, podobnie jak w naszym badaniu, nie stwierdzili, by ekspresja HSP90 i jej siła były w sposób istotny statystycznie skorelowane z rokowaniem.

Zuo i wsp. [22] porównali pacjentów z rakiem żołądka i zapaleniem żołądka pod kątem ekspresji HSP90, stwierdzając statystycznie wyższą ekspresję HSP90 w przypadku raka żołądka. Co więcej, wykazano, że u pacjentów z rakiem żołądka przerzuty do węzłów chłonnych były w sposób istotny statystycznie związane z ekspresją HSP90. Autorzy badania nie odnieśli się w żaden

sposób do kwestii rokowania. Isomoto i wsp. [24] oraz Maehara i wsp. [25] przeprowadzili badania, nie stwierdzając istotnego związku pomiędzy rakiem żołądka a ekspresją HSP.

W naszym badaniu ani ekspresja HSP90, ani jej nasilenie nie miały istotnego statystycznie znaczenia dla kliniczno-patologicznych cech pacjentów z rakiem żołądka, ani dla ich rokowania. Niespójność wyników wynika z tego, że w przeciwieństwie do publikacji literaturowych, w naszym badaniu wzięli udział pacjenci poddani zabiegowi radykalnej resekcji, a inne badania obejmowały również pacjentów z przerzutami. Być może więc ekspresja HSP90 wzrasta znacząco w późniejszych stadiach rozwoju nowotworu. Inną przyczyną mogą być różnice genetyczne. Nigdy wcześniej w naszej populacji nie przeprowadzono badań nad związkiem raka żołądka z ekspresją HSP90, a jedyne dostępne na ten temat dane pochodziły z zagranicznych doniesień. Ekspresja HSP90 może zależeć od wielu różnych czynników związanych z cechami danej populacji, dlatego związek między HSP90 a populacją powinien być przedmiotem dalszych badań. Inną przyczyną mogą być różne rodzaje sygnałów wysyłanych przez mikrośrodowisko guza oraz różne typy histologiczne poszczególnych komórek nowotworowych. Na uzyskane wyniki wpływ mogły mieć również kwestie techniczne. Badanie tkanek tylko przez jednego patomorfologa oraz różnice w zastosowanej technice barwienia mogły wpłynąć na ocenę ekspresji HSP90 oraz jej nasilenia w porównaniu z danymi z literatury.

Ograniczeniami niniejszego badania są: niewielka liczba pacjentów, retrospektywny model badania, przeprowadzenie go w jednym ośrodku oraz brak randomizacji i grupy kontrolnej. By ocenić rolę ekspresji HSP90 w naszej populacji, konieczne jest przeprowadzenie badań z udziałem większej liczby pacjentów.

W literaturze nie ma zbyt wielu doniesień na temat związku między rakiem żołądka a ekspresją HSP90, a dostępne na ten temat dane są raczej ograniczone. Zaprzeczające sobie wzajemnie dane literaturowe nie pozwalają na jednoznaczne określenie zależności pomiędzy ekspresją HSP90 a rakiem żołądka. Uważamy więc, że konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań poświęconych temu zagadnieniu, zwłaszcza w krajach, w których rak żołądka jest bardziej rozpowszechniony.

Wszystkie te badania stawiają sobie za cel odpowiedź na pytanie, w jaki sposób wykorzystać ekspresję HSP90 w leczeniu raka żołądka. W literaturze dostępne są prace oceniające rolę inhibicji HSP90 w leczeniu raka [26, 27]. W ostatnim czasie zablokowanie HSP90 jest jednym z głównych przedmiotów zainteresowania naukowców. W terapii pacjentów z rakiem żołądka zastosowanie tej metody jako jedynej lub w połączeniu z innymi sposobami leczenia jest obecnie przedmiotem badań. Jednak jak dotąd nie zaprobowano żadnego inhibitora HSP90 do stosowania u pacjentów z rakiem żołądka [28]. Szczególnie najnowsze badania sugerują, że

zahamowanie HSP90 może być skuteczną metodą leczenia raka w sytuacji oporności na inne leki [29–32]. Stworzenie nowych strategii terapeutycznych będzie możliwe wtedy, gdy uda się lepiej zrozumieć związek pomiędzy nowotworami a ekspresją HSP90.

Podsumowując, należy stwierdzić, że nie mamy jasnych dowodów na to, by ekspresja HSP90 pełniła u pacjentów z rakiem żołądka z naszej populacji rolę czynnika prognostycznego. Niniejsze badanie jest pierwszym, w którym wykazano związek pomiędzy rakiem żołądka a ekspresją HSP90 w naszej populacji. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, uważamy, że jest za wcześnie, by myśleć o zastosowaniu inhibitorów HSP90 w leczeniu raka żołądka. Dalsze badania mogą pomóc zgłębić nieznane dotąd aspekty ekspresji HSP90 w naszej populacji. Może się okazać, że HSP90 odgrywa istotną rolę w rozwoju nowotworu, jego inwazji lokalnej, przerzutach i rokowaniu dla pacjentów z tym typem zmian. HSP90 mogłoby stać się więc celem oddziaływać terapeutycznych, prowadząc w ten sposób do osiągnięcia lepszych wyników leczenia raka żołądka.

PIŚMIENICTWO

- Kamangar F., Dores G.M., Anderson W.F. et al.: Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*, 2006; 24(14): 2137–2150. PMID: 16682732 doi: 10.1200/JCO.2005.05.308.
- Aufricht C.: Heat-shock protein 70: molecular supertool? *Pediatr Nephrol*, 2005; 20(6): 707–713. PMID: 15782306; doi: 10.1007/s00467-004-1812-6.
- Calderwood S.K., Khaleque M.A., Sawyer D.B. et al.: Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*, 2006; 31(3): 164–172. PMID: 16483782 doi: 10.1016/j.tibs.2006.01.006.
- Eustace B.K., Jay D.G.: Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell cycle*, 2004; 3(9): 1096–1098. PMID: 15326368; doi: 10.4161/cc.3.9.1088.
- Workman P.: Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone. *Trends Mol Med*, 2004; 10(2): 47–51. PMID: 15106614; doi: 10.1016/j.molmed.2003.12.005.
- Giaginis C., Daskalopoulou S.S., Vgenopoulou S. et al.: Heat Shock Protein-27, -60 and -90 expression in gastric cancer: association with clinicopathological variables and patient survival. *BMC Gastroenterol*, 2009; 9(1): 14. PMID: 19203381; doi: 10.1186/1471-230X-9-14.
- Kajiyama Y., Tsurumaru M., Udagawa H. et al.: Prognostic factors in adenocarcinoma of the gastric cardia: pathologic stage analysis and multivariate regression analysis. *J Clin Oncol*, 1997; 15(5): 2015–2021. PMID: 9164213 doi: 10.1200/JCO.1997.15.5.2015.
- Kazlauskas A., Sundström S., Poellinger L. et al.: The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol*, 2001; 21(7): 2594–2607. PMID: 11259606; doi: 10.1128/MCB.21.7.2594-2607.2001.
- Berezowska S., Novotny A., Bauer K. et al.: Association between HSP90 and Her2 in gastric and gastroesophageal carcinomas. *PLoS One*, 2013; 8(7): e69098. PMID: 23874879; doi: 10.1371/journal.pone.0069098.
- Redlak M.J., Miller T.A.: Targeting PI3K/Akt/HSP90 signaling sensitizes gastric cancer cells to deoxycholate-induced apoptosis. *Dig Dis Sci*, 2011; 56(2): 323–329. PMID: 20585984; doi: 10.1007/s10620-010-1294-2.
- Wang J., Cui S., Zhang X. et al.: High expression of heat shock protein 90 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with advanced gastric cancer. *PLoS One*, 2013; 8(4): e62876. PMID: 23638161; doi: 10.1371/journal.pone.0062876.
- Xu Y., Jing D., Zhao D. et al.: New modification strategy of matrine as Hsp90 inhibitors based on its specific L conformation for cancer treatment. *Bioorg Med Chem*, 2020; 115305. PMID: 31928863; doi: 10.1016/j.bmc.2020.115305.
- Nagaraju G.P., Zakka K.M., Landry J.C. et al.: Inhibition of HSP90 overcomes resistance to chemotherapy and radiotherapy in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 2019; 145(6): 1529–1537. PMID: 30801702; doi: 10.1002/ijc.32227.
- Xiong Y., He L., Shay C. et al.: Nck-associated protein 1 associates with HSP90 to drive metastasis in human non-small-cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019; 38(1): 122. PMID: 30867003; doi: 10.1186/s13046-019-1124-0.
- Gowthami V.N., Suran S., Siripini S. et al.: Altered molecular pathways decides the treatment outcome of Hsp90 inhibitors against breast cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 2020; 65: 104828. PMID: 32184171; doi: 10.1016/j.tiv.2020.104828.
- Jiang Q., Shen X.: Research Progress of Heat Shock Protein 90 and Hepatocellular Carcinoma. *Int J Clin Med*, 2020; 11(2): 43–52. doi: 10.4236/ijcm.2020.112005.
- Bai X., Chen Y., Xin X. et al.: Expression and significance of heat shock protein 70, 90 in endometrial carcinomas. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi. Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 2003; 19(1): 38–40. PMID: 15132902.
- Eguchi T., Sogawa C., Ono K. et al.: CDC37 and HSP90 are Essential for Stressful Release and Tumor Progression in Resistant Prostate Cancer. *Cells*, 2020; 9(3): 755. PMID: 32204513; doi: 10.3390/cells9030755.
- Zhang S., Guo S., Li Z. et al.: High expression of HSP90 is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Peer J*, 2019; 7: e7946. PMID: 31687275; doi: 10.7717/peerj.7946.
- Kang G.H., Lee E.J., Jang K.T. et al.: Expression of HSP90 in gastrointestinal stromal tumours and mesenchymal tumours. *Histopathology*, 2010; 56(6): 694–701. PMID: 20546334; doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03550.x.
- Park S., Park J.-A., Jeon J.-H. et al.: Traditional and novel mechanisms of heat shock protein 90 (HSP90) inhibition in cancer chemotherapy including HSP90 cleavage. *Biomol Ther*, 2019; 27(5): 423. PMID: 31113013; doi: 10.4062/biomolther.2019.051.
- Zuo D.-S., Dai J., Bo A.-H. et al.: Significance of expression of heat shock protein90α in human gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2003; 9(11): 2616. PMID: 14606110; doi: 10.3748/wjg.v9.i11.2616.
- Liu H., Lu J., Hua Y. et al.: Targeting heat-shock protein 90 with ganetespib for molecularly targeted therapy of gastric cancer. *Cell Death Dis*, 2015; 6(1): e1595-e. PMID: 25590805; doi: 10.1038/cddis.2014.555.
- Isomoto H., Oka M., Yano Y. et al.: Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in gastric cancer. *Cancer Lett*, 2003; 198(2): 219–228. PMID: 12957361; doi: 10.1016/s0304-3835(03)00305-7.
- Maehara Y., Oki E., Abe T. et al.: Overexpression of the heat shock protein HSP70 family and p53 protein and prognosis for patients with gastric cancer. *Oncology*, 2000; 58(2): 144–151. PMID: 10705241; doi: 10.1159/000012091.

26. Haque A., Alam Q., Zubair Alam M. et al.: Current understanding of HSP90 as a novel therapeutic target: an emerging approach for the treatment of cancer. *Curr Pharm Des*, 2016; 22(20): 2947–2959. PMID: 27013225; doi: 10.2174/1381612822666160325152200.
27. Shrestha L., Bolaender A., Patel H.J. et al.: Heat shock protein (HSP) drug discovery and development: targeting heat shock proteins in disease. *Curr Top Med Chem*, 2016; 16(25): 2753–2764. PMID: 27072696; doi: 10.2174/1568026616666160413141911.
28. Jhaveri K., Modi S.: Ganetespib: research and clinical development. *Oncotargets Ther*, 2015; 8: 1849. PMID: 26244021; doi: 10.2147/OTT.S65804.
29. Chen X.-L., Liu P., Zhu W.-L., Lou L.-G.: DCZ5248, a novel dual inhibitor of Hsp90 and autophagy, exerts antitumor activity against colon cancer. *Acta Pharmacol Sin*, 2021; 42(1): 132–1341.
30. Birbo B., Madu E.E., Madu C.O., Jain A., Lu Y.: Role of HSP90 in Cancer. *Int J Mol Sci*, 2021; 22(19): 10317.
31. Zavareh R.B., Spangenberg S.H., Woods A., Martínez-Peña F., Lairson L.L.: HSP90 inhibition enhances cancer immunotherapy by modulating the surface expression of multiple immune checkpoint proteins. *Cell Chem Biol*, 2021; 28(2): 158–168.e5.
32. Lacey T., Lacey H.: Linking Hsp90's role as an evolutionary capacitor to the development of cancer. *Cancer Treat Res Commun*, 2021; 28: 100400. doi: 10.1016/j.ctarc.2021.100400.

Spis treści: <https://ppch.pl/issue/14531> Liczba stron: 8 Tabele: 5 Ryciny: 2 Piśmiennictwo: 32

Prawa autorskie: Some right reserved: Fundacja Polski Przegląd Chirurgiczny. Published by Index Copernicus Sp. z o. o.

Konflikt interesów: Autorzy deklaruja brak konfliktu interesów.



The content of the journal „Polish Journal of Surgery” is circulated on the basis of the Open Access which means free and limitless access to scientific data.



This material is available under the Creative Commons – Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0). The full terms of this license are available on: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Autor do korespondencji: Cemil Yüksel MD; Clinic of Surgical Oncology, Mersin City Training and Research Hospital, Mersin, Turkey; Surgical Oncologist, Specialist, Cebeci, 06590 Çankaya, Ankara; tel.: +90 535 443 1647; e-mail: cemil8537@hotmail.com

Cytowanie pracy: Yuksel C., Gundogdu S.B., Bakirarar B., Ciftci A.Y., Tez M., Yildiz B.D.: Relationship between HSP90 protein expression and overall survival and clinicopathological outcomes in gastric cancer patients; *Pol Przegl Chir* 2022; 94 (3): 51–58; DOI: 10.5604/01.3001.0015.7551