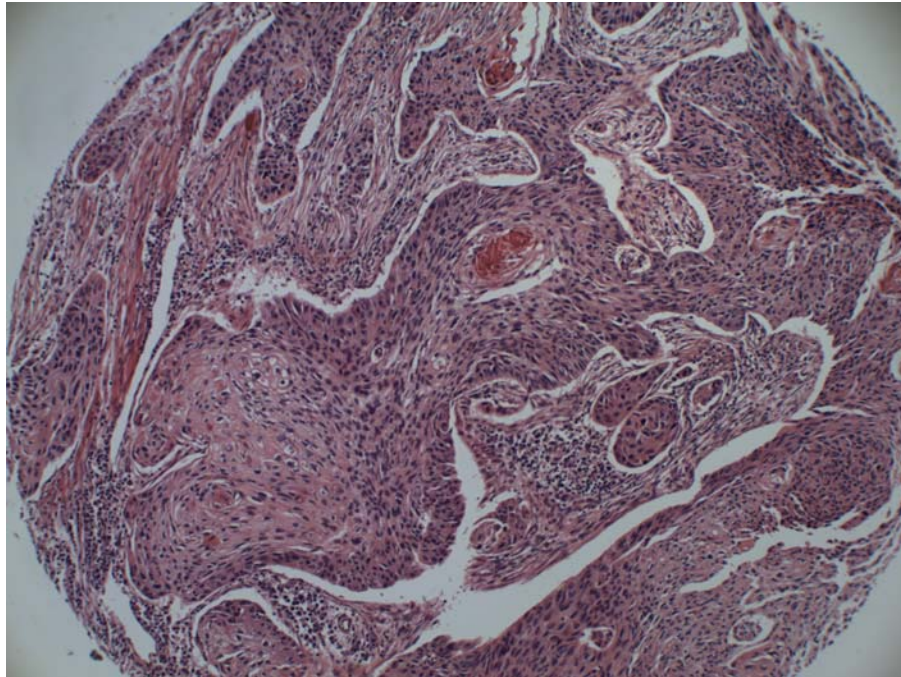


**KLINICZNE ZNACZENIE STOPNIA EKSPRESJI
CYKLOOKSYGENAZY-2 (COX-2)
W NIEDROBNOKOMÓRKOWYM RAKU PŁUCA
(NDRP)**

(rozprawa doktorska)

Barbara Szostakiewicz



Promotor: Prof. dr hab. Jacek Jassem
Katedra i Klinika Onkologii i Radioterapii
Akademia Medyczna w Gdańsku, 2008

Wykaz skrótów

COX 1 i 2 - cyklooksygenaza 1 i 2

EGF - naskórkowy czynnik wzrostu (*epidermal growth factor*)

HIF α - indukowany hipoksją czynnik α (*hypoxia induced factor α*)

IHC - wskaźnik immunohistochemiczny

IL - interleukina

MMLV - RT - wielotemperaturowa odwrotna transkryptaza

MMP - metaloproteinazy macierzy

NDRP - niedrobnokomórkowy rak płuca

NF IL-6 - czynnik jądrowy dla ekspresji interleukiny 6 (*nuclear factor for interleukin 6*)

NF κ B - czynnik jądrowy κ B (*nuclear factor κ B*)

PDGF - płytkopochodny czynnik wzrostu (*platelet derived growth factor*)

PGI₂, PGD₂, PGE₂, PGF₂ - prostaglandyny I₂, E₂, D₂, F₂

PU - przedział ufności

q - PCR - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

qRT-PCR - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (*quantitative real time polymerase chain reaction*)

TGF α i β - transformujący czynnik wzrostu α i β (*transforming growth factor α and β*)

TMA – mikromacierz tkankowa (*tissue microarray*)

TNF - czynnik martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor*)

TNFR - receptor dla czynnika martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor receptor*)

TXA - tromboksan

UICC - Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem (*Union Internationale Contre le Cancer*)

VEGF - naczyniowo-nabłonkowy czynnik wzrostu

1. Wstęp	4
1.1 Wprowadzenie	4
1.2 Cyklooksigenaza-2 i jej rola w kancerogenezie	5
1.2.1 Apoptoza	8
1.2.2 Neoangiogeneza	9
1.2.3 Tworzenie przerzutów	10
1.2.4 Układ immunologiczny	11
2. Cele pracy	13
3. Materiał i metody	14
3.1 Grupa badana	15
3.2 Metody oceny obecności COX-2 w komórkach NDRP	18
3.2.1 Mikromacierz tkankowa i immunohistochemiczna (IHC) ocena obecności COX-2	18
3.2.2 Ocena obecności białka COX-2	19
3.2.3 Izolacja RNA	20
3.2.4 Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT-PCR)	21
3.2.5 Ilościowa reakcja PCR (qPCR)	21
3.3 Metody statystyczne	26
4. Wyniki	27
4.1 Immunohistochemiczna ocena obecności białka COX-2	27
4.2 Rokownicze znaczenie ekspresji COX-2	29
4.3 Ocena ekspresji mRNA dla COX-2 przy zastosowaniu qRT-PCR	31
4.4 Rokownicze znaczenie ekspresji COX-2 mRNA	33
4.5 Związek pomiędzy obecnością białka COX-2 a ekspresją mRNA	35
5. Dyskusja	36
6. Wnioski	43
7. Streszczenie	44
8. Summary	46
8. Piśmiennictwo	48
9. Załączniki	60

1. Wstęp

1.1 Wprowadzenie

Rak płuca jest najczęściej występującym nowotworem na świecie. W 2002 roku odnotowano 1,35 miliona nowych zachorowań [1]. Stanowi on także najczęstszą przyczynę zgonu wśród chorób nowotworowych – 1,18 milionów zgonów na świecie. Częściej chorują mężczyźni (standaryzowany współczynnik zachorowalności 35,5/100.000 osób), niż kobiety (12,1/100.000). W Polsce w 2005 roku odnotowano ponad 20.000 zachorowań na raka płuca (standaryzowany współczynnik zachorowalności dla mężczyzn wynosi 60/100.000, a dla kobiet 14/100.000), przy czym udział niezarejestrowanych zachorowań ocenia się na kilkanaście procent. Rak płuca stanowi pierwszą przyczynę wśród zgonów nowotworowych u mężczyzn (ponad 16 000 rocznie) i drugą wśród kobiet (prawie 5 000 rocznie) [Krajowy rejestr nowotworów 2005]

Ze względu na istotne różnice w obrazie mikroskopowym, przebiegu klinicznym, rokowaniu i sposobie leczenia, wyróżnia się dwie główne postaci raka płuca - raka drobnokomórkowego i niedrobnokomórkowego. Rak niedrobnokomórkowy stanowi 75–80% wszystkich rozpoznań mikroskopowych raka płuca. Charakteryzuje go wolniejszy wzrost i mniejsza skłonność do tworzenia przerzutów odległych w porównaniu do raka drobnokomórkowego, uważanego za chorobę uogólnioną już w momencie rozpoznania.

Według klasyfikacji histologicznej WHO z 1999 do grupy raków niedrobnokomórkowych zalicza się raka płaskonabłonkowego, gruczolakoraka, raka wielokomórkowego, mieszanego raka gruczołowo-płaskonabłonkowego oraz rzadsze postaci raka z elementami pleomorficznymi lub mięsakowymi. Wyróżniono także cztery odmiany raka płaskonabłonkowego: brodawkowy, jasnokomórkowy, drobnokomórkowy i podstawnokomórkowy. Raka gruczołowego podzielono na postać pęcherzykową, brodawkową, raka oskrzelikowo-pęcherzykowego oraz guzy mieszane [2].

Podstawową metodą leczenia niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) jest doszczętna resekcja miąższu płucnego, jednak kwalifikuje się do niej jedynie 20-25% chorych – u pozostałych leczenie operacyjne jest niemożliwe z powodu znacznego zaawansowania nowotworu w momencie rozpoznania lub chorób towarzyszących. Pomimo postępu w chirurgii, u większości chorych leczonych operacyjnie w ciągu kilku lat dochodzi do nawrotu

miejscowego lub rozsiewu, a wskaźnik 5-letnich przeżyć wynosi 30-40% [3]. Próby zastosowania innych metod – chemioterapii lub radioterapii – doprowadziły jedynie do nieznacznej poprawy wyników leczenia w określonych sytuacjach klinicznych, kosztem zwiększonego ryzyka poważnych powikłań i znacznego wzrostu kosztów. Mimo postępu wiedzy o biologii tego nowotworu i rozwoju technik chirurgicznych, radioterapii i chemioterapii, wyniki leczenia NDRP pozostają niezadowalające i ostatnie dekady nie przyniosły znaczącego postępu.

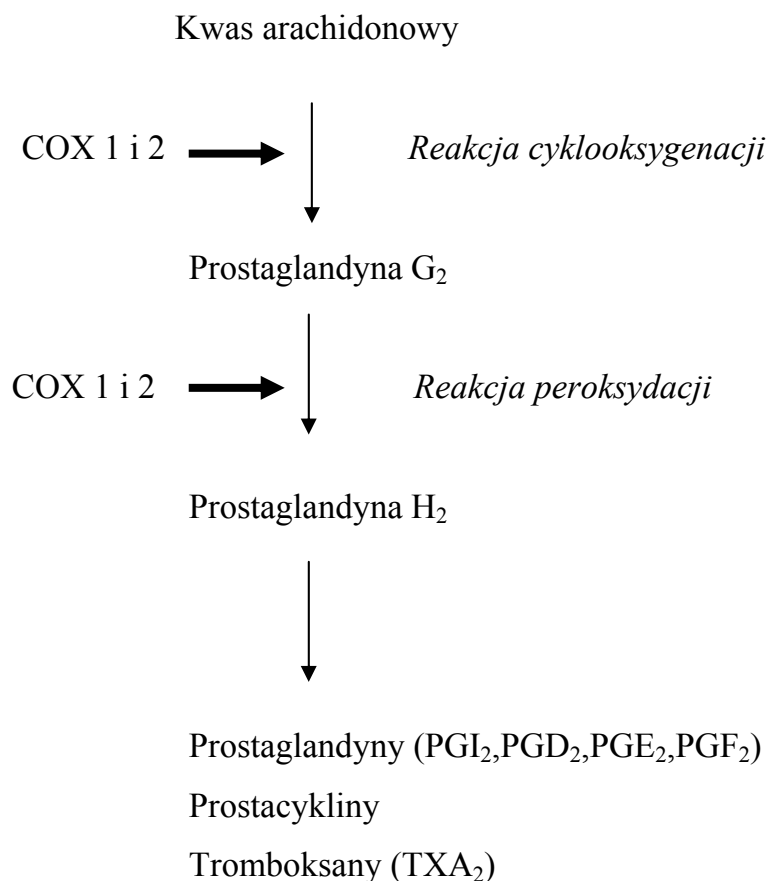
Szybki rozwój wiedzy o mechanizmach molekularnych powstawania i rozwoju raka płuca otwiera nowe możliwości w zakresie wczesnej diagnostyki oraz wyodrębnienia nowych czynników rokowniczych i predykcyjnych. Stwarza to także nadzieję na rozwój nowych strategii terapeutycznych wykorzystujących jako cele zaburzenia szlaków molekularnych związanych ze wzrostem nowotworu i tworzeniem przerzutów.

1.2 Cyklooksygenaza-2 i jej rola w kancerogenezie

Cyklooksygenaza, zwana również syntazą prostaglandyny H, jest enzymem katalizującym przemianę kwasu arachidonowego do prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanów (rys. 1). W organizmie ludzkim występuje ona w postaci dwóch izoform – cyklooksygenazy-1 (COX-1) i cyklooksygenazy-2 (COX-2). Obie izoformy mają ponad 60% wspólnej sekwencji aminokwasów. Ponadto w korze mózgowej, sercu i mięśniach znaleziono białko będące wynikiem alternatywnego składania produktu genu *COX-1*, które nazwano COX-3 [4]. Jego rola nie została jeszcze do końca poznana.

COX-1 ulega stałej ekspresji w prawie wszystkich tkankach i odpowiada za utrzymanie homeostazy ustroju m.in. przez cytoprotekcję błon śluzowych, agregację płytek i zachowanie prawidłowego przepływu nerkowego. COX-2 jest enzymem indukowanym, aktywnym w komórkach zaangażowanych w patofizjologiczne i patologiczne procesy, takie jak powstanie i podtrzymanie ostrego i przewlekłego stanu zapalnego, ból, gorączka, choroba Alzheimera i nowotwory. W warunkach fizjologicznych COX-2 występuje także w ośrodkowym układzie nerwowym, oku, przewodzie pokarmowym, w układzie krwionośnym nerek i śródbłonku naczyń.

Gen *COX-2* zlokalizowany jest na chromosomie 1 (1q25.2-25.3), składa się z 10 egzonów i koduje mRNA o wielkości ok. 4,5 kb. Białko COX-2, po potranslacyjnej modyfikacji polegającej głównie na glikozylacji, waży 75-80 kDa. W przeciwieństwie do genu *COX-1*, gen *COX-2* zawiera sekwencję *TATA box*, do której przyłącza się wiele czynników transkrypcyjnych m.in. czynnik jądrowy κB (NF- κB) i czynnik jądrowy dla ekspresji interleukiny 6 (NF-IL-6). Ponadto ekspresję COX-2 pobudza szerokie spektrum mediatorów stanu zapalnego, w tym cytokiny prozapalne (interleukina-1 β , interleukina-2, czynnik martwicy nowotworu ~ TNF, interferon- γ), lipopolisacharydy, a także czynniki wzrostu (naskórkowy czynnik wzrostu [EGF], płytkopochodny czynnik wzrostu [PDGF]) i benzopireny zawarte w dymie tytoniowym. Natomiast ekspresję COX-2 hamują czynniki przeciwzapalne – interleukina-10, interleukina-4, interleukina-13 i glukokortykosterydy [5,6].



Rys.1. Etapy syntezy prostanoidów katalizowanych przez cyklooksygenazę 1 i cyklooksygenazę 2

Podwyższone stężenia COX-2 stwierdzono w wielu guzach litych m.in. w raku jelita grubego, płuca, piersi, żołądka, przełyku, trzustki, głowy i szyi, endometrium, stercza i pęcherza moczowego [7-13].

W normalnym nabłonku w płucach nie stwierdza się obecności COX-2 [12,14-16]. Co prawda Hida i wsp. w pracy opublikowanej w 1998 roku wykryli ekspresję COX-2 w zdrowym nabłonku płucnym, jednak autorzy ci zastosowali królicze przeciwciała monoklonalne przeciw ludzkiej COX-2, podczas gdy w późniejszych pracach najczęściej stosowano mysie przeciwciała monoklonalne przeciw ludzkiej COX-2 [15].

Nadekspresję COX-2 stwierdzono w stanach poprzedzających raka płuca, takich jak atypowa hiperplazja gruczolakowa, atypowy nabłonek pęcherzykowy, dysplazja wysokiego stopnia i rak *in situ* [10,15-17]. W rozwiniętym NDRP nadekspresję COX-2 stwierdzono w 50-70% przypadków gruczolakoraka [10,18] i 20-30% raka płaskonabłonkowego [19,20]. Nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją COX-2 a cechami klinicznymi (wiekiem, płcią, stopniem zaawansowania itp.) [14,20,21].

Rokownicze znaczenie nadekspresji COX-2 w raku płuca jest kontrowersyjne. W większości prac dotyczących tego zagadnienia wykazano niekorzystne rokownicze znaczenie nadekspresji COX-2, zwłaszcza w I i w II stopniu zaawansowania NDRP [18,20,22-24], ale w innych nie znaleziono tej zależności [14,17,25]. W większości tych prac ekspresję COX-2 oceniano metodami immunohistochemicznymi. Wyjątkiem jest praca Brabendera i wsp., gdzie zastosowano ilościową reakcję łańcuchową polimerazy z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR) oraz praca Yuan i wsp., gdzie zastosowano obie metody. Niezależnie od znaczenia rokowniczego, ekspresja COX-2 może być potencjalnym biomarkerem wskazującym chorych, którzy mogliby odnieść korzyść z leczenia selektywnymi i nieselektywnymi inhibitorami COX m.in. z grupy niesterydowych leków przeciwzapalnych [26-33].

Badania przedkliniczne i kliniczne wskazują, że białko COX-2 jest zaangażowane w wiele procesów prowadzących do powstawania i rozwoju nowotworu [34-39]. W modelach zwierzęcych wykazano, że inhibitory COX-2 zapobiegają rakowi płuca [40]. Niektóre badania epidemiologiczne sugerują, że stosowanie niesterydowych leków przeciwzapalnych zmniejsza ryzyko raka płuca [41,42]. Zapobiegawczy wpływ przewlekłego stosowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych potwierdzono również w raku jelita grubego [43-45]. W grudniu 1999 r. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) zarejestrowała celekoksyb

(selektywny inhibitor COX-2) w profilaktyce farmakologicznej raka jelita grubego u chorych na rodzinną polipowatość jelita grubego.

Nadekspresja COX-2 prowadzi do powstania i rozwoju nowotworu poprzez wpływ na następujące zjawiska: zahamowanie apoptozy, nasilenie neoangiogenezy, wzrost aktywności metaloproteinazy macierzy i pobudzenie syntezy białek adhezyjnych oraz osłabienie aktywności układu immunologicznego. Zagadnienia te zostaną szczegółowo w kolejnych rozdziałach niniejszej rozprawy.

1.2.1 Apoptoza

Apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki, jest kluczowym procesem dla rozwoju (embrio- i organogenezy) i funkcjonowania organizmu. Zainicjowanie procesu apoptozy odbywa się na drodze zewnątrz- i wewnątrzpochodnej. Na szlaku wewnątrzpochodnym do zaprogramowanej śmierci komórki dochodzi na skutek zaburzeń w błonie mitochondrium i uwolnienia do cytoplazmy cytochromu c. Powstanie apoptosomu – kompleksu zawierającego cytochrom c, czynnik aktywujący proteazę apoptotyczną i nieaktywną formę kaspazy 9 – prowadzi do uaktywnienia kaskady kaspaz, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki. Szlak zewnątrzpochodny uruchamia proces apoptozy poprzez aktywację receptorów śmierci na powierzchni komórki. Do receptorów tych należy rodzina receptorów dla czynnika martwicy nowotworu (TNFR). Przyłączenie ligandu do któregoś z receptorów uruchamia kaskadę kaspaz. Prawidłowe funkcjonowanie szlaku wewnątrzpochodnego jest uzależnione od równowagi pomiędzy czynnikami proapoptotycznymi (m.in. białka Bax, Bak) a czynnikami antyapoptotycznymi takimi jak białka Bcl-2 i Bcl-X1 [46]. Wykazano, że nasilona ekspresja COX-2 wpływa na zahamowanie śmierci komórki przez wzrost aktywności białka antyapoptotycznego Bcl-2 [47]. Kolejne badania nad różnymi nowotworami sugerują, że COX-2 wpływa na apoptozę nie tylko za pośrednictwem szlaku zależnego od Bcl-2, ale także w inny sposób [48]. COX-2 aktywuje mianowicie szlak kinazy seroniniowo-treoninowej Akt [49]. Układ Akt odgrywa zasadniczą rolę w przeżyciu komórek śródbłonna naczyń i jego zablokowanie przez inhibitory COX-2 indukuje apoptozę niezależnie od Bcl-2. Ponadto stwierdzono, że zarówno nadekspresja COX-2, jak i ekspozycja na prostaglandynę E₂ (PGE₂) powoduje zahamowanie apoptozy w komórkach gruczolakoraka płuca na drodze aktywacji

genu *Mcl-1* należącego do rodziny bcl-2 [50]. Krysan i wsp. opublikowali wyniki swoich prac nad surwiwiną – białkiem o aktywności antyapoptotycznej, które wiąże kaspazy uniemożliwiając ich aktywację [51]. Stwierdzili oni, że w komórkach NDRP nadekspresja COX-2 znacząco wpływa na stężenie i stabilizację surwiwiny, co prowadzi do zwiększenia oporności na apoptozę.

Wykazano, że selektywne inhibitory COX-2 indukują apoptozę w różnych typach linii komórkowych, w tym w komórkach raka jelita grubego [52] i w różnych rodzajach guzów nowotworowych, a także w raku płuca [53]. Efekt ten zaobserwowano również w komórkach nie wykazujących ekspresji COX-2 [54]. Pozwala to na wyciągnięcie wniosku, że niesteroidowe leki przeciwzapalne pobudzają apoptozę w komórkach nowotworowych na drodze zależnej i niezależnej od cyklooksygenazy. Cao i wsp. udowodnili w eksperymencie przeprowadzonym na liniach komórkowych raka jelita grubego, że nadmiar kwasu arachidonowego, zarówno egzogenne, jak i powstałego w wyniku zahamowania COX-2, prowadzi do apoptozy [55]. Dodatkowo inhibitory COX-2 nasilają apoptotyczny efekt promieniowania jonizującego [29,53,56,57] i zwiększają skuteczność chemioterapii (Hida2002). Korzyść z połączenia inhibitorów COX-2 z chemioterapią wykazano w badaniach *in vitro* i *in vivo* [53,58-62].

1.2.2 Neoangiogeneza

Neoangiogeneza, czyli wytworzenie własnej sieci naczyń krwionośnych, jest niezbędne do wzrostu i progresji guzów nowotworowych o średnicy większej niż 1-2 mm. Istnieje wiele czynników zaangażowanych w tworzenie nowych naczyń krwionośnych w obrębie rosnącego nowotworu. Należą do nich m.in. naczyniowo-nabłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), transformujący czynnik wzrostu α i β (TGF α i β), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) i chemokiny ENA-78 i IL-8. W badaniach *in vitro* i *in vivo* stwierdzono, że wzrost ekspresji COX-2 w nowotworach prowadzi na wielu etapach do powstania i wzrostu nowych naczyń [63,64]. W NDRP dzieje się to na drodze wzrostu syntezy i aktywności czynników warunkujących angiogenezę: VEGF, chemokin ENA-78 i IL-8, a także na skutek bezpośredniego wpływu na komórki endothelium produktów reakcji COX-2, tj. tromboksanu A_2 , prostaglandyny E_2 i prostacykliny I_2 [20,65,66].

Stwierdzono, że tromboksan A₂ w warunkach *in vitro* pobudza komórki endotelium do migracji i tworzenia kapilaropodobnych struktur [64], zaś PGE₂ pobudza wytwarzanie VEGF przez ułatwienie translokacji indukowanego hipoksją czynnika α (HIF α) z cytoplazmy do jądra komórki [67]. Także aktywacja receptora dla PGE₂ pobudza syntezę VEGF przez kinazę białkową A i szlak ERK2/JNK1 [68].

Prostacyklina I₂ jest syntetyzowana przez COX-2 z prostaglandyny H₂ w komórkach śródbłónka naczyń. Prostacyklina ta jest także uwalniania z komórek endotelium poddanych działaniu bFGF, VEGF, angiogeniny lub płytkowo-śródbłonkowej cząstki adhezyjnej -1.

Liczne badania wykazały, że w różnych typach nowotworów czynniki pobudzające angiogenezę, w tym VEGF, PDGF, TGF- β , bFGF i COX-2 występują w komórce w tej samej lokalizacji. W raku piersi i raku szyjki macicy nasilona ekspresja COX-2 powiązana była ze zwiększoną gęstością naczyń i z gorszym rokowaniem [69]. W NDRP wykazano zależność pomiędzy ekspresją COX-2 a nadekspresją VEGF oraz związek tych cech z gorszym rokowaniem [20]. Marrogi i wsp. w swoich badaniach potwierdzili związek pomiędzy ekspresją COX-2 a VEGF, a także pomiędzy nadekspresją COX-2 a zwiększoną gęstością naczyń krwionośnych, jednak nie potwierdzili wartości rokowniczej tych cech [25].

1.2.3 Tworzenie przerzutów

Naciekanie otaczających tkanek przez guz nowotworowy oraz tworzenie odległych przerzutów jest związane z oddziaływaniem komórek guza na macierz zewnątrzkomórkową i na białka adhezyjne. Nadekspresja COX-2, przez wzrost aktywności metaloproteinaz macierzy MMP-2 i MMP-9, powoduje zwiększenie zdolności do naciekania i tworzenia przerzutów. Metaloproteinazy macierzy (MMP) to grupa cynkozależnych enzymów uczestniczących w proteolizie białek substancji zewnątrzkomórkowej. MMP wytwarzane przez komórki guza zwiększają jego zdolność do miejscowego naciekania i rozprzestrzeniania się, a także odgrywają kluczową rolę w neoangiogenenizacji [70]. PGE₂, działając przez receptor EP4, nasila ekspresję MMP-2, przy czym efekt ten może zostać zablokowany przez leki z grupy antagonistów PGE₂.

Adhezja do substancji zewnątrzkomórkowej jest najważniejszym etapem zapoczątkowującym tworzenie przerzutów. Proces ten w wielu nowotworach zależy od białka

CD44 [71]. CD44 jest receptorem powierzchniowym dla hialuronianu – glikozaminoglikanu, będącego głównym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej. Linie komórkowe raka płuca wykazujące nadekspresję COX-2 wykazywały również nadekspresję CD44. Dodanie swoistych inhibitorów CD44 znacząco zmniejszało zdolności inwazyjne komórek linii komórkowych. Dotychczasowe badania sugerują, że nadekspresja COX-2 wpływa na nasiloną inwazyjność NDRP na drodze zależnej od CD44 [72,73].

1.2.4 Układ immunologiczny

Odpowiedź komórkowa układu odpornościowego ogrywa ważną rolę w eliminowaniu zmienionych nowotworowo komórek. Istotne w tym procesie są cytokiny wytworzone przez komórki T. Nadekspresja COX-2, która powoduje nadprodukcję PGE₂, prowadzi do obniżenia kontroli układu immunologicznego przez zaburzenie równowagi pomiędzy stężeniami interleukiny 10 (IL-10) i 12 (IL-12), dwóch cytokin regulujących odpowiedź komórkową. W NDRP zwiększenie stężenia hamującej odpowiedź komórkową IL-10 i zmniejszenie stężenia indukującej odpowiedź komórkową IL-12, prowadzi do immunosupresji wywołanej przez guz, nasila angiogenezę i wydaje się pogarszać rokowanie [74,75]. W raku płuca wytwarzana przez guz PGE₂ odgrywa kluczową rolę w pobudzaniu wytwarzania IL-10 przez limfocyty i makrofagi oraz w równoczesnym hamowaniu syntezy IL-12 przez makrofagi [76]. Stolina i wsp. stwierdzili w modelu raka płuca Lewisa, że hamowanie COX-2 na drodze genetycznej i farmakologicznej powoduje nie tylko regresję guza, ale także zwiększenie wokół niego nacieku limfocytarnego [77].

Komórki dendrytyczne należą do komórek prezentujących antygen i są decydującym elementem w inicjowaniu odpowiedzi T-komórkowej. Prostanoidy – produkty reakcji COX-2 - wpływają na dojrzewanie komórek dendrytycznych zarówno na drodze zależnej, jak i niezależnej od IL-10 [78,79].

Selektywne inhibitory COX-2 znoszą zdolność komórek linii A549 pobudzanych IL-1 β do indukowania IL-10 w limfocytach i makrofagach. Ponadto dodanie do tej hodowli, selektywnych inhibitorów COX-2 odwraca zależny od PGE₂ efekt hamowania wytwarzania IL-12 przez makrofagi [77].

Podsumowanie

Nadekspresję COX-2 stwierdzono w stanach przednowotworowych i w wielu nowotworach litych. Rola COX-2 w powstawaniu i rozwoju guzów litych, w tym NDRP jest dosyć dobrze udokumentowana, jednak znaczenie nadekspresji COX-2 jako czynnika rokowniczego w tym nowotworze pozostaje kontrowersyjne. Niektóre prace wykazują, że nadekspresja COX-2 jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym, natomiast w innych nie wykazano tej zależności. Określenie wartości rokowniczej ekspresji COX-2 w NDRP umożliwi lepsze poznanie tego zjawiska oraz pozwoli na wyodrębnienie grupy chorych na NDRP, którzy potencjalnie byłiby kandydatami do leczenia inhibitorami COX-2 w ramach badań klinicznych.

2. Cele pracy

1. Ocena obecności białka COX-2 w komórkach NDRP przy zastosowaniu badania immunohistochemicznego mikromacierzy tkankowych;
2. Ocena ekspresji mRNA dla COX-2 w komórkach NDRP przy zastosowaniu jakościowej reakcji RT-PCR;
3. Ocena zależności pomiędzy tymi parametrami a cechami demograficznymi i klinicznymi badanej grupy chorych;
4. Określenie wartości rokowniczej ekspresji COX-2 ocenianej immunohistochemicznie i przy użyciu jakościowej reakcji RT-PCR.

3. Materiał i metody

Materiał do badania stanowiły wycinki NDRP uzyskane podczas radykalnej resekcji miększego płucnego, utrwalone w formalinie i przechowywane w postaci bloczków parafinowych, oraz wycinki uzyskane w czasie tego samego zabiegu operacyjnego i zamrożone w temperaturze -80°C . Ocenę histopatologiczną wszystkich skrawków barwionych hematoksyliną i eozyną przeprowadziło dwóch niezależnych patologów (prof. Kazimierz Jaśkiewicz z Katedry i Zakładu Patomorfologii Akademii Medycznej w Gdańsku oraz prof. Fred R. Hirsch z Centrum Onkologii Uniwersytetu Kolorado, USA). Stopień zaawansowania określano na podstawie badania patomorfologicznego, według obowiązującej skali TNM przyjętej przez Międzynarodową Unię do Walki z Rakiem (*UICC*) w 1997 r.

Ocenę obecności białka COX-2 w wycinkach guzów nowotworowych przeprowadzono na podstawie badania immunohistochemicznego mikromacierzy tkankowych. Barwienie oraz ocena mikroskopowa preparatów zostały wykonane przez autorkę w pracowni patomorfologii Wydziału Onkologii Centrum Onkologii Uniwersytetu Kolorado, kierowanej przez prof. Freda R. Hirscha. Ocenę ekspresji mRNA dla COX-2 autorka przeprowadziła w ww. laboratorium na podstawie ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją.

Dane kliniczne dotyczące chorych oraz stosowanego leczenia uzyskano na podstawie dokumentacji medycznej, a informacje dotyczące zgonów otrzymano od Urzędów Gmin oraz Urzędów Stanu Cywilnego.

W służącej do obliczeń statystycznych bazie danych zgromadzono następujące informacje: wiek i płeć chorych, data zabiegu operacyjnego, postać histologiczna NDRP, stopień zaawansowania według klasyfikacji TNM, stopień zróżnicowania nowotworu, cecha pT, cecha pN, rodzaj zabiegu operacyjnego, data ostatniej obserwacji lub data zgonu, data i lokalizacja nawrotu, występowanie oraz nasilenie ekspresji COX-2 oraz ilość mRNA dla COX-2.

3.1 Grupa badana

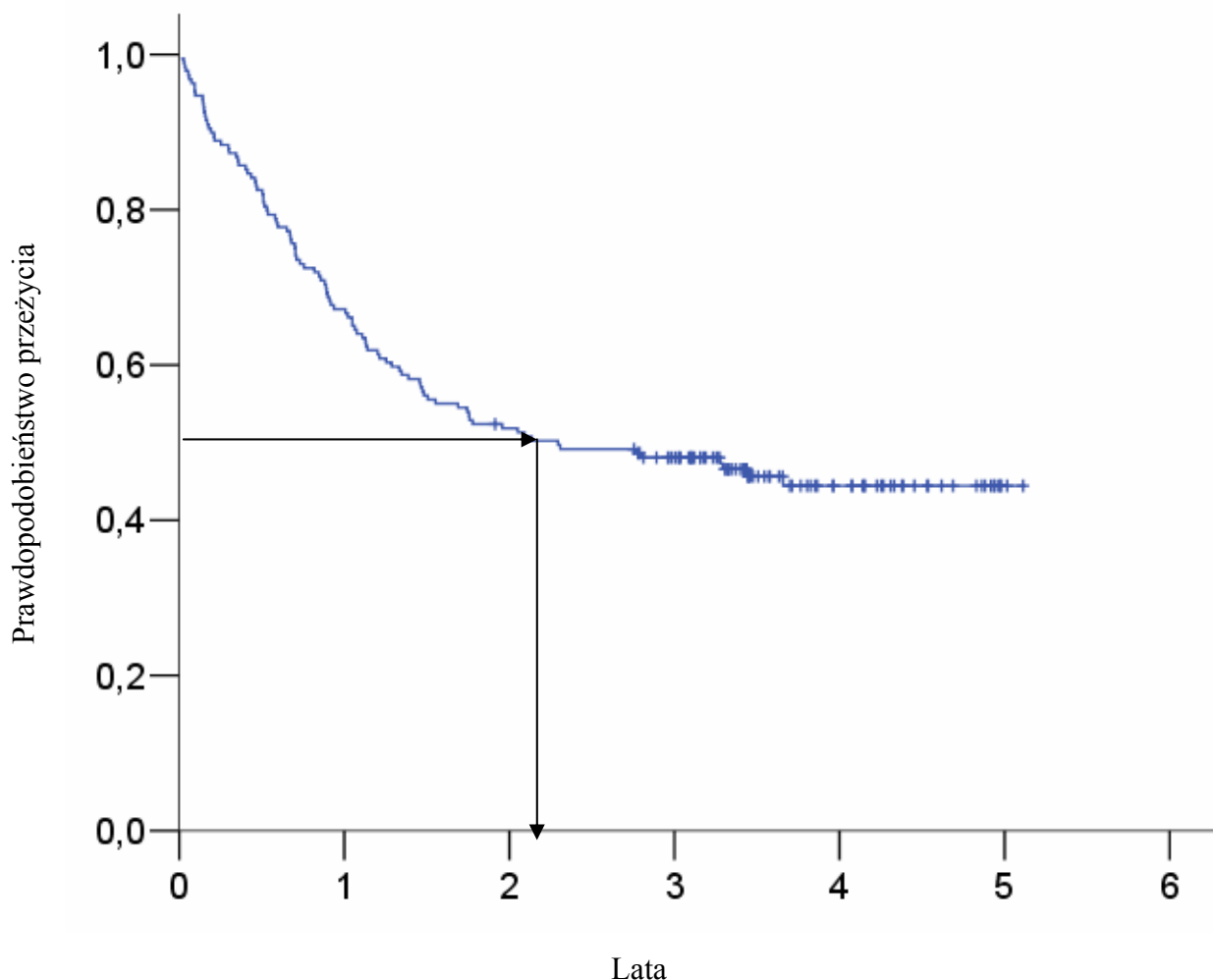
Badaną grupę stanowiło 191 chorych na NDRP poddanych resekcji mięszu płucnego w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 2002-2004. Z analizy wyłączono 5 chorych, u których w badaniu histopatologicznym materiału pooperacyjnego rozpoznano ostatecznie raka drobnokomórkowego lub przerzutowy charakter zmiany. Analizę przeprowadzono zatem w grupie 186 chorych (tab. 1). W grupie tej znalazły się 44 kobiety (24%) i 147 mężczyzn (76%), średnia wieku wynosiła 62 lata (zakres: 37-85), 177 chorych (95%) było aktywnymi palaczami lub paliło w przeszłości, a 9 chorych (5%) nigdy nie paliło papierosów. Wśród pooperacyjnych rozpoznań mikroskopowych przeważał rak płaskonabłonkowy – 102 chorych (55%), rzadziej występowały rak gruczołowy – 54 chorych (29%), mieszany rak gruczołowo-płaskonabłonkowy – 24 chorych (13%) oraz rak wielkokomórkowy – 5 chorych (2,5%). Ponadto u 1 chorego (0,5%) rozpoznano raka pęcherzykowo-oskrzelikowego. U 20 chorych (12%) stwierdzono wysoki stopień zróżnicowania nowotworu (G1), u 81 (50%) – pośredni stopień (G2), a u 61 chorych (38%) – niski (G3).

Na podstawie pooperacyjnego badania histopatologicznego stopień zaawansowania ogniska pierwotnego określono jako pT1 u 32 chorych (17%), pT2 – u 110 chorych (60%), pT3 – u 33 chorych (17%) oraz pT4 – u 11 chorych (6%). Przerzuty do węzłów chłonnych śródoskrzelowych oraz węzłowych (cecha pN1) stwierdzono u 40 chorych (21%) a do węzłów chłonnych śródpiersiowych (pN2) – u 50 chorych (27%). U 76 chorych (41%) stwierdzono I stopień zaawansowania, u 42 (22,5%) – II stopień, u 59 (32%) – III stopień oraz u 8 (4,5%) – IV. U 1 chorego wykonano wycięcie klinowe (0,5%), u 3 (1,5%) – resekcję segmentu płuca, u 100 (54%) – resekcję płata, u 13 (7%) – resekcję dwóch płatów, u 63 (34%) – pneumonektomię oraz u 6 chorych (3%) – resekcję mankietową płata.

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna badanej grupy (n=186)

Cecha	Liczba chorych (%)
Wiek Średnia Zakres	62,6 37–85
Płeć Kobiety Mężczyźni	44 (24%) 142 (76%)
Papierosy Palący Niepalący	177 (95%) 9 (5%)
pT T1 T2 T3 T4	32 (17%) 110 (60%) 33 (17%) 11 (6%)
pN N0 N1 N2	96 (52%) 40 (21%) 50 (27%)
Stopień zaawansowania klinicznego I II III IV	76 (41%) 42 (22,5%) 59 (32%) 8 (4,5%)
Postać histologiczna raka Rak płaskonabłonkowy Gruczołakorak Rak wielkokomórkowy Rak pęcherzykowo-oskrzelikowy Rak mieszany	102 (55%) 54 (29%) 5 (2,5%) 1 (0,5%) 24 (13%)
Stopień zróżnicowania raka G1 G2 G3	20 (12%) 81 (50%) 61 (38%)
Rodzaj zabiegu operacyjnego Wycięcie klinowe Segmentektomia Lobektomia Bilobektomia Pneumonektomia Resekcja mankietowa płata	1 (0,5%) 3 (1,5%) 100 (54%) 13 (7%) 63 (34%) 6 (3%)

Dane dotyczące czasu przeżycia zostały ustalone dla całej grupy 186 osób. Mediana czasu obserwacji chorych wynosiła 2,14 lat (zakres 0,3-5,2 lat). Weryfikacji przeżycia dokonano w lutym 2007. W analizowanej grupie stwierdzono 6 zgonów okołoperacyjnych (3%), które uwzględniono w analizie przeżycia



Rys. 2. Krzywa przeżycia chorych (n=184), na wykresie zaznaczono medianę czasu przeżycia (2,14 lata)

W pracy analizowano także czas do nawrotu choroby. Mediana czasu do progresji w całej grupie chorych wynosiła 1,69 roku (zakres 0,01-5,11).

3.2 Metody oceny obecności COX-2 w komórkach NDRP

3.2.1 Mikromacierz tkankowa i immunohistochemiczna (IHC) ocena obecności COX-2

Z każdego bloku parafinowego wykonywano skrawek grubości 4 μm , który wybarwiano hemoksyliną i eozyną. Następnie dokonywano mikroskopowej analizy jakości preparatu pod kątem tworzenia mikromacierzy tkankowej. Do tworzenia mikromacierzy zakwalifikowano 184 preparaty, z których w 178 (97%) stwierdzono dużą zawartość komórek raka, w 3 (1,5%) pośrednią oraz w 3 (1,5%) - małą ilość komórek raka. W następnym etapie z każdego preparatu wybierano miejsca do pobrania rdzeni tkankowych do mikromacierzy tkankowej.

W pracy zastosowano mikromacierz zawierającą 60 rdzeni w jednym bloku „zbiorczym”. Ze względu na dużą heterogenność NDRP, z jednego bloku od każdego pacjenta pobierano 3 rdzenie średnicy 1,5 mm. Wykorzystano do tego zestaw MaxArray Customer Kit firmy Zymed Laboratories San Francisco, CA, USA nr katalogowy 75-1013. Z badanego materiału uzyskano 10 mikromacierzy.

Bloki „zbiorcze” krojono na skrawki grubości 4 μm . Jeden preparat z każdego bloku „zbiorczego” oznaczano jako próbę pozytywną, drugi jako negatywną. Barwienie preparatu pozytywnego i negatywnego było takie same, z wyjątkiem dodania przeciwciała przeciwko COX-2. Następnie skrawki umieszczano na szkiełkach sialinizowanych i deparafinizowano. W następnym etapie trzykrotnie płukano preparaty wodą destylowaną. Po 10 min inkubacji w autoklawie w temperaturze 121 st. C z 1% Dako Target Retrieval Solution (Dako Cytomation, nr katalogowy S169984), w celu odsłonięcia antygenów, preparaty chłodzono w temperaturze pokojowej przez 20 min. i trzykrotnie płukano wodą destylowaną, po czym umieszczano je na 5 min. w buforze oczyszczającym (Dako Wash Buffer, Dako Cytomation nr katalogowy S302089).

Do oceny obecności COX-2 używano mysiego przeciwciała monoklonalnego IgG₁ przeciwko ludzkiej COX-2 (Cayman Chemical, CA, USA, nr katalogowy 160112).

Reakcję barwną przeprowadzano w urządzeniu Dako Autostainer wg następującego protokołu:

- 20 min. inkubacja w 3% roztworze nadtlenu wodoru i metanolu;
- płukanie buforem oczyszczającym;

- 10 min. inkubacja w buforze blokującym nieswoiste reakcje barwne (Protein Block Serum Free (Dako Cytomation, nr katalogowy X090989);
- zdmuchiwanie resztek;
- 30 min. inkubacja z przeciwciałem przeciwko COX-2 w rozcieńczeniu 1:400;
- płukanie buforem oczyszczającym;
- 30 min. inkubacja z drugim przeciwciałem (Dako Evision + Mouse, Dako Cytomation, nr katalogowy K400711);
- płukanie buforem oczyszczającym;
- 5 min. inkubacja w buforze oczyszczającym;
- płukanie buforem oczyszczającym;
- 10 min. inkubacja w roztworze chromogenu DAB (Dako Cytomation);
- płukanie wodą destylowaną;
- barwienie skrawków hematoksyliną;
- płukanie buforem oczyszczającym.

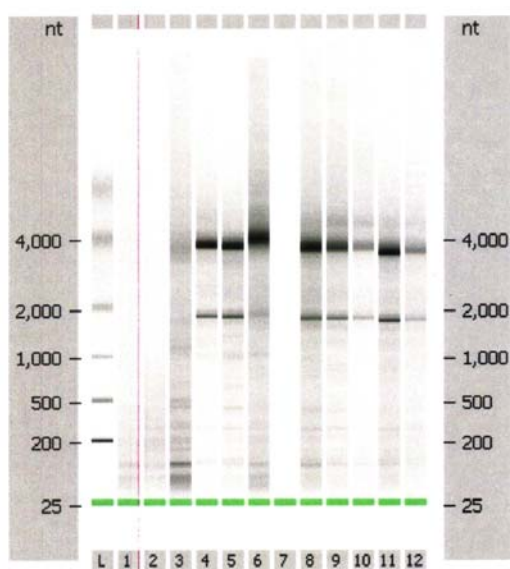
Po wyjściu skrawków z Dako Autostainera zanurzano je na 5 min. w buforze oczyszczającym, trzykrotnie przepłukiwano wodą destylowaną i odwadniano przy użyciu ksylenu. Po wybarwieniu według powyższej metody, preparaty zamykano szkiełkiem nakrywkowym z użyciem balsamu kanadyjskiego.

3.2.2 Ocena obecności białka COX-2

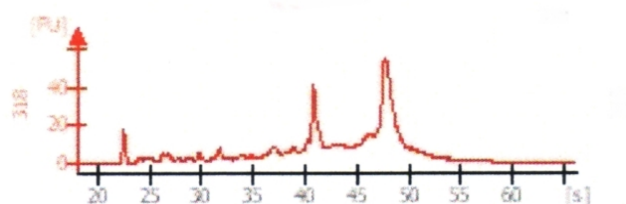
Ekspresję COX-2 w komórkach nowotworowych oceniano przy użyciu mikroskopu świetlnego. W ocenie tej stosowano wskaźnik IHC (zakres 0-400) opracowany przez Uniwersytet Kolorado. Wskaźnik ten stanowi iloczyn liczby komórek wykazujących barwienie (0-100%) i intensywności reakcji barwnej (0-4).

3.2.3 Izolacja RNA

Wycinki guza nowotworowego pobrane w trakcie zabiegu operacyjnego, a następnie zamrożone w temperaturze -80 st. C uzyskano od 165 chorych. Izolację RNA przeprowadzano przy użyciu zestawu do jednoczesnej izolacji RNA i DNA z zamrożonych tkanek zwierzęcych (AllPrep DNA/RNA Mini Kit (50), Qiagen, CA USA, nr katalogowy 80204), zgodnie z zalecanym przez producenta protokołem. Następnie sprawdzano zawartość RNA w każdej próbce za pomocą spektrofotometru NanoDrop N-1000. W 11 próbkach nie stwierdzono RNA. W pozostałych 154 próbkach stężenie RNA wynosiło 0,05-979,55 ng/μl (średnio 112,48 ng/μl). Następnie za pomocą bioanalizatora Agilent 2100 wykorzystującego elektroforezę mikrokapilarną, w 127 próbkach o stężeniu RNA ≥ 18 ng/μl oceniono jego jakość. Na podstawie tej oceny 7 próbek wyłączono z dalszej analizy z powodu całkowitej degradacji RNA. Dalszą analizę przeprowadzono na 120 próbkach; w części z nich RNA było częściowo zdegradowane, ale w stopniu umożliwiającym przeprowadzenie reakcji *real-time* PCR.



a.



b.

Rys. 4 Przykładowy odczyt jakości RNA z bioanalizatora w postaci obrazu elektroforetycznego (a) i wykresu (b).

3.2.4 Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT-PCR).

Próbki RNA zostały rozcieńczone wodą oczyszczoną z RNaz do stężenia 20 ng/μl, a następnie poddane reakcji odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem zestawu AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene, CA, USA, nr katalogowy 600559) według instrukcji producenta. Reakcję przeprowadzono w płytkach 96-dołkowych z końcową objętością 20 μl w każdym dołku. Do reakcji wykorzystano: 10 μl buforu cDNA Synthesis Master Mix, 3 μl losowych primerów, 1 μl odwrotnej transkryptazy AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase (MMLV-RT) i 6 μl badanego RNA. Do wyznaczenia krzywych standardowych wykorzystano standardowe referencyjne RNA (Stratagene QPCR Human Reference Total RNA, Stratagene, CA, USA, nr katalogowy 750500), przeprowadzając reakcję odwrotnej transkrypcji według tego samego protokołu. Do reakcji odwrotnej transkrypcji termocykler zaprogramowano wg zalecanego przez producenta schematu:

25° C - 5 min., 42° C - 15 min., 95° C - 5 min., 4° C - przechowywanie.

Po reakcji rozcieńczono próbki do końcowego stężenia 1 ng/μl cDNA, dodając po 100 μl wody do każdego dołka.

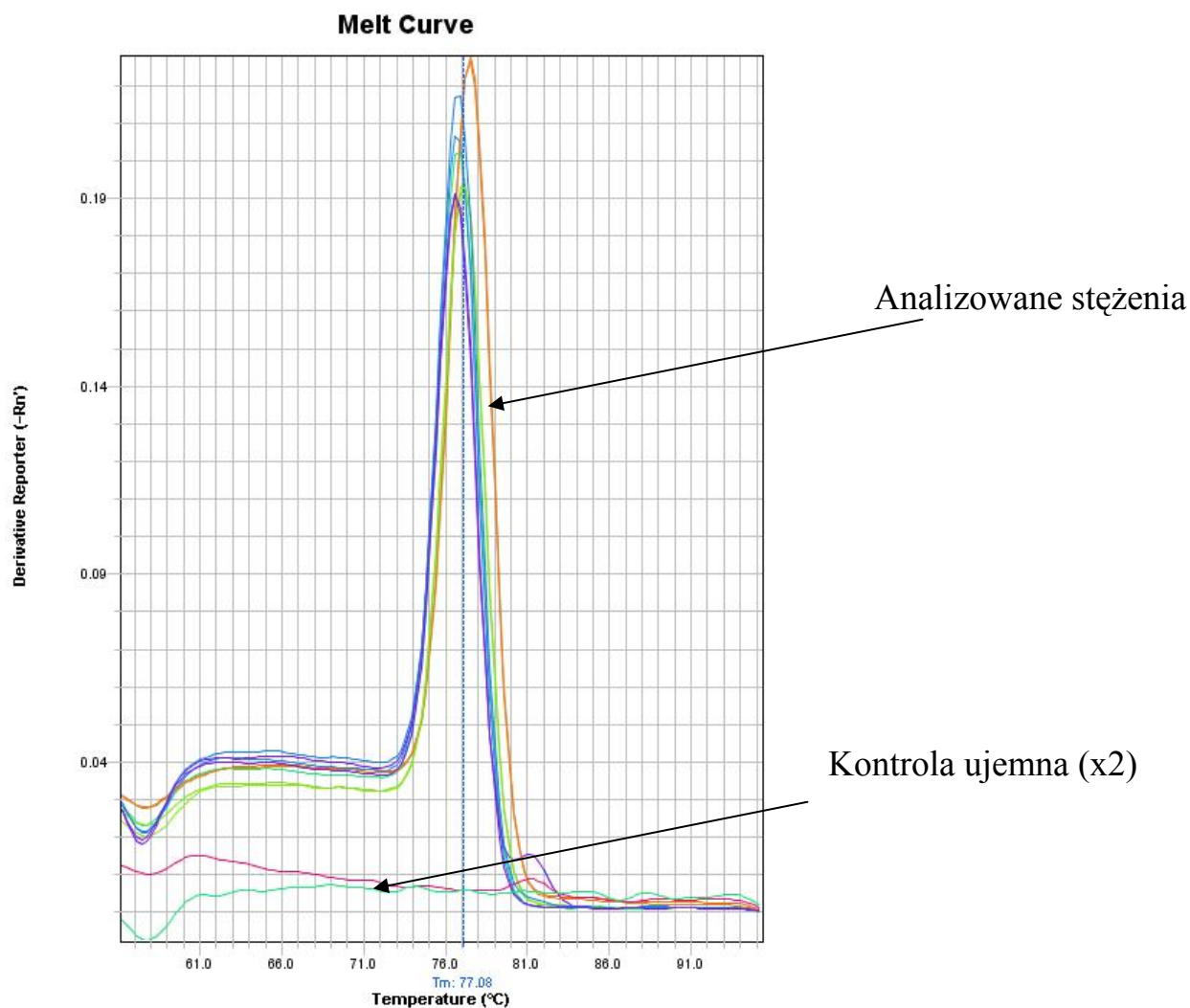
3.2.5 Ilościowa reakcja PCR (qPCR).

Do reakcji qPCR wykorzystano technologię Sybr Green, wykorzystującą barwnik łączący się z dwuniciowym DNA. W momencie tego połączenia dochodzi do bardzo silnej fluorescencji, silniejszej niż w reakcjach z użyciem bromku etydyny. Także współczynnik fluorescencji dwuniciowe/jednoniciowe DNA dla Sybr Green jest wyższy niż ww. dla bromku etydyny. W pracy wykorzystano zestaw Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, CA, USA, nr katalogowy 600815) oraz protokół postępowania zalecany przez producenta. Reakcje przeprowadzano korzystając z termocyklera StepOne (Applied Biosystems). Przed przystąpieniem do qPCR zaprojektowano zestaw primerów do oceny ekspresji COX-2 oraz β-aktyny, którą wybrano jako gen referencyjny ze względu na wcześniejsze doświadczenia [80]. Primery zaprojektowano korzystając z programu Primer Express 2.0 firmy Applied Biosystem, w taki sposób, aby produkt amplifikacji był możliwie krótki. Pozwoliło to zminimalizować wpływ stopnia degradacji RNA na wyniki doświadczeń. Sekwencje primerów używanych w ekspresji przedstawiono poniżej:

– 5'- GCT GGG AAG CCT TCT CTA ACC - 3',

– 5'- AGG GAG TCG GGC AAT CAT C - 3',

Prawidłowość i swoistość sekwencji zweryfikowano za pomocą programu BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). Warunki amplifikacji określono dla każdego z primerów za pomocą standardowego referencyjnego cDNA, analizując wyniki reakcji, w szczególności wykres temperatury topnienia (rys. 5).



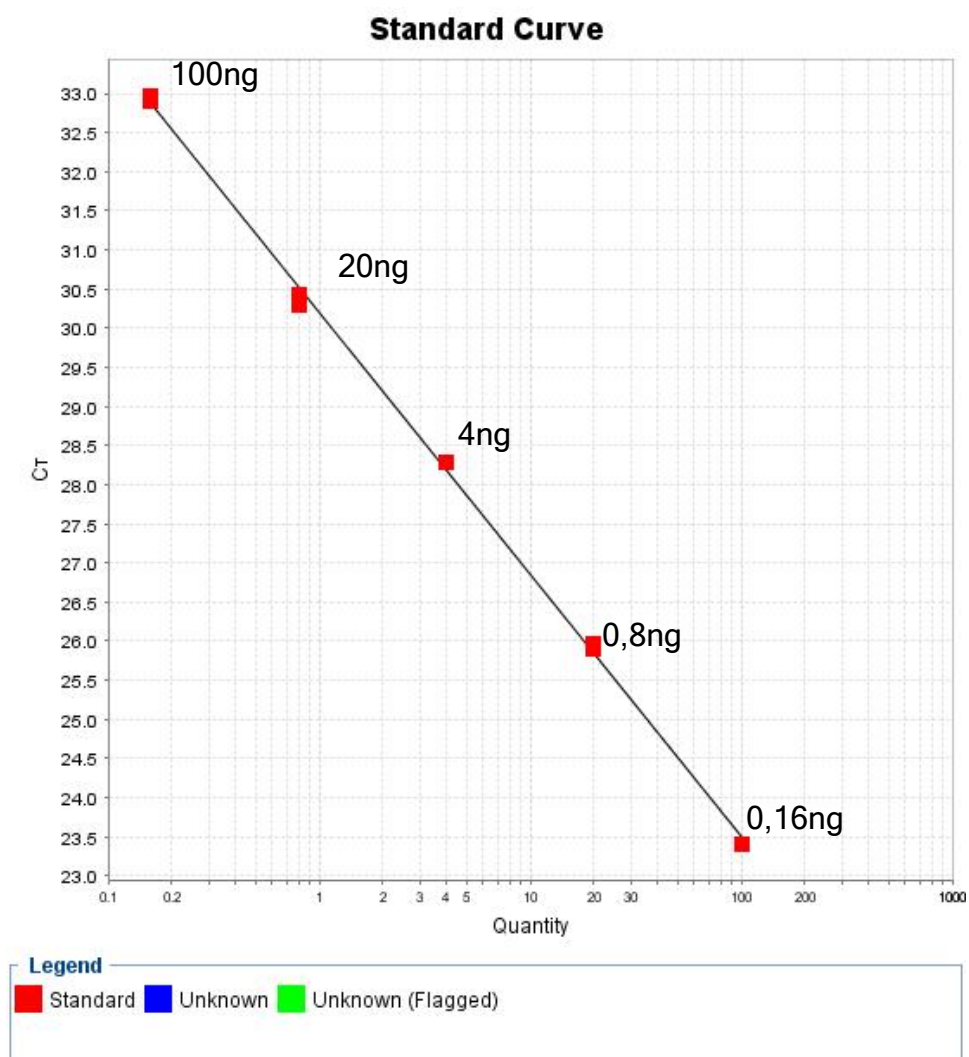
Rys. 5. Krzywe dysocjacji wskazujące na prawidłowy przebieg reakcji dla wszystkich analizowanych stężeń cDNA, które posłużyły do wyznaczenia krzywej standardowej. Produktu reakcji nie stwierdzono dla kontroli ujemnej. Temperatura topnienia $T_m=77^{\circ}\text{C}$.

Reakcję qPCR w płytkach 96-dółkowych przeprowadzono dwukrotnie dla każdej badanej próbki. Dla każdej reakcji przeprowadzono również krzywą standardową, wykorzystując cDNA ze standardowego referencyjnego RNA w 4 stężeniach. Jako kontrolę ujemną przeprowadzono dla każdej reakcji amplifikację z dodatkiem wody oczyszczonej z RNaz zamiast cDNA (*non-template control*). Reakcje przeprowadzono w końcowej objętości reakcji 20µl/dółek według następującego protokołu:

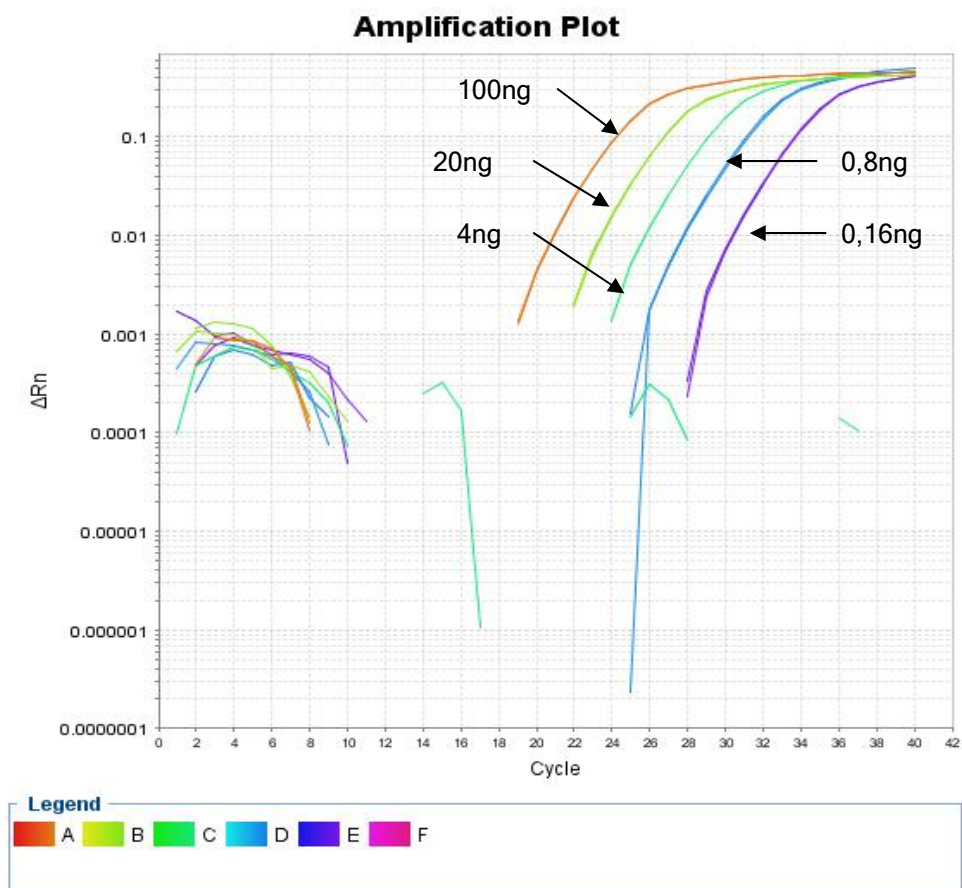
- Master Mix 10 µl;
- barwnik 0,3 µl
- woda 1 µl
- badane/kontrolne cDNA 4 µl (co odpowiada 4 ng cDNA).

Stężenia primerów i cDNA w reakcji qPCR wybrano po serii doświadczeń próbnych na podstawie zadowalających wyników.

Krzywe standardowe akceptowano, jeśli efektywność reakcji była zawarta w zakresie 90-110%, a współczynnik R^2 , określający korelację pomiędzy punktami pomiarowymi krzywej standardowej, był wyższy od 0,990 (rys. 6). Pomiary badanych stężeń akceptowano, jeśli różnica pomiędzy dwoma pomiarami była mniejsza od 1CT (stężenie z jednego cyklu), w przeciwnym razie powtarzano pomiar (rys. 7). Pomiary ekspresji β -aktyny przeprowadzano w ten sam sposób. Ekspresję genu *COX-2* i β -aktyny określano według metody względnej krzywej standardowej [81]. Normalizację do genu referencyjnego przeprowadzono dzieląc ekspresję *COX-2* przez ekspresję β -aktyny [81]. Uzyskany wynik jest liczbą bezwzględną, nieposiadającą jednostki.



Rys. 6. Krzywa standardowa – ilość cDNA dla każdego pomiaru zaznaczono na wykresie, pomiary wykonano dwukrotnie, $R^2=0.999$; Efektywność reakcji=98,54%



Rys. 7. Krzywe amplifikacji – ilość cDNA dla każdego pomiaru zaznaczono na wykresie, pomiary wykonano dwukrotnie. Wykres w skali logarytmicznej.

3.3 Metody statystyczne

Większość analizowanych zmiennych nie miała cech rozkładu normalnego, co zweryfikowano testem Kołmogorowa-Smirnowa. Z tego powodu w pracy zastosowano testy nieparametryczne. Dla zmiennych ciągłych podano średnią, medianę i zakres; zmienne kategoryzowane opisano za pomocą liczebności i odsetka w podgrupach.

Grupy zmiennych ciągłych porównano za pomocą testu U Manna-Whitneya (2 grupy) lub testu Kruskala-Wallisa (więcej niż 2 grupy). Dla czytelności przedstawienia danych, proporcje odsetkowe zaokrąglano do 1%, przez co ich suma w tabelach wynosiła $100\pm 1\%$.

Porównań zmiennych kategoryzowanych dokonano za pomocą testu chi-kwadrat wg Pearsona; w przypadku niskich liczebności oczekiwanych zastosowano poprawkę Yatesa.

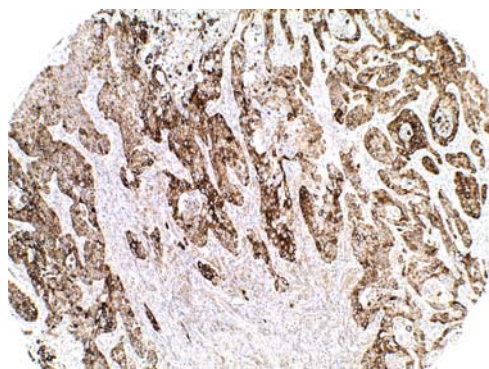
Analizę przeżycia przeprowadzono metodą Kaplana-Meiera. Wybrane wskaźniki opisujące krzywą przeżycia (mediana czasu przeżycia, prawdopodobieństwo przeżycia pięcioletniego) przedstawiono z 95% przedziałem ufności (95% PU). Analizę jednoczynnikową przeprowadzono za pomocą testu log-rank po kategoryzacji względem mediany, zaś analizę wieloczynnikową - za pomocą modelu proporcjonalnego ryzyka Cox'a. Analizę korelacji dla 2 zmiennych ciągłych przeprowadzono testem nieparametrycznym Spearmana, podając współczynnik korelacji rho opisujący siłę związku i współczynnik istotności statystycznej p [60].

We wnioskowaniu statystycznym przyjęto poziom istotności statystycznej przeprowadzonych testów $\alpha=0,05$. Do obliczeń statystycznych wykorzystano programy komputerowe Statistica 6.0 i SPSS 12.0 w wersjach dla *Windows*.

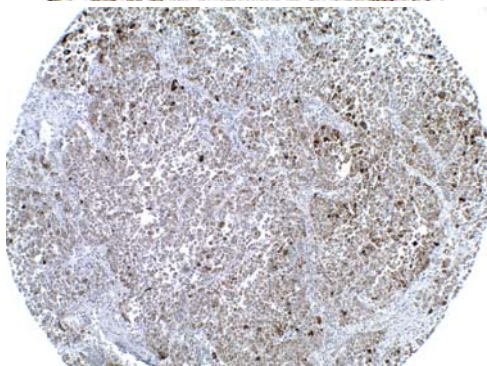
4. Wyniki

4.1 Immunohistochemiczna ocena obecności białka COX-2

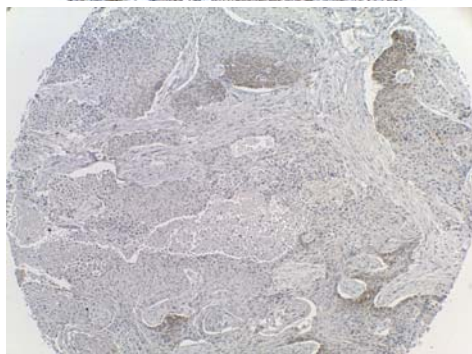
U 184 chorych ekspresję białka COX-2 oceniono w przynajmniej jednej z trzech próbek. Mediana wskaźnika immunohistochemicznego (IHC) wynosiła 120 (zakres 0-400; 95% PU 124-162). Do dalszych obliczeń przyjęto średnią wartość IHC z trzech próbek od każdego chorego. Na rys. 8 przedstawiono mikroskopowe zdjęcia przykładowych guzów o różnym stopniu ekspresji białka COX-2.



a) wysoki stopień ekspresji (wskaźnik IHC > 301)



b) pośredni stopień ekspresji (wskaźnik IHC ~ 120)



c) niski stopień ekspresji (wskaźnik IHC <100)

Rys. 8. Zdjęcia mikroskopowe mikromacierzy tkankowej NDRP wybarwione przy użyciu przeciwciała monoklonalnego przeciwko COX-2, przedstawiające preparaty o różnym stopniu ekspresji białka COX-2.

Ekspresję COX-2 stwierdzono u 168 chorych (91%), w tym u 52 wskaźnik IHC miał niską wartość, u 94 - średnią i u 22 - wysoką (tab. 2)

Tabela 2. Intensywność ekspresji COX-2 w komórkach nowotworowych (n=184)

Intensywność ekspresji (wskaźnik IHC)	n (%)
brak	16 (9%)
niska (IHC <100)	52 (28%)
średnia (101<IHC<300)	94 (51%)
wysoka (IHC<301)	22 (12%)

W celu oceny związku z cechami klinicznymi, analizowaną grupę chorych podzielono względem mediany wskaźnika IHC (120), uzyskując dwie grupy liczące po 92 chorych. Ten sam punkt odcięcia wybrano również do analizy przeżycia i analizy czasu do progresji choroby.

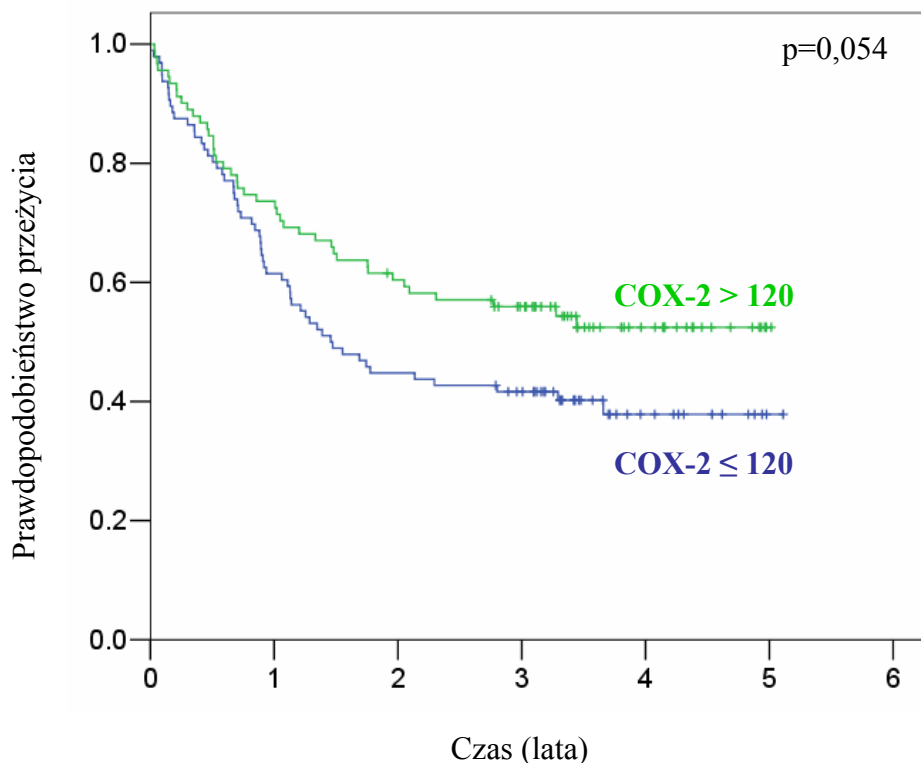
Nie stwierdzono znamiennej różnicy w stopniu ekspresji COX-2 w grupie chorych na raka płaskonabłonkowego w porównaniu do pozostałych postaci histologicznych ($p=0,45$), w grupie kobiet vs mężczyzn ($p=0,16$) oraz grupie chorych z niskim vs wysokim stopniem zaawansowania choroby ($p=0,061$). Ekspresja COX-2 była natomiast znamiennej wyższa w grupie palących w stosunku do niepalących ($p=0,043$; tab. 3).

Tabela 3. Rozkład wskaźnika IHC w zależności od wybranych cech klinicznych (n=184)

Cecha	Liczba chorych n (%)	Mediana wskaźnika IHC dla COX-2	Średnia wskaźnika IHC dla COX-2	95% PU	p
Wiek					
<60	68 (37)	130	154	128-179	0,3
≥60	116 (63)	113	139	119-159	
Płeć					
Kobiety	43 (23)	153	160	130-190	0,16
Mężczyźni	141 (77)	110	140	121-158	
Papierosy					
Palący	176 (95)	121	148	132-164	0,043
Niepalący	8 (5)	80	78	30-126	
Stopień zaawansowania klinicznego					
I	75 (41)	130	152	129-175	0,061
II	41 (22)	133	165	130-199	
III + IV	68 (37)	100	124	97-151	
Postać histologiczna raka					
Rak płaskonabłonkowy	101 (55)	113	139	118-160	0,45
Inne typy histologiczne	83 (45)	146	151	128-175	

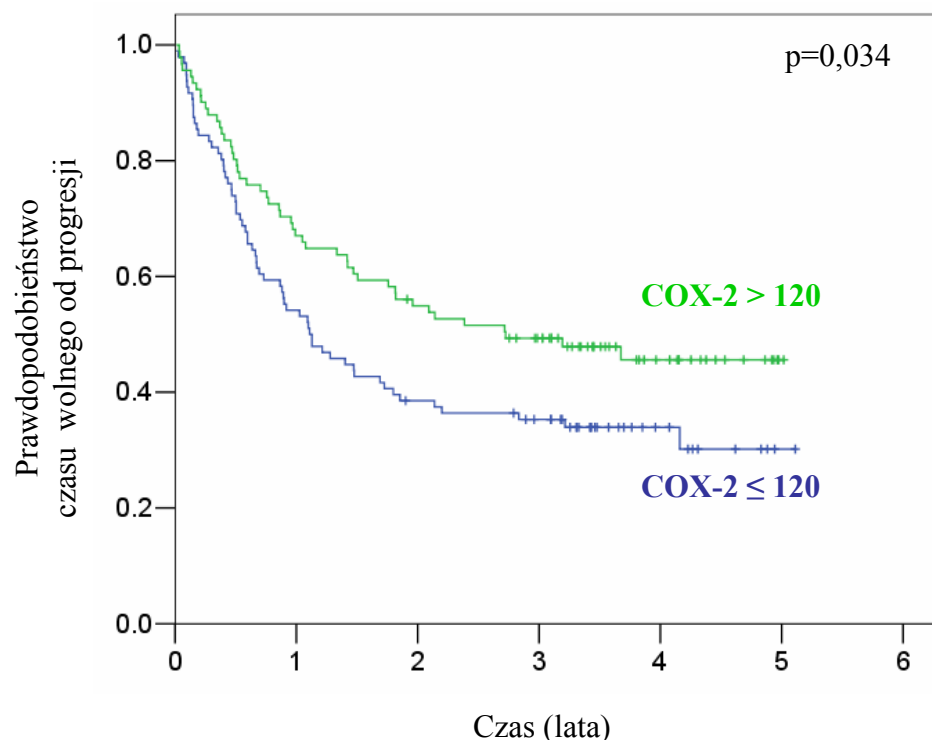
4.2 Rokownicze znaczenie ekspresji COX-2

Mediana czasu przeżycia w grupie chorych o niskim wskaźniku IHC (≤ 120) wynosiła 1,5 roku (95% PU: 0,9-2 lata), natomiast w grupie o wysokim wskaźniku IHC (> 120) nie została osiągnięta (rys. 9). Współczynnik ryzyka zgonu (HR) dla grupy o niskim w porównaniu z wysokim wskaźnikiem IHC wynosi 0,68 (PU 0,46-1,01; $p=0,055$). Prawdopodobieństwo trzyletniego przeżycia w obu wymienionych grupach wynosiło odpowiednio 42% (95% PU: 32-91%) i 59% (95% PU: 46-66%). Różnica ta była bliska znamienności ($p=0,055$).



Rys. 9 Krzywe przeżycia w zależności od wartości wskaźnika IHC.

Mediana czasu do nawrotu choroby w grupie o niskim wskaźniku IHC wynosiła 1,2 roku (95% PU: 0,6-1,6 roku), zaś w grupie o wysokim wskaźniku – 2,7 roku (przedziału ufności nie można oszacować; rys. 10). Współczynnik ryzyka nawrotu u chorych z niskim w porównaniu z wysokim wskaźnikiem IHC wynosił $HR=0,66$ (PU 0,46-0,97; $p=0,033$). Trzyletnie prawdopodobieństwo przeżycia bez nawrotu nowotworu wynosiło, w powyższych grupach odpowiednio 35% (95% PU: 26-45%) oraz 49% (95% PU: 39-60%). Różnica ta była znamienna ($p=0,033$).



Rys. 10 Krzywa przeżycia bez nawrotu nowotworu w zależności od wartości wskaźnika IHC.

W analizie jednoczynnikowej czasu przeżycia po podziale wskaźnika IHC na podstawie jego mediany (0-120 vs 121-400), wysoki wskaźnik był związany z tendencją do dłuższego czasu przeżycia ($p=0,10$). Tendencja ta utrzymała się w analizie wieloczynnikowej ($p=0,08$), po uwzględnieniu stopnia zaawansowania raka w ocenie histopatologicznej, jego postaci histopatologicznej, płci i nałogu palenia papierosów.

W analizie jedno- i wieloczynnikowej czasu do nawrotu choroby nie stwierdzono znamiennej różnicy pomiędzy grupami (odpowiednio $p=0,12$ i $p=0,11$), choć widoczna jest słaba tendencja do dłuższego czasu do nawrotu w grupie chorych z wysokim wskaźnikiem IHC.

4.3 Ocena ekspresji mRNA dla COX-2 przy zastosowaniu qRT-PCR

Ekspresję mRNA dla COX-2 oceniono w materiale pochodzącym od 121 chorych, o cechach klinicznych i patologicznych odpowiadających całej badanej grupie 184 chorych. Do

analizy związku z cechami klinicznymi, analizy przeżycia i analizy czasu do nawrotu nowotworu jako punkt odcięcia wybrano medianę ekspresji mRNA. Wynosiła ona 20 (zakres 0,4-548,4; 95% PU: 31,2-56).

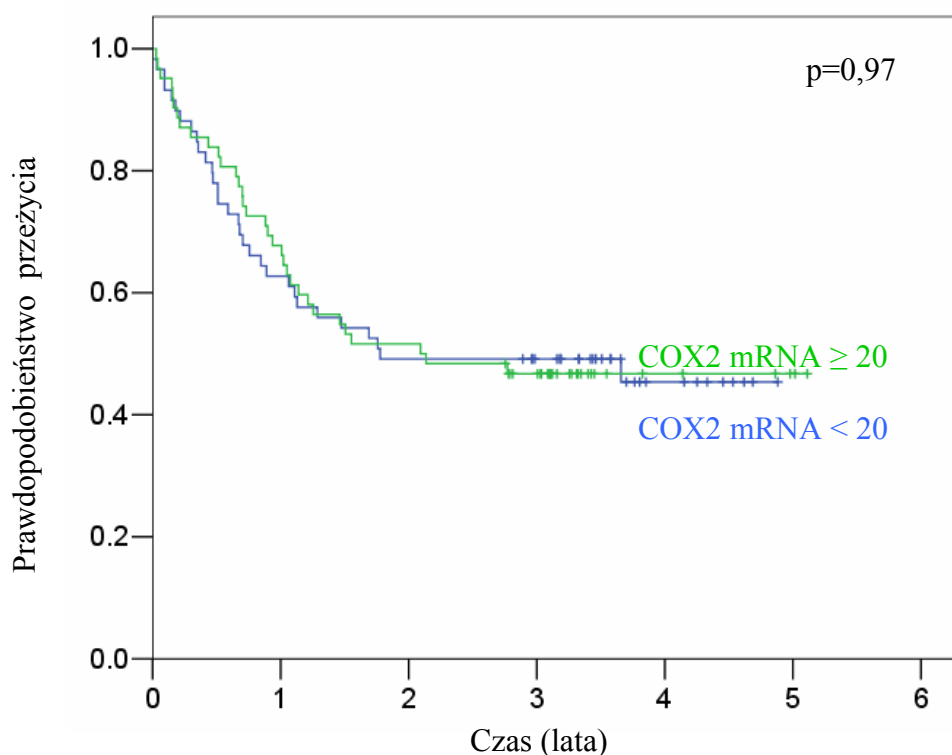
Tabela 4. Rozkład ekspresji mRNA dla COX-2 w zależności od wybranych cech klinicznych (n121)

Cecha	Liczba chorych n (%)	Mediana ilości mRNA COX-2	Średnia ilość mRNA COX-2	95% PU	p
Wiek					
<60	44 (36)	22,8	36,6	25,6-47,7	0,65
≥60	77 (64)	20,1	47,7	29-66,3	
Płeć					
Kobiety	29 (24)	20,3	36,2	14,9-57,5	0,64
Mężczyźni	92 (76)	20,7	46	30,9-61	
Papierosy					
Palący	116 (96)	20,2	43	30,4-55,6	0,7
Niepalący	5 (4)	23,6	57	51,5-166,8	
Stopień zaawansowania klinicznego					
I	44 (36,4)	17	41,2	23,8-58,7	0,93
II	26 (21,5)	18,8	51,4	7,4-95,4	
III + IV	49 (42,1)	23,6	41,8	27,4-56,2	
Postać histologiczna raka					
Rak płaskonabłonkowy	69 (57)	18,4	37,9	16,2-59,6	0,33
Inne typy histologiczne	52 (43)	21,3	47,98	33,2-62,8	

Nie stwierdzono znamiennej różnicy w ilości mRNA dla COX-2 w grupie na raka płaskonabłonkowego w porównaniu do pozostałych postaci histologicznych (p=0,33), w grupie kobiet vs mężczyzn (p=0,64) oraz grupie chorych z niskim vs wysokim stopniem zaawansowania choroby (p=0,93), jak również w grupie palących vs niepalących (p=0,7; tab. 4).

4.4 Rokownicze znaczenie ekspresji COX-2 mRNA

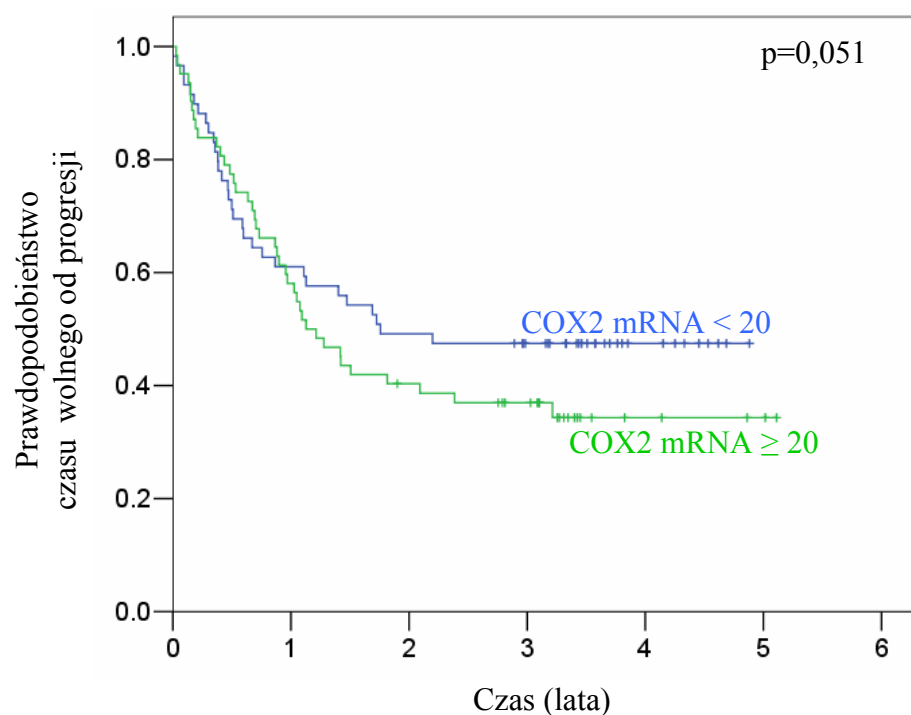
Mediana czasu przeżycia w grupie chorych o niskiej ekspresji mRNA (< 20) wynosiła 1,8 roku, zaś w grupie o wysokiej ekspresji mRNA (≥ 20) – 2,1 roku. W obu grupach nie można oszacować przedziałów ufności (rys. 11). Współczynnik ryzyka dla ww. grup wynosi 1,003 (95% PU: 1-1,006; $p=0,073$).



Rys.11 Krzywe przeżycia w zależności od ilości COX-2 mRNA.

Prawdopodobieństwo trzyletniego przeżycia w obu wymienionych grupach wynosiło odpowiednio 49% (95% PU: 37-62%) oraz 47% (95% PU: 34-59%). Różnica ta była nieznamienista ($p=0,96$).

Mediana czasu do nawrotu choroby w grupie o niskiej ekspresji COX-2 mRNA wynosiła 1,8 roku (przedziału ufności nie można oszacować), natomiast w grupie o wysokiej ekspresji – 1,1 roku (95% PU: 0,7-1,5). Względne ryzyko nawrotu choroby wynosiło $HR=1,003$ (PU: 1,000-1,006; $p=0,051$; rys. 12).



Rys.12. Krzywe przeżycia bez nawrotu nowotworu w zależności od ilości mRNA,

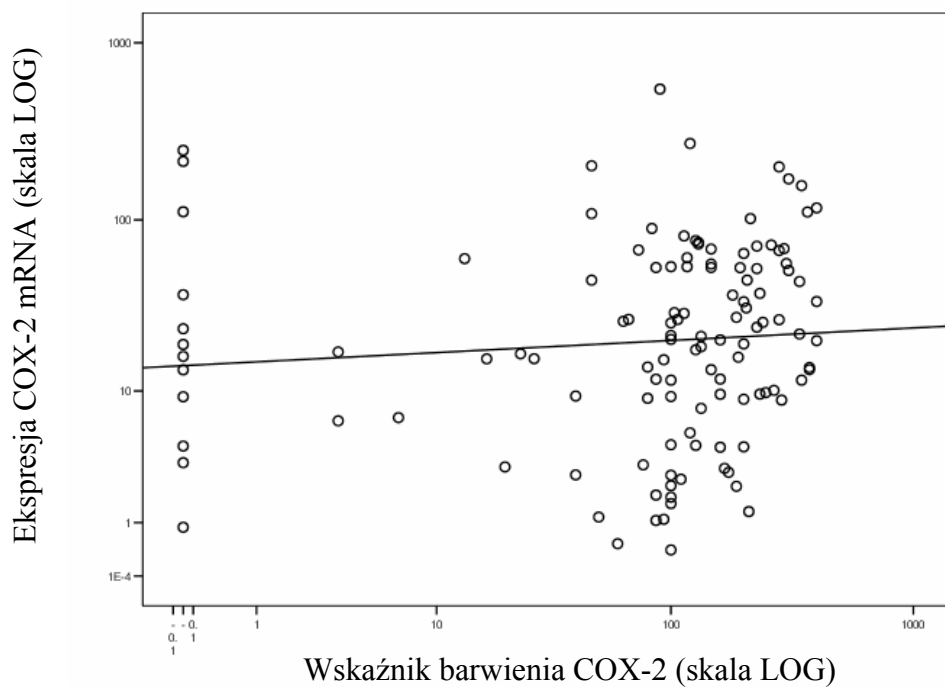
Prawdopodobieństwo trzyletniego przeżycia bez nawrotu choroby w powyższych grupach wynosiło 48% (PU: 35-60%) dla grupy chorych o niskiej ekspresji COX-2 mRNA i 37% (PU: 25-49%) dla grupy chorych o wysokiej ekspresji.

W analizie jednoczynnikowej czasu przeżycia po podziale ekspresji COX-2 mRNA na podstawie jego mediany (0-19 vs 20-56), różnica pomiędzy grupami była nieznamienna ($p=0,073$). W analizie wieloczynnikowej, po uwzględnieniu stopnia zaawansowania raka w ocenie histopatologicznej, jego postaci histopatologicznej, płci i nałogu palenia papierosów, wyższa ekspresja mRNA związana była z wyższym ryzykiem zgonu ($p=0,01$).

W analizie jednoczynnikowej stwierdzono silną tendencję do krótszego czasu do nawrotu choroby w grupie chorych z wysoką ekspresją COX-2 mRNA ($p=0,051$), a w analizie wieloczynnikowej, po uwzględnieniu ww. parametrów klinicznych, różnica ta okazała się znamienna ($p=0,007$).

4.5 Związek pomiędzy obecnością białka COX-2 a ekspresją mRNA

W analizie przeprowadzonej przy użyciu testu nieparametrycznego Spearmana stwierdzono słabą korelację pomiędzy wskaźnikiem IHC a ilością mRNA ($\rho=0,22$, $p=0,014$).



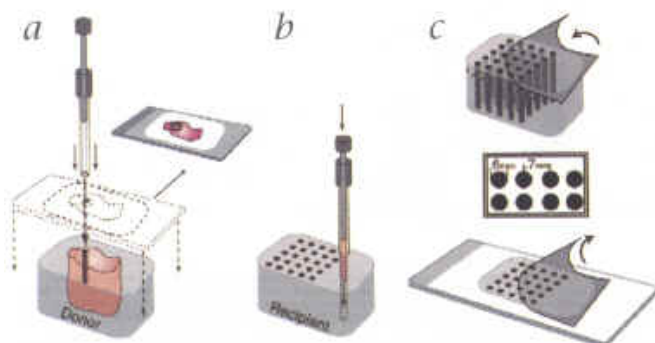
Rys. 13. Krzywa korelacji wskaźnika barwienia COX-2 i ekspresji COX-2 mRNA

5. Dyskusja

Znaczenie nadekspresji COX-2 w raku płuca jest obecnie przedmiotem intensywnych badań podstawowych i klinicznych. Piśmiennictwo poświęcone temu zagadnieniu jest bogate, jednak znaczenie rokownicze zaburzeń COX-2 pozostaje kontrowersyjne. W większości dotychczasowych prac ocenę ekspresji COX-2 przeprowadzono wyłącznie metodą IHC. W niniejszej rozprawie analizę zaburzeń COX-2 w komórkach NDRP przeprowadzono przy użyciu metody IHC i jakościowej reakcji RT-PCR. Markery te określono w odniesieniu do cech klinicznych, czasu przeżycia chorych i czasu do nawrotu choroby. Badania przeprowadzono na grupie 191 chorych na NDRP poddanych resekcji mięszu płucnego, reprezentatywnej dla Polski pod względem czynników klinicznych i demograficznych

Analizę IHC ekspresji COX-2 wykonano przy użyciu mikromacierzy tkankowych. Równoczesne badania IHC na wielu próbkach, mające na celu standaryzację warunków i przyspieszenie procesu, przeprowadzono po raz pierwszy 20 lat temu przez Battifora. Technikę tę rozwinął do obecnie znanej postaci mikromacierzy tkankowych (*tissue microarray* – TMA) Kononem w 1998 roku. Stworzenie nowoczesnej mikromacierzy tkankowej było odpowiedzią na rosnące zapotrzebowanie szybkiej oceny wielu biomarkerów odkrytych przy użyciu techniki mikromacierzy genetycznych. Do stworzenia TMA można użyć od kilkudziesięciu do kilkuset rdzeni tkankowych pochodzących z bloków parafinowych i wprowadzonych w jeden „zbiórny” blok (rys. 14). Blok ten można następnie skroić na 100-200 preparatów w zależności od typu tkanki i grubości tkanek z bloków „dawców”, co pozwala na równoczesną analizę wielu substancji. Tak wykonane preparaty mogą być poddane wielu analizom – IHC w celu oceny ekspresji białek, fluoroescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) w celu zbadania zmian w DNA i mRNA hybrydyzacji *in situ* (mRNA-ISH) w celu oceny ekspresji mRNA [82,83]. W technice TMA najbardziej krytykowane jest ograniczenie oceny do małego wycinka, co w przypadku heterogenności guza może utrudniać interpretację wyników. Szereg badań potwierdziło jednak doskonałą zgodność pomiędzy fragmentem wykorzystanym do TMA a całym preparatem [83,84]. Ponadto sposobem na zwiększenie reprezentatywności TMA jest pobranie więcej niż jednego rdzenia z każdego

bloku i/lub zwiększenie średnicy rdzenia ze standardowej 0,6 mm do 1,5-2,0 mm. Oba te warianty zastosowano w niniejszej pracy.



Rys. 14. Tworzenie mikromacierzy tkankowej (przedruk z Kononen, J. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat.Med., 4: 844-847, 1998.)

W niniejszej rozprawie nie stwierdzono zależności pomiędzy nadekspresją białka COX-2 ocenioną metodą immunohistochemiczną z wykorzystaniem przeciwciała monoklonalnego a cechami klinicznymi. Stwierdzono natomiast nieco lepsze rokowanie mierzone czasem przeżycia i czasem do nawrotu choroby u chorych z podwyższonym stężeniem białka COX-2.

Rokownicze znaczenie nadekspresji COX-2 w NDRP było przedmiotem licznych badań (tab. 5). Niektóre z nich wykazały niekorzystne znaczenie rokownicze nadekspresji COX-2, natomiast w innych nie potwierdzono tej zależności. Natomiast autorzy dwóch prac wykazali, że chorzy w I [18,24] i II [24] stopniu zaawansowania z nadekspresją COX-2 mają gorsze rokowanie. Również w niedawno opublikowanej meta-analizie wykazano znamiennej zależność pomiędzy ekspresją COX-2 a krótszym czasem przeżycia chorych na NDRP w I stopniu zaawansowania [85]. W wyższych stadiach nie potwierdzono tej zależności.

Znaczna różnorodność cytowanych doniesień, większe prawdopodobieństwo publikowania prac zawierających pozytywne wyniki (tzw. „*publication bias*”) oraz nieuwzględnienie indywidualnych danych chorych utrudniają ich jednoznaczną interpretację.

Źródeł rozbieżności w wynikach i interpretacji dotychczas przeprowadzonych badań, włączając niniejszą rozprawę, może być kilka. Pierwszym z nich jest dobór grupy badanej. W większości wcześniejszych prac przeważają chorzy z rozpoznaniem mikroskopowym raka gruczołowego. Badania te przeprowadzano w Azji i Ameryki Północnej, gdzie w ostatnich latach, wśród rozpoznań histologicznych niedrobnokomórkowego raka płuca dominuje postać gruczołowa.

Istotnym problemem jest także technika oceny obecności białka COX-2. Autorzy stosowali różne rodzaje przeciwciał monoklonalnych, różne skale oceny ekspresji oraz różne punkty odcięcia dla stopnia ekspresji (tab. 6). Najczęściej stosowano charakteryzujące się dużym subiektywizmem skale półilościowe (0 – brak ekspresji, 1 - słaba, 2 – średnia, 3 – silna) lub procentową ocenę wybarwionych komórek. W niniejszej pracy zastosowano najbardziej polecany w analizie statystycznej podział grupy według mediany wskaźnika IHC (zwłaszcza przy braku rozkładu normalnego zmiennej). Inni autorzy jako punkt odcięcia przyjmowali wartość, przy której stwierdzono obecność ekspresji, obecność silnej ekspresji lub arbitralnie wybrany punkt odcięcia, prawdopodobnie wyznaczony drogą wielokrotnego testowania i wyboru najbardziej różnicującej wartości. Ta ostatnia korekta nie jest zalecana ze względu na wyższe ryzyko popełnienia błędu I rodzaju (fałszywie dodatniej interpretacji w rzeczywistości nieistniejącej różnicy pomiędzy grupami).

Nie tylko wartość rokownicza COX-2 była przedmiotem analizy, ale także częstość występowania ekspresji COX-2. We wszystkich opublikowanych pracach w tym w niniejszej rozprawie, stwierdzono obecność białka COX-2 w komórkach guza. Odsetek próbek wykazujących średnią lub wysoką ekspresję wahał się w granicach od 37% do 100% (tab. 5). Obecność COX-2 stwierdzono już we wczesnych etapach onkogenezy zarówno raka płaskonabłonkowego [15] jak i gruczolakoraka [10,14,16,17], a także w stanach przednowotworowych [10,15-17]. Sugeruje to rolę COX-2 w transformacji nowotworowej, co potwierdzono w badaniach *in vitro* [10,16,17,34,49,50,86-91].

Tabela 5. Ogólna charakterystyka i wyniki dotychczasowych badań nad znaczeniem rokowniczym nadekspresji COX-2.

Autor/rok opublikowania pracy	Materiał/ liczba chorych	Stopień zaawansowania	Rozpoznanie histologiczne	Metoda wykorzystana do oceny ekspresji COX-2	Obecność ekspresji COX-2 /% próbek	Znaczenie rokownicze nadekspresji COX-2
Achiwa i wsp. /1999	Materiał pooperacyjny/ 130	I-III	100% ADC	IHC	++ / 72%	Negatywne w stopniu I.
Brabender i wsp. /2002	Materiał pooperacyjny/ 89	70% w I i II	46% SCC 37% AC 17% LCC	Q RT-PCR	+ / 100%	Negatywne
Hasturk i wsp. /2001	Materiał pooperacyjny/ 101	69% w I i II	50% ADC 46% SCC 4% LCC	IHC	++ / 37%	NZ
Hosomi i wsp. /2000	Materiał pooperacyjny/ 160 (187 próbek)	brak danych	47% ADC 43% AAH 10% BAC	IHC, <i>western blot</i>	+	NZ
Khuri i wsp. /2001	Materiał pooperacyjny/ 160	I	44% SCC 38% ADC	IHC, <i>western blot</i>	++ / 45%	Negatywne
Laga i wsp. /2005	Materiał pooperacyjny/ 259	86% w I i II	66% ADC 20% SCC 14% LCC	IHC	++ / 53%	Negatywne I i II stopniu
Marrogi i wsp. /2000	Materiał pooperacyjny/ 106 pacjentów	brak danych	52% ADC 27% SCC 21% LCC	IHC	++ / 48%	NZ
Petkova i wsp. /2004	Materiał pooperacyjny /52 chorych/, biopsja /13 chorych/, linie komórkowe gruczolakoraka i raka wielkokomórkowego	brak danych	88% SCC 12% ADC	IHC, <i>western blot</i>	+ /100%	NZ
Yuan i wsp. /2005	Materiał pooperacyjny/ 60	brak danych	43% SCC 57% ADC	Q RT-PCR, IHC,	++ / 50%	Negatywne

ADC- gruczolakorak, AAH – hiperplazja gruczolakowa, SCC – rak płaskonabłonkowy, LCC - rak wielkokomórkowy, BAC – rak pęcherzykowo-oskrzelikowy; +/- - ekspresja COX-2, /++/- nadekspresja COX-2; NZ – nieznamienne.

Tabela 6. Przeciwciała przeciwko COX-2 i punkty odcięcia

Autor/rok opublikowania pracy	Przeciwciało	Punkt odcięcia
Achiwa i wsp. /1999	IBL	1> ref
Hasturk i wsp. /2001	Santa Cruz	> 10%
Hosomi i wsp. /2000	IBL	> 10%
Khuri i wsp. /2001	Cayman, Oxford, Santa Cruz	1 %
Laga i wsp. /2005	Cayman	Poziom 3
Marrogi i wsp. /2000	Santa Cruz	Poziom 4
Petkova i wsp. /2004	Alexis	Poziom 4
Yuan i wsp. /2005	Oxford	Wskaźnik referencyjny

Kontrowersyjny jest także związek ekspresji COX-2 z poszczególnymi cechami klinicznymi. Większość autorów nie stwierdziła związku ekspresji COX-2 z płcią, wiekiem, postacią histologiczną nowotworu, rodzajem zabiegu operacyjnego stopniem zaawansowania i paleniem papierosów [17,21]. W niniejszej pracy nie stwierdzono znamienych różnic w stężeniu białka COX-2 w grupie chorych na raka płaskonabłonkowego w porównaniu do pozostałych postaci histologicznych, w grupie kobiet vs mężczyzn oraz grupie chorych z niskim vs wysokim stopniem zaawansowania choroby. Wykazano natomiast znamienne wyższą ekspresję COX-2 u chorych palących w porównaniu z chorymi niepalącymi ($p=0.043$). Podobne wyniki przedstawiono w pracy Hastruka i wsp. jednak różnica ta była nieznamienna ($p=0,15$) [14].

Znaczna rozbieżność w wynikach badań sugeruje ograniczoną przydatność techniki IHC do oceny wartości prognostycznej COX-2. Ewentualne zastosowanie IHC wymagałoby standaryzacji przeciwciał, protokołów badań i kryteriów oszacowania wartości pozytywnych markera.

W cytowanej meta-analizie [85] w analizie podgrup według technik wykorzystanych do wykrycia obecności COX-2, znamienne wyniki uzyskano tylko w przypadku zastosowania reakcji jakościowej RT-PCR. Technika ta, jako dobrze wystandaryzowana, jest bardziej wiarygodna w ocenie potencjalnych biomarkerów. W niniejszej rozprawie zastosowano jakościową reakcję odwrotnej transkryptazy RT-PCR z technologią barwienia Sybr Green. Stwierdzono gorsze rokowanie mierzone czasem przeżycia i czasem do nawrotu choroby u chorych z podwyższoną ekspresją COX-2 mRNA. Nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy cechami klinicznymi a ekspresją COX-2 mRNA.

Prac oceniających ekspresję COX-2 mRNA przy użyciu jakościowej reakcji RT-PCR jest znacznie mniej niż wykorzystujących IHC. W dotychczasowych badaniach stosowano kilka zestawów do qPCR, w tym najczęściej TaqMan [20,22] i Invitrogen [19] oraz różne zestawy primerów. Niezależnie od zastosowanej metody wszystkie te prace wykazały niekorzystne znaczenie rokownicze ekspresji COX-2 mRNA u chorych na NDRP. Podobnie jak w niniejszej rozprawie, w pracach tych nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy stopniem ekspresji COX-2 mRNA a cechami klinicznymi.

W niniejszej rozprawie oceniono także związek pomiędzy obecnością białka COX-2 w ocenie IHC a ekspresją mRNA COX-2. Związek ten jest co prawda znamienny ($p=0,014$), ale jego siła jest słaba (siłę korelacji określa współczynnik *rho*, wartość *rho* 0,2-0,4 świadczy o słabej korelacji, 0,4-0,6 – o średniej, zaś powyżej 0,8 o silnej). W niniejszej pracy współczynnik ten wynosi 0,22, co świadczy o słabym związku między obecnością białka COX-2 badaną IHC a ekspresją genu *COX-2* ocenianą za pomocą jakościowej reakcji odwrotnej transkryptazy RT-PCR. Przyczyny tego stanu mogą być wielorakie: po pierwsze, część COX-2 mRNA może nie ulegać translacji na skutek zaburzeń translacyjnych mechanizmów regulacji genów np. mikroRNA. Po drugie, może dochodzić do zwiększonej degradacji COX-2 mRNA lub białka COX-2. Po trzecie, półilościowa metoda oceny IHC nie jest dokładna do oceny rzeczywistego stężenia białka COX-2 w komórce. Zastosowany w niniejszej pracy sposób oceny liczby kopii mRNA przy użyciu metody krzywej standardowej liczby kopii jest normalizowany względem liczby kopii genu referencyjnego – β -aktyny, którego stopień ekspresji też może wpływać na końcowe wyniki. Kolejną przyczyną różnic pomiędzy zbadanym stężeniem białka COX-2 a ekspresją COX-2 mRNA może być źródło COX-2 – w ocenie IHC oceniano ekspresję COX-2 w komórkach nowotworowych, zaś

ekspresję COX-2 mRNA badano we fragmentach guzów zawierających zarówno komórki guza, jak i podścieliska, które również wykazuje ekspresję COX-2 [20].

W niniejsze rozprawie stwierdzono częste występowanie zaburzeń ekspresji COX-2 w NDRP. Ocena obecności białka COX-2 przy użyciu metody IHC obarczona jest wieloma błędami i stosowanie jej na szerszą skalę wymaga standaryzacji przeciwciał i warunków barwienia. W analizie jedno- i wieloczynnikowej wysokie stężenie białka COX-2, ocenionego metodą IHC związane było z tendencją do dłuższego czasu przeżycia. Natomiast ekspresja COX-2 mRNA oceniana przy użyciu jakościowej reakcji odwrotnej transkryptazy RT-PCR związana jest z tendencją do wyższego ryzyka nawrotu choroby. Metoda ta wydaje się lepsza do oceny nadekspresji COX-2 ze względu na wystandaryzowanie. Nie stwierdzono związku pomiędzy cechami klinicznymi a wyższym stężeniem białka COX-2 czy wyższą ekspresją COX-2 mRNA. Wyniki te są obiecujące w świetle badań nad zastosowaniem selektywnych inhibitorów COX-2 w chemoprewencji lub leczeniu uzupełniającym NDRP [30,56,58,59,61,92].

6. Wnioski

1. Zaburzenia ekspresji COX-2 są częstym zjawiskiem w niedrobnokomórkowym raku płuca.
2. Obecność białka COX-2 w komórkach NDRP może być związana z narażeniem na dym tytoniowy.
3. Obecność białka COX-2 w ocenie immunohistochemicznej jest w niewielkim stopniu związana z ekspresją mRNA dla COX-2.
4. Nadekspresja białka COX-2 u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca jest związana z nieco lepszym rokowaniem mierzonym czasem przeżycia i czasem do nawrotu nowotworu, podczas gdy ekspresja mRNA COX-2 związana jest wyższym ryzykiem nawrotu nowotworu i zgonu.

7. Streszczenie

Wprowadzenie: Nadekspresję cyklooksygenazy-2 (COX-2) stwierdzono w stanach przednowotworowych i w wielu nowotworach litych. Rola COX-2 w powstawaniu i rozwoju guzów litych, w tym w NDRP jest dobrze udokumentowana, jednak znaczenie nadekspresji COX-2 jako czynnika rokowniczego pozostaje przedmiotem kontrowersji.

Cel: Ocena obecności białka COX-2 w komórkach NDRP za pomocą mikromacierzy tkankowych i ekspresji mRNA dla COX-2 przy zastosowaniu jakościowej reakcji RT-PCR, zbadanie zależności pomiędzy tymi parametrami a cechami demograficznymi i klinicznymi badanej grupy chorych oraz określenie wartości rokowniczej zaburzeń COX-2.

Metody: Przedmiotem badania było 186 chorych na NDRP poddanych resekcji mięszu płucnego w latach 2002-2004. Chorzy z rozpoznaniem raka płaskonabłonkowego stanowili 55%, gruczolakoraka 29%, raka wielkomórkowego 2,5% i postaci mieszanej 13%. W grupie badanej były 44 kobiety i 147 mężczyzn. Osoby palące (w przeszłości lub obecnie) stanowiły 95%. Ekspresję COX-2 oceniono metodą immunohistochemiczną (IHC) i przy zastosowaniu jakościowej reakcji RT-PCR. Ocenę immunohistochemiczną przeprowadzono pobierając z parafinowych preparatów guza po 3 rdzenie tkankowe i wykonując mikromacierze tkankowe z wykorzystaniem zestawu MaxArray Customer Kit firmy Zymed Laboratories (San Fransico, CA, USA). Barwienie IHC w kierunku COX-2 wykonano z użyciem przeciwciał monoklonalnych. Ekspresję COX-2 oceniano przy użyciu wskaźnika IHC opracowanego przez Uniwersytet Kolorado USA (zakres 0-400). Do oceny ekspresji COX-2 mRNA wykorzystano 165 zamrożonych wycinków z guzów. Po wyizolowaniu RNA, dalszą analizę - reakcję odwrotnej transkrypcji a następnie reakcji jakościowej PCR przeprowadzono na 120 próbkach.

Wyniki: Nie stwierdzono znamiennej różnicy w stopniu ekspresji COX-2 w odniesieniu do postaci histopatologicznej raka (rak płaskonabłonkowy vs pozostałe postacie histologiczne; $p=0,45$ dla oceny IHC i $p=0,33$ dla reakcji qRT-PCR), w grupie kobiet vs mężczyzn (odpowiednio $p=0,16$ i $p=0,64$) oraz w grupie chorych z niskim vs wysokim stopniem zaawansowania ($p=0,061$ i $0,93$). Znamiennej różnicę w ocenie IHC stwierdzono w grupie chorych palących vs niepalących $p=0,04$; w ocenie mRNA różnica ta nie była znamienna

($p=0,7$). W analizie jednoczynnikowej czasu przeżycia po podziale wskaźnika IHC i ilości mRNA względem mediany (odpowiednio 0-120 vs 121-400; 0-20 vs 21-56), wysoki wskaźnik IHC COX-2 był związany z tendencją do dłuższego czasu przeżycia ($p=0,10$), ale tendencja ta nie wystąpiła w odniesieniu do ekspresji COX-2 mRNA ($p=0,073$). Tendencja ta w odniesieniu do wskaźnika IHC utrzymała się w analizie wieloczynnikowej, po uwzględnieniu stopnia zaawansowania nowotworu (pTNM), rozpoznania histopatologicznego, płci i palenia papierosów (0,08). W analizie wieloczynnikowej uwzględniającej ilość mRNA wyższa ekspresja związana była z wyższym ryzykiem zgonu – $p=0,01$.

Wnioski: Zaburzenia ekspresji COX-2 są częstym zjawiskiem w niedrobnokomórkowym raku płuca. Obecność białka COX-2 w komórkach NDRP może być związana z narażeniem na dym tytoniowy. Obecność białka COX-2 w ocenie immunohistochemicznej jest w niewielkim stopniu związana z ekspresją mRNA dla COX-2. Nadekspresja białka COX-2 u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca jest związana z nieco lepszym rokowaniem mierzonym czasem przeżycia i czasem do nawrotu nowotworu, podczas gdy ekspresja mRNA COX-2 związana jest z wyższym ryzykiem nawrotu nowotworu i zgonu.

8. Summary

Background: Overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) was detected in precancerous lesions and in many solid tumors. Role of COX-2 in cancerogenesis, including non-small cell lung cancer (NSCLC) is well documented but its prognostic role is still controversial.

Aims: 1) Evaluation of COX-2 protein expression in NSCLC using tissue microarray, and COX-2 mRNA expression using a quantitative real-time polymerase chain reaction. 2). Assessment of correlation between these parameters and demographic and clinical features in NSCLC patients 3). Determining prognostic value of COX-2 overexpression.

Methods: Between 2002 and 2004 186 NSCLC patients underwent surgical resection. Of those, 55% had squamous cell carcinoma, 29% adenocarcinoma, 2,5% large cell carcinoma and 13% mixed carcinoma. There were 44 women and 147 men and 95% were past or current smokers. COX-2 expression was analyzed using immunohistochemistry (IHC) and quantitative RT-PCR. IHC evaluation was performed after obtaining from paraffin-embedded tumors 3 cores of tissue and creating tissue microarray using MaxArray Customer Kit, Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA). Immunostaining was performed with the use of monoclonal antibodies. COX-2 expression was evaluated using IHC index, processed by University of Colorado (range 0-400). Total RNA was isolated from 165 fresh-frozen tumor samples. After RNA isolation, cDNA and qPCR reaction was performed on 120 samples.

Results: There was no significant correlation between COX-2 expression and clinicopathologic variables such as histological type (squamous cell carcinoma vs other cancer types; $p=0.45$ for IHC and $p=0.33$ for qRT-PCR), gender (female vs male; $p=0.16$ and 0.64 respectively), stage (low vs high; $p=0.061$ and 0.93). There was a significant correlation between COX-2 expression measured by IHC and smoking status (smokers vs non-smokers; $p=0.04$), but not so for COX-2 mRNA. In univariate analysis of survival time, after using median of IHC index and RNA as cut off values (0-120 vs 121-400, 0-20 vs 21-56 respectively), high IHC index was associated with better survival ($p=0.01$) but this relation was not significant for COX-2 mRNA ($p=0.073$). The correlation for IHC remained significant in the multivariate analysis after correction by disease stage (pTNM), histological type, gender and smoking status. In the multivariate analysis high mRNA expression was correlated with poor survival ($p=0.01$).

Conclusions: COX-2 expression abnormalities are a common event in NSCLC. COX-2 protein expression in NSCLC is probably associated with tobacco exposure. The correlation between COX-2 expression assessed by IHC and mRNA is weak. Patients with NSCLC overexpression of COX-2 protein had a tendency to better overall survival, and disease free survival whereas overexpression of COX-2 mRNA is associated with higher risk of relapse and death.

8. Piśmiennictwo

1. Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J.Clin.*, 55: 74-108, 2005.
2. Franklin, W. A. Diagnosis of lung cancer: pathology of invasive and preinvasive neoplasia. *Chest*, 117: 80S-89S, 2000.
3. Jassem, J., Skokowski, J., Dziadziuszko, R., Jassem, E., Szymanowska, A., Rzyman, W., and Roszkiewicz, A. Results of surgical treatment of non-small cell lung cancer: validation of the new postoperative pathologic TNM classification. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*, 119: 1141-1146, 2000.
4. Simmons, D. L., Botting, R. M., and Hla, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol.Rev.*, 56: 387-437, 2004.
5. Appleby, S. B., Ristimaki, A., Neilson, K., Narko, K., and Hla, T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem.J.*, 302 (Pt 3): 723-727, 1994.
6. Hinz, B. and Brune, K. Cyclooxygenase-2--10 years later. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 300: 367-375, 2002.
7. Chan, G., Boyle, J. O., Yang, E. K., Zhang, F., Sacks, P. G., Shah, J. P., Edelstein, D., Soslow, R. A., Koki, A. T., Woerner, B. M., Masferrer, J. L., and Dannenberg, A. J. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.*, 59: 991-994, 1999.
8. Hasegawa, K., Ichikawa, W., Fujita, T., Ohno, R., Okusa, T., Yoshinaga, K., and Sugihara, K. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA in human colorectal adenomas. *Eur.J.Cancer*, 37: 1469-1474, 2001.

9. Hasegawa, K., Ohashi, Y., Ishikawa, K., Yasue, A., Kato, R., Achiwa, Y., Nishio, E., and Udagawa, Y. Expression of cyclooxygenase-2 in uterine endometrial cancer and anti-tumor effects of a selective COX-2 inhibitor. *Int.J.Oncol.*, 26: 1419-1428, 2005.
10. Hida, T., Yatabe, Y., Achiwa, H., Muramatsu, H., Kozaki, K., Nakamura, S., Ogawa, M., Mitsudomi, T., Sugiura, T., and Takahashi, T. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 58: 3761-3764, 1998.
11. Soslow, R. A., Dannenberg, A. J., Rush, D., Woerner, B. M., Khan, K. N., Masferrer, J., and Koki, A. T. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer*, 89: 2637-2645, 2000.
12. Tucker, O. N., Dannenberg, A. J., Yang, E. K., Zhang, F., Teng, L., Daly, J. M., Soslow, R. A., Masferrer, J. L., Woerner, B. M., Koki, A. T., and Fahey, T. J., III Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res.*, 59: 987-990, 1999.
13. O'Kane, S. L., Cawkwell, L., Campbell, A., and Lind, M. J. Cyclooxygenase-2 expression predicts survival in malignant pleural mesothelioma. *Eur.J.Cancer*, 41: 1645-1648, 2005.
14. Hasturk, S., Kemp, B., Kalapurakal, S. K., Kurie, J. M., Hong, W. K., and Lee, J. S. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in bronchial epithelium and nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, 94: 1023-1031, 2002.
15. Mascaux, C., Martin, B., Verdebout, J. M., Ninane, V., and Sculier, J. P. COX-2 expression during early lung squamous cell carcinoma oncogenesis. *Eur.Respir.J.*, 26: 198-203, 2005.
16. Wolff, H., Saukkonen, K., Anttila, S., Karjalainen, A., Vainio, H., and Ristimäki, A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res.*, 58: 4997-5001, 1998.

17. Hosomi, Y., Yokose, T., Hirose, Y., Nakajima, R., Nagai, K., Nishiwaki, Y., and Ochiai, A. Increased cyclooxygenase 2 (COX-2) expression occurs frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*, 30: 73-81, 2000.
18. Achiwa, H., Yatabe, Y., Hida, T., Kuroishi, T., Kozaki, K., Nakamura, S., Ogawa, M., Sugiura, T., Mitsudomi, T., and Takahashi, T. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinomas. *Clin.Cancer Res.*, 5: 1001-1005, 1999.
19. Fang, H. Y., Lin, T. S., Lin, J. P., Wu, Y. C., Chow, K. C., and Wang, L. S. Cyclooxygenase-2 in human non-small cell lung cancer. *Eur.J.Surg.Oncol.*, 29: 171-177, 2003.
20. Yuan, A., Yu, C. J., Shun, C. T., Luh, K. T., Kuo, S. H., Lee, Y. C., and Yang, P. C. Total cyclooxygenase-2 mRNA levels correlate with vascular endothelial growth factor mRNA levels, tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Int.J.Cancer*, 115: 545-555, 2005.
21. Petkova, D. K., Clelland, C., Ronan, J., Pang, L., Coulson, J. M., Lewis, S., and Knox, A. J. Overexpression of cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer. *Respir.Med.*, 98: 164-172, 2004.
22. Brabender, J., Park, J., Metzger, R., Schneider, P. M., Lord, R. V., Holscher, A. H., Danenberg, K. D., and Danenberg, P. V. Prognostic significance of cyclooxygenase 2 mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Ann.Surg.*, 235: 440-443, 2002.
23. Khuri, F. R., Wu, H., Lee, J. J., Kemp, B. L., Lotan, R., Lippman, S. M., Feng, L., Hong, W. K., and Xu, X. C. Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Clin.Cancer Res.*, 7: 861-867, 2001.
24. Laga, A. C., Zander, D. S., and Cagle, P. T. Prognostic significance of cyclooxygenase 2 expression in 259 cases of non-small cell lung cancer. *Arch.Pathol.Lab Med.*, 129: 1113-1117, 2005.

25. Marrogi, A. J., Travis, W. D., Welsh, J. A., Khan, M. A., Rahim, H., Tazelaar, H., Pairolero, P., Trastek, V., Jett, J., Caporaso, N. E., Liotta, L. A., and Harris, C. C. Nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma. *Clin.Cancer Res.*, 6: 4739-4744, 2000.
26. Sandler, A. B. and Dubinett, S. M. COX-2 inhibition and lung cancer. *Semin.Oncol.*, 31: 45-52, 2004.
27. Dy, G. K. and Adjei, A. A. Novel targets for lung cancer therapy: part II. *J.Clin.Oncol.*, 20: 3016-3028, 2002.
28. Dy, G. K. and Adjei, A. A. Novel targets for lung cancer therapy: part I. *J.Clin.Oncol.*, 20: 2881-2894, 2002.
29. Grimes, K. R., Warren, G. W., Fang, F., Xu, Y., and St Clair, W. H. Cyclooxygenase-2 inhibitor, nimesulide, improves radiation treatment against non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo. *Oncol.Rep.*, 16: 771-776, 2006.
30. Krysan, K., Reckamp, K. L., Sharma, S., and Dubinett, S. M. The potential and rationale for COX-2 inhibitors in lung cancer. *Anticancer Agents Med.Chem.*, 6: 209-220, 2006.
31. Leahy, K. M., Ornberg, R. L., Wang, Y., Zweifel, B. S., Koki, A. T., and Masferrer, J. L. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res.*, 62: 625-631, 2002.
32. Liao, Z., Milas, L., Komaki, R., Stevens, C., and Cox, J. D. Combination of a COX-2 inhibitor with radiotherapy or radiochemotherapy in the treatment of thoracic cancer. *Am.J.Clin.Oncol.*, 26: S85-S91, 2003.
33. Koki, A. T., Khan, N. K., Woerner, B. M., Seibert, K., Harmon, J. L., Dannenberg, A. J., Soslow, R. A., and Masferrer, J. L. Characterization of cyclooxygenase-2 (COX-2) during tumorigenesis in human epithelial cancers: evidence for potential clinical utility of COX-2 inhibitors in epithelial cancers. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, 66: 13-18, 2002.

34. Ashton, A. W., Yokota, R., John, G., Zhao, S., Suadicani, S. O., Spray, D. C., and Ware, J. A. Inhibition of endothelial cell migration, intercellular communication, and vascular tube formation by thromboxane A(2). *J.Biol.Chem.*, 274: 35562-35570, 1999.
35. Byun, J. H., Lee, M. A., Roh, S. Y., Shim, B. Y., Hong, S. H., Ko, Y. H., Ko, S. J., Woo, I. S., Kang, J. H., Hong, Y. S., Lee, K. S., Lee, A. W., Park, G. S., and Lee, K. Y. Association between cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in non-small cell lung cancer. *Jpn.J.Clin.Oncol.*, 36: 263-268, 2006.
36. Ermert, L., Dierkes, C., and Ermert, M. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase isoenzymes and downstream enzymes in human lung tumors. *Clin.Cancer Res.*, 9: 1604-1610, 2003.
37. Gately, S. and Li, W. W. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Semin.Oncol.*, 31: 2-11, 2004.
38. Leahy, K. M., Koki, A. T., and Masferrer, J. L. Role of cyclooxygenases in angiogenesis. *Curr.Med.Chem.*, 7: 1163-1170, 2000.
39. Sanchez-Alcazar, J. A., Bradbury, D. A., Pang, L., and Knox, A. J. Cyclooxygenase (COX) inhibitors induce apoptosis in non-small cell lung cancer through cyclooxygenase independent pathways. *Lung Cancer*, 40: 33-44, 2003.
40. Rioux, N. and Castonguay, A. Prevention of NNK-induced lung tumorigenesis in A/J mice by acetylsalicylic acid and NS-398. *Cancer Res.*, 58: 5354-5360, 1998.
41. Harris, R. E., Beebe-Donk, J., and Schuller, H. M. Chemoprevention of lung cancer by non-steroidal anti-inflammatory drugs among cigarette smokers. *Oncol.Rep.*, 9: 693-695, 2002.
42. Pereg, D. and Lishner, M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention and treatment of cancer. *J.Intern.Med.*, 258: 115-123, 2005.
43. Brown, J. R. and DuBois, R. N. COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. *J.Clin.Oncol.*, 23: 2840-2855, 2005.

44. Imperiale, T. F. Aspirin and the prevention of colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.*, 348: 879-880, 2003.
45. Thun, M. J. and Heath, C. W., Jr. Aspirin use and reduced risk of gastrointestinal tract cancers in the American Cancer Society prospective studies. *Prev.Med.*, 24: 116-118, 1995.
46. Rowinsky, E. K. Targeted induction of apoptosis in cancer management: the emerging role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor activating agents. *J.Clin.Oncol.*, 23: 9394-9407, 2005.
47. Tsujii, M. and DuBois, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 83: 493-501, 1995.
48. Hsu, A. L., Ching, T. T., Wang, D. S., Song, X., Rangnekar, V. M., and Chen, C. S. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J.Biol.Chem.*, 275: 11397-11403, 2000.
49. Arico, S., Pattingre, S., Bauvy, C., Gane, P., Barbat, A., Codogno, P., and Ogier-Denis, E. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J.Biol.Chem.*, 277: 27613-27621, 2002.
50. Lin, M. T., Lee, R. C., Yang, P. C., Ho, F. M., and Kuo, M. L. Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J.Biol.Chem.*, 276: 48997-49002, 2001.
51. Krysan, K., Dalwadi, H., Sharma, S., Pold, M., and Dubinett, S. Cyclooxygenase 2-dependent expression of survivin is critical for apoptosis resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 64: 6359-6362, 2004.

52. Sheng, H., Shao, J., Morrow, J. D., Beauchamp, R. D., and DuBois, R. N. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.*, 58: 362-366, 1998.
53. Hida, T., Kozaki, K., Muramatsu, H., Masuda, A., Shimizu, S., Mitsudomi, T., Sugiura, T., Ogawa, M., and Takahashi, T. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin.Cancer Res.*, 6: 2006-2011, 2000.
54. Elder, D. J., Halton, D. E., Hague, A., and Paraskeva, C. Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. *Clin.Cancer Res.*, 3: 1679-1683, 1997.
55. Cao, Y., Pearman, A. T., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., and Prescott, S. M. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97: 11280-11285, 2000.
56. Hida, T., Kozaki, K., Ito, H., Miyaishi, O., Tatematsu, Y., Suzuki, T., Matsuo, K., Sugiura, T., Ogawa, M., Takahashi, T., and Takahashi, T. Significant growth inhibition of human lung cancer cells both in vitro and in vivo by the combined use of a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, JTE-522, and conventional anticancer agents. *Clin.Cancer Res.*, 8: 2443-2447, 2002.
57. Baumann, M., Krause, M., Zips, D., Petersen, C., Dittmann, K., Dorr, W., and Rodemann, H. P. Molecular targeting in radiotherapy of lung cancer. *Lung Cancer*, 45 Suppl 2: S187-S197, 2004.
58. Altorki, N. K., Keresztes, R. S., Port, J. L., Libby, D. M., Korst, R. J., Flieder, D. B., Ferrara, C. A., Yankelevitz, D. F., Subbaramaiah, K., Pasmantier, M. W., and Dannenberg, A. J. Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.*, 21: 2645-2650, 2003.

59. Csiki, I., Morrow, J. D., Sandler, A., Shyr, Y., Oates, J., Williams, M. K., Dang, T., Carbone, D. P., and Johnson, D. H. Targeting cyclooxygenase-2 in recurrent non-small cell lung cancer: a phase II trial of celecoxib and docetaxel. *Clin.Cancer Res.*, 11: 6634-6640, 2005.
60. Edelman, M. J., Watson, D., Wang, X., Morrison, C., Kratzke, R. A., Jewell, S., Hodgson, L., Mauer, A. M., Gajra, A., Masters, G. A., Bedor, M., Vokes, E. E., and Green, M. J. Eicosanoid modulation in advanced lung cancer: cyclooxygenase-2 expression is a positive predictive factor for celecoxib + chemotherapy--Cancer and Leukemia Group B Trial 30203. *J.Clin.Oncol.*, 26: 848-855, 2008.
61. Gridelli, C., Gallo, C., Ceribelli, A., Gebbia, V., Gamucci, T., Ciardiello, F., Carozza, F., Favaretto, A., Daniele, B., Galetta, D., Barbera, S., Rosetti, F., Rossi, A., Maione, P., Cignetti, F., Testa, A., Di Maio, M., Morabito, A., and Perrone, F. Factorial phase III randomised trial of rofecoxib and prolonged constant infusion of gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the GEmcitabine-COxib in NSCLC (GECO) study. *Lancet Oncol.*, 8: 500-512, 2007.
62. Subbaramaiah, K. and Dannenberg, A. J. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol.Sci.*, 24: 96-102, 2003.
63. Masferrer, J. L., Leahy, K. M., Koki, A. T., Zweifel, B. S., Settle, S. L., Woerner, B. M., Edwards, D. A., Flickinger, A. G., Moore, R. J., and Seibert, K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.*, 60: 1306-1311, 2000.
64. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., and DuBois, R. N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93: 705-716, 1998.
65. Daniel, T. O., Liu, H., Morrow, J. D., Crews, B. C., and Marnett, L. J. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res.*, 59: 4574-4577, 1999.

66. Pold, M., Zhu, L. X., Sharma, S., Burdick, M. D., Lin, Y., Lee, P. P., Pold, A., Luo, J., Krysan, K., Dohadwala, M., Mao, J. T., Batra, R. K., Strieter, R. M., and Dubinett, S. M. Cyclooxygenase-2-dependent expression of angiogenic CXC chemokines ENA-78/CXC Ligand (CXCL) 5 and interleukin-8/CXCL8 in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 64: 1853-1860, 2004.
67. Liu, M., Yang, S. C., Sharma, S., Luo, J., Cui, X., Peebles, K. A., Huang, M., Sato, M., Ramirez, R. D., Shay, J. W., Minna, J. D., and Dubinett, S. M. EGFR Signaling is Required for TGF- β 1-mediated COX-2 Induction in Human Bronchial Epithelial Cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, 2007.
68. Inoue, H., Takamori, M., Shimoyama, Y., Ishibashi, H., Yamamoto, S., and Koshihara, Y. Regulation by PGE₂ of the production of interleukin-6, macrophage colony stimulating factor, and vascular endothelial growth factor in human synovial fibroblasts. *Br.J.Pharmacol.*, 136: 287-295, 2002.
69. Zha, S., Yegnasubramanian, V., Nelson, W. G., Isaacs, W. B., and De Marzo, A. M. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett.*, 215: 1-20, 2004.
70. Yu, Q. and Stamenkovic, I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev.*, 13: 35-48, 1999.
71. Bartolazzi, A., Peach, R., Aruffo, A., and Stamenkovic, I. Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J.Exp.Med.*, 180: 53-66, 1994.
72. Dohadwala, M., Luo, J., Zhu, L., Lin, Y., Dougherty, G. J., Sharma, S., Huang, M., Pold, M., Batra, R. K., and Dubinett, S. M. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion is mediated by CD44. *J.Biol.Chem.*, 276: 20809-20812, 2001.
73. Dohadwala, M., Batra, R. K., Luo, J., Lin, Y., Krysan, K., Pold, M., Sharma, S., and Dubinett, S. M. Autocrine/paracrine prostaglandin E₂ production by non-small cell

- lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion. *J.Biol.Chem.*, 277: 50828-50833, 2002.
74. Colombo, M. P., Vagliani, M., Spreafico, F., Parenza, M., Chiodoni, C., Melani, C., and Stoppacciaro, A. Amount of interleukin 12 available at the tumor site is critical for tumor regression. *Cancer Res.*, 56: 2531-2534, 1996.
 75. Riedl, K., Krysan, K., Pold, M., Dalwadi, H., Heuze-Vourc'h, N., Dohadwala, M., Liu, M., Cui, X., Figlin, R., Mao, J. T., Strieter, R., Sharma, S., and Dubinett, S. M. Multifaceted roles of cyclooxygenase-2 in lung cancer. *Drug Resist.Updat.*, 7: 169-184, 2004.
 76. Huang, M., Stolina, M., Sharma, S., Mao, J. T., Zhu, L., Miller, P. W., Wollman, J., Herschman, H., and Dubinett, S. M. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res.*, 58: 1208-1216, 1998.
 77. Stolina, M., Sharma, S., Lin, Y., Dohadwala, M., Gardner, B., Luo, J., Zhu, L., Kronenberg, M., Miller, P. W., Portanova, J., Lee, J. C., and Dubinett, S. M. Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J.Immunol.*, 164: 361-370, 2000.
 78. Sombroek, C. C., Stam, A. G., Masterson, A. J., Lougheed, S. M., Schakel, M. J., Meijer, C. J., Pinedo, H. M., van den Eertwegh, A. J., Scheper, R. J., and de Gruijl, T. D. Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *J.Immunol.*, 168: 4333-4343, 2002.
 79. Harizi, H., Juzan, M., Pitard, V., Moreau, J. F., and Gualde, N. Cyclooxygenase-2-issued prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J.Immunol.*, 168: 2255-2263, 2002.
 80. Dziadziuszko, R., Witta, S. E., Cappuzzo, F., Park, S., Tanaka, K., Danenberg, P. V., Baron, A. E., Crino, L., Franklin, W. A., Bunn, P. A., Jr., Varela-Garcia, M.,

- Danenberg, K. D., and Hirsch, F. R. Epidermal growth factor receptor messenger RNA expression, gene dosage, and gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer. *Clin.Cancer Res.*, 12: 3078-3084, 2006.
81. Simon, G., Sharma, A., Li, X., Hazelton, T., Walsh, F., Williams, C., Chiappori, A., Haura, E., Tanvetyanon, T., Antonia, S., Cantor, A., and Bepler, G. Feasibility and efficacy of molecular analysis-directed individualized therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.*, 25: 2741-2746, 2007.
 82. Giltane, J. M. and Rimm, D. L. Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology. *Nat.Clin.Pract.Oncol.*, 1: 104-111, 2004.
 83. Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M. J., Sauter, G., and Kallioniemi, O. P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat.Med.*, 4: 844-847, 1998.
 84. Camp, R. L., Charette, L. A., and Rimm, D. L. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*, 80: 1943-1949, 2000.
 85. Mascaux, C., Martin, B., Paesmans, M., Berghmans, T., Dusart, M., Haller, A., Lothaire, P., Meert, A. P., Lafitte, J. J., and Sculier, J. P. Has Cox-2 a prognostic role in non-small-cell lung cancer? A systematic review of the literature with meta-analysis of the survival results. *Br.J.Cancer*, 95: 139-145, 2006.
 86. Castela, J. E., Bart, R. D., III, DiPerna, C. A., Sievers, E. M., and Bremner, R. M. Lung cancer and cyclooxygenase-2. *Ann.Thorac.Surg.*, 76: 1327-1335, 2003.
 87. Han, S. and Roman, J. COX-2 inhibitors suppress integrin $\alpha 5$ expression in human lung carcinoma cells through activation of Erk: involvement of Sp1 and AP-1 sites. *Int.J.Cancer*, 116: 536-546, 2005.
 88. Hida, T., Leyton, J., Makheja, A. N., Ben Av, P., Hla, T., Martinez, A., Mulshine, J., Malkani, S., Chung, P., and Moody, T. W. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase activity and proliferation are inhibited by non-steroidal antiinflammatory drugs. *Anticancer Res.*, 18: 775-782, 1998.

89. Kang, H. K., Lee, E., Pyo, H., and Lim, S. J. Cyclooxygenase-independent down-regulation of multidrug resistance-associated protein-1 expression by celecoxib in human lung cancer cells. *Mol.Cancer Ther.*, 4: 1358-1363, 2005.
90. Taketo, M. M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J.Natl.Cancer Inst.*, 90: 1529-1536, 1998.
91. Taketo, M. M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *J.Natl.Cancer Inst.*, 90: 1609-1620, 1998.
92. Altorki, N. K., Port, J. L., Zhang, F., Golijanin, D., Thaler, H. T., Duffield-Lillico, A. J., Subbaramaiah, K., and Dannenberg, A. J. Chemotherapy induces the expression of cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer. *Clin.Cancer Res.*, 11: 4191-4197, 2005.

9. Załączniki