

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Wydział Farmaceutyczny

Damian Wodziński

**Ocena ekspresji wybranych czynników szlaku TGF- β
w raku jelita grubego**

**Assessment of the expression of selected factors of the TGF- β pathway
in colorectal cancer**

Rozprawa doktorska wykonana
w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki
Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej
Międzywydziałowa Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Kierownik Katedry oraz Promotor rozprawy:

prof. dr hab. n. farm. Ewa Balcerczak

Kierownik Zakładu:

prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski

Łódź 2020

Składam serdeczne podziękowania
Pani prof. dr hab. n. farm. Ewie Balcerczak
za pomoc oraz udzielanie cennych wskazówek
w trakcie wykonywania badań oraz pisanie niniejszej rozprawy.

Pracę dedykuję moim Najbliższym

Spis treści

Wykaz skrótów	6
CZĘŚĆ TEORETYCZNA	10
1. Wstęp.....	11
2. Rak jelita grubego.....	12
2.1. Epidemiologia	19
2.2. Etiologia	20
2.3. Patogeneza.....	22
2.4. Objawy kliniczne	32
2.5. Diagnostyka.....	33
2.6. Leczenie polipów jelita grubego	44
2.7. Leczenie raka okrężnicy	45
2.8. Leczenie raka odbytnicy	51
2.9. Profilaktyka	57
3. Szlak sygnałowy TGF- β	60
4. Gen <i>RUNX3</i> i jego produkt białkowy	66
5. Gen <i>TGFB1</i> i jego produkt białkowy	67
6. Gen <i>ACVR2A</i> i jego produkt białkowy	69
CZĘŚĆ PRAKTYCZNA.....	71
7. Cel pracy.....	72
8. Materiał.....	73
9. Metodyka	74
9.1 Izolacja DNA	75
9.2 Izolacja RNA.....	76
9.3 Reakcja RT-PCR.....	78
9.4 Łańcuchowa reakcja polimerazy PCR	79
9.5 Elektroforeza w żelu agarozowym.....	84

9.6	Real-time PCR	86
9.7	Przygotowanie DNA do oceny metylacji.....	98
9.8	Reakcja MS – PCR.....	100
10.	Analiza statystyczna	103
11.	Wyniki	104
11.1.	Ocena względnych poziomów ekspresji genów <i>ACVR2A</i> i <i>TGFB1</i> w powiązaniu z parametrami demograficzno – patologicznymi pacjentów	106
11.2.	Ocena metylacji w obrębie regionu promotorowego genu <i>TGFB1</i> w powiązaniu z parametrami demograficzno – patologicznymi pacjentów	144
12.	Podsumowanie wyników	169
13.	Dyskusja.....	171
14.	Wnioski.....	186
15.	Streszczenie	188
16.	Summary.....	190
17.	Piśmiennictwo.....	192

Wykaz skrótów:

ACF	ang. <i>aberrant crypt foci</i> – zmienione patologicznie krypty jelitowe
AMH	ang. <i>anti-Müllerian hormone</i> – hormon antymüllerowski
AP-1	ang. <i>activator protein 1</i> – białko aktywujące 1
APC	ang. <i>adenomatous polyposis coli</i> – gen kodujący białko supresorowe APC
BAMBI	ang. <i>bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor</i> – związany z błoną inhibitor sygnalizacji BMP i aktywin
BMPR1A	ang. <i>bone morphogenetic protein receptor type 1A</i> – gen kodujący białko BMPR1A
BMPs	ang. <i>bone morphogenic proteins</i> – białka morfogenetyczne kości
cDNA	ang. <i>complementary DNA</i> – komplementarne DNA
CIMP	ang. <i>CpG island methylator phenotype</i> – fenotyp metylatora wysp CpG
CIN	ang. <i>chromosomal instability</i> – niestabilność chromosomowa
CK1α/ϵ	ang. <i>casein kinase 1α/ϵ</i> – kinaza kazeinowa 1 α/ϵ
CMSs	ang. <i>consensus molecular subtypes</i> – powszechnie przyjęte podtypy molekularne raka jelita grubego
C-MYC	ang. <i>MYC proto-oncogene</i> – gen kodujący białko C-MYC
Co-SMAD	ang. <i>co-operating SMAD</i> – pośredniczące białko SMAD
Ct	ang. <i>threshold cycle</i> – cykl progowy real-time PCR
CTGF	ang. <i>connective tissue growth factor</i> – czynnik wzrostu tkanki łącznej
DCC	ang. <i>deleted in colorectal carcinoma</i> – gen kodujący białko DCC
DNDM	ang. <i>DNA demethylating complex</i> – kompleks białek demetylujących DNA
ESGE	ang. <i>European Society of Gastrointestinal Endoscopy</i> – Europejskie Towarzystwo Endoskopii Przewodu Pokarmowego
EUS	ang. <i>endoscopic ultrasound</i> – ultrasonografia endoskopowa
FGF2	ang. <i>basic fibroblast growth factor</i> – podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów
FKBP12	ang. <i>FK506-binding protein</i> – białko wiążące FK506
FOBT	ang. <i>fecal occult blood test</i> – test na obecność krwi utajonej w kale
GDFs	ang. <i>growth and differentiation factors</i> – czynniki różnicowania wzrostu
GSK-3β	ang. <i>glycogen synthase kinase-3β</i> – izoforma β kinazy syntazy

	glikogenu 3
Gy	grej – jednostka dawki pochłoniętego promieniowania (ilość energii promieniowania pochłoniętej przez kilogram materii)
HATs	ang. <i>histon acetyl transferase</i> – acetylotransferazy histonowe
HDACs	ang. <i>histon deacetylases</i> – deacetylazy histonowe
HNPCC	ang. <i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i> – dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością (zespół Lyncha)
H-RAS	ang. <i>HRas proto-oncogene, GTPase</i> – gen kodujący białko H-Ras o aktywności GTPazy
I-SMADs	ang. <i>inhibitory SMADs</i> – inhibitorowe białka SMAD
K-RAS	ang. <i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i> – gen kodujący białko K-Ras o aktywności GTPazy
LAPs	ang. <i>latency associated peptides</i> – białka związane z latencją
LEF	ang. <i>lymphoid enhancer factor</i> – czynnik wzmacniający leukocyty
LLC	ang. <i>large latency complex</i> – duży kompleks latentny
LTBP	ang. <i>latent TGF-β binding protein</i> – latentne białko wiążące TGF- β
MAPKs	ang. <i>mitogen-activated protein kinases</i> – kinazy aktywowane mitogenami
MET	ang. <i>mesenchymal-epithelial transition</i> – przejście mezenchymalno-nabłonkowe
MLH1	ang. <i>MutL homolog 1</i> – gen kodujący białko MLH1
MMR	ang. <i>mismatch repair</i> – mechanizm naprawy niesparowanych zasad
MUTYH	ang. <i>mutY DNA glycosylase</i> – gen kodujący białko MUTYH
MRI	ang. <i>magnetic resonance imaging</i> – obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego
MSH2	ang. <i>MutS homolog 2</i> – gen kodujący białko MSH2
MSH6	ang. <i>MutS homolog 6</i> – gen kodujący białko MSH6
MSI	ang. <i>microsatellite instability</i> – niestabilność mikrosatelitarna
MSS	ang. <i>microsatellite stable</i> – stabilność mikrosatelitarna
NBI	ang. <i>narrow band imaging</i> – obrazowanie w wąskim paśmie światła
NLPZ	niesteroidowe leki przeciwzapalne
Nodal	ang. <i>nodal growth differentiation factor</i> – białko syntetyzowane w komórkach węzła zarodkowego
N-RAS	ang. <i>NRAS proto-oncogene, GTPase</i> – gen kodujący białko N-Ras o aktywności GTPazy

PET	ang. <i>positron emission tomography</i> – pozytonowa tomografia emisyjna
PGE2	ang. <i>prostaglandin E2</i> – prostaglandyna E2
PI3Ks	ang. <i>phosphoinositide 3-kinases</i> – kinazy 3-fosfatydylinozytolu
PMS1	ang. <i>PMS1 homolog 1</i> – gen kodujący białko PMS1
PMS2	ang. <i>PMS1 homolog 2</i> – gen kodujący białko PMS2
pz	par zasad
ROS	ang. <i>reactive oxygen species</i> – reaktywne formy tlenu
RPM	ang. <i>revolutions per minute</i> – ilość obrotów na minutę
R-SMADs	ang. <i>receptor-regulated SMADs</i> – aktywowane przez receptor białka SMAD
SBE	ang. <i>SMAD-binding element</i> – sekwencja rozpoznawana przez białka SMAD
SIK	ang. <i>salt-inducible kinase</i> – kinaza aktywowana solą
SLC	ang. <i>small latency complex</i> – mały kompleks latentny
SMAD4	ang. <i>SMAD family member 4</i> – gen kodujący białko SMAD4
STK11/LKB1	ang. <i>serine/threonine kinase 11</i> – gen kodujący białko STK11/LKB1
STR	ang. <i>short tandem repeats</i> – krótkie powtórzenia tandemowe
STRAP	ang. <i>serine-threonine kinase receptor-associated protein</i> – białko związane z receptorem o aktywności kinazy serynowo-treoninowej
TCF	ang. <i>T-cell factor</i> – czynnik specyficzny dla komórek T
TGF-β	ang. <i>transforming growth factor β</i> – transformujący czynnik wzrostu β
TIMP	ang. <i>tissue inhibitor of metalloproteases</i> – tkankowy inhibitor metaloproteinaz
T_m	ang. <i>melting temperature</i> – temperatura topnienia
TME	ang. <i>tumor microenvironment</i> – mikrośrodowisko nowotworu
TP53	ang. <i>tumor protein p53</i> – gen kodujący białko supresorowe p53
UCH37	ang. <i>ubiquitin C-terminal hydrolase</i> – C-końcowa hydrolaza ubikwityny
USP4	ang. <i>ubiquitin-specific protease 4</i> – proteaza 4 specyficzna dla ubikwityny
USP11	ang. <i>ubiquitin-specific protease 11</i> – proteaza 11 specyficzna dla ubikwityny
USP15	ang. <i>ubiquitin-specific protease 15</i> – proteaza 15 specyficzna dla ubikwityny
VD	ang. <i>virtual colonoscopy</i> – kolonoskopia wirtualna

VEGF	ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
WHO	ang. <i>World Health Organization</i> – Światowa Organizacja Zdrowia

CZEŚĆ TEORETYCZNA

1. Wstęp

Wraz z postępem cywilizacyjnym rak jelita grubego stał się poważnym problem zdrowotnym, szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych. Jak podaje Światowa Organizacja Zdrowia w samym 2018 roku liczba nowo rozpoznanych raków jelita grubego na świecie przekroczyła 1 800 000 przypadków. Według ogólnoswiatowych statystyk rak jelita grubego jest drugim najczęstszym nowotworem kobiet i trzecim najczęstszym nowotworem mężczyzn. Ogromna skala problemu skłania wielu badaczy do poszukiwania podstaw kancerogenezy.

Wśród czynników sprzyjających rozwojowi raka jelita grubego wymieniane są zarówno czynniki modyfikowalne, takie jak niska aktywność fizyczna, otyłość, palenie papierosów, nadmierne spożywanie alkoholu czy nieprawidłowe nawyki żywieniowe, jak i czynniki niemodyfikowalne, związane z genetycznym podłożem nowotworzenia. Wśród nich można wymienić mutacje w genach supresorowych, protoonkogenach i genach zaangażowanych w szlaki naprawy DNA.

Szczególnie istotny jest szlak sygnałowy TGF- β (ang. *transforming growth factor β*), który w zależności od stadium zaawansowania choroby, opisywany jest w piśmiennictwie, jako supresor lub promotor nowotworzenia. TGF- β jako supresor indukuje apoptozę, hamuje cykl komórkowy, jak również ekspresję czynników wzrostu, cytokin i chemokin. TGF- β , jako promotor determinuje przejście mezenchymalno – nabłonkowe (MET ang. *mesenchymal – epithelial transition*), zwiększa aktywność proteaz, zmniejsza odpowiedź immunologiczną, sprzyja angiogenezie, moduluje strukturę cytoszkieletu i macierz zewnątrzkomórkową.

2. Rak jelita grubego

Jelito grube jest końcowym odcinkiem przewodu pokarmowego mierzącym około 100 – 125 centymetrów. Do najistotniejszych funkcji jelita grubego zalicza się wchłanianie wody i elektrolitów oraz formowanie, a następnie usuwanie stolca. Głównymi jonami resorbowanymi zwrotnie w jelicie grubym są jony Na^+ i Cl^- , a wydalany K^+ i HCO_3^- . Wraz z wodą absorbowane zwrotnie są również sole kwasów żółciowych, glukoza, mocznik oraz leki. Wchłaniane są dodatkowo witaminy, które nie uległy absorpcji w jelicie cienkim, takie jak biotyna, kobalamina, witamina K czy kwas pantotenowy. Jelito grube uczestniczy także w metabolizmie amoniaku, który wchłaniany jest w okrężnicy i żyłą wrotną transportowany do wątroby, gdzie następuje jego końcowa detoksykacja do mocznika i glutaminy [Szczeklik, 2017; Szmidt, 2010].

Jelito grube zostało podzielone pod względem anatomicznym na trzy odcinki:

- a) kątnica (łac. *cecum*). Pierwszy, zlokalizowany nad prawym talerzem biodrowym odcinek jelita grubego, oddzielony od jelita krętego zastawką krętniczo – kątniczą (łac. *valva ileocecalis*). W dolnej części kątnicy mieści się wyrostek robaczkowy bogaty w grudki limfatyczne;
- b) okrężnica: wstępująca (łac. *colon ascendens*), poprzeczna (łac. *colon transversum*), zstępująca (łac. *colon descendens*) oraz esowata (łac. *colon sigmoideum*);
- c) odbytnica (łac. *rectum*) i kanał odbytu (łac. *canalis analis*).

Krew do kątnicy, okrężnicy wstępującej i poprzecznej doprowadzana jest poprzez tętnicę krezkową górną. Z kolei tętnica krezkowa dolna odpowiada za ukrwienie dalszej części jelita [Szczeklik, 2017; Szmidt, 2010].

W obrębie ściany jelita grubego można wyodrębnić cztery różne warstwy: błonę śluzową, tkankę podśluzową, błonę mięśniową oraz surowiczą. W obrazie mikroskopowym błony śluzowej widoczne są liczne cewy gruczołowe (in. krypty) zbudowane z komórek nabłonkowych – kolonocytów, które otoczone są tkanką łączną tworzącą blaszkę właściwą. Błonę śluzową wyściełają komórki kubkowe produkujące śluz, którego zadaniem jest protekcja przed drażniącym działaniem substancji znajdujących się w kale oraz pomoc w tworzeniu mas kałowych i ich sprawnym pasażu

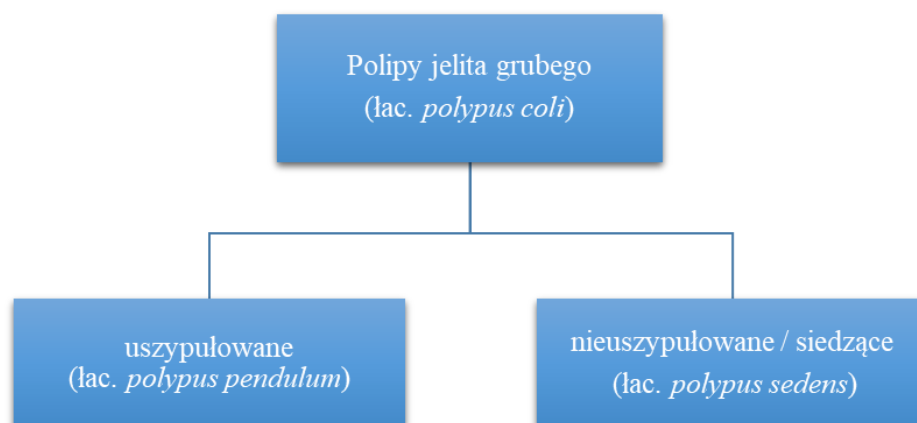
jelitowym [Szczeklik, 2017; Wronkowski, 2008].

NIEZŁOŚLIWE NOWOTWORY JELITA GRUBEGO

Uwypuklenia błony śluzowej zwrócone w kierunku światła jelita określane są terminem polipów (łac. *polypus coli*). Polipy zalicza się do niezłośliwych nowotworów jelita grubego. W obrębie ich budowy można wyszczególnić cztery części: podstawę (szeroką w polipach nieuszypułowanych), szypułkę, szyję i głowę.

W piśmiennictwie funkcjonują różne klasyfikacje różnicujące polipy pod względem ich morfologii (Rycina 1) czy obrazu mikroskopowego (Rycina 4) [Szczeklik, 2017; Szmidt, 2010].

Rycina 1. Podział polipów za względu na budowę morfologiczną [Szmidt, 2010].

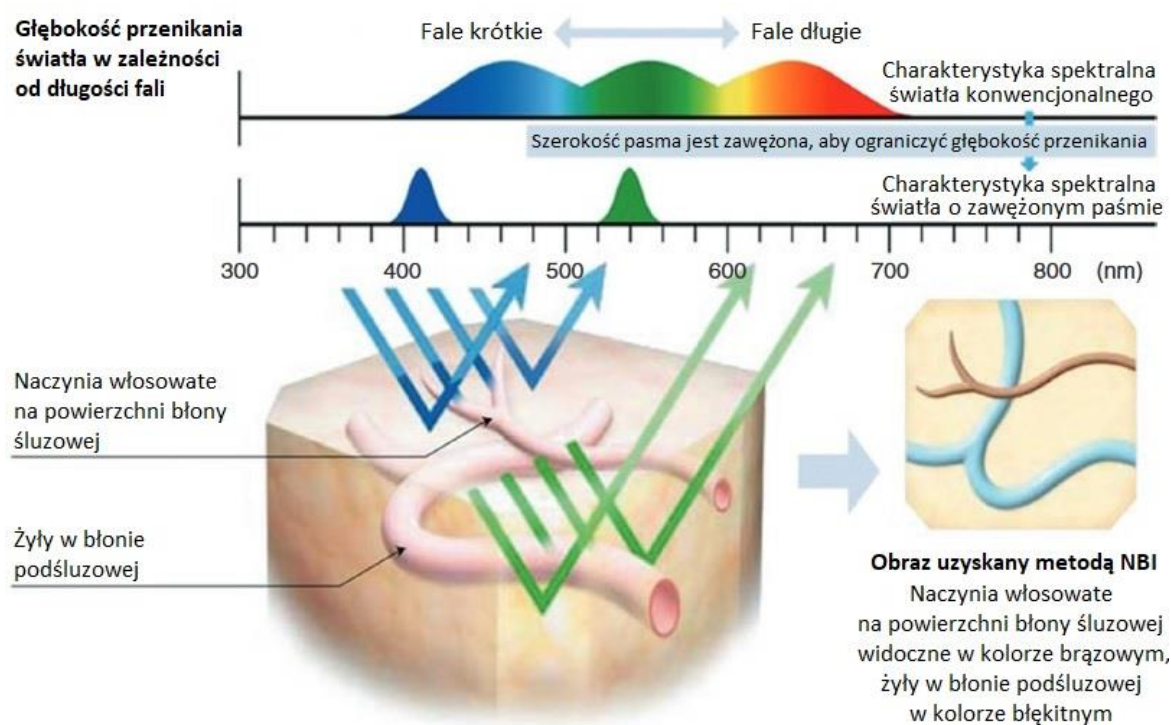


Według różnych źródeł, 96% przypadków raków jelita grubego rozwija się na tle gruczolaka uszypułowanego, natomiast 3% na tle rzadziej występującego gruczolaka nieuszypułowanego, który wiąże się z wyższym ryzykiem transformacji złośliwej [Szmidt, 2010].

Poważnym problemem diagnostycznym są łatwe do przeoczenia w trakcie większości badań przesiewowych gruczolaki płaskie, zwane inaczej gruczolakami

dywanowymi (ang. *flat adenoma*), które w odróżnieniu od pozostałych polipów nie tworzą charakterystycznych uwypukleń do światła jelita. Dodatkowo wyróżnia je większe ryzyko transformacji w nowotwór złośliwy. W rozpoznaniu gruczolaków płaskich istotne jest duże doświadczenie i staranność wykonywanego przez lekarza badania endoskopowego. W diagnostyce tych gruczolaków szczególnie przydatne może być barwienie błony śluzowej jelita grubego lub przeprowadzanie badań obrazowych z wykorzystaniem różnych długości fal światła, jak np. badanie NBI (ang. *narrow band imaging*), które pozwalają na lepsze rozróżnianie struktur tkankowych [Szmidt, 2010; Srivastava, 2019].

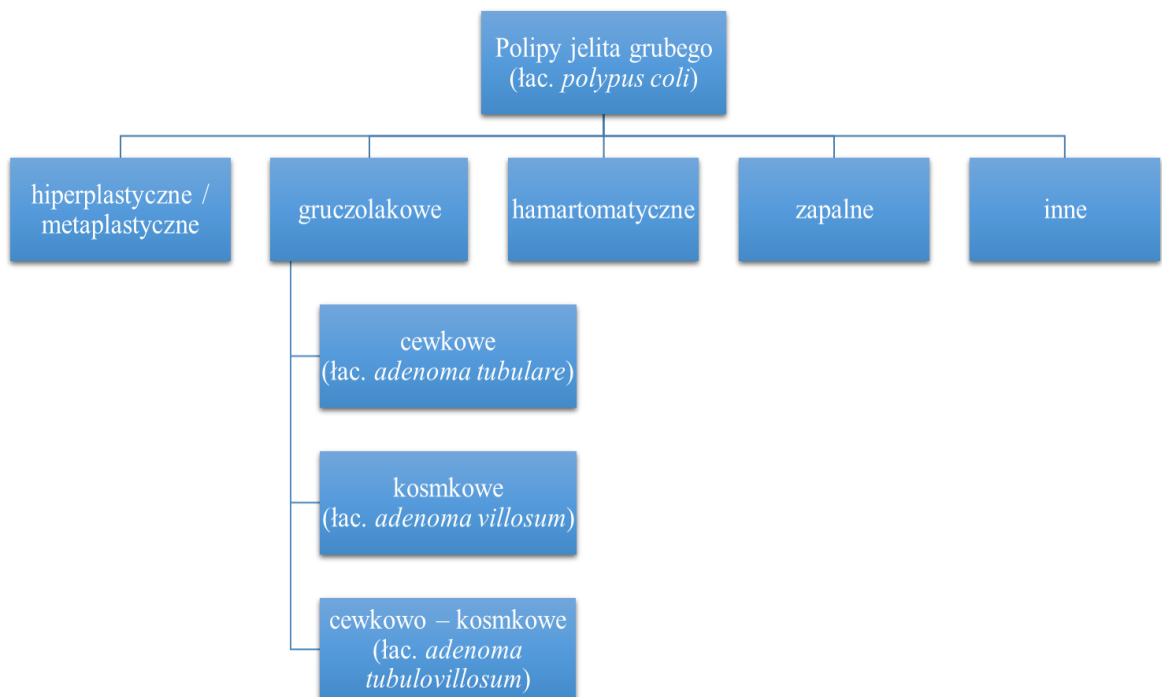
Rycina 2: Zasada metody NBI (ang. *narrow band imaging*) [Srivastava, 2019].



Rycina 3: Porównanie obrazu błony śluzowej jelita uzyskanego w tradycyjnym badaniu endoskopowym (lewa strona) z obrazem uzyskanym w badaniu NBI (prawa strona) [<https://linkd.pl/zuaa>].



Rycina 4. Podział polipów ze względu na budowę histologiczną [Szmidt, 2010].



Polipy hiperplastyczne nie są wynikiem zmian genetycznych, a efektem przyspieszonego dojrzewania komórek nabłonkowych w kryptach jelitowych i ich spowolnionej migracji do zewnętrznej części błony śluzowej. Mogą być spowodowane zaburzeniami metabolicznymi, niedokrwieniem bądź toczącym się procesem zapalnym w komórkach nabłonka. Te nierozległe polipy o wielkości ok. 5 mm powstają w wyniku zgrubienia błony śluzowej, której komórki nie wykazują cech atypii. Mimo to mogą stać się podłożem rozwoju gruczolaków i raka jelita grubego [Szmidt, 2010].

Polipy gruczolakowe, mimo że zaliczane są do niezłośliwych polipów nowotworowych mogą wiązać się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju zaawansowanej neoplazji. Ryzyko transformacji do raka jest tym wyższe, im większa jest średnica polipa. Oszacowano, że polipy o średnicy mniejszej niż 1 cm wiążą się z 0,5-1,0% ryzykiem rozwoju raka a średnica powyżej 2 cm zwiększa prawdopodobieństwo do 10-50%. Około 75% stwierdzanych gruczolaków to twarde, uszypułowane gruczolaki cewkowe (łac. *adenoma tubulare*) o gładkiej powierzchni. Z kolei 10% stanowią duże, miękkie, wydzielające śluz i posiadające liczne wypustki gruczolaki kosmkowe (łac. *adenoma villosum*). Pozostałe, określane mianem gruczolaków cewkowo – kosmkowych (łac. *adenoma tubulovillosum*), wykazują cechy obu wyżej opisanych typów i stanowią około 15% wszystkich gruczolaków [Szmidt, 2010].

Polipy zbudowane z prawidłowych komórek, ale występujących w zmienionych proporcjach lub charakteryzujących się nieuporządkowanym rozmieszczeniem przestrzennym, określa się terminem polipów hamartomatycznych. Wariantem polipa hamartomatycznego jest polip Peutza i Jeghersa, charakterystyczny dla chorych z zespołem o tej samej nazwie [Szmidt, 2010].

Kolejną przedinwazyjną postacią nowotworu jelita grubego jest rak powierzchniowy (ang. *superficial carcinoma*), w którym naciek atypowych komórek ograniczony jest do blaszki właściwej błony śluzowej i nie tworzy przerzutów (Tis, łac. *carcinoma in situ*). Jest to tak zwany wczesny rak jelita grubego i zgodnie z kliniczną klasyfikacją TNM opisuje się go jako T1NxMx, co jest równoznaczne z inwazyjnym rakiem ograniczonym do warstwy podsłuzowej. O polipie złośliwym zaczyna się mówić w momencie, gdy komórki rakowe penetrują blaszkę mięśniową błony śluzowej i zaczynają naciekać warstwę podsłuzową [Szmidt, 2010].

W obrębie 40% gruczolaków kosmkowych, 20% gruczolaków cewkowo-kosmkowych oraz 5% gruczolaków cewkowych rozpoznaje się ogniska raka. Stopień zaawansowania wczesnego raka ocenia się w oparciu o klasyfikację Hagitta lub o częściej stosowaną klasyfikację japońską [Szmidt, 2010].

Tabela 1: Klasyfikacje oceny stopnia zaawansowania wczesnego raka jelita grubego [Szmidt, 2010].

Klasyfikacja Hagitta	
Stopień	Głębokość naciekania komórek rakowych
1	głowa polipa uszypułowanego
2	szyja polipa uszypułowanego
3	szypuła polipa uszypułowanego
4	podstawa polipa uszypułowanego lub dowolna część polipa nieuszypułowanego

Klasyfikacja japońska	
Stopień	Głębokość naciekania komórek rakowych
sm1	1/3 górnej części warstwy podśluzowej
sm2	1/3 środkowej części warstwy podśluzowej
sm3	1/3 dolnej części warstwy podśluzowej

Ryzyko tworzenia przerzutów jest niewielkie w przypadku raków w polipie uszypułowanym o stopniach 1, 2 i 3 klasyfikacji Hagitta oraz stopniach sm1 i sm2 klasyfikacji japońskiej, przy jednoczesnym braku innych niekorzystnych czynników rokowniczych. Zalicza się do nich: dużą głębokość nacieku komórek nowotworowych, niski i średni stopień ich zróżnicowania oraz zdolność do naciekania naczyń krwionośnych i limfatycznych. Za wystarczający sposób leczenia raków w polipie uznaje się endoskopową polipektomię.

Polipy w czwartym stopniu klasyfikacji Hagitta oraz sm3 klasyfikacji japońskiej wiążą się z 10% ryzykiem tworzenia przerzutów, dlatego najlepszym sposobem postępowania w przypadku tych zmian jest resekcja fragmentu jelita [Szmidt, 2010].

NOWOTWORY ZŁOŚLIWE JELITA GRUBEGO

Polipy zbudowane z nabłonka błony śluzowej lub głębszych warstw ściany jelita, wykazujące dodatkowo cechy dysplazji, określane są mianem polipów nowotworowych. Najczęstszymi polipami nowotworowymi u ludzi są gruczolaki zbudowane z komórek nabłonka gruczołowego o cechach dysplazji. Moment, w którym komórki dysplastyczne zaczynają naciekać tkankę podśluzową uznaje się za początek rozwoju raka inwazyjnego – gruczolakoraka (łac. *adenocarcinoma*). Przyjmuje się, że od etapu polipa do powstania przemiany złośliwej może minąć od 7 do 12 lat [Szczeklik, 2017; Szmidt, 2010].

Ryzyko transformacji w gruczolakoraka wzrasta wraz ze średnicą polipa. W przypadku polipów o średnicy mniejszej niż 1 cm szansa na powstanie raka inwazyjnego jest niska i wynosi 0,5 – 1%. Prawdopodobieństwo to wzrasta do 10 – 50% w przypadku polipów o średnicy większej niż 2 cm. Ryzyko transformacji złośliwej jest wyższe w przypadku częściej spotykanych polipów siedzących, niż polipów uszypułowanych a gruczolaki kosmkowe (łac. *adenoma villosum*) wiążą się z większym zagrożeniem transformacji nowotworowej, niż gruczolaki cewkowe (łac. *adenoma tubulare*) [Szczeklik, 2017; Szmidt, 2010].

Około 85% przypadków raka jelita grubego to gruczolakoraki, które w 90% wywodzą się z gruczolaków. Jedna piąta nowotworów jelita grubego pod względem stopnia złośliwości komórkowej jest słabo zróżnicowana lub niezróżnicowana, co wiąże się z gorszym rokowaniem dla pacjenta. Od 10 do 20% gruczolakoraków posiada zdolność wydzielania dużych ilości mucyny, która może być gromadzona wewnątrzkomórkowo (rak sygnetowatokomórkowy, łac. *adenocarcinoma mucocellulare*) lub usuwana na zewnątrz komórki (rak śluzotwórczy, łac. *adenocarcinoma mucinosum*) [Szczeklik, 2017; Domagała, 2006; Kruś, 2007].

2.1. Epidemiologia

Według danych WHO (ang. *World Health Organization*) w 2018 roku rak jelita grubego był trzecim najczęściej diagnozowanym, a przy tym drugim o najwyższej śmiertelności nowotworem na świecie. Szczególnie niepokojąco wygląda wzrost częstości występowania raka jelita grubego w krajach rozwiniętych, do których zaliczamy m.in.: USA, Koreę Południową, Japonię, Australię, Nową Zelandię i większość krajów europejskich. Nie zaobserwowano tej tendencji w krajach rozwijających się, co przypisywane jest odmiennym nawykom żywieniowym i innym uwarunkowaniom środowiskowym [Rawla, 2019]. Zaobserwowano również zwiększoną predyspozycję do rozwoju raka jelita grubego u Żydów aszkenazyjskich i Afroamerykanów [Wronkowski, 2008].

W Polsce rak jelita grubego jest drugą najczęstszą przyczyną zgonów na nowotwory złośliwe u mężczyzn i trzecią u kobiet. W 2018 roku zmarło z powodu tej jednostki chorobowej przeszło 14,0 tysięcy osób, a prawdopodobieństwo zachorowania na raka jelita grubego w ciągu całego życia dla populacji ogólnej oscyluje w granicach 5-6% [Szmidt, 2010].

Niepokojący jest fakt, że z roku na rok zapadalność i umieralność na raka jelita grubego niezmiennie rośnie. Według danych dostępnych w bazie GLOBOCAN w 2018 roku zachorowało w naszym kraju 24,5 tysiąca osób, co stanowiło 13,2% przypadków wszystkich nowotworów. Niezależnie od płci stwierdza się częstsze występowanie raków zlokalizowanych w okrężnicy niż odbytnicy. Zaobserwowano również, że prawdopodobieństwo zachorowania na nowotwór jelita grubego wzrasta wraz z wiekiem. Zwiększa się w czwartej dekadzie życia, a szczyt zachorowalności przypada po 80. roku życia [Szczeklik, 2017; Solnica, 2014; Szmidt, 2010].

2.2. Etiologia

Od 65% do 85% wszystkich przypadków raka jelita grubego stanowią raki sporadyczne, 10-30% przypadków to raki dziedziczne, 1-5% raki powstałe na tle zespołu Lyncha, a około 0,5% raki o etiologii rodzinnej polipowatości gruczolakowej (FAP, ang. *familial adenomatous polyposis*).

Na rozwój sporadycznych raków jelita grubego wpływa wiele elementów, przy czym największą wagę przypisuje się czynnikom epidemiologicznym, środowiskowym, genetycznym i mieszanym [Szmidt, 2010].

Do czynników epidemiologicznych zaliczamy m.in. wiek pacjenta (wzrost częstości zachorowań z wiekiem), zbyt dużą masę ciała, niewielką aktywność fizyczną, pochodzenie, wykonywany zawód czy uwarunkowania rodzinne [Szmidt, 2010].

Uznany czynnikiem środowiskowym jest niewłaściwy sposób odżywiania. Szczególnie szkodliwa wydaje się być dieta oparta o czerwone mięso, bogata w nasycone kwasy tłuszczowe, a uboga w owoce i warzywa. Niekorzystnie działa deficyt błonnika i pierwiastków, takich jak wapń czy selen. Z kolei azotany, służące do konserwacji produktów spożywczych, w wyniku wewnątrzsobniczych przemian metabolicznych, stają się źródłem szkodliwych nitrozoamin. Również nieprawidłowa obróbka termiczna może generować powstawanie wielu związków rakotwórczych. W wyniku pieczenia bądź wędzenia produktów spożywczych, podobnie jak podczas palenia tytoniu, powstają węglowodory aromatyczne, w tym przede wszystkim silnie rakotwórcze benzopireny. Wyższe ryzyko zachorowania niesie za sobą otyłość i nadużywanie alkoholu, które dwu- a nawet trzykrotnie zwiększają prawdopodobieństwo rozwoju raka jelita grubego. Nieodpowiednia dieta negatywnie działa również na mikrobiotę jelitową i stymuluje syntezę prekursorów kancerogenów, co w połączeniu z wydłużonym pasażem jelitowym predysponuje do inicjowania zmian nowotworowych. Działaniem wyżej wymienionych czynników zewnątrzpochodnych tłumaczy się różnice w częstości rozpoznawania raka jelita grubego w poszczególnych rejonach świata [Szczeklik, 2017; Wronkowski, 2008; Yamada, 2006; Partyka, 2010]. O ich istotnej roli w patogenezie może świadczyć obserwowany wzrost częstości występowania raka jelita grubego u obywateli krajów o niskiej zachorowalności po emigracji do krajów o wyższej zapadalności, co tłumaczy się zmianą trybu życia i nawyków żywieniowych [Yamada, 2006].

W przebiegu kilku chorób uwarunkowanych genetycznie istnieje zwiększone ryzyko transformacji złośliwej, jak ma to miejsce w zespole Peutza i Jeghersa oraz polipowatości młodzieńczej. Przyczynami tych zespołów są mutacje w genach *SMAD4* (ang. *SMAD family member 4*), *BMPR1A* (ang. *bone morphogenetic protein receptor type 1A*) oraz *STK11/LKB1* (ang. *serine/threonine kinase 11*) [Szczeklik, 2017]. Zwiększone ryzyko rozwoju raka jelita grubego obserwowane jest także u osób, u których odnotowano wśród krewnych I^o jego przypadki – niezależnie od rozpoznania któregoś z wyżej wymienionych zespołów o podłożu genetycznym [Szmidt, 2010].

Do mieszanych czynników etiologicznych zalicza się między innymi, zwiększającą 500-krotnie ryzyko raka jelita grubego, ureterosigmoidostomię wykonywaną w następstwie chirurgicznej resekcji raka pęcherza moczowego. Zwiększone zagrożenie opisywane jest również u pacjentów po przeprowadzonej cholecystektomii oraz po wielokrotnej ekspozycji narządów jamy brzusznej na promieniowanie jonizujące [Szmidt, 2010].

Do stanów przednowotworowych wlicza się również obecność pojedynczych gruczolaków i/lub nieswoistych chorób zapalnych jelit, w tym choroby Leśniowskiego i Crohna oraz wrzodziejącego zapalenia jelita grubego [Szczeklik, 2017; Yamada, 2006; Szmidt, 2010]. Trwające dwie dekady wrzodziejące zapalenie jelita grubego zwiększa ryzyko transformacji nowotworowej o 5%, a trwające pięć lat dłużej – nawet o 12% [Partyka, 2010].

Niewielka część raków jelita grubego ma charakter dziedziczny, jak w przypadku rodzinnej polipowatości gruczolakowatej (FAP), czy polipowatości jelita grubego związanej z genem *MUTYH* [Kołos, 2016]. Do dziedzicznych raków jelita grubego zaliczamy także inne zespoły polipowatości rodzinnej oraz zespół Lyncha [Szczeklik, 2017].

Zespoły polipowatości rodzinnej stanowią około 1% przypadków raka jelita grubego [Yamada, 2006]. Włącza się do tej grupy między innymi rodzinną polipowatość gruczolakowatą FAP wraz z jej wariantami – zespołem Gardnera i zespołem Turcota. Pierwszy z nich, poza obecnością wielu polipów o typie gruczolaków, charakteryzuje powstawanie kostniaków i nowotworów tkanek miękkich. W zespole Turcota, obok gruczolakowatości jelita grubego, opisywane są nowotwory złośliwe ośrodkowego układu nerwowego. Podłożem FAP są mutacje w genach *APC* (ang. *adenomatous polyposis coli*) i *MUTYH* (ang. *mutY DNA glycosylase*),

które stwierdza się odpowiednio u 90% i 8% chorych [Szczeklik, 2017]. Osoby z rodzinną polipowatością gruczolakowatą wykazują prawie 100% ryzyko rozwoju raka jelita grubego do 40. roku życia [Rawla, 2019].

Zespół Lyncha, czyli dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością (HNPCC ang. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*), sprzężony jest ze zmianami w obrębie genów naprawczych DNA, czyli grupą genów *mismatch repair* (MMR): *MLH1* (ang. *MutL Homolog 1*) i *MSH2* (ang. *MutS Homolog 2*) w 80%, *MSH6* (ang. *MutS Homolog 6*) w 10-12%, *PMS1* i *PMS2* (ang. *PMS1 Homolog 1* i *PMS1 Homolog 2*) w 2-3%. Prawdopodobieństwo rozwoju raka jelita grubego na tle HNPCC wynosi od 25% do 70%. Zespół Lyncha odpowiada za około 1-3% przypadków raka jelita grubego, ale wiąże się również z większym zagrożeniem rozwoju nowotworów złośliwych innych narządów, w tym: mózgu, żołądka, trzustki, dróg żółciowych, jelita cienkiego, jajnika, trzonu macicy, skóry oraz układu moczowego [Szczeklik, 2017; Yamada, 2006].

2.3. Patogeneza

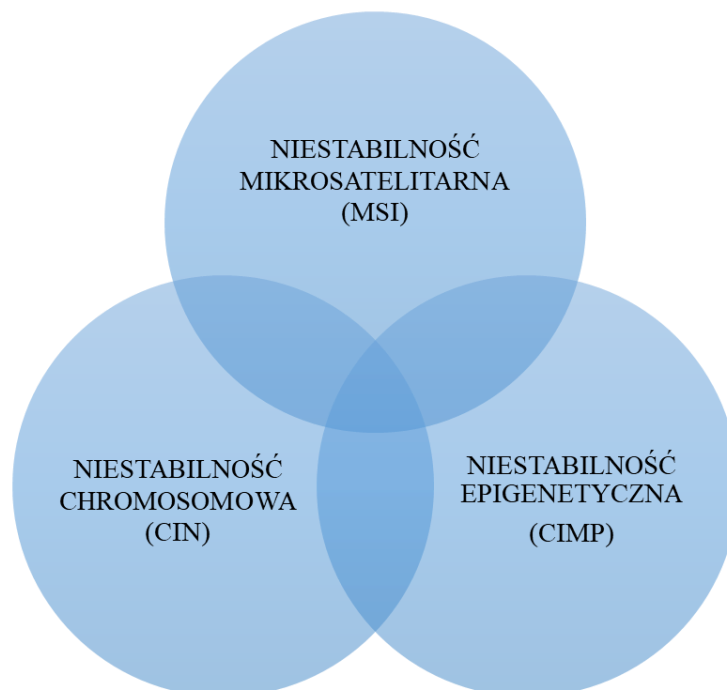
Kancerogeneza jest patologicznym procesem prowadzącym do rozwoju nowotworu. Przyczyną jego powstania jest postępująca kumulacja wieloletnich i trudnych do przewidzenia uszkodzeń sekwencji DNA w kolejnych genach odpowiedzialnych za proliferację, różnicowanie, kontrolę cyklu komórkowego czy apoptozę [Francuz, 2016]. W rezultacie dochodzi do zaburzeń cyklu komórkowego prawidłowej komórki i przejście jej na tzw. tor mutacyjny. Pojawienie się pierwszych zmian w obrębie genów kontrolujących cykl komórkowy nazywane jest fazą inicjacji kancerogenezy. W wyniku przekazania mutacji komórkom potomnym powstaje klon zbudowany z komórek charakteryzujących się niekontrolowanym i nieograniczonym podziałem komórkowym – tak zwana faza promocji. Z czasem komórki te na skutek zmian w kolejnych genach nabierają zdolności do naciekania okolicznych tkanek i tworzenia przerzutów odległych, przechodząc tym samym w fazę progresji nowotworzenia [Tomasetti, 2017; Wronkowski, 2008].

Na kancerogenezę składa się wiele etapów, a proces transformacji prawidłowej tkanki, poprzez stadium gruczolaka, w raka jelita grubego trwa wiele lat. W komórce

dochodzi do kumulacji licznych zmian genetycznych i epigenetycznych. Wśród szlaków prowadzących do rozwoju raka jelita grubego wymienia się niestabilność chromosomową CIN (ang. *chromosomal instability*), niestabilność mikrosatelitarną MSI (ang. *microsatellite instability*) oraz niestabilność epigenetyczną CIMP (ang. *CpG island methylator phenotype*) [Pino, 2010; Mojarad, 2013].

Wszystkie wymienione szlaki wzajemnie się przenikają powodując, że w genomie pojedynczej komórki nowotworowej może dochodzić do mutacji nawet w 15 genach „kandydujących”, bezpośrednio związanych z rozwojem raka i 61 rzadziej spotykanych genach „pasażerskich”, o pośredniej roli w onkogenezie. Tak duża złożoność i różnorodność zmian w genach świadczy o nieprzewidywalności kancerogenezy oraz sprawia, że wpływ pojedynczej mutacji na cały proces staje się trudny do określenia [Markowitz, 2009].

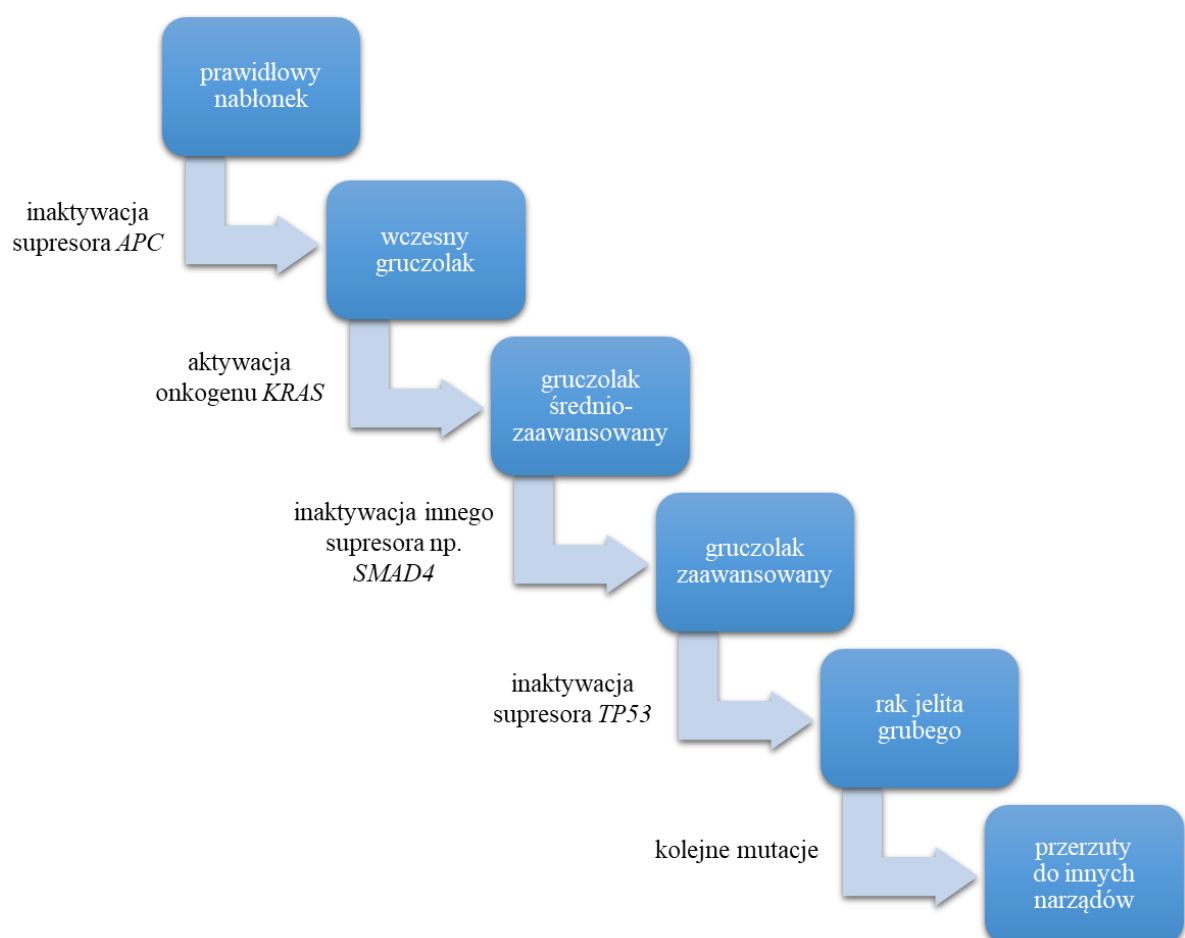
Rycina 5: Szlaki kancerogenezy prowadzące do rozwoju raka jelita grubego [Pino, 2010; Mojarad, 2013].



SZLAK KANCEROGENEZY CIN (NIESTABILNOŚĆ CHROMOSOMOWA)

Klasyczny model rozwoju raka jelita grubego wg Fearona i Vogelsteina zakłada współwystępowanie mutacji w genach supresorowych inicjujących proces rozwoju gruczolaka, takich jak *APC*, *DCC* (ang. *deleted in colorectal carcinoma*) czy *TP53* (ang. *tumor protein p53*) oraz nakładających się na nie mutacji protoonkogenów np. *K-RAS* (ang. *KRAS proto-oncogene, GTPase*), *N-RAS* (ang. *NRAS proto-oncogene, GTPase*), *H-RAS* (ang. *HRas proto-oncogene, GTPase*) i *C-MYC* (ang. *MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*), które warunkują dalszą progresję zmian. (Rycina 6) [Szczeklik, 2017; Szmidt, 2010]. Szacuje się, że transformacja gruczolaka do nowotworu złośliwego trwa wtedy od 10 do 20 lat [Rawla, 2019].

Rycina 6: Klasyczny model rozwoju sporadycznego raka jelita grubego wg Fearona i Vogelsteina [Tobias, 2013].



Jest to najdłużej znany szlak, zwany również szlakiem niestabilności chromosomowej, obserwowany w przypadku większości (65-70%) spontanicznych raków jelita grubego. CIN jest wynikiem kumulacji nieprawidłowości kariotypowych oraz typowych mutacji w genach supresorowych i protoonkogenach, które aktywują inne szlaki kluczowe w patogenezie raka jelita grubego [Pino, 2010].

Krytycznym momentem inicjującym szlak kancerogenezy wydaje się być mutacja w obrębie genu *APC*. W jej wyniku dochodzi do zakłócenia tworzenia przez białko APC kompleksu z elementami szlaku Wnt, m.in. β -kateniną, aksyną oraz GSK-3 β (ang. *glycogen synthase kinase-3 β*) i CK1 α/ϵ (ang. *casein kinase 1 α/ϵ*). Prowadzi to do kumulacji β -kateniny w cytozolu, która penetruje do jądra komórkowego i poprzez czynniki transkrypcyjne LEF (ang. *lymphoid enhancer factor*) i TCF (ang. *T-cell factor*) nasila ekspresję wielu genów zaangażowanych we wzrost i inwazyjność komórek [Pino, 2010].

Z kolei mutacje w genie *K-RAS* blokują kodowany przez niego enzym w aktywnej formie związanej z GTP, co prowadzi do aktywacji białek z grupy Ras, które poprzez inne szlaki sygnałowe wpływają na wzrost, proliferację, różnicowanie, cykl komórkowy czy hamowanie apoptozy. Mutacje w obrębie genu *K-RAS* nie są jednak w stanie samodzielnie wywołać inicjacji kancerogenezy [Pino, 2010].

Kluczowym elementem szlaku CIN jest defekt w genie *TP53*, którego konsekwencją jest transformacja gruczolaka w raka jelita grubego. Przyczyną w większości są mutacje zmiany sensu zlokalizowane w obrębie pięciu szczególnie podatnych miejsc tzw. „hot spotów” w kodonach 175, 245, 248, 273 i 282. Mutacje te prowadzą do utraty supresorowej funkcji białka TP53 o aktywności czynnika transkrypcyjnego, który wpływa na cykl komórkowy, angiogenezę, różnicowanie i migrację komórek. Inaktywacja TP53 prowadzi przede wszystkim do utraty zdolności indukcji apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA i uniemożliwia uruchomienie procesów naprawczych [Pino, 2010].

W podobnym momencie szlaku kancerogenezy opisywane są mutacje w innych genach supresorowych, takich jak *SMAD2* czy *SMAD4*, których produkty białkowe są elementami szlaku TGF- β regulującego wzrost, różnicowanie i apoptozę komórek. Nie bez znaczenia jest również nadekspresja takich czynników jak COX-2, która poprzez zwiększenie syntezy VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) i FGF2 (ang. *basic fibroblast growth factor*) nasila proces angiogenezy [Pino, 2010].

Pomimo tego, kolejność zmian molekularnych w komórce może odbiegać

od zaproponowanego przez Fearona i Vogelsteina modelu rozwoju sporadycznego raka jelita grubego, a w szlak CIN mogą być zaangażowane również inne geny, takie jak *PIK3CA*, *BRAF*, *DCC*, *AXIN2*, *NRAS* czy rzadziej *HRAS* [Pino, 2010; Nguyen, 2018].

SZLAK KANCEROGENEZY MSI (NIESTABILNOŚĆ MIKROSATELITARNA)

Druga możliwa droga transformacji nowotworowej nabłonka jelita grubego zakłada inaktywację genów mutatorowych, których produkty białkowe związane są z naprawą uszkodzonego DNA.

Mutacje w obrębie genów naprawczych tzw. MMR (ang. *mismatch repair genes*), jak *MLH2*, *MSH1*, *MSH6* czy *PMS2* doprowadzają do nieograniczonej hiperplazji komórek nabłonkowych poprzez powstanie niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) definiowanej jako zmienność krótkich, wielokrotnych powtórzeń nukleotydowych [Szczeklik, 2017; Yamada, 2006; Szmidt, 2010]. Te rozproszone po całym genomie powtórzenia mikrosatelitarne – nazywane również krótkimi powtórzeniami tandemowymi STR (ang. *short tandem repeats*) – charakteryzują się szczególnie wysoką częstością mutacji, które mogą powstawać na przykład w wyniku poślizgu polimerazy DNA.

MSI stwierdzana jest w dziedzicznych zespołach, jak ma to miejsce w zespole Lyncha (opisywany u 3% osób z rakiem jelita grubego), ale może także występować w rakach sporadycznych u 15% chorych. Kumulacja mutacji w obrębie genów naprawczych skutkuje rozwojem klonu komórkowego wymykającego się spod mechanizmów kontrolujących wzrost komórkowy [Szczeklik, 2017; Yamada, 2006; Szmidt, 2010; Kołos, 2016].

W zależności od stopnia niestabilności mikrosatelitarnej wyróżnia się nowotwory: MSI-High, MSI-Low oraz MSS (ang. *microsatellite stable*), z których każdy charakteryzuje się różnym rokowaniem. Szlak MSI inicjowany jest mutacjami somatycznymi w obrębie genów MMR lub zaburzeniami epigenetycznymi powstającymi na przykład w efekcie hipermetylacji regionu promotorowego genu *MLH1*. Wskutek inaktywacji genów MMR zmiany w sekwencji DNA nie mogą być korygowane, co może prowadzić do rozwoju gruczolaka [Kołos, 2016; Nojadeh, 2018]. Kolejnym etapem, umożliwiającym przejście gruczolaka w raka są mutacje w genach *TGFBR2* oraz *BAX* [Markowitz, 2009].

Ocena MSI w tkance nowotworowej może być szczególnie pomocna przy określaniu celów terapeutycznych i prognostycznych [Nojadeh, 2018]. Wiele doniesień sugeruje, że raki MSI-H cechują się lepszym rokowaniem niż MSI-L czy MSS, jednak wiążą się one ze słabszą odpowiedzią na stosowany w leczeniu 5-fluorouracyl. Z tego powodu określanie u pacjentów markerów niestabilności mikrosatelitarnej, jakimi są np. *BAT-25*, *BAT-26*, *NR-21* i *NR-24*, może stać się podstawą do podjęcia decyzji o zastosowaniu chemioterapii adiuwantowej [Dotan, 2011; Murphy, 2006].

SZLAK KANCEROGENEZY CIMP (NIESTABILNOŚĆ EPIGENETYCZNA)

Trzecim szlakiem zaangażowanym w rozwój raka jelita grubego jest ścieżka związana z niestabilnością epigenetyczną, obejmująca między innymi proces metylacji DNA.

Proces przyłączania reszt metylowych do zasad azotowych zachodzi zazwyczaj w miejscach bogatych w pary cytozyna-guanina, czyli tak zwanych wyspach *CpG* obecnych powszechnie w regionach promotorowych genów. W momencie przyłączenia reszty metylowej do cytozyny dochodzi do inaktywacji promotora, co sprawia, że metylacja DNA stanowi jeden z mechanizmów regulujących ekspresję genów.

W odróżnieniu od komórek prawidłowych, w komórkach raka jelita grubego zauważalna jest ogólna hipometylacja genomu z jednoczesną lokalną hipermetylacją wysp *CpG* promotorów wybranych genów. Zwiększona metylacja regionów promotorowych genów supresorowych może powodować ich funkcjonalną inaktywację, podczas gdy hipometylacja DNA może aktywować protoonkogeny. Opisywane zaburzenia wzoru metylacji DNA stanowią jedno z wcześniejszych zdarzeń na drodze kancerogenezy, a nawet mogą ją wyprzedzać [Markowitz, 2009; Tokarz, 2013].

Grupa nowotworów o wysokim poziomie metylacji wielu genów określana jest fenotypem metylatora wysp *CpG* (CIMP), który rozpoznawany jest w około 15% przypadków raka jelita grubego.

W zależności od nasilenia metylacji wyróżnia się dwa fenotypy CIMP:

- a) CIMP-*high*, z hipermetylacją wielu genów, któremu dodatkowo towarzyszy MSI i mutacje genu *BRAF* oraz
- b) CIMP-*low*, z mniejszą liczbą hipermetylowanych genów oraz mutacjami genu *K-RAS* [Markowitz, 2009; Tokarz, 2013; Mojarad, 2013].

W piśmiennictwie wymieniane są różne grupy genów, które są wykorzystywane do oceny CIMP. Parker i wsp. jako markery CIMP proponuje pięć genów *MLH1*, *p16*, *MINT1*, *MINT2* i *MINT31*, natomiast Weisenberg i wsp. opierają swoją ocenę o *NEUROG1*, *SOCS1*, *RUNX3*, *IGF2* oraz *CACNA1G* [Tokarz, 2013].

Najczęściej obserwowane zmiany metylacji mają miejsce w genach *hMLH1*, *p16* oraz *MGMT*. Wyciszenie ekspresji należącego do grupy MMR genu *hMLH1* skutkuje niedoborem białka odpowiedzialnego za naprawę błędnie sparowanych zasad. Efektem tego jest duże nagromadzenie mutacji, w tym w obrębie sekwencji mikrosatelitarnych, doprowadzających do niestabilności MSI.

Z kolei niedobór białka kodowanego przez *MGMT* uniemożliwia sprawne usuwanie grup alkilowych dołączanych do DNA, a obserwowana u 40% pacjentów hipermetylacja w obrębie genu supresorowego *p16* powoduje niedobór białka spowalniającego cykl komórkowy [Tokarz, 2013].

Uważa się, że z powstaniem gruczolaków z prawidłowych komórek nabłonkowych związana jest metylacja w obrębie promotorów genów: *APC*, *p14*, *CDH1*, *DAPK1*, *JAM2*, *CNRIP1*, *ADHFE1*, *ITGA4*, *IRF4*, *TWIST1*, *ST6GALNAC5*, *NRG1*, *FLI1*, *EYA4*, *SLC5A8*, *SFR2*, *SFR4*, *SFR5*. Mogą dzięki temu stać się w przyszłości potencjalnymi markerami wczesnego raka jelita grubego. Natomiast moment przejścia gruczolaka w raka kojarzony jest z hipermetylacją takich genów jak: *JAM2*, *CNRIP1*, *FLI1*, *ADHFE1*, *IRF4*, *TWIST1*, *ST6GALNAC5*, *NRG1* oraz *EYA4* [Tokarz, 2013].

Wymienione szlaki prowadzące do rozwoju raka jelita grubego mogą nakładać się wzajemnie lub występować na różnych etapach przebiegu kancerogenezy. Skłania to do podejmowania kolejnych badań poszerzających aktualną wiedzę o mechanizmach, które wpływają na wyżej omówione ścieżki. Dokładniejsze poznanie tych procesów

może zaowocować w przyszłości opracowaniem nowych metod diagnostycznych, przysłużyć się do celów prognostycznych, a nawet stać się kryterium wyboru terapii dobieranej indywidualnie do profilu zmian genetycznych pacjenta.

Dla wyeliminowania niespójności pomiędzy różnymi klasyfikacjami raka jelita grubego zaproponowano podział uwzględniający zmiany w obrębie genów. Stworzenie klasyfikacji molekularnej pozwoliło na wyodrębnienie czterech podtypów raka jelita grubego (CMSs, ang. *consensus molecular subtypes*). Każdy z nich charakteryzuje się odmiennym przebiegiem klinicznym i odpowiedzią na leczenie, dzięki czemu klasyfikacja ta może stać się cennym narzędziem w zindywidualizowanym doborze terapii [Nojadeh, 2018].

Tabela 2: Porównanie podtypów molekularnych raka jelita grubego [Nojadeh, 2018; Thanki, 2017].

Podtyp	Nazwa	Częstość występowania [%]	Charakterystyka nowotworu
CMS1	immunologiczny	14	duża ilość mutacji; obecność MSI i CIMP; najczęstsza lokalizacja: prawa strona okrężnicy; duża immunogenność; pomyślne rokowanie w przypadku wykrycia przed powstaniem przerzutów a złe przy nawrocie choroby; wskaźnik przeżyć 5-letnich: 73%
CMS2	kanoniczny	37	lokalizacja: lewa strona okrężnicy; mniejsza niż w CMS1 ilość mutacji; fenotyp CIN; aktywacja szlaków Wnt i Myc; najwyższy wskaźnik przeżyć 5-letnich (77%); lepsze rokowanie po nawrocie choroby niż CMS1
CMS3	metaboliczny	13	ilość mutacji mniejsza niż CMS1, ale większa niż CMS2 i 4; fenotyp CIN; MSI większa niż CMS2 i CMS4; komórki wzbogacone o wiele szlaków metabolicznych; wskaźnik przeżyć 5-letnich: 75%
CMS4	mezenchymalny	23	zwiększona sygnalizacja szlaku TGF- β ; fenotyp CIN; duża inwazyjność; nasilona angiogeneza; silna sygnalizacja prozapalna; słaba odpowiedź na chemioterapię; najniższy wskaźnik przeżyć 5-letnich (62%); przy przerzutach oporność na leczenie przeciwko receptorom EGFR (niezależnie od mutacji KRAS)
Pozostałe 13% raków wykazuje pośrednie cechy wymienionych podtypów.			

[<https://linkd.pl/z2df>].



2.4. Objawy kliniczne

Polipy zlokalizowane w obrębie jelita grubego bardzo rzadko manifestują objawy i z tego powodu najczęściej wykrywane są przypadkowo podczas badania endoskopowego.

W przypadku polipów zlokalizowanych w odbytnicy częstym objawem są krwawienia, które z czasem mogą doprowadzać do rozwoju niedokrwistości mikrocytarnej. Dodatkowo mogą objawiać się obecnością śluzu w kale i uczuciem parcia na stolec. Innym polipom towarzyszą biegunki, objawy niedrożności lub wgłobienia jelit [Szmidt, 2010].

Statystycznie najczęściej, bo w 30-50% przypadków, rak jelita grubego umiejscawia się w odbytnicy. Rzadziej rozpoznawany jest w obrębie esicy (15-20%), okrężnicy wstępującej i kątnicy (15%), okrężnicy poprzecznej (10%), a najrzadziej w okrężnicy zstępującej (5%). Rodzaj oraz nasilenie objawów raka jelita grubego są zależne od lokalizacji nowotworu, ale również od jego typu i stopnia zaawansowania [Szmidt, 2010].

Wczesne symptomy raka jelita grubego bardzo często są niespecyficzne i mogą zostać zbagatelizowane przez pacjentów. Do najczęstszych z nich zaliczamy zmianę rytmu wypróżnień, przewlekłe lub nawracające biegunki i zaparcia, chroniczne bóle brzucha, zmniejszenie średnicy stolca, nieustępujące po wypróżnieniu uczucie parcia na stolec oraz ogólne osłabienie lub przemęczenie [Wronkowski, 2008; Leszczyński, 2012].

Manifestacja wyżej wymienionych objawów jest zależna od lokalizacji nowotworu.

W przypadku usytuowania raka w prawej połowie okrężnicy, jedynym objawem może być postępująca niedokrwistość z niedoboru żelaza spowodowana utajonym krwawieniem do światła przewodu pokarmowego. Jeśli zmianą nowotworową objęta zostanie lewa połowa okrężnicy obserwowane są również jawne krwawienia dostrzegane przez pacjentów podczas wypróżnień oraz naprzemienne biegunki i zaparcia. Bardzo ważne jest ustalenie przyczyny obecności krwi w kale, ponieważ stosunkowo często objaw ten jest lekceważony i przypisywany innym schorzeniom np. chorobie hemoroidalnej.

Umieszczenie raka w odbytnicy, z uwagi na jej anatomiczne przewężenie, może

objawiać się początkowo niedrożnością. Stosunkowo rzadko w przebiegu choroby pojawiają się bezpośrednio zagrażające życiu krwotoki lub perforacje [Szczeklik, 2017; Wronkowski, 2008].

2.5. Diagnostyka

BADANIA PRZESIEWOWE W DIAGNOSTYCE RAKA JELITA GRUBEGO

Z definicji, badania przesiewowe mają na celu wykrycie choroby na jej początkowym etapie, przed wystąpieniem jej pierwszych symptomów w populacji ogólnej. W diagnostyce raka jelita grubego wymieniane są dwie strategie badań przesiewowych, które powinny być zintensyfikowane po 50. roku życia, nawet u osób niebędących w grupie podwyższonego ryzyka.

Pierwsza, jednostopniowa, zakłada przeprowadzanie kontrolnej kolonoskopii co 10 lat, natomiast druga – nazywana dwuetapową – wykonywanie rokrocznie badania kału w kierunku obecności krwi utajonej (FOBT, ang. *fecal occult blood test*) i dodatkowo kolonoskopii w przypadku dodatniego wyniku testu. Według aktualnych wytycznych test na krew utajoną w kale pełni nadrzędną rolę względem kolonoskopii (tzw. *prescrining*) i powinien być wykonywany co 2 lata [Szczeklik, 2017; Wronkowski, 2008; Rawla, 2019].

Istotnym atutem przemawiającym za FOBT jest wysoka dodatnia wartość predykcyjna testu, ponieważ jego czułość sięga 95,6%. Zgodnie z dwustopniową strategią diagnostyki, każdy dodatni wynik FOBT powinien w dalszej kolejności zostać zweryfikowany w badaniu kolonoskopowym. Dzięki zastosowaniu takiego schematu badań przesiewowych u osób powyżej 50. roku życia, możliwe staje się wczesne wykrycie nowotworu i zmniejszenie umieralności pacjentów o około 20-30% [Szmidt, 2010; Szczeklik, 2017; Wronkowski, 2008; Rawla, 2019; Jeziorski, 2005].

Wiele krajów, w tym Polska, wprowadziło własne programy badań przesiewowych w kierunku diagnostyki raka jelita grubego. Wydaje się, że ich wdrożenie przynosi wymierne efekty, o czym może świadczyć chociażby zmniejszenie umieralności Polek na raka jelita grubego od 2010 roku, czy ogólny spadek śmiertelności w krajach rozwiniętych [Szczeklik, 2017; Wronkowski, 2008;

Rawla, 2019]. Odrębności diagnostyczne badań przesiewowych w kierunku raka jelita grubego zostały ujęte w Tabeli 3.

W diagnostyce raka jelita grubego kluczowe jest wczesne wykrycie zmian nowotworowych, zwiększające szansę na skuteczne wyleczenie. Z tego powodu ogromną rolę przypisuje się badaniom przesiewowym.

Tabela 3: Schemat badań przesiewowych w kierunku wykrywania raka jelita grubego [Szmidt, 2010].

ujemny wywiad rodzinny	co 10 lat $\geq$ 50 roku życia
pozytywny wywiad rodzinny w kierunku raka jelita grubego	a) jeden krewny I ^o z rozpoznaniem raka jelita grubego po 60 r. ż. – badania przesiewowe od 40 r. ż. b) $\geq$ 2 krewnych I ^o z rozpoznaniem raka jelita grubego po 60 r. ż. lub jeden krewny I ^o z rozpoznaniem raka jelita grubego przed 60 r. ż. – badania od 40 r. ż. lub dekadę wcześniej niż wiek najmłodszego krewnego z rozpoznaniem rakiem jelita grubego
pozytywny wywiad rodzinny w kierunku HNPCC	a) pełna kolonoskopia co 1-2 lata od 20-25 r. ż. b) gastroscopia co 2 lata od 30 r. ż. c) u kobiet badania przesiewowe wykonywane co rok w kierunku raka trzonu macicy
pozytywny wywiad rodzinny w kierunku FAP	badanie molekularne oraz kolonoskopia co rok po 12-15 r. ż.
obecność choroby zapalnej jelit	kolonoskopia wraz z pobraniem wycinków z miejsc zmienionych oraz losowych co 1-2 lata po 8 latach od rozpoznania choroby

Podstawowymi obrazowymi badaniami przesiewowym umożliwiającymi dokładną ocenę powierzchni błony śluzowej i stosowanymi w diagnostyce raka jelita grubego są metody endoskopowe. Zaliczamy do nich rektoskopię, sigmoidoskopię oraz kolonoskopię. Niewątpliwą zaletą tych badań jest – oprócz dokładnej lokalizacji raka – również możliwość pobrania wycinków do analizy histopatologicznej oraz dokładna ocena całego jelita w celu identyfikacji wszelkich zmian synchronicznych. Czułość i swoistość kolonoskopii w wykrywaniu polipów sięga odpowiednio 95 i 99% [Szczeklik, 2017; Wronkowski, 2008; Yamada, 2006].

Odrębnym badaniem przesiewowym, stosowanym w kombinacji z innymi metodami diagnostycznymi lub uzupełniającym dla kolonoskopii, może być radiologiczne badanie dwukontrastowe [Szmidt, 2010].

Wskazania do przeprowadzenia kolonoskopii:

- a) jawne lub utajone krwawienia w obrębie dolnego odcinka jelita grubego (FOBT),
- b) diagnostyka zwężeń jelita grubego widocznych podczas badań radiologicznych,
- c) weryfikacja prawidłowych wyników rektoskopii i badania radiologicznego przy jednoczesnym występowaniu objawów chorobowych,
- d) weryfikacja wyników wątpliwych badania radiologicznego z kontrastem,
- e) badania przesiewowe u osób z dodatnim wywiadem rodzinnym lub w stanach przedrakowych,
- f) diagnostyka przesiewowa polipów i raka jelita grubego,
- g) diagnostyka nowotworów synchronicznych jelita grubego,
- h) badania okresowe u osób w stanach przedrakowych lub z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku raka jelita grubego [Szmidt, 2010].

Dogłębna ocena endoskopowa jest istotna ze względu na możliwość wykrycia polipów w innej lokalizacji (stwierdzanych u 30% pacjentów), a także drugiego ogniska raka (stwierdzanego u 1-3% chorych). Wprowadzenie obrazowych badań przesiewowych przyczyniło się do redukcji umieralności aż o 60-70% [Szczeklik, 2017].

Przy wykonywaniu kolonoskopii istnieje niewielkie ryzyko powikłań, takich jak perforacja ściany jelita lub krwawienia (odpowiednio u 0,2% i 0,9% przypadków), które wzrasta przy współwystępowaniu uchyłków, rozległych procesów zapalnych czy nowotworowych w obrębie jelita [Szmidt, 2010].

Podstawą rozpoznania raka jelita grubego jest mikroskopowa ocena pobranych endoskopowo wycinków wraz z ich klasyfikacją i oceną stopnia zróżnicowania. Istnieją trzy systemy oceniające stopień zaawansowania raka jelita grubego. Każdy z nich uwzględnia głębokość inwazji raka w obrębie ściany jelita, obecność przerzutów do innych narządów i regionalnych węzłów chłonnych [Szczeklik, 2017; Wronkowski, 2008].

Najpopularniejsza jest kliniczna klasyfikacja TNM oceniająca wielkość i głębokość naciekania ściany jelita przez zmianę pierwotną (cecha T – łac. *tumor*), obecność przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (cecha N – łac. *nodi*) i przerzutów odległych (cecha M – łac. *metastases*) [Wronkowski, 2008].

Tabela 4: Klasyfikacja kliniczna TNM oceny stopnia zaawansowania raka jelita grubego [Wronkowski, 2008; Szmidt, 2010].

Stopień	Opis
<i>Tumor (T)</i>	
Tx	brak możliwości oceny głębokości naciekania ściany jelita lub niekompletna informacja o wielkości zmiany pierwotnej
T0	nie stwierdza się pierwotnego ogniska raka
Tis	rak przedinwazyjny, ograniczony do nabłonka błony śluzowej (rak <i>in situ</i>)
T1	rak nacieka tkankę podśluzową
T2	rak nacieka błonę mięśniową
T3	rak sięga błony surowiczej, ale nie zajmuje tkanek przyległych do jelita
T4a	nowotwór zajmuje całą grubość ściany jelita oraz otrzewną trzewną
T4b	nowotwór obejmuje okoliczne narządy lub do nich przylega
<i>Nodi (N)</i>	
Nx	brak możliwości oceny regionalnych węzłów chłonnych
N0	regionalne węzły chłonne wolne od komórek nowotworowych
N1	ogniska metastatyczne w 1-3 regionalnych węzłach chłonnych
N1a	ognisko metastatyczne tylko w jednym regionalnym węźle chłonnym
N1b	ogniska metastatyczne w 2-3 regionalnych węzłach chłonnych
N1c	brak ognisk metastatycznych, komórki nowotworowe obecne w tkance podsurowiczej, krezce lub niepokrytych otrzewną tkankach
N2	ogniska metastatyczne w ≥ 4 regionalnych węzłach chłonnych
N2a	ogniska metastatyczne w 4-6 regionalnych węzłach chłonnych
N2b	ogniska metastatyczne w ≥ 7 regionalnych węzłach chłonnych
<i>Metastases (M)</i>	
Mx	niekompletna informacja na temat przerzutów odległych
M0	brak odległych ognisk metastatycznych
M1	obecne odległe ogniska metastatyczne
M1a	ogniska metastatyczne zlokalizowane w jednym narządzie lub miejscu
M1b	ogniska metastatyczne w ≥ 2 narządach lub miejscach

Tabela 5: Klasyfikacje oceniające stopień zaawansowania klinicznego raka jelita grubego [Szczeklik, 2017; Wronkowski, 2008; Szmidt, 2010].

Stopień	Klasyfikacja Dukes'a	Klasyfikacja Astlera- Collera	Klasyfikacja pTNM	Opis	5-letnie przeżycie [%]
0	-	-	Tis, N0, M0	rak ograniczony do nabłonka (rak <i>in situ</i>)	100
I	A	B1	T1, N0, M0	rak nieprzekra- czający błony mięśniowej	85-100
II A	B	B2	T2, N0, M0	przekraczają- cy ścianę jelita	50-80
II B		B3	T3, N0, M0		
II C		C1	T4a, N0, M0		
III A	C	C1	T1-T2, N1/N1c, M0	przerzuty do węzłów chłonnych	30-60
III B	C	C1	T1, N2a, M0		
		C2	T3-T4a, N1/N1c, M0		
		C1/C2	T2-T3, N2a, M0		
III C	C	C1	T1-T2, N2b, M0		
		C2	T4a, N2a, M0		
		C2	T3-T4a, N2b, M0		
		C3	T4b, N1-N2, M0		

IV A	-	D	dowolne T, dowolne N, M1a	przerzuty odległe	< 25
IV B	-	D	dowolne T, dowolne N, M1b		

Istnieje również zaproponowana przez WHO klasyfikacja złośliwości histologicznej *Classification of Tumours of the Digestive System*, której kryterium podziału jest mikroskopowy obraz pobranego endoskopowo wycinka oceniający jego utkanie oraz parametry cytologiczne komórek nowotworowych [Damjanov, 2013].

Tabela 6: Klasyfikacja złośliwości histologicznej gruczolakoraków wg *Classification of Tumours of the Digestive System* [Damjanov, 2013].

Stopień złośliwości	Stopień zróżnicowania	Obraz mikroskopowy
G1	dobry	$\geq 95\%$ komórek stanowią prawidłowe pęcherzykowe lub cewkowe komórki gruczołowe o właściwym kształcie i otwartym świetle. Komórki rakowe mają kształt sześciangu lub walca, zmienną ilość prawidłowej lub kwasochłonnej cytoplazmy oraz pęcherzykowe jądra z gruboziarnistą chromatyną jądrową.
G2	umiarkowany	prawidłowe komórki gruczołowe stanowią od 50% do 95% wszystkich komórek wycinka. Komórki nowotworowe o opisanej wyżej morfologii tworzą nieregularne skupiska lub zwarte gniazda.
G3	słaby	$< 50\%$ komórek wycinka zbudowana jest z prawidłowych komórek gruczołowych. Komórki nowotworowe tworzą zbite struktury, wykazują dużą zmienność kształtów i mogą penetrować do okolicznych tkanek.

* wymieniany przez WHO czwarty stopień złośliwości histologicznej G4 (gruczolakoraki niezróżnicowane) nie jest uwzględniany z uwagi na brak cech morfologicznych, immunohistochemicznych i molekularnych charakterystycznych dla komórek nabłonka gruczołowego.

BADANIA UZUPEŁNIAJĄCE W DIAGNOSTYCE RAKA JELITA GRUBEGO

Uzupełniając do kolonoskopii lub w przypadku przeciwwskazań do jej wykonania bywa stosowany wlew dwukontrastowy. Polega on na doodbytniczym podaniu środka cieniującego np. barytu wraz z powietrzem, co pozwala na lepszą niż kolonoskopia ocenę miejsc powyżej zwężenia światła jelita [Szmidt, 2010].

Inne badania obrazowe, takie jak USG i tomografia komputerowa umożliwiają ocenę stopnia zaawansowania raka oraz pomagają przy określeniu obecności regionalnych i odległych ognisk metastatycznych przed interwencją chirurgiczną. Ocenę stopnia zaawansowania nowotworu pierwotnego umożliwia również tomografia rezonansu magnetycznego (MRI, ang. *magnetic resonance imaging*), a RTG i TK klatki piersiowej pozwalają na wykrycie przerzutów odległych [Szmidt, 2010].

Do rozpoznania raka odbytu pomocne bywa nieinwazyjne badanie *per rectum*, które jednak charakteryzuje się niską czułością. W przypadku diagnostyki zmian nowotworowych w obrębie tego odcinka jelita grubego szczególnie pomocna jest MRI. Ocena stopnia zaawansowania nowotworu tej części jelita przeprowadzana jest za pomocą ultrasonografii endoskopowej (EUS, ang. *endoscopic ultrasound*) [Szczeklik, 2017; Szmidt, 2010].

BADANIA DIAGNOSTYCZE W MONITOROWANIU TERAPII

Markery nowotworowe, takie jak antygen karcynoembrionalny CEA (ang. *carcino-embryonic antigen*) i antygen CA 19-9, służą do monitorowania skuteczności leczenia oraz sygnalizują nawrót choroby [Szczeklik, 2017; Wronkowski, 2008]. Z racji zbyt niskiej czułości i swoistości diagnostycznej (odpowiednio 40-50% i 95%), a także braku wzrostu stężenia CEA u 10-15% chorych, oznaczanie stężenia CEA w surowicy nie może być wykorzystywane do wykrywania raka jelita grubego [Solnica, 2014].

BADANIA KONTROLNE PO LECZENIU CHIRURGICZNYM RAKA JELITA GRUBEGO

Badania kontrolne po zabiegu mają za zadanie jak najszybciej wykryć wznowę choroby oraz potencjalne ogniska metachroniczne. Co istotne, dają także informację zwrotną onkologom i samym pacjentom co do skuteczności podjętej terapii [Szmidt, 2010].

Tabela 7: Schemat zalecanych badań kontrolnych po leczeniu raka jelita grubego [Szmidt, 2010].

Badanie	Stopień zaawansowania	Częstość wykonywania
wywiad, badanie przedmiotowe	I, II	co 6 miesięcy przez 5 lat
	III, IV	co 3 miesiące przez 2 lata, później co 6 miesięcy przez 3 lata
ocena stężenia CEA w surowicy	I, II	co 6 miesięcy przez 5 lat
	III, IV	co 3 miesiące przez 2 lata, później co 6 miesięcy przez 3 lata
kolonoskopia	niezależnie od stopnia zaawansowania	w ciągu roku od wykonania operacji, następnie po 3 latach, a później co 5 lat (po wykryciu polipów gruczolakowych kolejna kolonoskopia po roku)
TK klatki piersiowej, jamy brzusznej, miednicy	I, II, III	rocznie przez 3 lata
	IV	co 3-6 miesięcy przez 2 lata, później co 6-12 miesięcy przez 3 lata

Ponowny wzrost stężenia CEA w surowicy krwi po zabiegu, może świadczyć o wznowie choroby i obliuguje do przeprowadzenia badania przedmiotowego, ponownego wykonania kolonoskopii i TK klatki piersiowej, brzucha oraz miednicy.

W przypadku niewykrycia przyczyny podwyższonego stężenia CEA we krwi należy rozważyć wykonanie – niestosowanego w standardowym schemacie leczenia pooperacyjnego – pozytonową tomografię emisyjną (PET, ang. *positron emission tomography*) lub powtórzyć TK po upływie 3 miesięcy [Szmidt, 2010].

Do oceny wznowy po zabiegach operacyjnych może być pomocna radioimmunoscintygrafia, MRI i PET, która dodatkowo pozwala na wykrycie nowotworu i precyzyjną lokalizację przerzutów [Szczeklik, 2017; Leszczyński, 2012]. Jednak ze względu na duże koszty badania oraz małą ilość skanerów PET w kraju, możliwości stosowania tej metody na szeroką skalę są ograniczone [Szmidt, 2010].

NOWE BADANIA DIAGNOSTYCZNE I DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA

Wraz z rozwojem technik diagnostycznych pojawiają się, obok standardowych badań przesiewowych, również badania molekularne służące m.in. do wykrywania w komórkach nabłonkowych obecnych w kale mutacji niektórych genów (np. protoonkogenu *K-RAS*) lub bardziej zaawansowane metody obrazowe, jak kolonoskopia wirtualna (VD) [Szczeklik, 2017; Bał, 2013]. W związku z mniejszym obciążeniem dla pacjenta, wynikającym ze stosowania VD oraz możliwością wizualizacji miejsc niedostępnych dla endoskopu, technika ta wykazuje przewagę nad tradycyjną kolonoskopią. Jednocześnie zachowuje równie wysoką czułość i swoistość diagnostyczną, co tomografia komputerowa. W przypadku polipów o średnicy powyżej 10 mm czułość obu technik wynosi 90%, a swoistość 100%. Do wykrywania polipów o średnicy mniejszej niż ≤ 5 mm, VD i TK mają mniejsze znaczenie z powodu znacznie niższej czułości diagnostycznej wynoszącej około 59%. Niewątpliwym ograniczeniem VD jest brak możliwości usuwania polipów i pobierania wycinków do badań histopatologicznych ze zmienionych miejsc. Pacjenci poddawani VD eksponowani są również na dwukrotnie wyższą dawkę promieniowania, niż w przypadku tradycyjnej tomografii komputerowej. Ta ostatnia znalazła zastosowanie w przedoperacyjnej ocenie wielkości nowotworu, określaniu stopnia naciekania okolicznych tkanek, czy wykrywaniu przerzutów odległych i w węzłach chłonnych [Szmidt, 2010].

W przyszłości, do śródoperacyjnej oceny błony śluzowej jelita grubego i odpowiedniego doboru marginesu resekcji, pomocna może stać się tomografia

optycznej koherencji (OCT, ang. *optical coherence tomography*). Umożliwia ona zwizualizowanie powierzchni błony śluzowej za pomocą odbijających się od różnych struktur fal podczerwonych [Szmidt, 2010].

Wśród potencjalnie przydatnych badań przesiewowych, wymieniane są inne metody molekularne oceniające DNA komórek nabłonkowych znajdujących się w kale. Zakładają one analizę 21 mutacji związanych z występowaniem raka jelita grubego. Badanie to nie ustępuje czułością FOBT (94,4% vs 95,6%), a charakteryzuje się lepszą skutecznością w wykrywaniu zaawansowanych nowotworów (51,6% vs 13-40%). Kolejną zaletą analizy DNA jest fakt, że do przeprowadzenia badania wystarczy pobranie jednej próbki kału, natomiast do wykonania testu na obecność krwi utajonej niezbędnych jest od 2 do 6 próbek. Wadami badań molekularnych są ich stosunkowo wysokie koszty oraz brak aktualnych zaleceń, co do częstości ich wykonywania [Szmidt, 2010].

2.6. Leczenie polipów jelita grubego

Obecność polipów gruczolakowych jelita grubego wymaga ich endoskopowego usunięcia, a następnie przeprowadzenia specjalistycznego badania mikroskopowego. Polipektomia uważana jest za wystarczającą metodę leczenia gruczolaków i ognisk raka w obrębie gruczolaków ograniczonych do błony śluzowej i podśluzowej potwierdzonych w badaniu histopatologicznym. Zabiegi chirurgiczne, polegające na częściowej resekcji odcinka jelita wraz z okolicznymi węzłami chłonnymi, przeprowadzane są w sytuacjach niedoszczętej polipektomii gruczolaka z rakiem, wysokiego stopnia złośliwości histologicznej polipa oraz w przypadkach naciekania naczyń krwionośnych lub chłonnych [Szmidt, 2010].

Według zaleceń ESGE (ang. *European Society of Gastrointestinal Endoscopy*) z 2013 roku pacjenci po usunięciu gruczolaków jelita powinni być regularnie poddawani kontrolnej kolonoskopii, celem wykrycia potencjalnych zmian nowotworowych [Szczeklik, 2017].

Tabela 8: Schemat wykonywania kontrolnych kolonoskopii po polipektomii [Szmidt, 2010].

Ilość i średnica usuniętych polipów	Częstotliwość wykonywania kolonoskopii
1-2 gruczolaki < 1 cm	po 5-10 latach
≥ 3 gruczolaki lub przynajmniej jeden > 1 cm lub o wysokim histologicznie zaawansowaniu	po 3 latach
> 10 gruczolaków	co 2-3 lata
ocena skuteczności usunięcia gruczolaka nieuszypułowanego	po 2-6 miesiącach

Odpowiednio wczesne wykrycie i usunięcie wszystkich polipów ze światła jelita grubego zmniejsza ryzyko rozwoju raka o 95%, dlatego dużą uwagę przywiązuje się do regularnie wykonywanych badań przesiewowych.

Polipy młodzieńcze (np. zespół polipowatości młodzieńczej), polipy Peutza i Jeghersa, polipy związane z zespołem Cowden i polipy hiperplastyczne zaliczane są do polipów nienowotworowych, które nie podlegają transformacji nowotworowej. Standardowym sposobem postępowania w tych przypadkach jest usunięcie polipów, bez konieczności wykonywania ponadplanowych badań kontrolnych w przyszłości [Szczeklik, 2017].

2.7. Leczenie raka okrężnicy

LECZENIE OPERACYJNE

Podstawowym sposobem postępowania w zaawansowanej postaci operacyjnego raka jelita grubego jest chirurgiczne usunięcie zmiany z marginesem tkanki zdrowej i resekcją regionalnych węzłów chłonnych. W przypadku raków nieoperacyjnych leczenie chirurgiczne wybierane jest ze względu na próbę zwiększenia jakości życia pacjentów.

Dodatkowo, zabieg operacyjny może być poprzedzony neoadiuwantową radio- i/lub chemioterapią, których celem jest zarówno zmniejszenie objętości nowotworu, jak i obniżenie ryzyka powstania nawrotów miejscowych [Szczeklik, 2017; Szmidt, 2010].

Resekcja nowotworu wykonywana jest zwykle tradycyjną metodą laparoskopową lub – w przypadkach niewielkich i dobrze zróżnicowanych nowotworów – metodą endoskopową z dostępu przezodbytnego (TEM, ang. *transanal endoscopic microsurgery*). Jedynie przy występowaniu poważnych przeciwwskazań można odstąpić od leczenia operacyjnego na rzecz radykalnej radioterapii [Szczeklik, 2017; Szmidt, 2010].

Dobór leczenia dostosowywany jest indywidualnie do pacjenta, w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu potwierdzonego przed zabiegiem [Szmidt, 2010].

Tabela 9: Zalecenia dotyczące leczenia operacyjnego raka jelita grubego według *National Cancer Institute* [Szmidt, 2010].

Stopień zaawansowania	Postępowanie
0	polip lub zmiana miejscowa – usunięcie z zachowaniem marginesu cięcia
	brak możliwości usunięcia miejscowego – resekcja fragmentu jelita
I	resekcja fragmentu jelita z zachowaniem szerokiego marginesu cięcia z utworzeniem zespolenia pierwotnego
II	stadium T3 bez dodatkowych czynników ryzyka (tj. bez naciekania naczyń krwionośnych i chłonnych, przebadanie minimum 12 węzłów chłonnych, brak perforacji raka w następstwie leczenia, brak niedrożności jelita i dodatniego marginesu resekcji) – resekcja fragmentu jelita z zachowaniem szerokiego marginesu cięcia z utworzeniem zespolenia pierwotnego oraz rozpatrzenie zasadności włączenia uzupełniającej chemioterapii
	stadium T4 lub T3 z dodatkowymi czynnikami ryzyka – resekcja

	fragmentu jelita z zachowaniem szerokiego marginesu cięcia z utworzeniem zespolenia pierwotnego oraz uzupełniająco chemioterapia lub badania kontrolne
III	resekcja fragmentu jelita z zachowaniem szerokiego marginesu cięcia z utworzeniem zespolenia pierwotnego oraz uzupełniająco chemioterapia
	przerzuty operacyjne w obrębie wątroby i płuc:
	a) resekcja fragmentu jelita połączona z usunięciem przerzutów oraz chemioterapią uzupełniającą lub
	b) przedoperacyjna chemioterapia połączona z resekcją fragmentu jelita, usunięciem przerzutów oraz uzupełniającą chemioterapią lub
IV	c) resekcja jelita z chemioterapią, a następnie usunięcie przerzutów i ponowna chemioterapia
	przerzuty nieoperacyjne w obrębie wątroby i płuc:
	a) chemioterapia oraz ponowne rozpatrzenie możliwości resekcji,
	b) w przypadku niedrożności – resekcja jelita.

W przypadku lokalizacji nowotworu w kątnicy lub okrężnicy wstępującej przeprowadza się hemikolektomię prawostronną, polegającą na wycięciu prawej połowy okrężnicy z późniejszym wytworzeniem zespolenia jelita krętego z poprzeczną.

W przypadku umiejscowienia raka w sąsiedztwie zgięcia wątrobowego okrężnicy stosuje się poszerzoną hemikolektomię prawostronną z usunięciem poprzecznicy.

Hemikolektomię lewostronną przeprowadza się w leczeniu raka okrężnicy zstępującej oraz niektórych przypadków raka esicy. Ciągłość jelita zachowywana jest dzięki chirurgicznemu zespoleniu poprzecznicy z okrężnicą esowatą lub odbytem.

W sytuacji, gdy zmiany nowotworowe znajdują się w okrężnicy poprzecznej bliżej zgięcia wątrobowego stosuje się poszerzoną hemikolektomię prawostronną, a w przypadku lokalizacji bliższej zgięcia śledzionowego poszerzoną hemikolektomię lewostronną.

Nowotwory esicy usuwane są operacyjnie z utworzeniem zespolenia między zstępnicą i odbytnicą, a w przypadkach zajęcia górnego odcinka okrężnicy esowatej przeprowadzana jest hemikolektomia lewostronna [Szmidt, 2010].

Subtotalną kolektomię, polegającą na usunięciu okrężnicy wraz z końcowym odcinkiem krętnicy i górnym odcinkiem odbytnicy, z utworzeniem zespolenia krętniczno-odbytniczego, wykonuje się w przypadku:

- a) synchronicznych raków jelita grubego,
- b) raków metachronicznych, po resekcji fragmentu jelita grubego w przeszłości,
- c) perforacji początkowego odcinka jelita grubego na tle niedrożności,
- d) osób z rodzinną polipowatością gruczolakową jelita grubego – FAP,
- e) niektórych pacjentów z HNPCC [Szmidt, 2010].

LECZENIE UZUPEŁNIAJĄCE

Według aktualnych wytycznych chemioterapia stosowana jest uzupełniająco do leczenia chirurgicznego raków okrężnicy w III i IV oraz niektórych przypadkach II stopnia zaawansowania nowotworu. Dzięki wdrożeniu leczenia uzupełniającego zauważalnie zmniejszała się liczba nawrotów i zgonów pacjentów z 40% do 20%, a odsetek przeżyć 5-letnich wzrastał o 10%. W przypadku chorych z odległymi przerzutami do innych narządów chemioterapia służy jedynie leczeniu paliatywnemu, a w przypadkach niskiego stadium zaawansowania leczenie uzupełniające nie jest w ogóle zalecane. Decyzja o włączeniu cytostatyków do terapii zawsze podejmowana jest indywidualnie przez lekarza po uwzględnieniu stopnia zaawansowania nowotworu i obecności czynników prognostycznych, takich jak:

- a) stan zróżnicowania nowotworu,
- b) obecność nacieków do naczyń krwionośnych, limfatycznych i nerwów,
- c) zwiększona ploidalności DNA komórek,
- d) obecność transkryptu genu kodującego CEA w węzłach chłonnych,
- e) obecności białek P21, TP53 i syntazy tymidylanowej,
- f) obniżona ekspresja genu *DCC* [Szmidt, 2010].

Tabela 10: Leczenie uzupełniające w raku okrężnicy [Szmidt, 2010].

Stopień	Klasyfikacja Dukes'a	Klasyfikacja Astlery-Collera	Zalecany schemat leczenia uzupełniającego
0	-	-	leczenie cytostatykami niezalecane
I	-	-	leczenie cytostatykami niezalecane
II	B	B2	zasadność stosowania chemioterapii adiuwantowej dyskusyjna – decyzja o wdrożeniu leczenia należy do lekarza
III	C	C1-C2	przez 6 miesięcy od operacji 5-FU z kwasem folinowym, kapecytabiną lub oksaliplatyną
IV	-	D	chemioterapia paliatywna (stosowana u osób z dobrym stanem ogólnym) – różne schematy terapii: 5-FU z kwasem folinowym, irynotekan z oksaliplatyną lub kapecytabiną

Najczęściej stosowanym cytostatykiem jest 5-fluorouracyl (5-FU) podawany w skojarzeniu z folinianem wapnia, oksaliplatyną oraz pochodną fluoropirymidyny – kapecytabiną. Folinian wapnia, mimo że sam nie jest cytostatykiem, stosowany jest w terapii dla wzmocnienia działania fluorouracylu. W raku odbytnicy, gdy leczenie operacyjne nie zostanie poprzedzone radioterapią oraz przy niekorzystnym rokowaniu, metodą uzupełniającą jest radiochemioterapia. Z uwagi na złą odpowiedź na leczenie, u pacjentów z HNPCC o fenotypie MSI-H nie stosuje się 5-FU. Natomiast w przypadku nowotworów lokalizowanych w okrężnicy nie wykorzystuje się radioterapii [Szczeklik, 2017; Wronkowski, 2008; Szmidt, 2010].

Leczenie raka z ogniskami metastatycznymi opiera się na terapii fluorouracylem (wraz z folinianem wapnia), w skojarzeniu z hamującym topoizomerazę I irynotekaniem lub oksaliplatyną. Stosowanie chemioterapii ma na celu ograniczenie śmiertelności i wydłużenie czasu przeżycia pacjentów. Terapię cytostatykami kontynuuje się

do momentu zahamowania rozrostu nowotworu i wznawia ją przy każdym nawrocie choroby.

Wskazania do zastosowania chemioterapii w raku jelita grubego:

- a) wysoki stopień zaawansowania nowotworu (T4),
- b) wysoki stopień złośliwości histologicznej (G3),
- c) śródoperacyjna perforacja ściany jelita,
- d) przerzuty do węzłów chłonnych,
- e) niedoszczętna limfadenektomia,
- f) niedrożność jelit [Szczeklik, 2017; Szmidt, 2010].

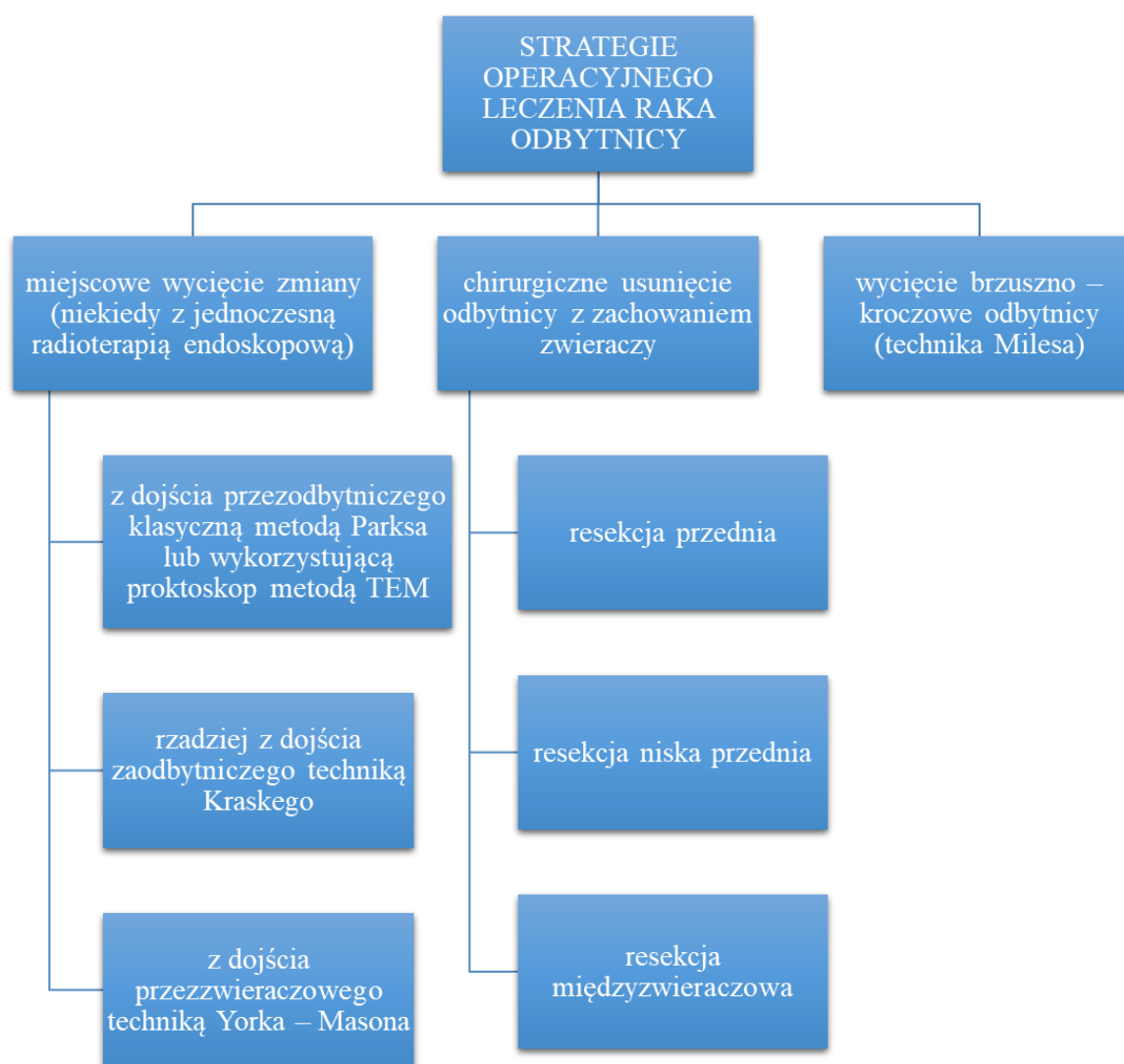
W strategii leczenia uzupełniającego znajduje zastosowanie terapia celowana, która umożliwia blokowanie wybranych szlaków metabolicznych na poziomie molekularnym [Szmidt, 2010]. Zastosowanie znajdują tutaj przeciwciała monoklonalne, takie jak: antagoniści czynnika wzrostu śródbłona naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) np. bewacyzumab czy antagoniści receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor*) np. cetuksymab, panitumumab. Antagoniści VEGF są lekami pierwszego rzutu, łącznie z 5-FU i kwasem folinowym, w przerzutującej postaci raka jelita grubego. W rozsianej postaci nowotworu, przy braku odpowiedzi na leczenie irynotekanem, stosuje się również antagonistów receptorów EGFR. Warunkiem ich podania jest jednak potwierdzenie obecności genu *K-RAS* typu dzikiego oraz wykazanie ekspresji *EGFR* u co najmniej 1% komórek nowotworowych [Szczeklik, 2017; Bal, 2013; Szmidt, 2010].

2.8. Leczenie raka odbytnicy

LECZENIE OPERACYJNE

Z uwagi na różnice w budowie anatomicznej odbytnicy i okrężnicy leczenie nowotworów obu tych odcinków różni się, jednak niezmiennie podstawą terapii jest operacyjne usunięcie zmiany. W przypadku raka odbytnicy sposób postępowania uzależniony jest od jego lokalizacji, stopnia zaawansowania, zróżnicowania histologicznego czy czynników osobniczych [Szmidt, 2010].

Rycina 8: Strategie operacyjnego leczenia raka odbytnicy [Szmidt, 2010].



Wycięcie zmiany miejscowej ma uzasadnienie w przypadkach niewielkich nowotworów do 4 cm, o dużym stopniu zróżnicowania histologicznego (G1-G2) klasyfikowanych w badaniu EUS jako uT1/uT2, uN0. Zmiany operacyjne powinny być również dobrze odgraniczone od okolicznych tkanek, mieścić się do 10 cm od brzegu odbytu (bądź do 20 cm w przypadku metody TEM) i obejmować mniej niż 2/3 obwodu jelita.

W dalszej kolejności pobrane wycinki poddawane są badaniu histopatologicznemu, pod kątem oceny radykalności zabiegu. Przy niesatysfakcjonującej doszczętności zachodzi konieczność wykonania przedniej resekcji odbytnicy bądź operacji techniką Yorka – Masona lub Milesa oraz włączenia adiuwantowej radioterapii. Metodą dającą dobre wyniki leczenia, a stosowaną w różnych stadiach zaawansowania raka odbytnicy, jest napromienianie endokawitarne. Polega ono na skierowaniu na zmiany nowotworowe przy pomocy rektoskopu promieniowania o całkowitej dawce 9-15 Gy w czasie 3-5 sesji naświetleń [Szmidt, 2010].

Leczenie raków umiejscowionych w 1/3 górnej części, odcinka środkowego oraz w niektórych przypadkach dolnej 1/3 części odbytnicy opiera się na chirurgicznym usunięciu odbytnicy z zachowaniem zwieraczy (przednia lub niska przednia resekcja). W takich przypadkach, z wyjątkiem raków Tis, uT1 i uT2, zaleca się dodatkowe podanie przed zabiegiem radio- lub chemioterapii, która poprawia rokowanie i zmniejsza ryzyko wznowy miejscowej [Szmidt, 2010].

Brzuszo-kroczone wycięcie sposobem Milesa przeprowadza się w przypadku zaawansowanych lub niskozróżnicowanych histologicznie raków 1/3 środkowego odcinka odbytnicy lub nowotworów obejmujących 1/3 dolnej części odbytnicy. Zabieg ten stosowany jest obecnie rzadko, a preferowanym sposobem postępowania stały się operacje usunięcia odbytnicy oszczędzające zwieracze [Szmidt, 2010].

W przypadku najniżej umiejscowionych nowotworów alternatywnym sposobem postępowania dla brzuszo-kroczonej resekcji odbytnicy jest resekcja międzyzwieraczowa, która zwiększa komfort życia i pozwala na uniknięcie wytworzenia kolostomii u wybranych pacjentów.

Wskazaniem do zastosowania tego zabiegu jest:

- a) usytuowanie nowotworu w 1/3 dolnej części odbytnicy lub kanale odbytu,
- b) prawidłowy stan czynnościowy zwieraczy i odbytnicy potwierdzony badaniem manometrycznym,
- c) stopień złośliwości histologicznej G1 lub G2 stwierdzony przed operacją,
- d) brak penetracji ściany jelita oraz nacieków nowotworowych na zwieracz zewnętrzny potwierdzony w przezodbytowej ultrasonografii endoskopowej (EAUS, ang. *endoanal ultrasonography*) lub MRI [Szmidt, 2010].

Ze względu na fakt, iż u połowy chorych na raka odbytnicy po wykonanym zabiegu chirurgicznym zachodzi ryzyko wznowy miejscowej lub tworzenia przerzutów odległych konieczne staje się włączenie leczenia adiuwantowego [Szmidt, 2010].

LECZENIE NEOADIUWANTOWE I UZUPEŁNIAJĄCE

U około 5-30% pacjentów pojawiają się wznowy miejscowe w ciągu pierwszych 2 lat od zabiegu. Z tego też względu *National Institutes of Health* rekomenduje stosowanie chemioradioterapii neoadiuwantowej u wszystkich chorych z II^o oraz III^o zaawansowania raka odbytnicy. Włączenie leczenia uzupełniającego zwiększa z 48% do 57% odsetek przeżyć 5-letnich oraz zmniejsza odsetek wznów miejscowych i przerzutów odległych. W rakach zaawansowanych stosowanie radioterapii przed zabiegiem operacyjnym umożliwia miejscową regresję zmian nowotworowych i zwiększa szansę na usunięcie odbytnicy z zachowaniem zwieraczy. Dodatkowo zmniejsza z 30% do 15% ryzyko tworzenia wznów miejscowych, z 22% do 16% ryzyko przerzutów odległych, a w połączeniu z chemioterapią zwiększa odsetek przeżyć 5-letnich. Jednak według wielu badań zastosowanie radioterapii neoadiuwantowej wiąże się z wyższą śmiertelnością po zabiegu oraz większym zagrożeniem powikłaniami [Szmidt, 2010].

Dla zapewnienia czystości pola operacyjnego i miejscowej regresji zmian stosowane są dwie strategie radioterapii neoadiuwantowej:

- a) przez 5-7 dni przed zabiegiem 5 dawek promieniowania po 5,1 Gy (system Sztokholm),
- b) przez 4-6 tygodni przed zabiegiem dawki 1,8 Gy do uzyskania 45,0-50,4 Gy (system przedłużony), często w połączeniu z 5-FU.

Dzięki zastosowaniu schematu przedłużonego udaje się osiągnąć regresję zmian nowotworowych u 30% pacjentów, a u 20% brak komórek rakowych w badaniu histopatologicznym wycinków pobranych podczas zabiegu [Szmidt, 2010].

Z uwagi na możliwość precyzyjnego podania dużych dawek promieniowania, a tym samym na redukcję skutków ubocznych, szczególnie korzystne jest stosowanie radioterapii śródoperacyjnie. Co więcej, oszacowano, że odsetek przeżyć 2-letnich zwiększał się z 35% do 62% w terapii łączącej radioterapię śródoperacyjną z chemioradioterapią neoadiuwantową. Połączenie obu tych metod zapewnia redukcję wielkości raka jeszcze przed zabiegiem oraz pozwala na oczyszczenie pola operacyjnego z komórek nowotworowych i schemat ten powinien być wykorzystywany w przypadku raków miejscowo zaawansowanych [Szmidt, 2010].

Stosowanie radioterapii po zabiegu chirurgicznym znajduje uzasadnienie w przypadku najbardziej zaawansowanych nowotworów naciekających tkankę tłuszczową, naczynia krwionośne, limfatyczne czy dających przerzuty do węzłów chłonnych. Radioterapia pooperacyjna zalecana jest również w przypadku raków histologicznie niskozróżnicowanych (G3), rozrastających się wzdłuż włókien nerwowych lub w następstwie perforacji ściany jelita [Szmidt, 2010].

Tabela 11: Strategie leczenia raka odbytnicy w zależności od stopnia zaawansowania wg *National Cancer Institute* [Szmidt, 2010].

Stopień	Sposób leczenia
0	mięscowe wycięcie nowotworu lub operacja przezbrzuszną
I	mięscowe wycięcie nowotworu przy braku niekorzystnych czynników rokowniczych lub mięscowe wycięcie nowotworu połączone z chemioradioterapią lub operacja przezbrzuszną
II	przedoperacyjna chemioradioterapia z późniejszym leczeniem operacyjnym i chemioterapią adiuwantową lub operacja z późniejszą chemioradioterapią
III	taki sam sposób leczenia jak w II ^o
IV	przedoperacyjna chemioradioterapia z późniejszą resekcją odbytnicy, wycięciem przerzutów i chemio- lub radioterapią adiuwantową lub przedoperacyjna chemio- lub radioterapia z późniejszą resekcją odbytnicy, wycięciem przerzutów i chemioterapią adiuwantową

Chemioterapia neoadiuwantowa jest istotna z tego względu, iż zapewnia eliminację komórek nowotworowych tworzących przerzuty na bardzo wczesnym etapie. Jej zastosowanie pozwala na uniknięcie interwencji chirurgicznej u osób z wczesną postacią choroby, jak i na ocenę odpowiedzi pacjenta na podane chemioterapeutyki. Znajduje ona szczególne uzasadnienie w przypadku chorych z nowotworami na granicy ich resekcyjności oraz zmianami zakwalifikowanymi początkowo jako nieresekcyjne, u których doszło do pozytywnej odpowiedzi na chemioterapię umożliwiającą zastosowanie leczenia miejscowego. Interwencja chirurgiczna przeprowadzana jest w momencie remisji choroby pozwalającej na skuteczną resekcję, jednak nie później niż 3-4 miesiące od włączenia chemioterapii [Szmidt, 2010].

W przypadku nowotworów odbytnicy o III i IV stopniu zaawansowania rutynowo stosowana jest chemioterapia adiuwantowa. Podobny schemat leczenia uzupełniającego zaleca się w przypadku nowotworów o II stopniu zaawansowania zlokalizowanych w pobliżu załamka otrzewnej lub niżej, u których stwierdzono dodatni margines chirurgiczny, nacieki mięśniówki właściwej, naczyń krwionośnych

i limfatycznych lub niski stopień zróżnicowania histologicznego raka [Szmidt, 2010].

W postępowaniu paliatywnym stosowana jest jedynie radioterapia oraz zabiegi chirurgiczne udrażniające światło jelita i poprawiające komfort życia pacjenta [Szmidt, 2010].

Odsetek przeżyć 5-letnich według *Surveillance Epidemiology and End Results* nie różni się znaczenie w przypadku raków okrężnicy i odbytnicy, a dane te zostały zestawione w Tabeli 12.

Tabela 12: Odsetek przeżyć 5-letnich chorych na raka okrężnicy i odbytnicy wg *Surveillance Epidemiology and End Results* (2010) [Szmidt, 2010].

Stopień zaawansowania	Odsetek przeżyć 5-letnich [%]	
	rak okrężnicy	rak odbytnicy
I	74	74
II A	67	64
II B	59	52
II C	37	32
III A	73	74
III B	46	45
III C	28	33
IV	6	6

Rutynowym sposobem postępowania w przypadku miejscowego nawrotu choroby jest włączenie radioterapii i ponowne chirurgiczne usunięcie nowotworu. Niekiedy resekcja poszerzana jest o takie narządy jak pochwa, pęcherz moczowy czy kość krzyżowa, co pozwala na zwiększenie szansy skutecznego wyleczenia do około 25%. Z kolei usunięcie przerzutów odległych w wątrobie lub płucach w połączeniu z chemioterapią wysoce zwiększa odsetek przeżyć 5-letnich z 25% do 40% [Szmidt, 2010].

2.9. Profilaktyka

Ze względu na niski odsetek przeżyć 5-letnich w Polsce wynoszący ok. 40% (na świecie 50-60%), a będący konsekwencją zbyt późnej diagnostyki, istotne jest wprowadzenie odpowiednich działań zapobiegających powstawaniu raka jelita grubego oraz wykonywanie rutynowych badań przesiewowych umożliwiających wykrycie nowotworu lub jego wznowy na wczesnym etapie [Szczeklik, 2017].

Podstawowym działaniem w profilaktyce raka jelita grubego jest zmiana stylu życia. Szczególnie ważne jest stosowanie się do zaleceń dietetycznych. Odpowiednio zbilansowana dieta zakłada redukcję spożycia czerwonego mięsa bogatego w cholesterol i nasycone kwasy tłuszczowe, na rzecz większej podaży składników roślinnych. Pokarmy pochodzenia roślinnego są zasobne w antyoksydanty i błonnik, który skraca czas kontaktu błony śluzowej jelita z kancerogenami obecnymi w kale. Zasobne w błonnik są przede wszystkim produkty pełnoziarniste, a także owoce i warzywa. Te ostatnie są również bogate w przeciwutleniacze np. witaminy A, C i E, składniki mineralne np. selen oraz polifenole [Bał, 2013; Wronkowski, 2008; Partyka, 2010]. Protekcyjnie działa również wapń dostarczany z pożywieniem [Szmidt, 2010]. Dodatkowo kurkumina, będąca produktem ekstrakcji kłączy ostryżu długiego, zapobiega rozwojowi raka jelita grubego poprzez inhibicję COX-2, a w konsekwencji całego procesu zapalnego [Bał, 2013; Wronkowski, 2008].

Ponadto zalecana jest zmiana sposobu obróbki termicznej produktów polegająca na zastępowaniu potraw smażonych, pieczonych czy wędzonych daniami gotowanymi lub przygotowanymi na parze.

Dużą rolę odgrywa jakość artykułów spożywczych. Należy wykluczyć z diety produkty przetworzone i nieświeże. Szczególnie niebezpieczne są spleśniałe produkty, będące źródłem dużych ilości mykotoksyn o silnych właściwościach mutagennych. W parze ze zbilansowaną dietą powinna iść regularna aktywność fizyczna zapobiegająca nadmiernemu przybieraniu masy ciała i występowaniu chronicznych zaparć [Bał, 2013; Wronkowski, 2008]. Liczne badania sugerują, że systematyczna aktywność fizyczna obniża o 25% ryzyko rozwoju raka jelita grubego [Rawla, 2019]. O dużym znaczeniu czynników środowiskowych, może świadczyć fakt zrównywania się częstości występowania raka jelita grubego u osób emigrujących z krajów o niższej do krajów o wyższej zachorowalności [Yamada, 2006].

Rutynowym postępowaniem profilaktycznym jest również wykonanie kompletnej kolonoskopii najpóźniej do roku, a następnie w 3 i 5 roku od wykonanej operacji, celem wykluczenia innych potencjalnych ognisk raka. Pacjentów po operacji poddaje się badaniom kontrolnym od dwóch do czterech razy w przeciągu roku przez pierwsze 2 lata po przeprowadzonym zabiegu, a następnie rzadziej do 5 roku po interwencji chirurgicznej.

W monitorowaniu leczenia wiele organizacji np. *American Society of Clinical Oncology*, *National Academy of Clinical Biochemistry* czy *European Group on Tumor Markers* rekomenduje oznaczanie poziomu antygenu rakowo-płodowego CEA w surowicy krwi co 2-3 miesiące przez minimum 3 lata od zabiegu oraz rokroczne wykonywanie TK lub USG wątroby i RTG klatki piersiowej [Szczeklik, 2017; Solnica, 2014].

Do działań profilaktycznych zaliczane jest również stosowanie niektórych farmaceutyków. W redukcji zapadalności i umieralności z powodu raka jelita grubego (nawet o 40-50%) pomocna może być systematyczna suplementacja niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ) – kwasem acetylosalicylowym lub sulindakiem. NLPZ hamują cyklooksygenazę typu 2 (COX-2) katalizującą syntezę zaangażowanych w proces zapalny prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanów. Sulindak zmniejsza liczbę i wielkość polipów u pacjentów z rodzinną polipowatością gruczolakowatą. Jednakże z uwagi na niejednoznaczny bilans zysków i strat (tj. zapobieganie raka vs. zwiększone ryzyko krwawień z przewodu pokarmowego) nie stosuje się rutynowo suplementacji NLPZ w prewencji raka jelita grubego.

Zmniejszone ryzyko zachorowania na raka jelita grubego zaobserwowano także u kobiet objętych hormonalną terapią zastępczą. Jednak należy pamiętać, że efektem niepożądanym wieloletniego przyjmowania hormonów może być zwiększone ryzyko rozwoju choroby zakrzepowo-zatorowej, nowotworów piersi, trzonu macicy oraz powikłań ze strony układu krążenia [Szczeklik, 2017; Wronkowski, 2008; Tobias, 2013].

Niektóre badania wskazują na korzystny wpływ stosowanych w leczeniu osteoporozy doustnych bisfosfonianów (BPs, ang. *bisphosphonates*). BPs inicjują odpowiedź immunologiczną przeciwko komórkom nowotworowym, hamują angiogenezę, inwazję i adhezję komórek raka jelita grubego.

Zmniejszenie ryzyka rozwoju raka jelita grubego przypisuje się również statynom i inhibitorom konwertazy angiotensyny (ACEI, ang. *angiotensin-converting enzyme*

inhibitors) [Rawla, 2019].

3. Szlak sygnałowy TGF- β

Szlak sygnałowy TGF- β pełni bardzo ważną funkcję w embriogenezie oraz homeostazie komórkowej [Itatani, 2019; Hata, 2016]. Zaangażowany jest w wiele procesów biologicznych, zaczynając od kontroli wzrostu, różnicowania czy migracji komórek, a kończąc na procesie apoptozy [Zhao, 2018; Hata, 2016].

Nadrodzina szlaku sygnalizacyjnego TGF- β obejmuje 40 różnych białek. Zalicza się do tej grupy między innymi białko syntetyzowane w komórkach węzła zarodkowego (nodal, ang. *nodal growth differentiation factor*), aktywiny, białka morfogenetyczne kości (BMPs, ang. *bone morphogenic proteins*), czynniki różnicowania wzrostu (GDFs, ang. *growth and differentiation factors*), hormon antymüllerowski (AMH ang. *anti-Müllerian hormone*) czy białka TGF- β [Zhao, 2018; Liu, 2017; Walton, 2017].

Poszczególne cytokiny, przy udziale specyficznych receptorów transbłonowych oraz białek SMAD, mogą przekazywać sygnał do jądra komórkowego i regulować ekspresję poszczególnych genów [Hata, 2016; Yan, 2017].

Wyróżnia się trzy typy białek receptorowych typu I (T β R-I), typu II (T β R-II) oraz typu III (T β R-III). T β R-I i II posiadają w swojej budowie domenę wiążącą ligand, region transbłonowy oraz cytoplazmatyczną domenę o aktywności kinazy serynowo-treoninowej [Wrana, 1994; Chen, 2020]. Koreceptor T β R-III pozbawiony jest właściwości enzymatycznej [Talar, 2013]. Pełni natomiast rolę regulacyjną w szlaku polegającą na zwiększaniu dostępności pozostałych receptorów dla ligandów [Chen, 2020; Stalińska, 2005].

Tabela 13: Receptory i ligandy szlaku sygnałowego TGF- β [Zakrzewski, 2012].

Receptor	Ligand
RECEPTORY TYPU I	
ALK1	TGF- β 1, TGF- β 3, aktywina A, BMP-9
ALK2	TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, aktywina A, BMP-6, BMP-7, AMH
ALK3 (BMPR1A)	BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7
ALK4	GDF-1, GDF-11, aktywina A, nodal
ALK5 (T β R-I)	TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3
ALK6	GDF-5, GDF-6, GDF-9b, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, AMH
ALK7	nodal
RECEPTORY TYPU II	
ACVR2A	aktywina A, inhibina A, inhibina B, BMP-2, BMP-6, BMP-7, GDF-1, GDF-5, GDF-8, GDF-9b, GDF-11
ACVR2B	aktywina A, inhibina A, inhibina B, BMP-2, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-8, GDF-11, nodal
BMPR2	BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-6, GDF-9b
AMHR2	AMH
T β R-II	TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3
RECEPTORY POMOCNICZE	
T β R-III	TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, inhibina, BMP-2, BMP-4, BMP-7, GDF-5
ENDOGLINA (CD105)	TGF- β 1, TGF- β 3, aktywina A, BMP-2, BMP-7
CD109	TGF- β 1, TGF- β 3

SZLAK SYGNAŁOWY ZALEŻNY OD BIAŁEK SMAD

Transdukcja sygnału rozpoczyna się od przyłączenia dimerycznego ligandu do domeny wiążącej T β R-II znajdującego się na powierzchni błony komórkowej, co zapoczątkowuje proces aktywacji domeny kinazowej tego receptora. Dzięki zwiększeniu powinowactwa do receptora typu I tworzony jest heterotetramer zbudowany z dwóch cząsteczek T β R-II oraz dwóch T β R-I [Liu, 2017; Talar, 2013]. W następstwie fosforylacji przez T β R-II bogatej w reszty glicyny i seryny domeny GS receptora typu I angażowane są cytoplazmatyczne białka z rodziny SMAD [Hata, 2016; Liu, 2017; Itatani, 2019; Wrana, 1994]. W budowie tych białek można wyróżnić dwie konserwatywne domeny. Domena MH1 znajduje się na N-końcu i wykazuje zdolność wiązania DNA, podczas gdy C-końcowa domena MH2 bierze udział w oddziaływaniach z innymi białkami [Yan, 2017]. Receptorowe kinazy fosforylują dwie reszty serynowe (Ser) znajdujące się w obrębie C-końcowej domeny MH2 białek SMAD aktywowanych przez receptor (R-SMADs, ang. *receptor-regulated SMADs*) [Zhao, 2018].

W przypadku przyłączenia do receptora typu I (TGFR1, ACVR1B, ACVR1C) ligandów, takich jak TGF- β , aktywiny lub białko nodal, fosforylacji ulegają białka SMAD-2 oraz SMAD-3, które łączą się z białkiem pośredniczącym SMAD-4 (Co-SMAD, ang. *co-operating SMAD*). Z białkiem Co-SMAD wiążą się również pozostałe białka R-SMAD, tj. SMAD-1, SMAD-5, SMAD-8, które przekazują sygnał pochodzący od białek BMPs i GDFs za pośrednictwem receptorów: ACVRL1, ACVR1, BMPR1A i BMPR1B [Zhao, 2018; Ramachandran, 2018]. Powstały kompleks, składający się z dwóch białek R-SMAD oraz jednej cząsteczki Co-SMAD, wnika do jądra komórki, gdzie oddziałując z białkami wiążącymi DNA oraz transkrypcyjnymi koaktywatorami i korepresorami reguluje ekspresję genów docelowych [Liu, 2017; Itatani, 2019; Hata, 2016].

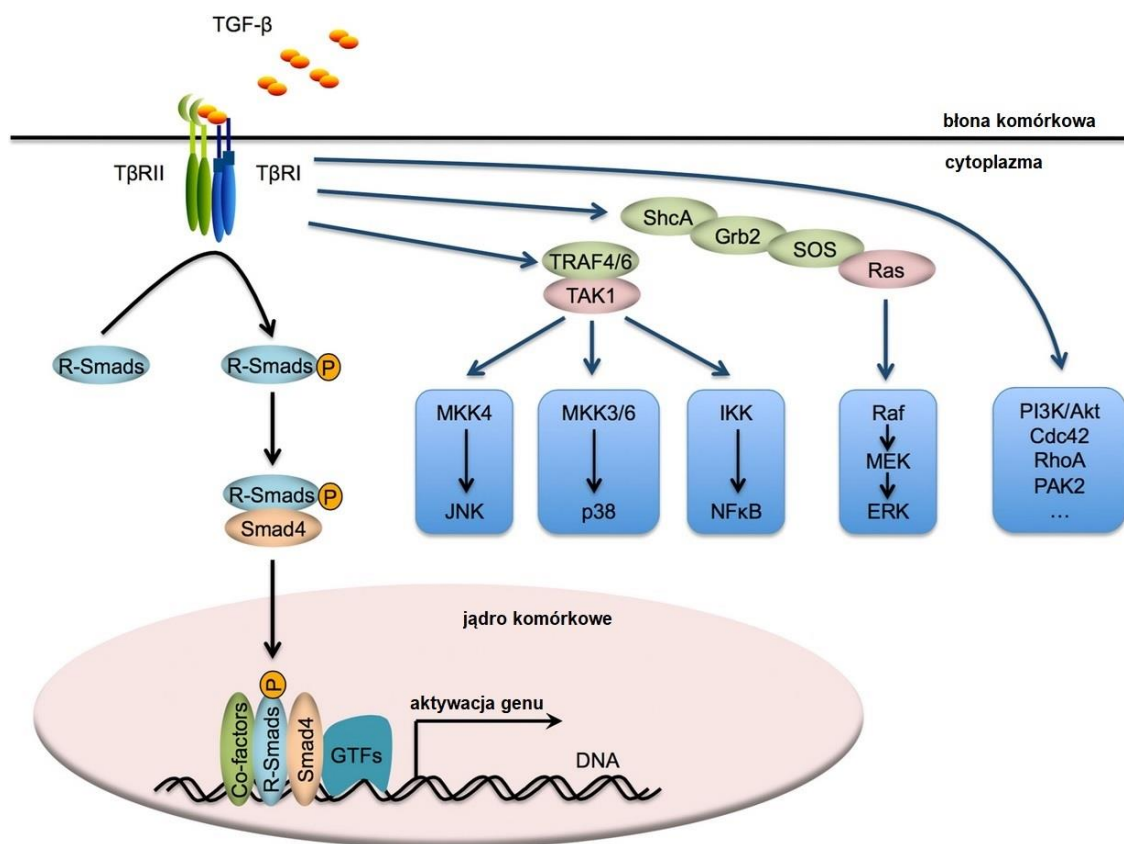
Kompleksy białkowe R-SMAD/Co-SMAD transportowane są do jądra, gdzie regulują transkrypcję docelowych genów. Białka SMAD-2, SMAD-3 i SMAD-4 poprzez N-końcową domenę MH1 przyłączają się w obrębie DNA do specyficznej sekwencji AGAC lub GTCT określane mianem SBE (ang. *SMAD-binding element*). Z kolei białka SMAD-1-5 oraz SMAD-8 mogą wiązać się domeną MH1 do fragmentów bogatych

w pary zasad GC. Dodatkowo, R-SMAD łącząc się C-kończową domeną MH2 z białkami remodelującymi chromatynę rozpoznają modyfikacje histonów i sprzyjają powstawaniu euchromatyny niezbędnej dla ekspresji genów. R-SMAD mogą także regulować proces syntezy miRNA oddziałując z kompleksem enzymatycznym Drosha [Hata, 2016; Itatani, 2019; Hill, 2016].

SZLAKI SYGNAŁOWE NIEZALEŻNE OD BIAŁEK SMAD

Poza klasycznym szlakiem, ligandy nadrodziny TGF- β mogą angażować również białka należące do innych ścieżek sygnałowych, w których regulacja ekspresji genów zachodzi z pominięciem białek SMAD. Za pośrednictwem receptorów TGF- β oraz receptorów białka morfogenetycznego kości rekrutowane są szlaki kinaz aktywowanych mitogenami (MAPKs, ang. *mitogen-activated protein kinases*) oraz kinaz 3-fosfatydylinozytolu (PI3Ks, ang. *phosphoinositide 3-kinases*) [Hata, 2016]. Receptory TGF- β po związaniu z TRAF6 (ang. *TNF receptor-associated factor 6*) aktywują białko TAK1 (ang. *TGF- β -associated kinase 1*), który uruchamia kaskady sygnalizacyjne MKK4 – JNK, MKK3/6 – p38 oraz IKK – NF κ B. Za ich pośrednictwem dochodzi również do przekazywania sygnału do innych cząsteczek sygnalizacyjnych, jak PAR6, RhoA, Cdc42 czy PAK2 istotnych w procesie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego [Yan, 2017; Talar, 2013].

Rycina 9: Szlak sygnałowy TGF- β [Yan, 2017].



Podobnie jak inne ścieżki sygnałowe, również szlak TGF- β podlega wielopoziomowej regulacji. Dostępność receptorów dla ligandów może być ograniczana za pośrednictwem zewnątrzkomórkowych białek wiążących ligand. Wśród nich wymienia się białko noggin czy Gremlin-1, które są antagonistami BMP oraz lefty blokujący wiązanie białek nodal z receptorami. Zmniejszony poziom ekspresji receptorów, lokalizacja na powierzchni komórki oraz ich modyfikacje potranslacyjne (np. ubiquitynacja) również mogą wpływać na zdolność rozpoznawania ligandów bądź na samą aktywność enzymatyczną kinaz. Obecność białkowej fosfatazy-1 (PP1) pozbawia T β R-I grup fosforanowych związanych z seryną lub treoniną, co powoduje zahamowanie przekazywania sygnałowego. Receptory mogą być również blokowane przez białko FKBP12 (ang. *FK506-binding protein*) oraz pseudoreceptor BAMBI (ang. *bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor*), które uniemożliwiają formowanie heterotetrameru receptorowego T β R-I/T β R-II [Itatani, 2019; Hata, 2016].

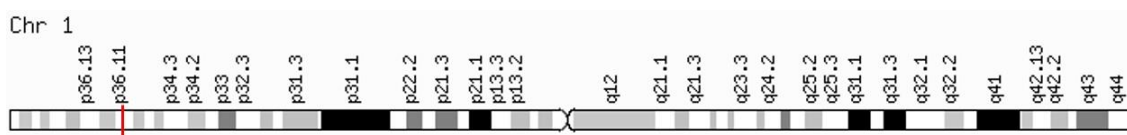
W samej rodzinie białek SMAD wyróżnia się również proteiny inhibitorowe (I-SMADs, ang. *inhibitory SMADs*). Zaliczane do tej grupy białka SMAD-6 oraz SMAD-7 mogą hamować szlak TGF- β , poprzez blokowanie fosforylacji białek R-SMAD przez T β R-I i uniemożliwiać w ten sposób powstawanie kompleksu R-SMAD/Co-SMAD. Podobne działanie wykazują białka STRAP (ang. *serine-threonine kinase receptor-associated protein*) oraz SIK (ang. *salt-inducible kinase*), które promują wiązanie SMAD-7 do ufosforylowanego T β R-I [Itatani, 2019; Hata, 2016].

Kompleks R-SMAD/Co-SMAD może ulegać degradacji na drodze ubiquitynacji. Ubiquityna może być również przyłączana do T β R-I. Proces ten jest jednak odwracalny, a ubiquityna może być usuwana z receptora dzięki C-końcowej hydrolazie ubiquityny (UCH37, ang. *ubiquitin C-terminal hydrolase*) oraz proteazom specyficznym dla ubiquityny: USP4, USP11 oraz USP15 (ang. *ubiquitin-specific protease 4, 11, 15*) [Itatani, 2019; Hata, 2016].

4. Gen *RUNX3* i jego produkt białkowy

Gen *RUNX3* (ang. *RUNX family transcription factor 3*) znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 1 w pozycji p36.11. Zbudowany jest z 65,6 kpz obejmujących 7 eksonów [<https://linkd.pl/ar7d>].

Rycina 10: Lokalizacja genu *RUNX3* [<https://linkd.pl/ar7d>].

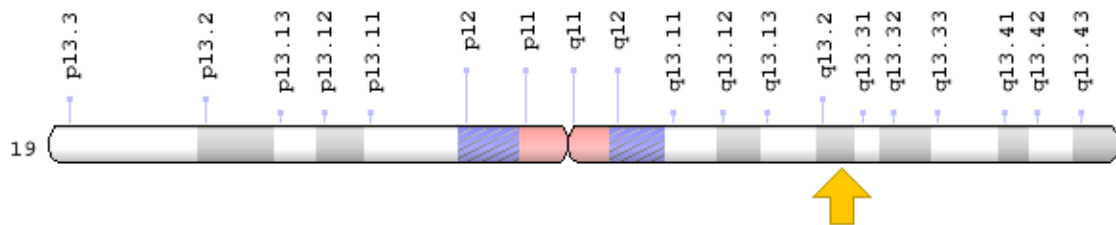


Potranslacyjny produkt genu *RUNX3* ma masę molekularną 44,4 kDa i zbudowany jest z 415 aminokwasów, z czego 128 przypada na aminokwasową domenę Runt. Białko *RUNX3* (ang. *runt-related transcription factor 3*) zaliczane jest do czynników transkrypcyjnych, ponieważ może przyłączać się domeną Runt do specyficznych sekwencji 5'-TGTGGT-3' lub 5'-TGCGGT-3' znajdujących się w obrębie promotorów i wzmacniaczy genów. Może również kooperować z innymi czynnikami transkrypcyjnymi. Dodatkowo *RUNX3* jest ważnym czynnikiem w dojrzewaniu limfocytów T i kościotworzeniu [<https://linkd.pl/ar7d>; <https://linkd.pl/ar7e>].

5. Gen *TGFB1* i jego produkt białkowy

Gen kodujący *TGFB1* (ang. *transforming growth factor β -1*) zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 19 o lokalizacji genomowej 19q13.2. Składa się z 7 eksonów i 6 intronów o łącznej długości 52,3 kpz [Derynck, 1987; Stalińska, 2005].

Rycina 11: Lokalizacja genu *TGFB1* [<https://linkd.pl/ar7f>].



Kodowane przez gen białko ma masę cząsteczkową wynoszącą 44,3 kDa i zbudowane jest z 390 aminokwasów. Produktem ekspresji genu jest pro-TGF- β , czyli prekursor białka LAP (ang. *latency associated peptide*) oraz transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) zaliczanego do ligandów nadrodziny TGF- β (ang. *transforming growth factor β*) [Robertson, 2016; Stalińska, 2005]. Białko prekursorowe zostaje proteolitycznie rozdzielone między dwoma aminokwasami w pozycjach 278 i 279 tworząc dojrzałą cząsteczkę TGF- β oraz LAP [Stalińska, 2005].

Wyróżnia się trzy izoformy transformującego czynnika wzrostu β : TGF- β 1, TGF- β 2 oraz TGF- β 3, które w 64-82% wykazują homologię sekwencji aminokwasowych. Wszystkie są homodimerycznymi polipeptydami o masie cząsteczkowej wynoszącej 25 kDa i zbliżonej budowie strukturalnej. Pomimo tego, poszczególne izoformy charakteryzują się odmiennym powinowactwem do T β R-II. Izoformy TGF- β 1 i TGF- β 3 mają z nim silniejsze koligacje w odróżnieniu od TGF- β 2 [Zi, 2019; Chen, 2020]. Co więcej, TGF- β 1 wykazuje także powinowactwo do receptorów typu I: Alk1, Alk2, Alk5 oraz T β R-III [Zakrzewski, 2012].

W przestrzeni zewnątrzkomórkowej cytokiny występują w postaci nieaktywnej, związanej niekowalencyjnie z homodimerem LAPs, tworząc tzw. mały kompleks latentny (SLC, ang. *small latency complex*) niezdolny do łączenia się z białkami receptorowymi. Często do kompleksu SLC przyłącza się dodatkowo białko LTBP (ang. *latent TGF- β binding protein*) formując tym samym tzw. duży kompleks latentny (LLC, ang. *large latency complex*). Obecność kompleksów sprawia, że w przestrzeni zewnątrzkomórkowej często występuje nadmiar nieaktywnego TGF- β , który może zostać szybko wykorzystany w razie zwiększonego zapotrzebowania, np. w czasie embriogenezy, podczas gojenia ran, włóknienia czy kancerogenezy. Aktywacja cytokiny w warunkach *in vitro* następuje pod wpływem zmiany pH, termicznej denaturacji, działania ROS (ang. *reactive oxygen species*), interakcji z trombospondyną-1 (TSP1, ang. *thrombospondin-1*), trombiną czy metaloproteinazami np. MMP-2. Zaobserwowano również *in vivo* wpływ integryn na uwalnianie TGF- β z SLC [Yan, 2017].

TGF- β jest jedną z najważniejszych cytokin w regulacji rozwoju tkanek oraz homeostazie. Uwalniana jest głównie przez trombocyty oraz w mniejszym stopniu przez aktywowane makrofagi, limfocyty i granulocyty obojętnochłonne. Szczególnie duże stężenia TGF- β stwierdza się w miejscu toczącej się reakcji zapalnej. Bierze czynny udział w procesach kościotwórczych, angiogenezie, rozwoju tkanki mięśniowej i tłuszczowej, stanach zapalnych czy gojeniu ran. Dysfunkcje białka kojarzone są z chorobami zwłóknieniowymi, patologiami tkanki łącznej oraz nowotworami [Zi, 2019; Walton, 2017; Stalińska, 2005; Stępień-Wyrobiec, 2008; <https://linkd.pl/ar7f>].

6. Gen ACVR2A i jego produkt białkowy

Gen *ACVR2A* (ang. *activin A receptor type 2A*) znajduje się na długim ramieniu 2 chromosomu w pozycji q22.3-q23.1. Gen składa się z 12 eksonów a jego całkowita długość sekwencji wynosi 86,3 kpz [<https://linkd.pl/arm>].

Białko kodowane przez gen tworzy 513 aminokwasów o łącznej masie cząsteczkowej wynoszącej 57,9 kDa i należy do rodziny transbłonowych receptorów $T\beta R$ -II pośredniczących w przekaznictwie sygnału w szlaku $TGF-\beta$ [<https://linkd.pl/arm>].

Rycina 12: Lokalizacja genu *ACVR2A* [<https://linkd.pl/arm>].



Receptor *ACVR2A* stanowi ligand dla takich cytokin jak aktywina A, inhibina A i B, BMP-2, BMP-6, BMP-7, GDF-1, GDF-5, GDF-8, GDF-9b, GDF-11. Jego funkcją fizjologiczną, podobnie jak pozostałych receptorów $T\beta R$ -II, jest fosforylacja receptorów $T\beta R$ -I umożliwiających aktywację cytoplazmatycznych białek mediatorowych [Zakrzewski, 2012; <https://linkd.pl/arm>]. Białka te przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie we współpracy z koaktywatorami transkrypcyjnymi, jak CBP i p300, aktywują lub wyciszają ekspresję genów o wielu funkcjach biologicznych (np. wpływających na apoptozę czy proliferację komórkową). Stąd istnieją przesłanki, że gen *ACVR2A* wpływa na proces kancerogenezy a spadek ekspresji tego genu może sprzyjać progresji raka jelita grubego i tworzeniu przerzutów odległych. O ważnej roli tego genu w kancerogenezie może dowodzić fakt, że mutacje w obrębie *ACVR2A* są powszechne i stwierdzone aż u 60% pacjentów z rakiem jelita grubego. Co więcej, uważa się, że gen ten może być w przyszłości wykorzystywany

do celów prognostycznych, a nawet stać się celem terapeutycznym [Zhuo, 2018].

CZEŚĆ PRAKTYCZNA

7. Cel pracy

1. Ocena znaczenia wybranych czynników szlaku TGF- β – genów *ACVR2A*, *TGFB1* oraz *RUNX3* w patogenezie raka jelita grubego.
2. Określenie względnych poziomów ekspresji genu *ACVR2A*, *TGFB1* oraz *RUNX3* w tkankach pacjentów z rakiem jelita grubego.
3. Porównanie względnych poziomów ekspresji genu *ACVR2A*, *TGFB1* oraz *RUNX3* z cechami demograficzno-patologicznymi, takimi jak:
 - a) wiek, płeć i wywiad rodzinny pacjentów,
 - b) lokalizacja nowotworu,
 - c) wielkość i głębokość naciekania ściany jelita,
 - d) obecność przerzutów do węzłów chłonnych,
 - e) obecność przerzutów odległych,
 - f) stopień zaawansowania klinicznego TNM,
 - g) stopień zaawansowania klinicznego wg Astlera-Collera,
 - h) stopień złośliwości histologicznej,
 - i) podtyp histopatologiczny,
 - j) zajęcie naczyń krwionośnych przez komórki nowotworowe,
 - k) obecność nacieku limfocytarnego oraz
 - l) czas przeżycia pacjentów.
4. Ocena jakościowa metylacji wysp CpG regionu promotorowego genu *TGFB1* oraz analiza korelacji uzyskanych wyników z wyżej wymienionymi cechami demograficzno-patologicznymi.

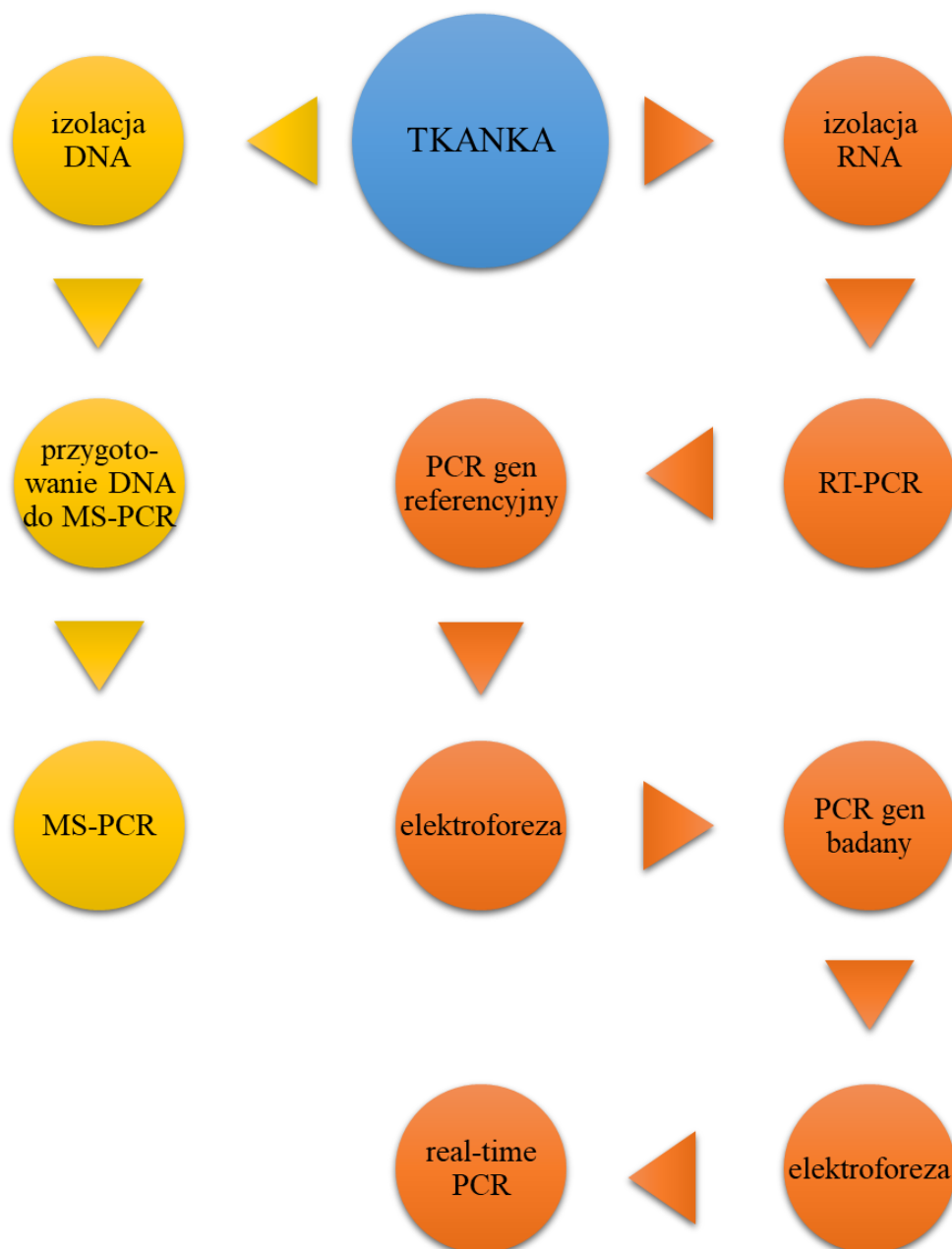
8. Materiał

Do badań wykorzystano archiwalne i zanonimizowane fragmenty tkankowe pochodzące od pacjentów z rakiem jelita grubego otrzymane z Zakładu Patologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Wszystkie próby zostały pobrane podczas operacji usunięcia raka, a obecność komórek nowotworowych potwierdzona w badaniu histopatologicznym. Tkanki pochodzące od 84 pacjentów zostały natychmiast po pobraniu zamrożone w ciekłym azocie i przechowywane w -80°C do czasu dalszych analiz.

Wszyscy pacjenci wyrazili świadomą zgodę na wykorzystanie otrzymanego materiału do celów naukowych. Badania przeprowadzono na podstawie zgód Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o numerach: RNN/214/00 (z trzema poprawkami: KE/223/03, KE/286/05, KE/813/07), RNN/8/08/KE oraz RNN/83/20/KE.

9. Metodyka

Celem przeprowadzenia analiz wykonano ciąg czynności zgodnie z poniższym schematem. W trakcie badań optymalizowano poszczególne metody dla zwiększenia ich efektywności.



9.1 Izolacja DNA

Metoda, która posłużyła do tego celu zakładała wykorzystanie źróź krzemionkowych o wysokim powinowactwie do DNA przy wysokim stężeniu soli chaotropowych. Izolacja DNA z fragmentów tkankowych została wykonana zgodnie z protokołem *Genomic Mini* dostarczonym przez firmę *A&A Biotechnology* (Polska):

1. Defragmentacja 10-15 mg tkanki w probówce typu Eppendorf o pojemności 1,5 mL przy użyciu 100 μ L buforu Tris, 50 μ L roztworu lizującego LT oraz 20 μ L proteinazy K.
2. Wortexowanie mieszaniny i inkubacja w 50°C do momentu osiągnięcia pełnej lizy komórek.
3. Dodanie 150 μ L roztworu lizującego LT i wymieszanie całości przez wortexowanie przez 20 sekund.
4. Wirowanie przez 3 minuty przy 10-15 tysiącach RPM.
5. Przeniesienie płynu nadosadowego po odwirowaniu na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA.
6. Wirowanie przez 1 minutę przy 10-15 tysiącach RPM.
7. Odpipetowanie do minikolumny 500 μ L roztworu płuczącego A1.
8. Wirowanie przez 1 minutę przy 10-15 tysiącach RPM.
9. Przeniesienie minikolumny do nowej probówki o pojemności 2 mL i dodanie 400 μ L roztworu płuczącego A1.
10. Wirowanie przez 2 minuty przy 10-15 tysiącach RPM.
11. Umieszczenie minikolumny w probówce elucyjnej o pojemności 1,5 mL i naniesienie na złoże krzemionkowe 200 μ L buforu Tris lub jałowej wody, które zostały uprzednio ogrzane do temperatury 75°C.
12. Inkubowanie w temperaturze pokojowej przez 5 min.
13. Wirowanie przez 1 minutę przy 10-15 tysiącach RPM.
14. Usunięcie minikolumny i przeniesienie probówki elucyjnej zawierającej DNA do temperatury –20°C do czasu dalszych analiz.

9.2 Izolacja RNA

Całkowite RNA wyizolowano z zamrożonych fragmentów tkankowych raka jelita grubego zgodnie z protokołem *Total RNA Mini (A&A Biotechnology, Polska)*:

1. Rozdrobnienie 20-50 mg tkanki za pomocą ciekłego azotu i przeniesienie do probówki Eppendorf 1,5 mL.
2. Dodanie do rozdrobnionej tkanki 800 μ L fenozolu i wymieszanie roztworu przez pipetowanie do osiągnięcia pełnej lizy komórek.
3. Inkubacja w temperaturze 50°C przez 5 min.
4. Dodanie do lizatu 200 μ L chloroformu i wymieszanie całości przez kilkukrotne obracanie probówki.
5. Inkubacja w temperaturze pokojowej przez 3 min a następnie wirowanie przez 10 min przy 10-12 tysiącach RPM.
6. Przeniesienie górnej warstwy supernatantu (ok. 450 μ L) do nowej probówki Eppendorf o pojemności 1,5 mL i dodanie do niej 250 μ L izopropanolu.
7. Wymieszanie i naniesienie całości na minikolumnę do oczyszczania RNA.
8. Wirowanie przez 1 minutę przy 10-12 tysiącach RPM.
9. Przeniesienie minikolumny do nowej probówki o pojemności 2 mL i dodanie 700 μ L roztworu płuczącego A1.
10. Wirowanie przez 1 minutę przy 10-12 tysiącach RPM.
11. Wylanie przesączu i ponowne umieszczenie minikolumny w probówce.
12. Naniesienie na minikolumnę 700 μ L roztworu płuczącego A1.
13. Wirowanie przez 1 minutę przy 10-12 tysiącach RPM.
14. Wylanie przesączu i ponowne umieszczenie minikolumny w probówce.
15. Naniesienie na minikolumnę 200 μ L roztworu płuczącego A1.
16. Wirowanie przez 2 minuty przy 10-12 tysiącach RPM.
17. Umieszczenie minikolumny w nowej, jałowej i wolnej od RNAz probówce elucyjnej o pojemności 1,5 mL.
18. Naniesienie na dno minikolumny 100 μ L jałowej wody.
19. Inkubacja w temperaturze pokojowej przez 3 min.
20. Wirowanie przez 1 minutę przy 10-12 tysiącach RPM.

21. Usunięcie po odwirowaniu minikolumny i przeniesienie probówki elucyjnej zawierającej RNA do temperatury w zakresie -20°C – -80°C do czasu dalszych analiz.

W kolejnym etapie zmierzono stężenie i czystość prób RNA po izolacji przy pomocy spektrofotometru *NanoPhotometer*TM firmy *IMPLEN*. Oceny czystości RNA dokonano wyliczając współczynnik absorbancji przy długości fal 260 i 280 nm. Za wartości pożądane przyjęto współczynnik A_{260}/A_{280} mieszczący się w zakresie 1,8-2,0.

9.3 Reakcja RT-PCR

Kolejny etap badań polegał na przepisaniu informacji zawartej w RNA na komplementarny do niego cDNA (ang. *complementary DNA*) w reakcji odwrotnej transkrypcji RT-PCR (ang. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). Przed wykonaniem RT-PCR w każdej z wyizolowanych prób zmierzono stężenie RNA. Do reakcji wykorzystano taką ilość materiału, aby ostatecznie w mieszaninie o objętości 20,0 μL znajdowało się dokładnie 0,1 μg RNA, co dawało stężenie równe 0,005 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Poszczególne etapy reakcji RT-PCR przeprowadzano zgodnie z protokołem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Protocol* (Applied Biosystems, USA).

Tabela 14: Skład mieszaniny reakcyjnej do przeprowadzenia reakcji RT-PCR.

Odczynnik	Objętość [μL]
woda destylowana	14,2 – x
wyizolowane RNA	x
10x RT Buffer	2,0
oligo(dT) ₂₃ (stęż. 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2,0
odwrotna transkryptaza (stęż. 20 U/ μL)	1,0
25x dNTP Mix (stęż. 100 mM)	0,8
końcowa objętość	20,0

x – objętość RNA została wyliczona na podstawie stężenia całkowitego RNA po izolacji, dla uzyskania końcowego stężenia 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dla każdej próby.

Mieszaninę w dalszej kolejności worteksowano, wirowano i umieszczano w termocyklerze *MJ Mini™ Personal Thermal Cycler* firmy *Bio-Rad* (USA). Warunki reakcji RT-PCR przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15: Profil czasowo-temperaturowy reakcji RT-PCR.

Temperatura [°C]	Czas [min]
25,0	10
37,0	120
85,0	5

Otrzymane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz.

9.4 Łańcuchowa reakcja polimerazy PCR

Celem sprawdzenia prawidłowości przebiegu reakcji RT-PCR i obecności cDNA wykonano metodą PCR amplifikację genu metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping gene*) *GAPDH* lub *ACTB* kodującego β -aktynę. Wszystkie reakcje PCR przeprowadzano w termocyklerze *MJ Mini™ Personal Thermal Cycler* (Bio-Rad, USA). Sekwencje starterów, skład mieszanin reakcyjnych oraz warunki reakcji PCR dla genów referencyjnych zostały przedstawione poniżej.

Tabela 16: Sekwencje starterów użytych do przeprowadzenia reakcji PCR dla genów referencyjnych.

Nazwa	Sekwencja
<i>ACTB</i> Forward	5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3'
<i>ACTB</i> Reverse	5' CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC 3'
<i>GAPDH</i> Forward	5' TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC 3'
<i>GAPDH</i> Reverse	5' ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC 3'

Tabela 17: Skład mieszanin do przeprowadzenia reakcji PCR dla genów referencyjnych.

Odczynnik	Objętość [μL]
	<i>ACTB</i> / <i>GAPDH</i>
gotowy do użycia <i>2xPCR Super Master Mix</i> (<i>Biotoool</i> , Niemcy) zawierający bufor, dNTP (stęż. 0,5 mM), MgCl_2 (stęż. 4 mM), polimerazę <i>Taq</i> DNA (stęż. 100 U/mL)	5,0
starter Forward (stęż. 10 μM)	0,7
starter Reverse (stęż. 10 μM)	0,7
cDNA	1,0
woda destylowana	12,6
końcowa objętość	20,0

Dla każdej reakcji PCR wykonywano kontrolę negatywną zawierającą mieszaninę reakcyjną i wolną od nukleaz wodę zamiast matrycy cDNA.

Tabela 18: Profil czasowo-temperaturowy reakcji PCR dla genów referencyjnych.

Etap reakcji PCR	<i>ACTB</i>		<i>GAPDH</i>	
	Czas	Temp. [$^{\circ}\text{C}$]	Czas	Temp. [$^{\circ}\text{C}$]
początkowa denaturacja	2 min	94,0	1 min	96,0
denaturacja	15 s	94,0	50 s	94,0
przyłączanie starterów	30 s	64,0	50 s	57,0
wydłużanie	1 min	68,0	1 min	72,0
końcowe wydłużanie	5 min	68,0	7 min	72,0
przechowywanie	∞	4,0	∞	4,0

Po potwierdzeniu w rozdziale elektroforetycznym obecności produktu reakcji PCR dla genu metabolizmu podstawowego *GAPDH* lub *ACTB*, przeprowadzano reakcję PCR dla genów badanych: *RUNX3*, *ACVR2A* oraz *TGFB1*. Wszystkie reakcje PCR wykonywano za pomocą termocyklera *MJ Mini™ Personal Thermal Cyclers* (Bio-Rad, USA). Sekwencje starterów, skład mieszanin reakcyjnych oraz warunki reakcji PCR dla analizowanych genów zostały przedstawione w poniższych tabelach.

Tabela 19: Sekwencje starterów użytych do przeprowadzenia reakcji PCR dla genów badanych.

Nazwa	Sekwencja
<i>RUNX3</i> Forward	5' ATG ACG AGA ACT ACT CCG 3'
<i>RUNX3</i> Reverse	5' TCA GGG TGA AAC TCT TCC 3'
<i>ACVR2A</i> Forward	5' AGG GTT CAC TAT CAG ACT TTC 3'
<i>ACVR2A</i> Reverse	5' GTA AAT ATG CCA ATC CTC TAG C 3'
<i>TGFB1</i> Forward	5' AAC CCA CAA CGA AAT CTA TG 3'
<i>TGFB1</i> Reverse	5' CTT TTA ACT TGA GCC TCA GC 3'

Tabela 20: Skład mieszanin do przeprowadzenia reakcji PCR dla genów badanych.

Odczynnik	Objętość [μ L]
	<i>RUNX3 / ACVR2A / TGFB1</i>
gotowy do użycia <i>2xPCR Super Master Mix</i> (Biotoool, Niemcy) zawierający bufor, dNTP (stęż. 0,5 mM), $MgCl_2$ (stęż. 4 mM), polimerazę <i>Taq DNA</i> (stęż. 100 U/mL)	5,0
starter Forward (stęż. 10 μ M)	0,7
starter Reverse (stęż. 10 μ M)	0,7
cDNA	1,0
woda destylowana	12,6
końcowa objętość	20,0

Dla każdej reakcji PCR wykonywano kontrolę negatywną zawierającą mieszaninę reakcyjną i wolną od nukleaz wodę zamiast matrycy cDNA.

Tabela 21: Profil czasowo-temperaturowy reakcji PCR dla genów badanych.

Etap reakcji PCR	<i>RUNX3</i>		<i>ACVR2A</i>		<i>TGFB1</i>	
	Czas	Temp. [$^{\circ}$ C]	Czas	Temp. [$^{\circ}$ C]	Czas	Temp. [$^{\circ}$ C]
początkowa denaturacja	3 min	95,0	5 min	95,0	2 min	94,0
denaturacja	30 s	95,0	1 min	95,0	15 s	94,0
przyłączanie starterów	1 min	56,0	1 min	57,0	30 s	58,0
wydłużanie	1 min	72,0	1 min	72,0	1 min	72,0
końcowe wydłużanie	5 min	72,0	7 min	72,0	5 min	72,0
przechowywanie	∞	4,0	∞	4,0	∞	4,0

Pomimo prób optymalizacji składu mieszaniny reakcyjnej, warunków przebiegu reakcji PCR oraz zmiany zestawów odczynnikowych nie udało się uzyskać specyficznych produktów w przypadku genu *RUNX3* (Tabela 22 i 23). Z tego powodu w dalszych etapach nie wykonywano ilościowej oceny ekspresji oraz metylacji wysp CpG dla tego genu.

Tabela 22: Optymalizacja składu mieszanin do przeprowadzenia reakcji PCR dla genu *RUNX3*.

Odczynnik <i>THERMO SCIENTIFIC</i>	Objętość [μL]	Odczynnik <i>MERCK</i>	Objętość [μL]		Odczynnik <i>MERCK</i>	Objętość [μL]
10x <i>DreamTaq</i> <i>Buffer</i> z MgCl ₂ o stęż. 20 mM	2,5	10x <i>Buffer</i> <i>for AccuTaq</i> <i>LA DNA</i> <i>Polymerase</i>	3,5	3,5	<i>KAPA Taq 2x</i> <i>ReadyMix</i> z MgCl ₂ (stęż. 25 mM), dNTP (stęż. 10 mM), <i>KAPA Taq</i> <i>DNA</i> <i>Polymerase</i> (stęż. 5 U/μl)	12,5
MgCl ₂ (stęż. 25 mM)	0,5	MgCl ₂ (stęż. 25 mM)	0,7	1,0		
dNTP (stęż. 10 mM)	1,25	dNTP (stęż. 10 mM)	0,4	0,4		
<i>DreamTaq</i> <i>DNA</i> <i>Polymerase</i> (stęż. 5 U/μl)	0,25	<i>JumpStart</i> <i>Taq DNA</i> <i>Polymerase</i> (stęż. 2,5 U/μl)	0,2	0,2		
starter Forward (stęż. 10 μM)	0,35	starter Forward (stęż. 10 μM)	0,7	0,7	starter Forward (stęż. 10 μM)	1,25
starter Reverse (stęż. 10 μM)	0,35	starter Reverse (stęż. 10 μM)	0,7	0,7	starter Reverse (stęż. 10 μM)	1,25
cDNA	2,0	cDNA	1,0	1,0	cDNA	1,0
woda destylowana	18,8	woda destylowana	13,8	13,5	woda destylowana	4,0
końcowa objętość	26,0		21,0	21,0		20,0

Tabela 23: Optymalizacja profilu czasowo-temperaturowego reakcji PCR dla genu *RUNX3*.

Etap reakcji PCR	1		2		3	
	Czas	Temp. [°C]	Czas	Temp. [°C]	Czas	Temp. [°C]
początkowa denaturacja	3 min	95,0	2 min	94,0	2 min	95,0
denaturacja	30 s	95,0	15 s	94,0	1 min	92,0
przyłączanie starterów	1 min	56,0	30 s	56,0	30 s	56,0
wydłużanie	1 min	72,0	1 min	72,0	45 s	72,0
końcowe wydłużanie	5 min	72,0	5 min	72,0	7 min	72,0
przechowywanie	∞	4,0	∞	4,0	∞	4,0

9.5 Elektroforeza w żelu agarozowym

Obecność produktów reakcji PCR była potwierdzana przy pomocy elektroforezy w 2% żelu agarozowym z wykorzystaniem niespecyficznego barwnika interkalującego w nić DNA – bromku etydy, który umożliwiał wizualizację produktów PCR w świetle UV.

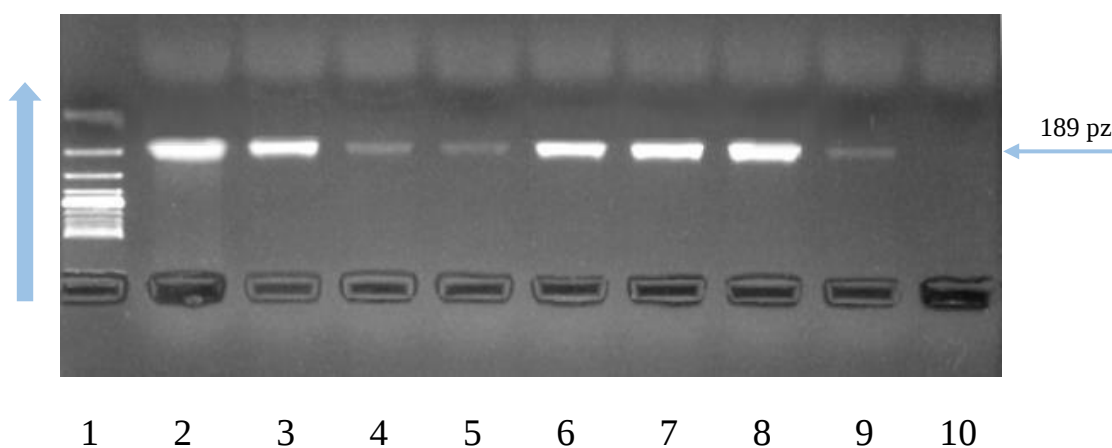
Żele przygotowywano poprzez rozpuszczenie 0,7 g agarozy w 35 mL 0,5x buforu TBE, który otrzymano poprzez 20-krotne rozcieńczenie buforu 10x stężonego (59,0 g TRIS; 27,5 g kwasu bornego; 20,0 mL 0,5M roztworu EDTA o pH 8,0). Po ogrzaniu i całkowitym rozpuszczeniu agarozy do roztworu dodawano 2 µL bromku etydy, a następnie żel wylewano na wanienkę z założonym na niej grzebieniem. Po spolimeryzowaniu żelu aparat wypełniano buforem 0,5x TBE.

Na tak przygotowany żel nanoszono 8 µL każdej z badanych prób zmieszanych z 2 µL buforu obciążającego (glicerolowo-wodny roztwór błękitu bromofenolowego). W analogiczny sposób postępowano z kontrolą negatywną. Do jednej ze studzienek nanoszono również 1,0 µL wzorca masy molekularnej M100-1000 *Ladder* (MR61) DNA Gdańsk (Polska).

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano dwustopniowo przy pomocy aparatu *PowerPac™ Universal Power Supply* firmy *Bio-Rad*. Przez pierwsze 5 minut elektroforezę prowadzono przy napięciu 110 V, przez kolejne 15 minut przy 130 V.

Po zakończeniu rozdziału elektroforetycznego żele analizowano w świetle UV przy pomocy aparatu *MiniBis Pro (DNR Bio – Imaging Systems, Izrael)* i programu *Gel Capture*.

Rycina 13: Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR dla genu referencyjnego *GAPDH*.



Gdzie:

- 1: wzorzec masy molekularnej
- 2-9: produkty reakcji PCR (189 pz)
- 10: kontrola negatywna

Wielkość produktu dla genu *ACTB* wynosiła 540 pz, dla *GAPDH* 189 pz, dla *ACVR2A* 96 pz oraz 146 pz dla genu *TGFB1*.

Jedynie te próby, które wykazały obecność ekspresji genów badanych metodą jakościową poddawane były dalszej analizie ilościowej.

9.6 Real-time PCR

Do ilościowej oceny poziomu ekspresji mRNA genów badanych wykorzystano technikę real-time PCR. Od standardowej reakcji PCR różni się tym, że po każdym cyklu reakcji PCR ma miejsce pomiar natężenia fluorescencji, co pozwala na monitorowanie przyrostu produktu w czasie rzeczywistym i określenie początkowej ilości cDNA. Do oceny ilości produktów reakcji stosuje się znakowane sondy oligonukleotydowe lub niespecyficzne barwniki fluorescencyjne interkalujące w dwuniciowe fragmenty DNA np. SYBR Green.

W analizowanych próbach powielano równolegle gen badany *ACVR2A* lub *TGFB1* oraz gen referencyjny *ACTB* lub *GAPDH*, które służyły jako odnośniki. Analizę przeprowadzano w tripletach w aparacie *Mx3005P QPCR SYSTEM* (Stratagene, USA) a reakcję wykonywano zgodnie z protokołem załączonym do zestawu *SYBR® Green JumpStart Taq Ready Mix* (Sigma Aldrich, Niemcy). Dla każdej reakcji real-time PCR wykonano kontrolę negatywną zawierającą zamiast matrycy wolną od nukleaz wodę.

Tabela 24: Składy mieszanin do przeprowadzenia reakcji real-time PCR.

Odczynnik	Objętość [μL]
	<i>ACTB</i> / <i>GAPDH</i> / <i>ACVR2A</i> / <i>TGFB1</i>
gotowy do użycia <i>JumpStart Taq Ready Mix</i> (Sigma Aldrich, Niemcy) zawierający bufor, dNTP (stęż. 0,4 mM), MgCl ₂ (stęż. 7 mM), polimerazę <i>Taq</i> DNA (stęż. 0,05 U/μL)	7,5
starter Forward (stęż. 10 μM)	0,7
starter Reverse (stęż. 10 μM)	0,7
cDNA	1,0
woda destylowana	6,1
końcowa objętość	16,0

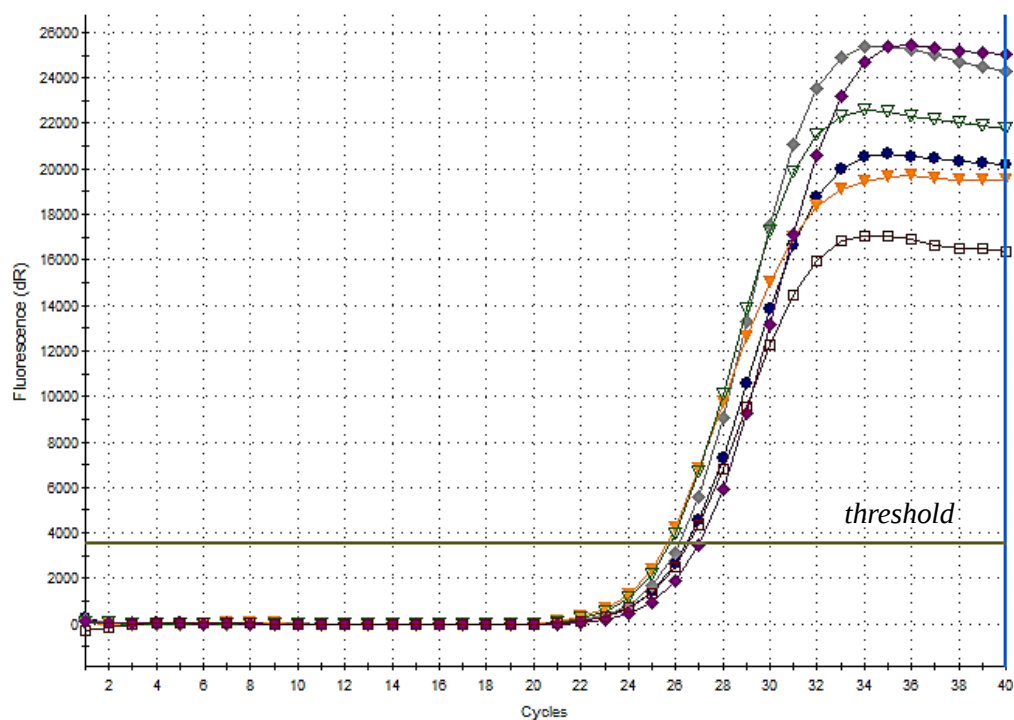
W reakcji real-time PCR użyto tych samych starterów co do analizy jakościowej.

Tabela 25: Profil czasowo-temperaturowy reakcji real-time PCR.

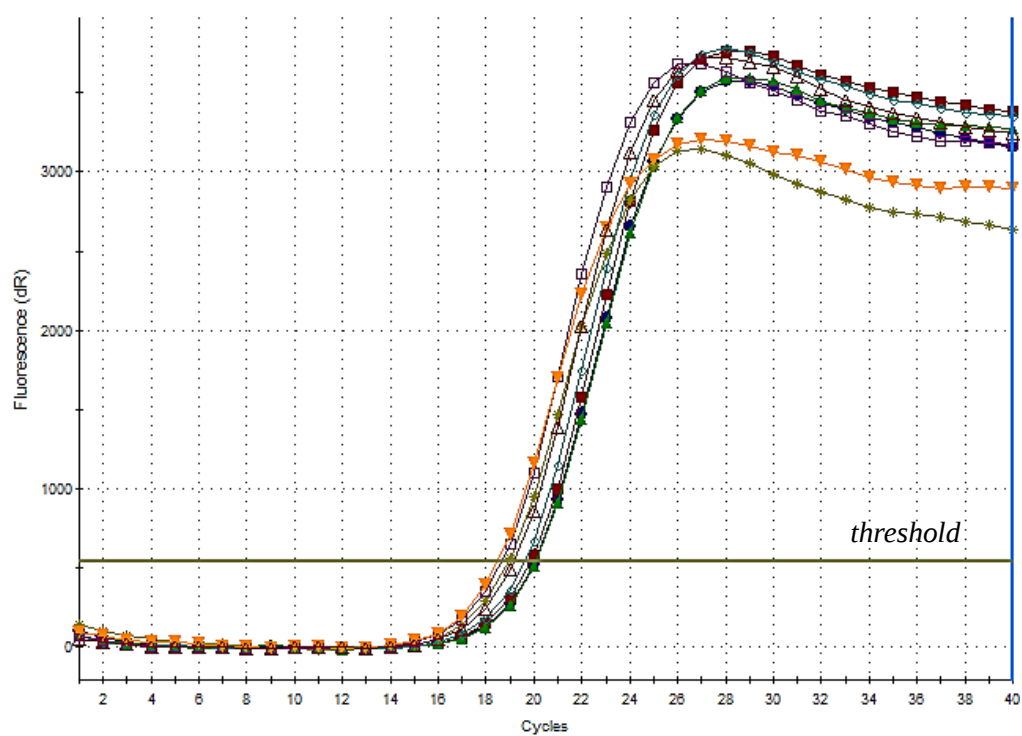
Etap reakcji real-time PCR	<i>ACTB / ACVR2A</i>		<i>GAPDH / TGFB1</i>	
	Czas	Temp. [°C]	Czas	Temp. [°C]
początkowa denaturacja	10 min	95,0	10 min	95,0
denaturacja	30 s	95,0	30 s	95,0
przyłączanie starterów	1 min	58,0	1 min	59,0
wydłużanie	1 min	72,0	1 min	72,0
denaturacja	1 min	95,0	1 min	95,0
przyłączanie starterów	30 s	58,0	30 s	55,0
denaturacja	30 s	95,0	30 s	95,0

W real-time PCR otrzymywano wykresy amplifikacji, na podstawie których wyznaczano punkt wejścia reakcji w fazę logarytmicznego wzrostu ilości produktu – tak zwany punkt Ct (ang. *threshold cycle*).

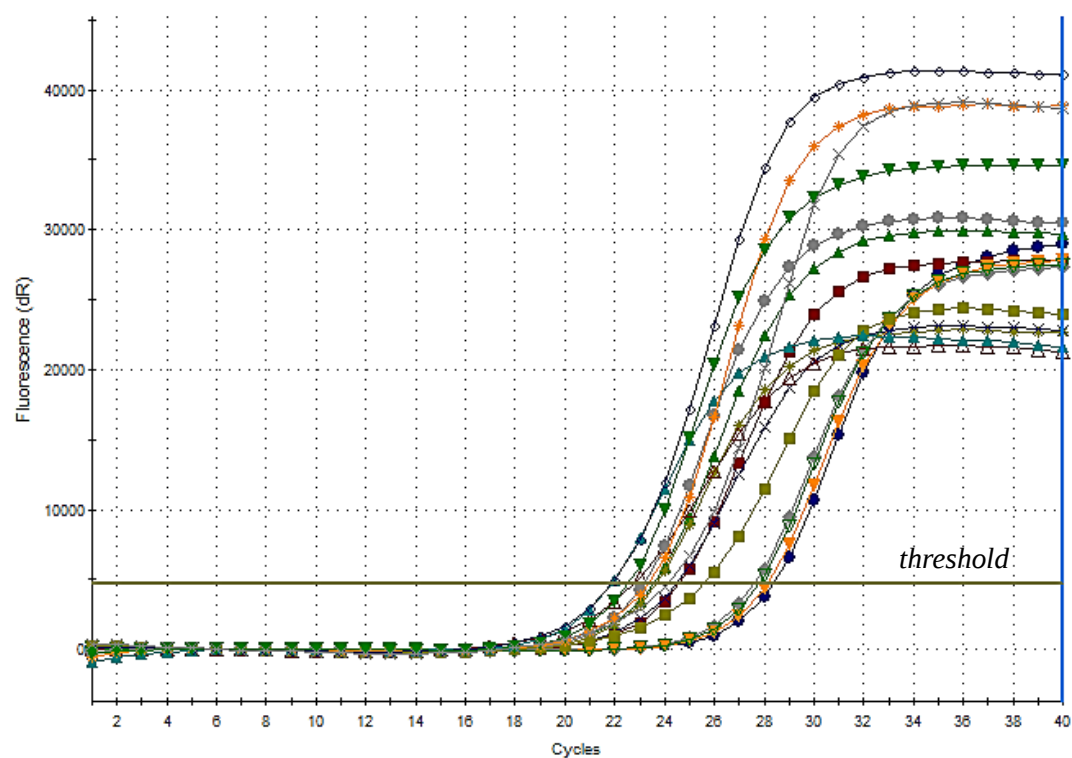
Rycina 14: Wykres fluorescencji dla genu referencyjnego *ACTB* w reakcji real-time PCR.



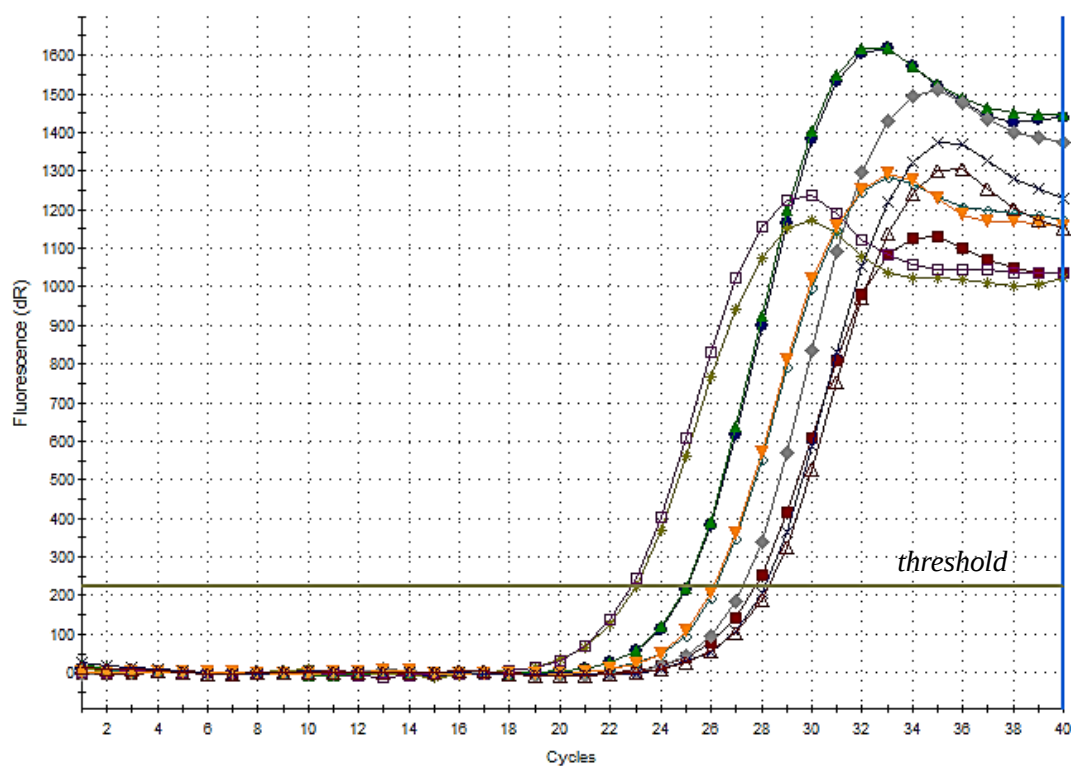
Rycina 15: Wykres fluorescencji dla genu referencyjnego *GAPDH* w reakcji real-time PCR.



Rycina 16: Wykres fluorescencji dla genu badanego *ACVR2A* w reakcji real-time PCR.



Rycina 17: Wykres fluorescencji dla genu badanego *TGFB1* w reakcji real-time PCR.

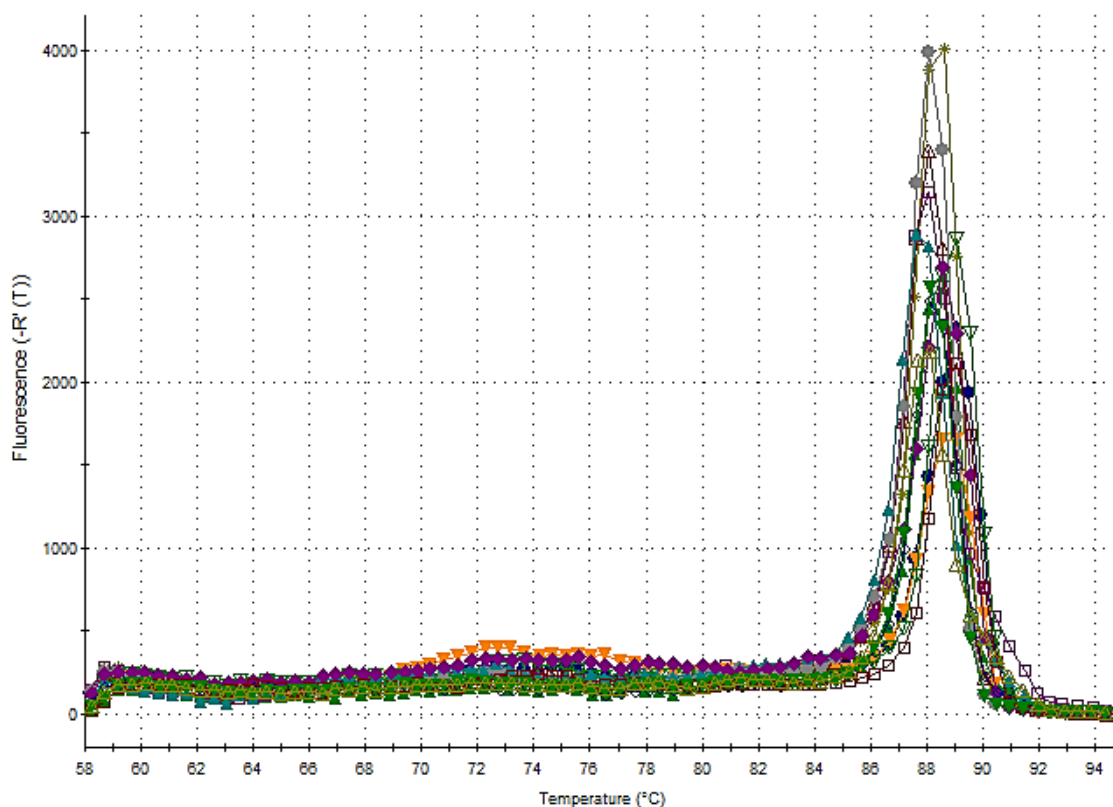


W celu oceny specyficzności produktów reakcji wykonywano każdorazowo krzywą topnienia dla wszystkich genów. Powstałe produkty cechowały się charakterystycznymi dla siebie temperaturami topnienia T_m (ang. *melting temperature*) wynikającymi z ich sekwencji nukleotydowych.

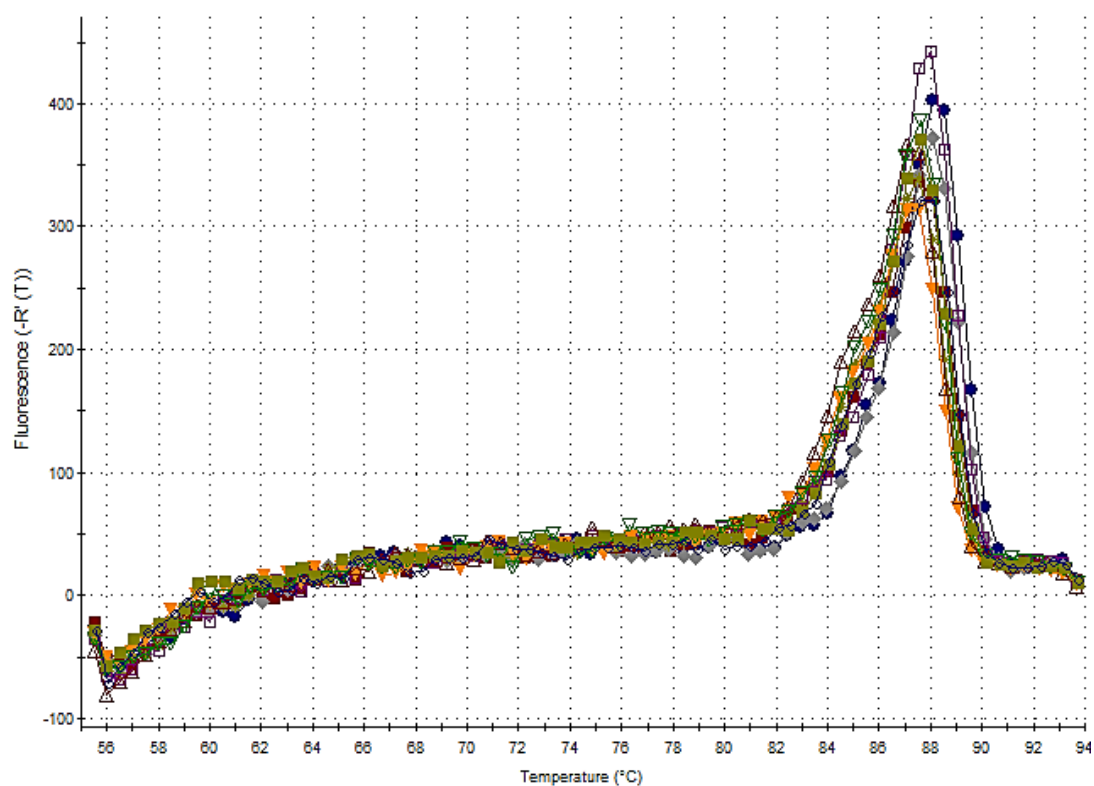
Tabela 26: Temperatury topnienia (T_m) dla analizowanych genów.

Nazwa genu	T_m [°C]
<i>ACTB</i>	88,0
<i>GAPDH</i>	88,0
<i>ACVR2A</i>	79,0
<i>TGFB1</i>	81,0

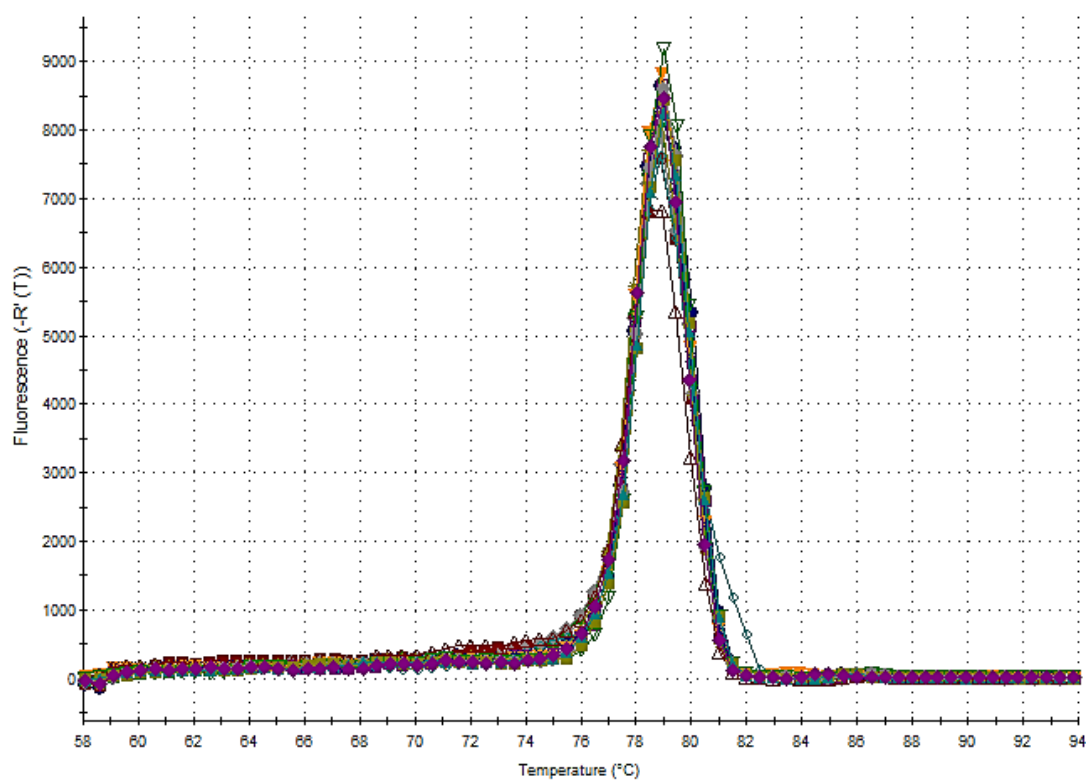
Rycina 18: Wykres krzywych topnienia dla produktów reakcji real-time PCR genu referencyjnego *ACTB*.



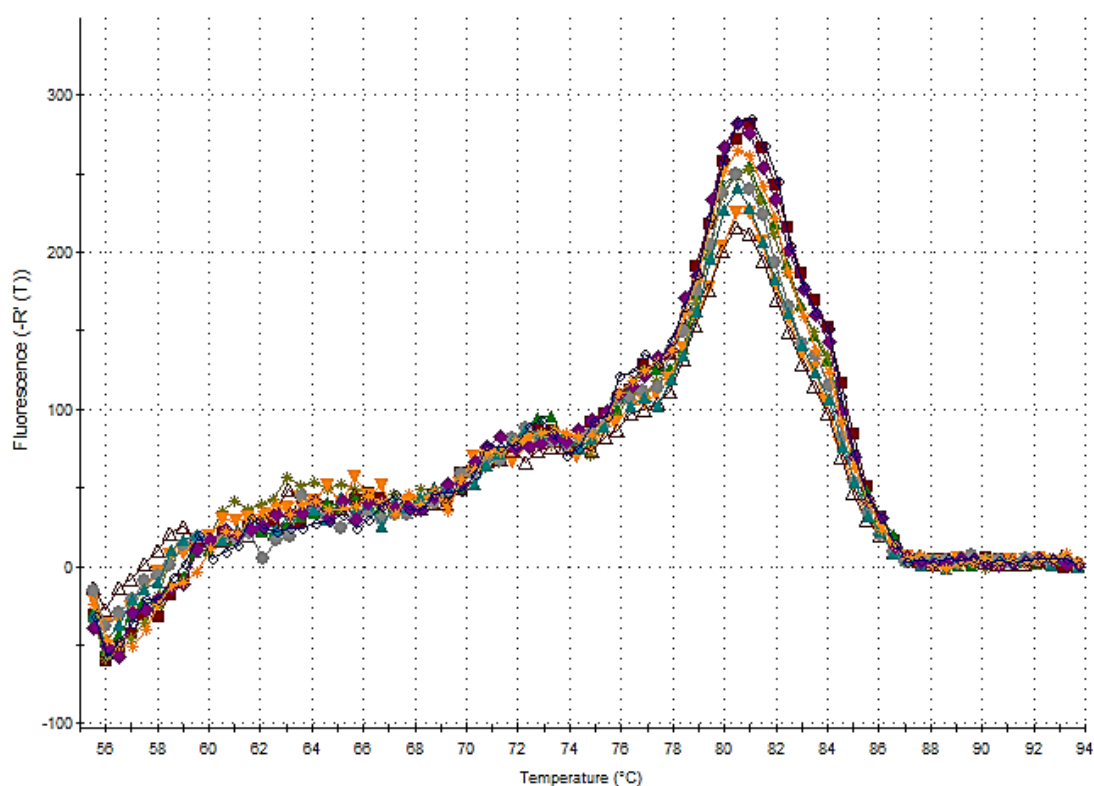
Rycina 19: Wykres krzywych topnienia dla produktów reakcji real-time PCR genu referencyjnego *GAPDH*.



Rycina 20: Wykres krzywych topnienia dla produktów reakcji real-time PCR genu badanego ACVR2A.

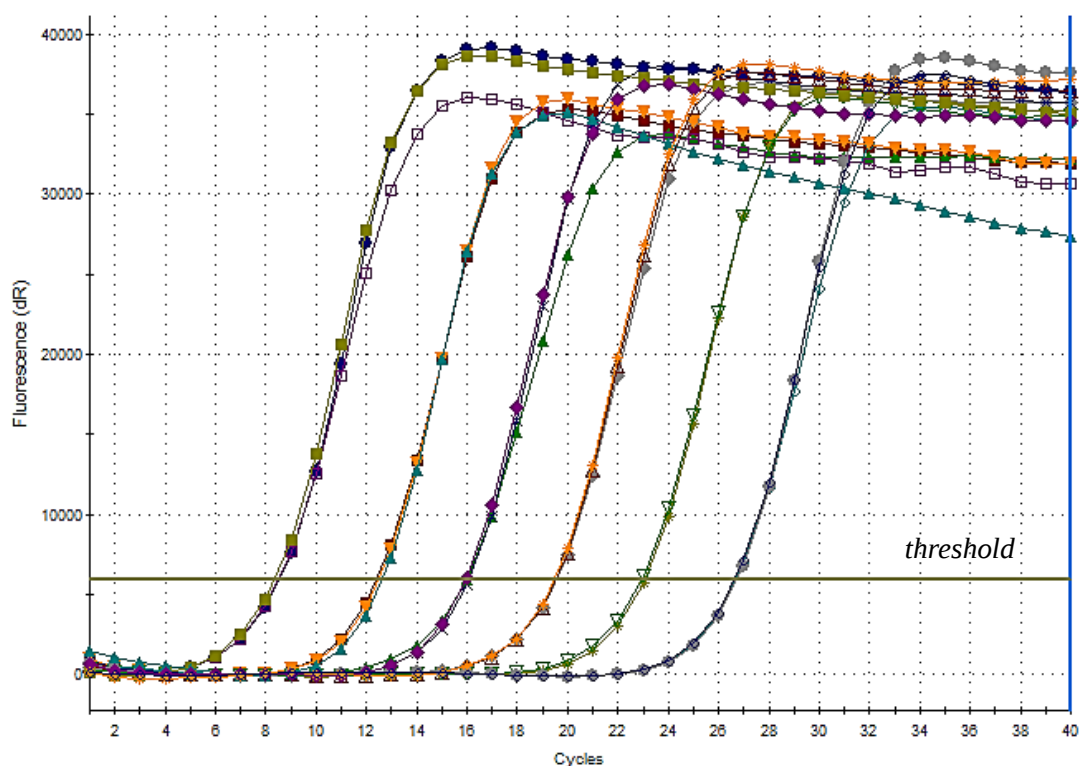


Rycina 21: Wykres krzywych topnienia dla produktów reakcji real-time PCR genu badanego *TGFB1*.

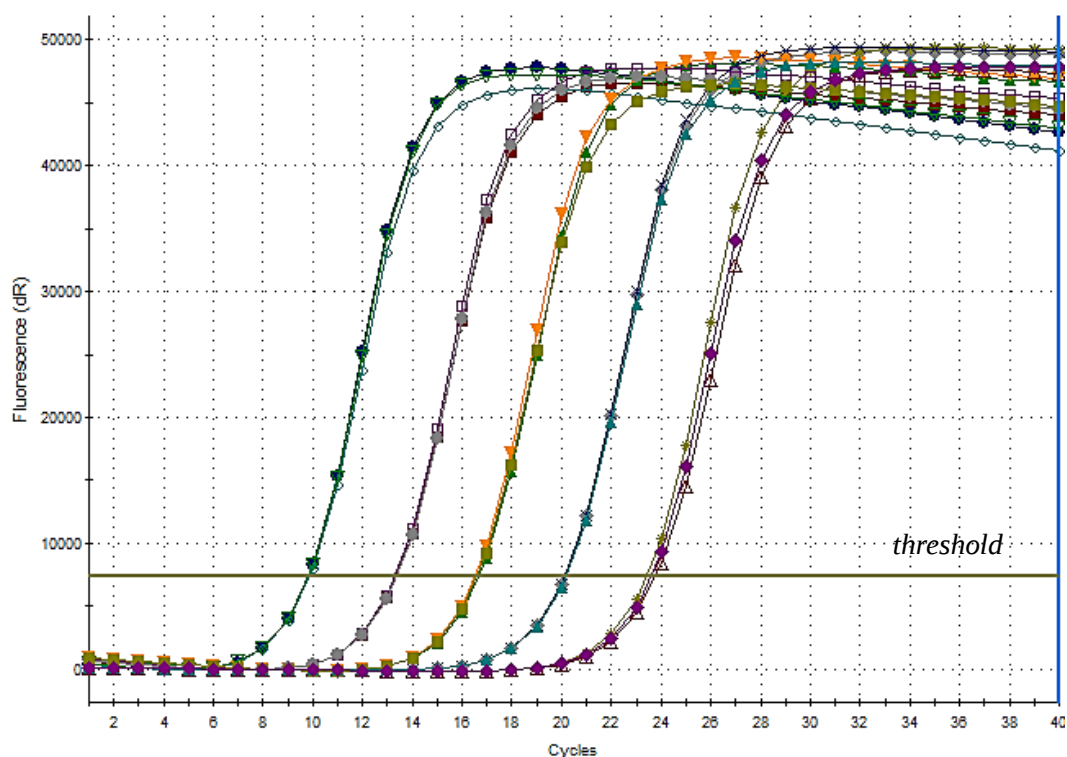


Oszacowanie wydajności kinetycznej reakcji real-time PCR dokonywano w oparciu o analizę krzywych standardowych genu metabolizmu podstawowego i badanego. Do tego celu przygotowywano dla jednej z prób po reakcji PCR, dla której określono także stężenie uzyskanego produktu, szereg rozcieńczeń w zakresie od 10^0 do 10^7 . Następnie, dla każdego z rozcieńczeń wykonywano real-time PCR i odczytywano wartości C_t , które posłużyły do wyliczenia wydajności reakcji (Ryciny 22-25). Wydajność obliczano na podstawie nachyleń krzywych standardowych zgodnie z równaniem $E = 10^{-1/\text{nachylenie}} - 1$.

Rycina 22: Wykresy fluorescencji dla genu referencyjnego *ACTB* po reakcji real-time PCR (rozcieńczenia 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7).

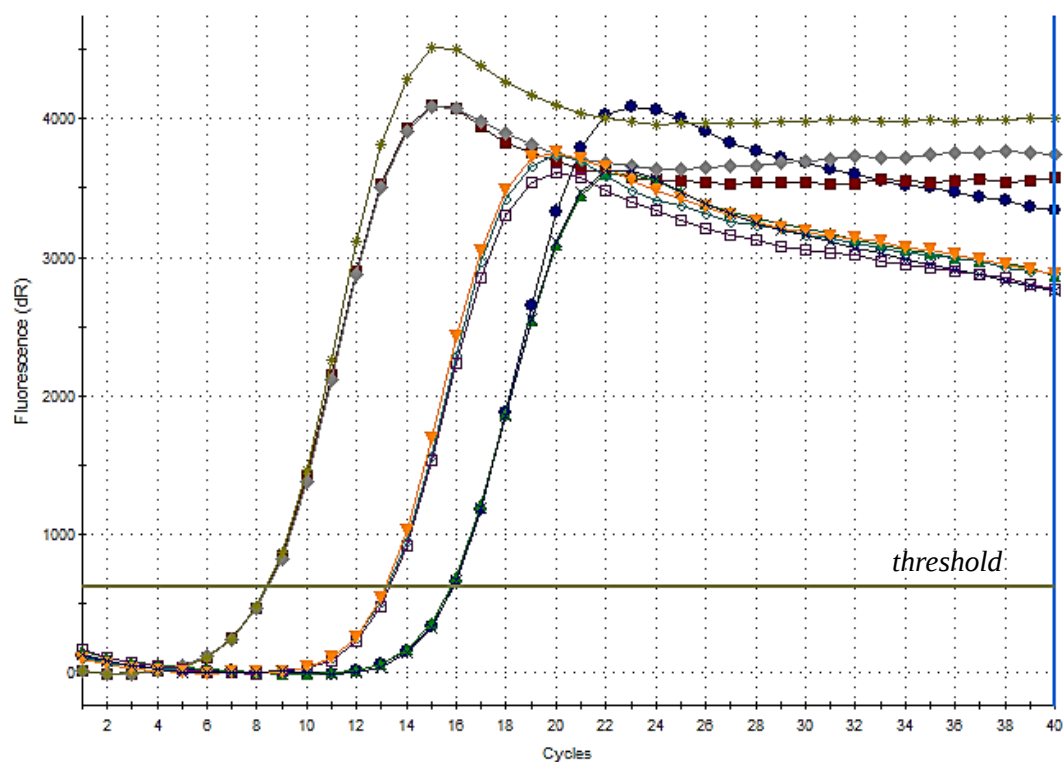


Rycina 23: Wykresy fluorescencji dla genu badanego ACVR2A po reakcji real-time PCR (rozcieńczenia 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7).

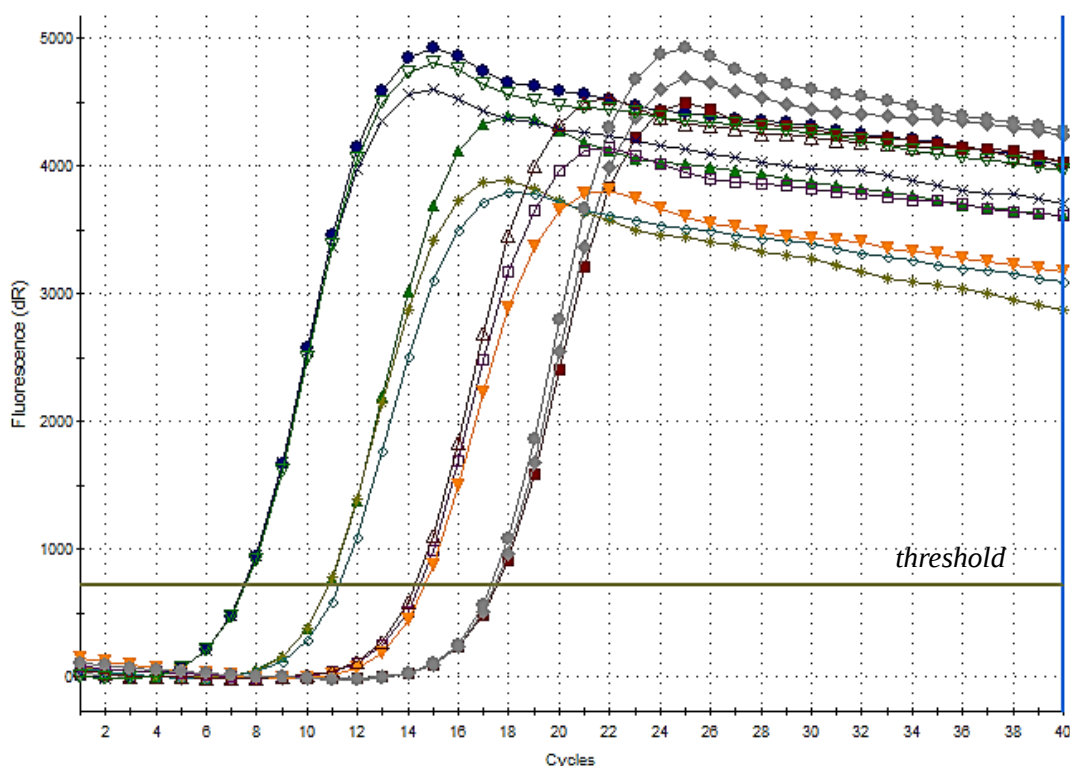


Wydajności reakcji PCR genów *ACTB* oraz *ACVR2A* były zbliżone w stosunku do siebie, dlatego do obliczenia względnego poziomu ekspresji *ACVR2A* zastosowano metodę $\Delta\Delta C_t$. W metodzie tej średnie wartości C_t ze wszystkich prób dla obu genów przyjęto jako kalibrator.

Rycina 24: Wykresy fluorescencji dla genu referencyjnego *GAPDH* po reakcji real-time PCR (rozcieńczenia 10^5 , 10^6 , 10^7).



Rycina 25: Wykresy fluorescencji dla genu badanego *TGFB1* po reakcji real-time PCR (rozcieńczenia 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7).



W przypadku drugiej analizy, wydajności reakcji PCR pomiędzy porównywanymi genami istotnie się różniły (111% dla *GAPDH* oraz 101% dla *TGFB1*), dlatego do wyliczenia współczynników względnej ekspresji zastosowano metodę Pfaffl'a uwzględniającą poziom wydajności reakcji dla każdego z genów.

9.7 Przygotowanie DNA do oceny metylacji

Procedura oceny metylacji wyspy CpG regionu promotorowego genu *TGFB1* wymagała etapu przygotowania DNA do dalszych badań. W tym celu wykonano konwersję niezmetylowanych cytozyn do uracylu zgodnie z protokołem *CiTi Converter DNA Methylation Kit* (A&A Biotechnology, Polska).

1. Do 20 μ L uprzednio wyizolowanego DNA dodawano 5 μ L roztworu D do rozcieńczania prób oraz 25 μ L jałowej wody.
2. Po wymieszaniu roztworu przez pipetowanie całość inkubowano 15 minut w 37°C.
3. Dodanie do roztworu 100 μ L odczynnika C/T do konwersji i wymieszanie całości poprzez pipetowanie.
4. Inkubowanie próby w ciemności przez 12-16 godzin w suchym bloku grzeijnym o temperaturze 50°C.
5. Przeniesienie próby po inkubacji na 10 minut do temperatury 0-4°C.
6. Dodanie do mieszaniny 400 μ L roztworu wiążącego G i wymieszanie całości poprzez pipetowanie.
7. Przeniesienie prób na minikolumny a następnie wirowanie przez 60 sekund przy 10-15 tysiącach RPM.
8. Wylanie przesączu po odwirowaniu i włożenie minikolumny do tej samej probówki.
9. Dodanie do minikolumny 100 μ L roztworu płuczącego A1 i odwirowanie całości przez 60 sekund przy 10-15 tysiącach RPM.
10. Naniesienie na minikolumnę 200 μ L roztworu DS do desulfonowania.
11. Po 10-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej próbę wirowano przez 60 sekund przy 10-15 tysiącach RPM.
12. Wylanie przesączu po odwirowaniu i włożenie minikolumny do tej samej probówki.
13. Dodanie do minikolumny 200 μ L roztworu płuczącego A1 i odwirowanie całości przez 60 sekund przy 10-15 tysiącach RPM.
14. Ponowne odpipetowanie na minikolumnę 200 μ L roztworu płuczącego A1 i wirowanie całości przez 2 minuty przy 10-15 tysiącach RPM.

15. Umieszczenie minikolumny w probówce elucyjnej o pojemności 1,5 mL i naniesienie na znajdujące się na jej dnie złoże 30 μ L buforu elucyjnego.
16. Inkubowanie całości w temperaturze pokojowej przez 3 minuty.
17. Wirowanie przez 1 minutę przy 10-15 tysiącach RPM.
18. Usunięcie minikolumny i przeniesienie probówki elucyjnej zawierającej oczyszczone i zmodyfikowane DNA do temperatury 4-8°C do czasu dalszych analiz.

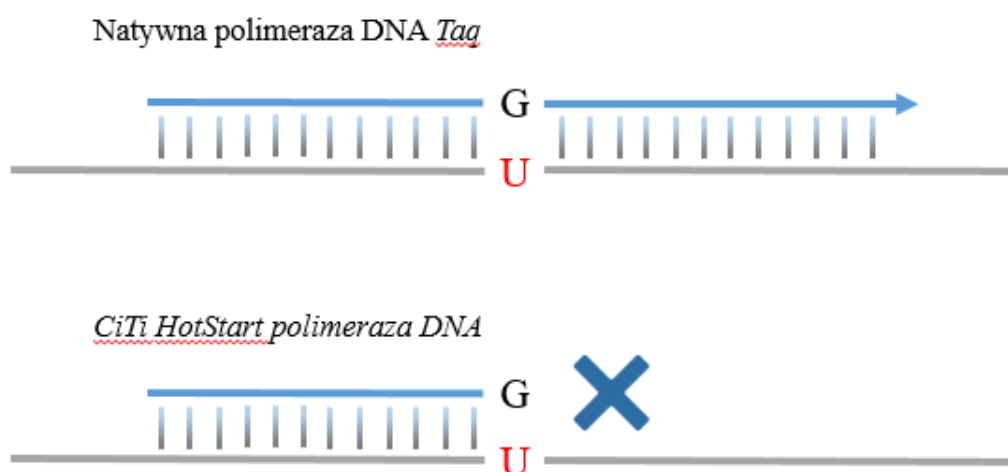
Dla zwiększenia wydajności modyfikowano metodę konwersji zgodnie z rekomendacją producenta. Zakładała ona wydłużenie czasu pierwszej inkubacji do 30 minut i podwyższenie temperatury do 42°C (etap 2 protokołu).

9.8 Reakcja MS – PCR

Celem procesu przygotowania DNA do reakcji MS-PCR była chemiczna konwersja wszystkich niezmetylowanych cytozyn do uracylu. Modyfikacja ta uniemożliwiała wydłużanie przez zmodyfikowaną polimerazę *Taq* (*CiTi HotStart polimeraza DNA*) startera, który na końcu 3' zawierał niekomplementarny do matrycy nukleotyd (Rycina 26).

Zastosowanie *CiTi HotStart polimerazy DNA* blokowało amplifikację niespecyficznych produktów reakcji PCR i uzyskanie wyników fałszywie pozytywnych, które powstawałyby w przypadku natywnej polimerazy *Taq*.

Rycina 26: Porównanie działania natywnej polimerazy DNA *Taq* oraz *CiTi HotStart polimerazy DNA* po chemicznej konwersji niemetylowanych cytozyn do uracylu.



Oceny metylacji sekwencji *CpG* genu *TGFB1* dokonano w oparciu o protokół *CiTi Converter MSP PCR Kit* (A&A Biotechnology, Polska).

Tabela 27: Skład mieszaniny reakcyjnej MS-PCR.

Odczynnik	Objętość [μ L]
gotowy do użycia 2x <i>CiTi MSP PCR Mix</i> (A&A Biotechnology, Polska) zawierający stabilizatory reakcji, dNTP, $MgCl_2$, Tris-HCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$ i <i>CiTi HotStart polimerazę DNA</i>	25,0
starter Forward (stęż. 0,3-0,4 μ M)	1,75
starter Reverse (stęż. 0,3-0,4 μ M)	1,75
DNA	2,5
woda jałowa	19,0
końcowa objętość	50,0

Do reakcji wykorzystywano uprzednio oczyszczone i chemicznie zmodyfikowane DNA.

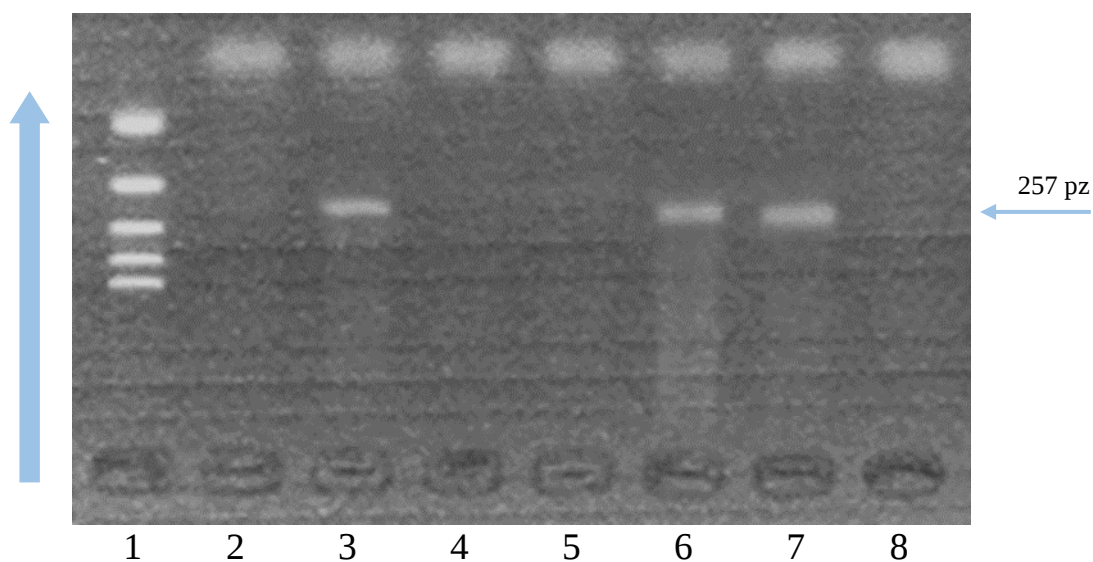
Tabela 28: Profil czasowo-temperaturowy reakcji MS-PCR.

Etap reakcji MS-PCR	<i>TGFB1</i>	
	Czas	Temp. [$^{\circ}$ C]
początkowa denaturacja matrycy i aktywacja <i>CiTi HotStart polimerazy DNA</i>	5 min	95,0
denaturacja	15 s	95,0
przyłączanie starterów	30 s	59,0
wydłużanie	30 s	72,0
końcowe wydłużanie	5 min	72,0
schłodzenie reakcji	10 min	10,0
przechowywanie	∞	4,0

Tabela 29: Sekwencje starterów użytych do przeprowadzenia reakcji MS-PCR.

Nazwa	Sekwencja
<i>TGFB1 Forward</i>	5' GGG TAT AGT GCG GGA GC 3'
<i>TFGB1 Reverse</i>	5' CAA CCG CAC GAA AAA CGC 3'

Rycina 27: Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji MS-PCR dla sekwencji CpG regionu promotorowego genu *TGFB1*.



Gdzie:

- 1: wzorzec masy molekularnej
- 2: kontrola negatywna
- 3: kontrola pozytywna
- 4-8: produkty reakcji MS-PCR

Wielkość produktu dla sekwencji CpG regionu promotorowego genu *TGFB1* wynosiła 257 pz.

10. Analiza statystyczna

Do statystycznej oceny uzyskanych wyników użyto programu STATISTICA 13.1 firmy *StatSoft Inc.* (Tulsa, OK, USA).

Pierwszym etapem analizy porównawczej zmiennych ilościowych należących do dwóch grup było sprawdzenie za pomocą testu Shapiro-Wilka zgodności cech z rozkładem normalnym.

Po potwierdzeniu normalności rozkładu weryfikowano jednorodność wariancji zmiennych za pomocą testu Levene'a. W przypadku stwierdzenia homogeniczności wariancji do porównania badanych grup stosowano parametryczny test t Studenta.

Przy braku zgodności z rozkładem normalnym przeprowadzano analizę porównawczą grup nieparametrycznym testem U Manna-Whitneya.

W przypadku braku zgodności z rozkładem normalnym lub brakiem jednorodności wariancji zmiennych ilościowych do oceny porównawczej więcej niż dwóch grup wykorzystano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa. Celem wskazania grup różniących się między sobą po teście Kruskala-Wallisa przeprowadzano test *post-hoc* Dunn z poprawką Benjamini-Hochberga.

Dwie zmienne ilościowe były ze sobą korelowane za pomocą macierzy korelacji.

Do analizy porównawczej dwóch lub więcej grup zmiennych nominalnych o $n > 40$ i wszystkich liczebności oczekiwanych > 10 wykorzystywano test niezależności χ^2 Pearsona. Do zbadania zależności między dwoma cechami jakościowym o $n > 40$ oraz jakiegokolwiek liczebności oczekiwanej < 10 zastosowano test V^2 . W przypadkach $n > 40$ i którejkolwiek z liczebności oczekiwanej < 5 oraz $20 < n \leq 40$ i wszystkich liczebności oczekiwanych > 5 stosowano test χ^2 z poprawką Yatesa.

Analizę przeżycia pacjentów oceniano przy pomocy testu Wilcoxona wg Gehana.

W przypadku wszystkich testów za istotne statystycznie przyjęto wyniki o prawdopodobieństwie $p < 0,05$.

11. Wyniki

CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ

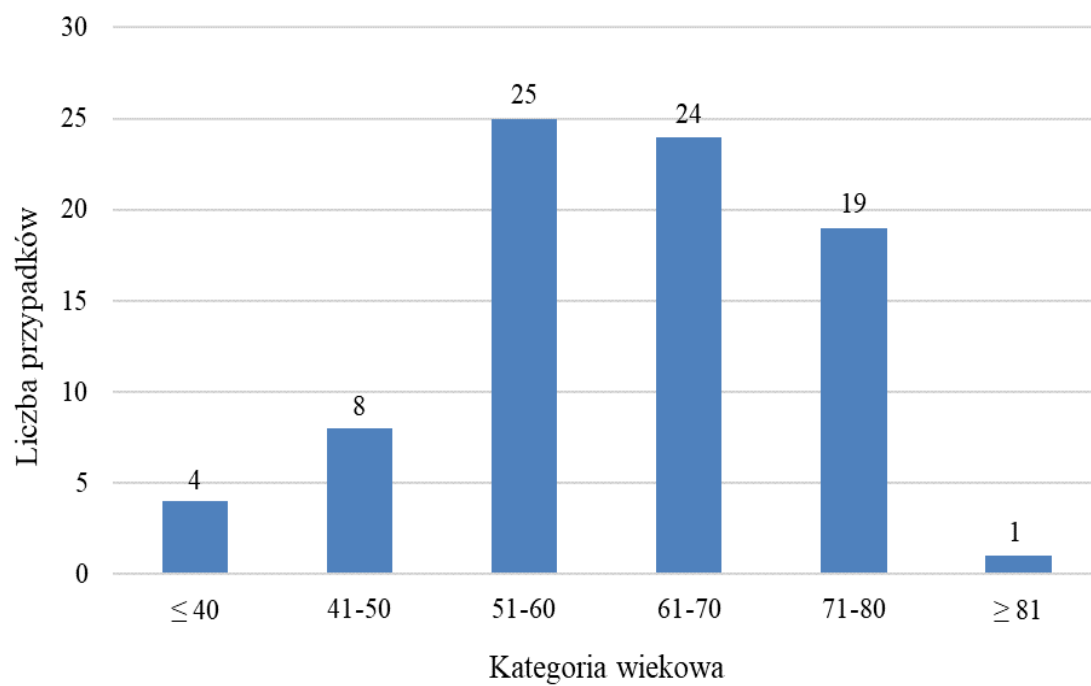
Analizie poddano 45 kobiet i 36 mężczyzn, tworzących grupę 81 pacjentów z potwierdzonym histopatologicznie rakiem jelita grubego. Mediana wieku badanej populacji ogółem wynosiła 63 lata, z czego mediana wieku równała się 57 lat dla samych kobiet oraz 66 lat w przypadku mężczyzn.

Tabela 30: Charakterystyka ogólna badanej grupy pacjentów z rakiem jelita grubego.

Płeć	Liczebność (N)	Odsetek [%]	Mediana wieku [lata]	Minimum [lata]	Maksimum [lata]
Kobiety	45	56	57	37	82
Mężczyźni	36	44	66	34	79
Ogółem	81	100	63	34	82

W analizowanej populacji wiek w momencie zachorowania wynosił więcej niż 50 lat, a zdecydowana większość przypadków (84%) pochodziła od pacjentów między 51 a 80 rokiem życia.

Rycina 28: Struktura wieku badanej grupy pacjentów z rakiem jelita grubego.

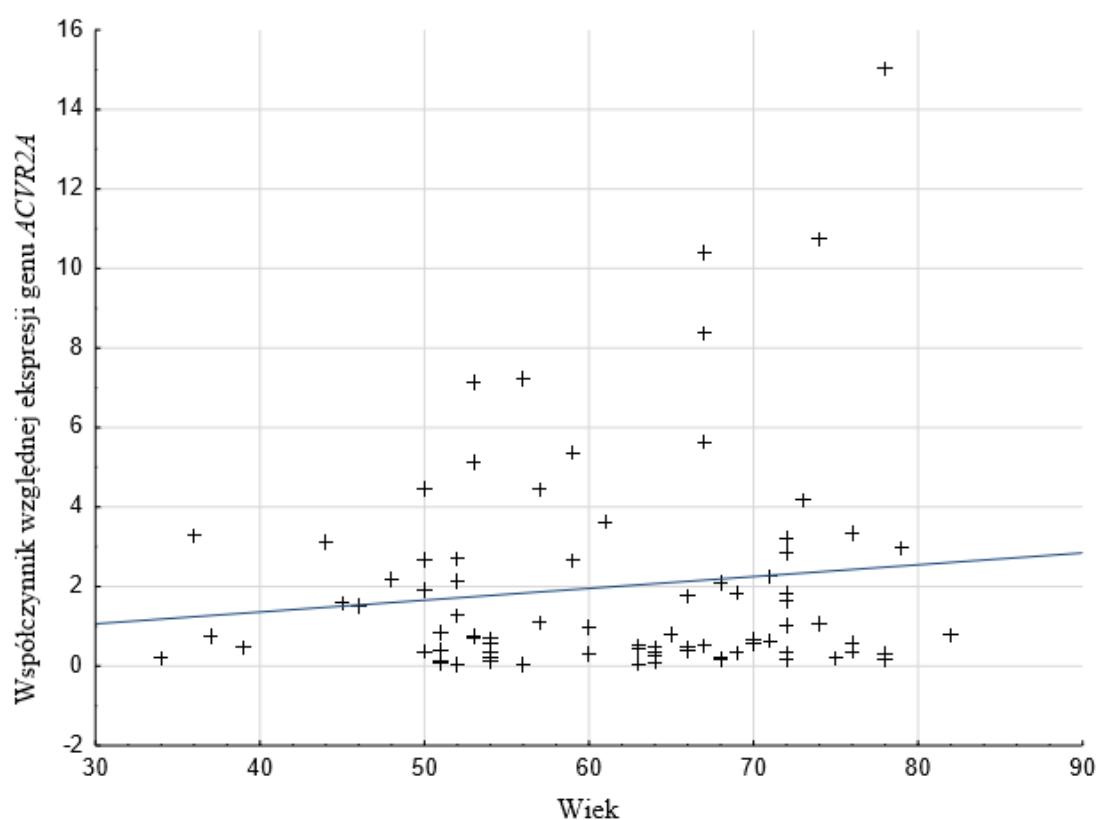


11.1. Ocena względnych poziomów ekspresji genów *ACVR2A* i *TGFB1* w powiązaniu z parametrami demograficzno – patologicznymi pacjentów

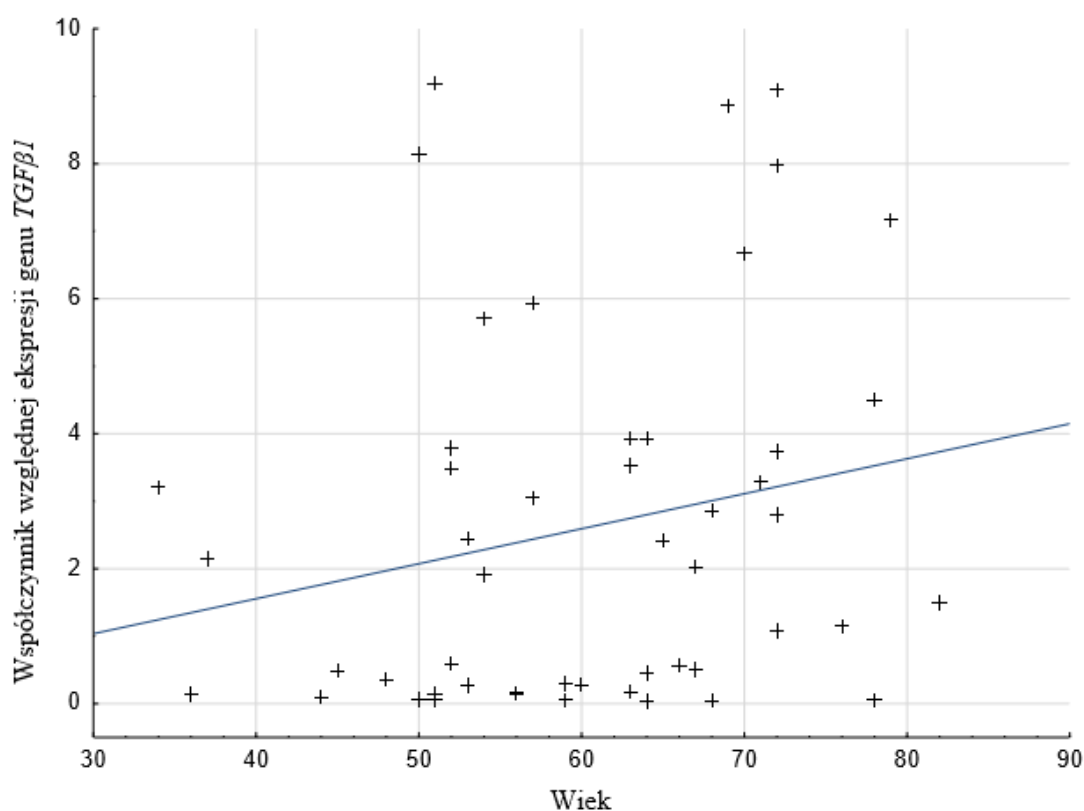
WZGLĘDNE POZIOMY EKSPRESJI GENÓW *ACVR2A* I *TGFB1* A WIEK PACJENTÓW

Ocena zależności pomiędzy wiekiem pacjentów grupy badanej w momencie zachorowania a względnym poziomem mRNA genu *ACVR2A* i *TGFB1* nie wykazała korelacji między porównywanymi cechami (odpowiednio $p=0,7170$, $p=0,1380$). Poniżej zamieszczono wykresy zależności współczynników względnej ekspresji badanych genów a wiekiem pacjentów.

Rycina 29: Korelacja między względnym poziomem ekspresji genu *ACVR2A* a wiekiem pacjentów.



Rycina 30: Korelacja między względnym poziomem ekspresji genu *TGFB1* a wiekiem pacjentów.



Drugim etapem oceny statystycznej było porównanie względnych poziomów ekspresji badanych genów w grupie kobiet i mężczyzn.

WZGLĘDNE POZIOMY EKSPRESJI GENÓW *ACVR2A* I *TGFB1* A PŁEĆ PACJENTÓW

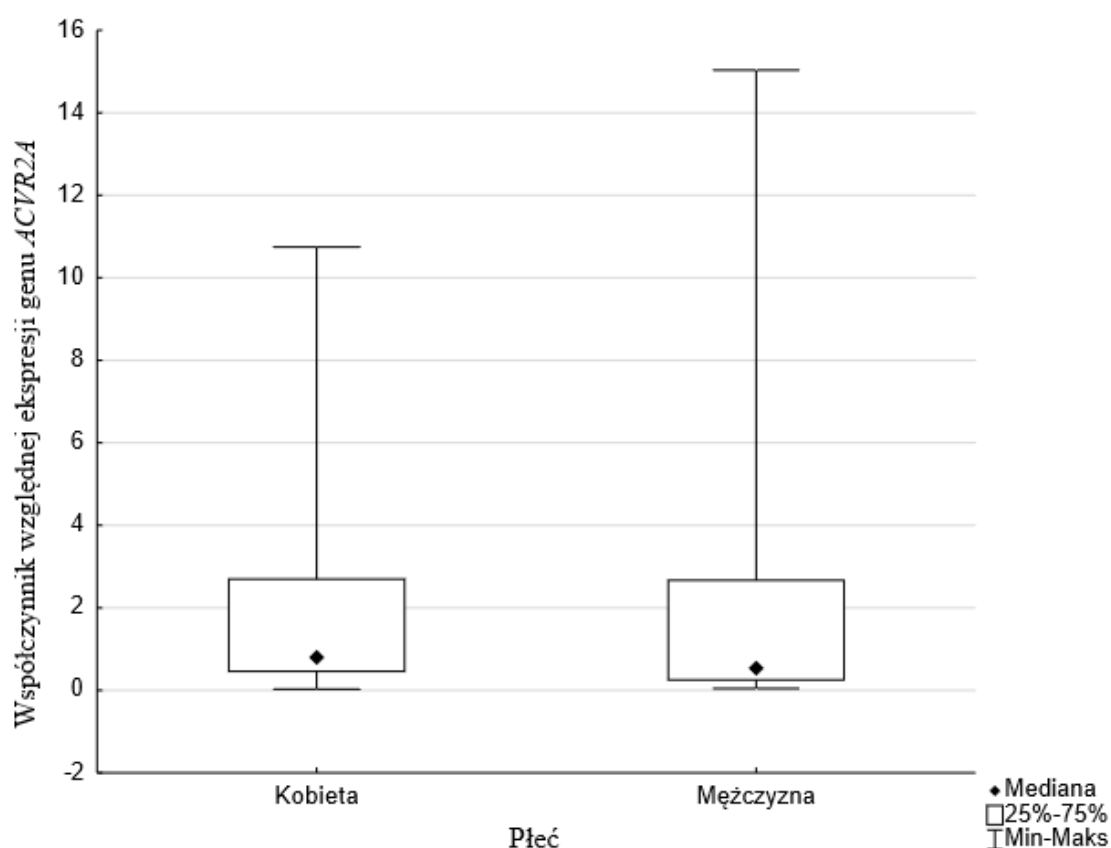
Z dostępnych badań epidemiologicznych wynika, że mężczyźni statystycznie częściej zapadają na raka jelita grubego niż kobiety. Z tego powodu uzasadnione staje się poszukiwanie podstaw molekularnych mogących przyczyniać się do powstawania obserwowanych różnic. W pracy oceniano zależność pomiędzy płcią a względnym poziomem ekspresji w grupie 81 pacjentów dla genu *ACVR2A* oraz 50 pacjentów dla genu *TGFB1*.

Tabela 31: Względne poziomy ekspresji badanych genów a płeć pacjentów.

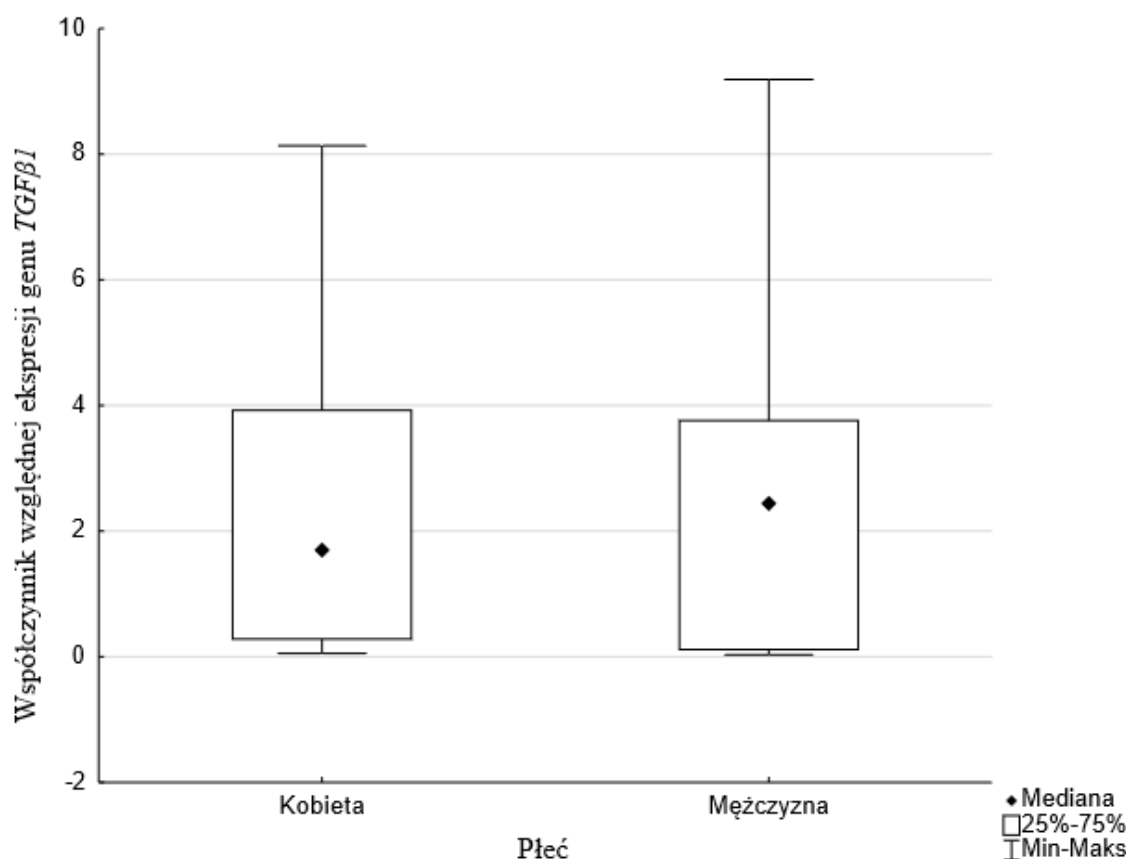
Gen	Liczebność kobiet	Liczebność mężczyzn	Wartość p
<i>ACVR2A</i>	45	36	0,2482
<i>TGFB1</i>	30	20	0,9763

Analiza porównawcza przeprowadzona testem U Manna-Whitneya wykazała brak zależności między względnymi poziomami ekspresji genów i płcią pacjentów. Wyniki te są zbieżne z doniesieniami dostępnymi w piśmiennictwie.

Rycina 31: Względne poziomy ekspresji genu *ACVR2A* w grupach kobiet i mężczyzn.



Rycina 32: Względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* w grupach kobiet i mężczyzn.



Część przypadków raka jelita grubego ma charakter dziedziczny, dlatego w kolejnym etapie analizy statystycznej określano zależność pomiędzy względnymi poziomami ekspresji badanych genów a obecnością nowotworu w najbliższej rodzinie chorego.

WZGLĘDNE POZIOMY EKSPRESJI GENÓW *ACVR2A* I *TGFB1* A WYWIAD RODZINNY PACJENTÓW

W toku przeprowadzonego wywiadu lekarskiego uzyskano informację dotyczącą rodzinnego występowania raka jelita grubego od 31 pacjentów, u których oceniano względny poziom ekspresji genu *ACVR2A* oraz od 18 pacjentów poddanych analizie względnego poziomu mRNA genu *TGFB1*.

Uzyskane wartości p testu U Manna-Whitneya zostały przedstawione w Tabeli 32.

Tabela 32: Względne poziomy ekspresji badanych genów a wywiad rodzinny pacjentów.

Gen	Wywiad rodzinny	Liczebność (N)	Odsetek [%]	Wartość p
ACVR2A	pozytywny	9	29	0,6793
	negatywny	22	71	
TGFB1	pozytywny	6	33	0,8149
	negatywny	12	67	

Odsetek osób potwierdzających obecność raka jelita grubego w rodzinie był podobny dla obu opisywanych genów. W większości pacjenci włączeni do badania pochodzili z rodzin, u których przypadki nowotworu tego odcinka jelita nie były wcześniej diagnozowane. Co więcej, nie stwierdzono istotnego statystycznie związku między wywiadem rodzinnym a względnym poziomem ekspresji żadnego z genów.

Z punktu widzenia odpowiedniego doboru strategii leczenia oraz ze względów rokowniczych istotne znaczenie ma lokalizacja zmian nowotworowych. Z tego powodu kolejną ocenianą zależnością była korelacja względnych poziomów ekspresji badanych genów z umiejscowieniem raka jelita grubego.

WZGLĘDNE POZIOMY EKSPRESJI GENÓW *ACVR2A* I *TGFB1* A UMIEJSCOWIENIE NOWOTWORU

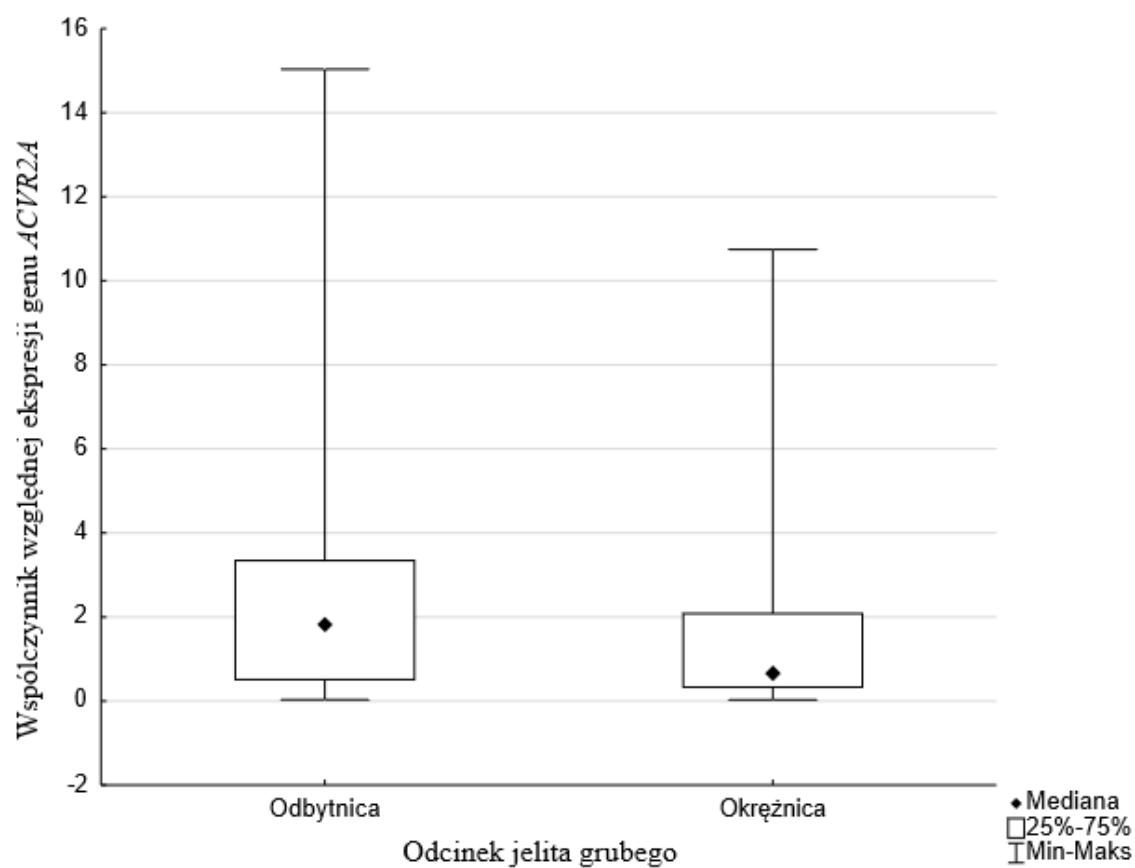
Z uwagi na odrębności postępowania terapeutycznego wynikające z różnej lokalizacji zmian nowotworowych pacjentów podzielono na dwie grupy: z nowotworem odbytnicy lub nowotworem umiejscowionym we wcześniejszych odcinkach jelita grubego. Do analiz statystycznych włączono 80 pacjentów, u których oceniano poziom transkryptu genu *ACVR2A* oraz 49 pacjentów, u których oceniano poziom mRNA genu *TGFB1*.

Tabela 33: Względne poziomy ekspresji badanych genów a umiejscowienie nowotworu.

Gen	Umiejscowienie nowotworu	Liczebność (N)	Odsetek [%]	Wartość p
<i>ACVR2A</i>	kątnica lub okrężnica	51	64	<i>0,0330</i>
	odbytnica	29	36	
<i>TGFB1</i>	kątnica lub okrężnica	29	59	<i>0,1246</i>
	odbytnica	20	41	

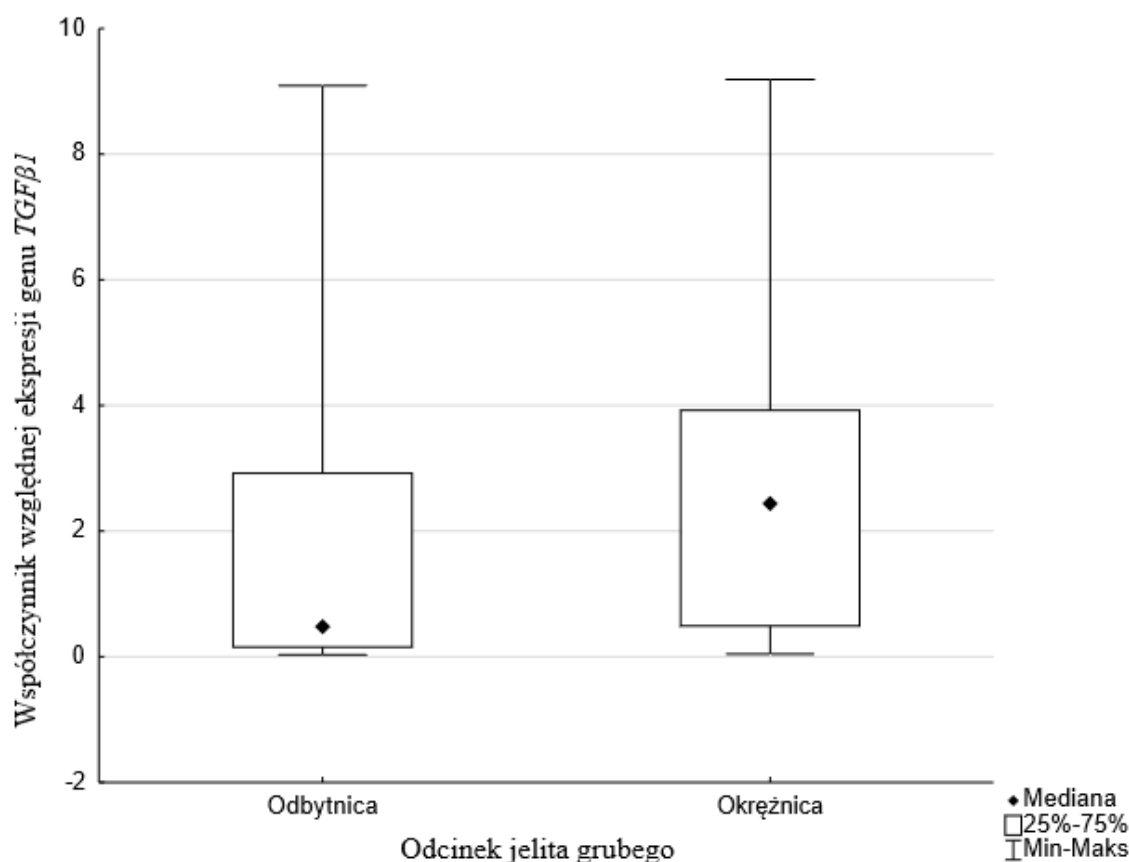
Analiza porównawcza przeprowadzona testem U Manna-Whitneya wykazała, że względne poziomy ekspresji genu *ACVR2A* obserwowane w nowotworach odbytnicy oraz nowotworach zlokalizowanych w kątncy lub okrężnicy istotnie różniły się od siebie (***p=0,0330***). Raki odbytnicy cechowały się wyższym względnym poziomem ekspresji genu *ACVR2A* niż raki zlokalizowane we wcześniejszych odcinkach jelita grubego, co może wskazywać na uczestnictwo tego genu w patogenezie raka odbytnicy.

Rycina 33: Względne poziomy ekspresji genu *ACVR2A* a umiejscowienie nowotworu.



Nie wykazano jednak istotnej statystycznie zależności pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *TGFB1* a umiejscowieniem nowotworu ($p=0,1246$).

Rycina 34: Względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* a umiejscowienie nowotworu.



W badanej populacji wyróżniono na podstawie badania histopatologicznego trzy różne typy gruczolakoraków: cewkowe (łac. *adenocarcinoma tubulare*), śluzotwórcze (łac. *adenocarcinoma mucinosum*) i cewkowo-śluzotwórcze (łac. *adenocarcinoma tubulare/ mucinosum*). Każdy z nich został porównany ze względu na poziom ekspresji analizowanych genów.

WZGLĘDNE POZIOMY EKSPRESJI GENÓW *ACVR2A* I *TGFB1* A PODTYP HISTOPATOLOGICZNY RAKA JELITA GRUBEGO

Poszukiwano zależności pomiędzy typem histopatologicznym raka a względnym poziomem ekspresji genów *ACVR2A* i *TGFB1* odpowiednio u 77 i 47 pacjentów.

U większości z nich w badaniu histopatologicznym stwierdzano raka jelita grubego typu cewkowego. Gruczolakoraki śluzotwórcze i cewkowo-śluzotwórcze stanowiły

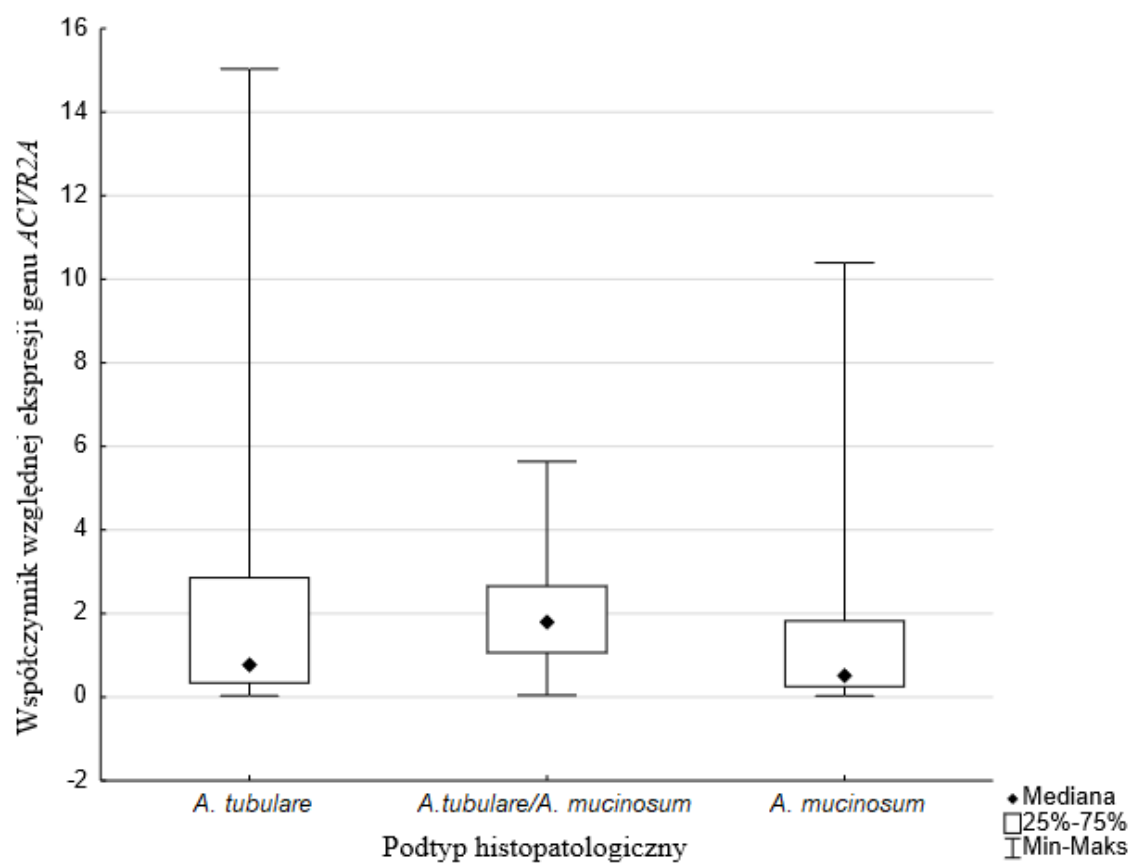
mniejszość ujętych w badaniu raków, tj. 26% w przypadku grupy z ocenianą ekspresją genu *ACVR2A* oraz 32% w przypadku grupy poddawanej ilościowej ocenie transkryptu *TGFB1*. Dane dotyczące poszczególnych podtypów histopatologicznych zostały przedstawione w Tabeli 34.

Tabela 34: Względne poziomy ekspresji badanych genów a podtyp histopatologiczny raka.

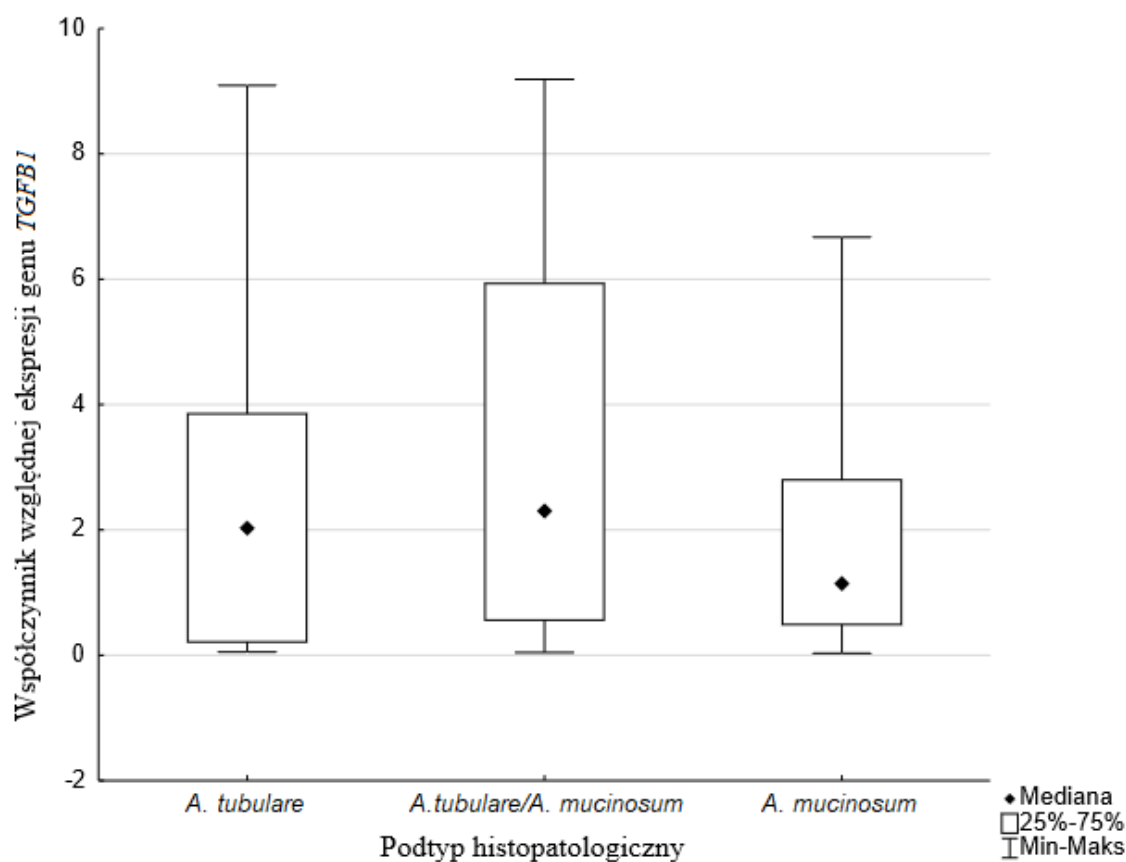
Gen	Podtyp histopatologiczny	Liczebność (N)	Odsetek [%]	Wartość p
ACVR2A	<i>Adenocarcinoma tubulare</i>	57	74	0,1094
	<i>Adenocarcinoma mucinosum</i>	10	13	
	<i>Adenocarcinoma tubulare/</i>			
	<i>Adenocarcinoma mucinosum</i>	10	13	
TGFB1	<i>Adenocarcinoma tubulare</i>	32	68	0,9561
	<i>Adenocarcinoma mucinosum</i>	9	19	
	<i>Adenocarcinoma tubulare/</i>			
	<i>Adenocarcinoma mucinosum</i>	6	13	

Analiza porównawcza przeprowadzona za pomocą testu Kruskala-Wallisa wykazała brak różnic pomiędzy względnymi poziomami ekspresji obu badanych genów a typem histopatologicznym raka.

Rycina 35: Względne poziomy ekspresji genu *ACVR2A* a podtyp histopatologiczny raka.



Rycina 36: Względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* a podtyp histopatologiczny raka.



WZGLĘDNE POZIOMY EKSPRESJI GENÓW *ACVR2A* I *TGFB1* A ZŁOŚLIWOŚĆ HISTOLOGICZNA RAKA JELITA GRUBEGO WG WHO

Podczas oceny mikroskopowej każdą z tkanek nowotworowych klasyfikowano w zależności od stopnia zróżnicowania histologicznego komórek do jednej z trzech grup. Większość obserwowanych przypadków stanowiły nowotwory o umiarkowanym i słabym stopniu zróżnicowania (Tabela 35). Z uwagi na niewielką ilość dobrze zróżnicowanych gruczolakoraków (G1), do celów statystycznych połączono grupy G1 i G2.

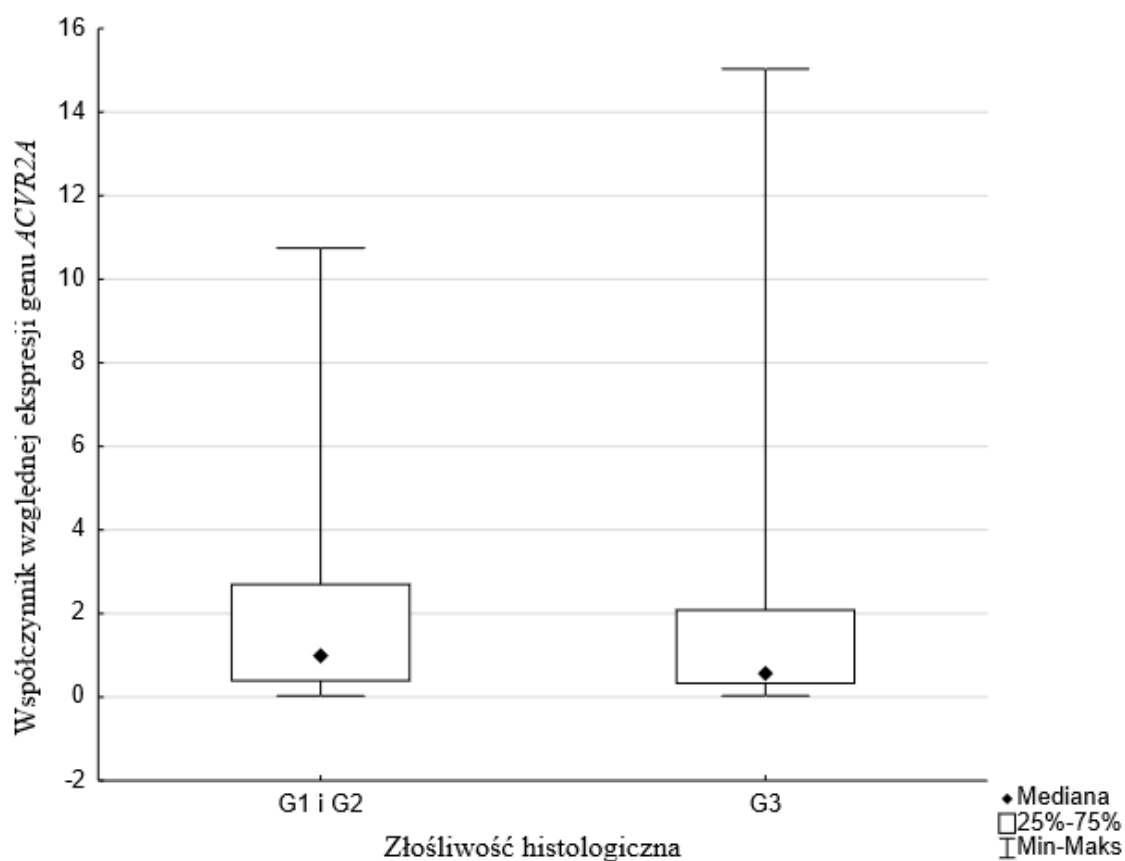
Do zbadania różnic pomiędzy poszczególnymi stopniami złośliwości histologicznej raków porównywano mediany względnych poziomów ekspresji genów *ACVR2A* (N=80) oraz *TGFB1* (N=50).

Tabela 35: Względne poziomy ekspresji badanych genów a stopień złośliwości histologicznej.

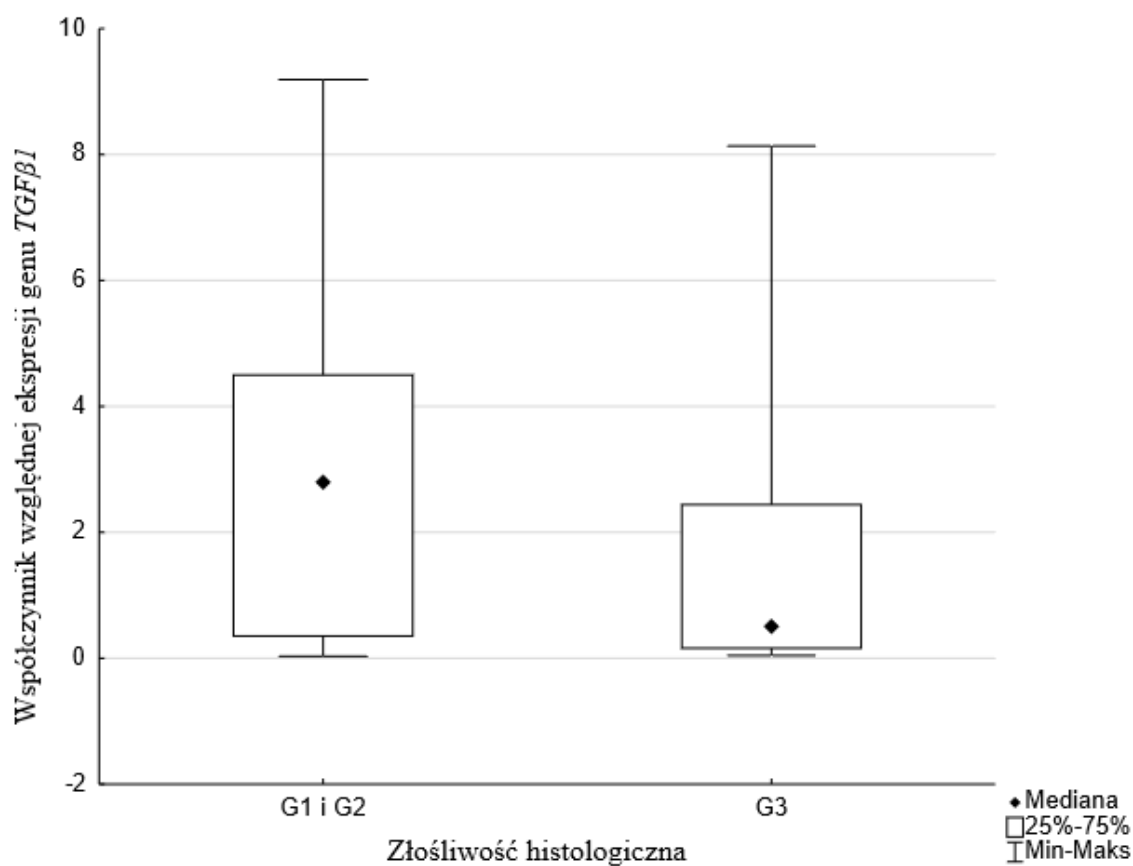
Gen	Stopień złośliwości histologicznej	Liczebność (N)	Odsetek [%]	Wartość p
ACVR2A	G1 i G2	58 (7+51)	72,5	0,3137
	G3	22	27,5	
TGFB1	G1 i G2	33 (4+29)	66	0,1102
	G3	17	34	

Z przeprowadzonej za pomocą testu U Manna-Whitneya analizy wynikało, że mediany względnych poziomów ekspresji genów *ACVR2A* oraz *TGFB1* nie różniły się pomiędzy grupami (odpowiednio $p=0,3137$ oraz $p=0,1102$).

Rycina 37: Względne poziomy ekspresji genu *ACVR2A* a stopień złośliwości histologicznej raka.

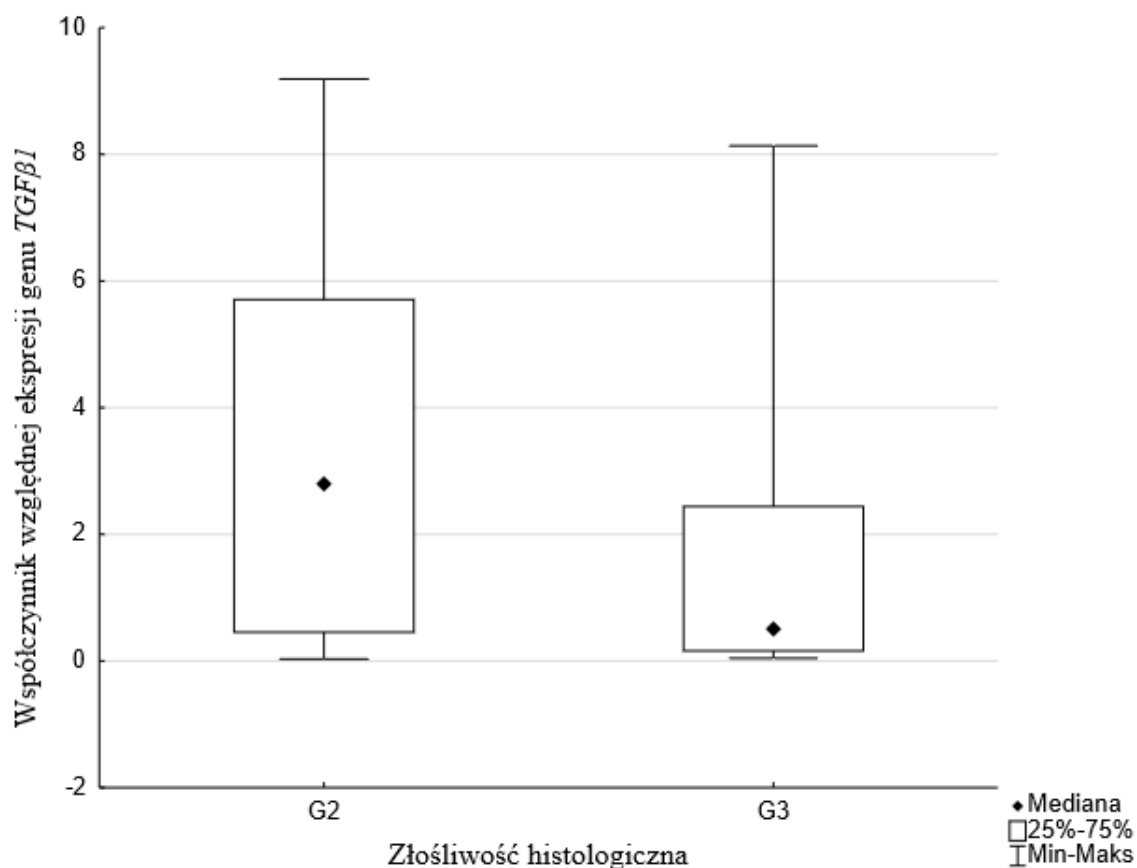


Rycina 38: Względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* a stopień złośliwości histologicznej raka.



Pomimo braku istotnej statystycznie zależności pomiędzy poziomem transkryptu genu *TGFB1* a stopniem złośliwości histologicznej, zauważono tendencję do osiągania wyższych względnych poziomów ekspresji tego genu przez gruczolakoraki G1 i G2. Z uwagi na zbyt małą liczbę przypadków raków o stopniu G1, zdecydowano się wykonać kolejną analizę statystyczną celem zweryfikowania zależności pomiędzy grupami G2 i G3.

Rycina 39: Względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* a stopień złośliwości histologicznej G2 i G3.



Ponownie nie potwierdzono statystycznie znamiennej zależności pomiędzy porównywanymi grupami, mimo zauważalnie wyższych względnych poziomów ekspresji genu *TGFB1* w stopniu G2 ($p=0,0687$).

WZGLĘDNE POZIOMY EKSPRESJI GENÓW *ACVR2A* I *TGFB1* A STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA KLINICZNEGO NOWOTWORU WG KLASYFIKACJI ASTLERA-COLLERA

Grupę 79 pacjentów, u których oceniano względny poziom ekspresji genu *ACVR2A* oraz 49 pacjentów poddanych analizie pod kątem poziomu ekspresji genu *TGFB1* przydzielono do 6 grup w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego

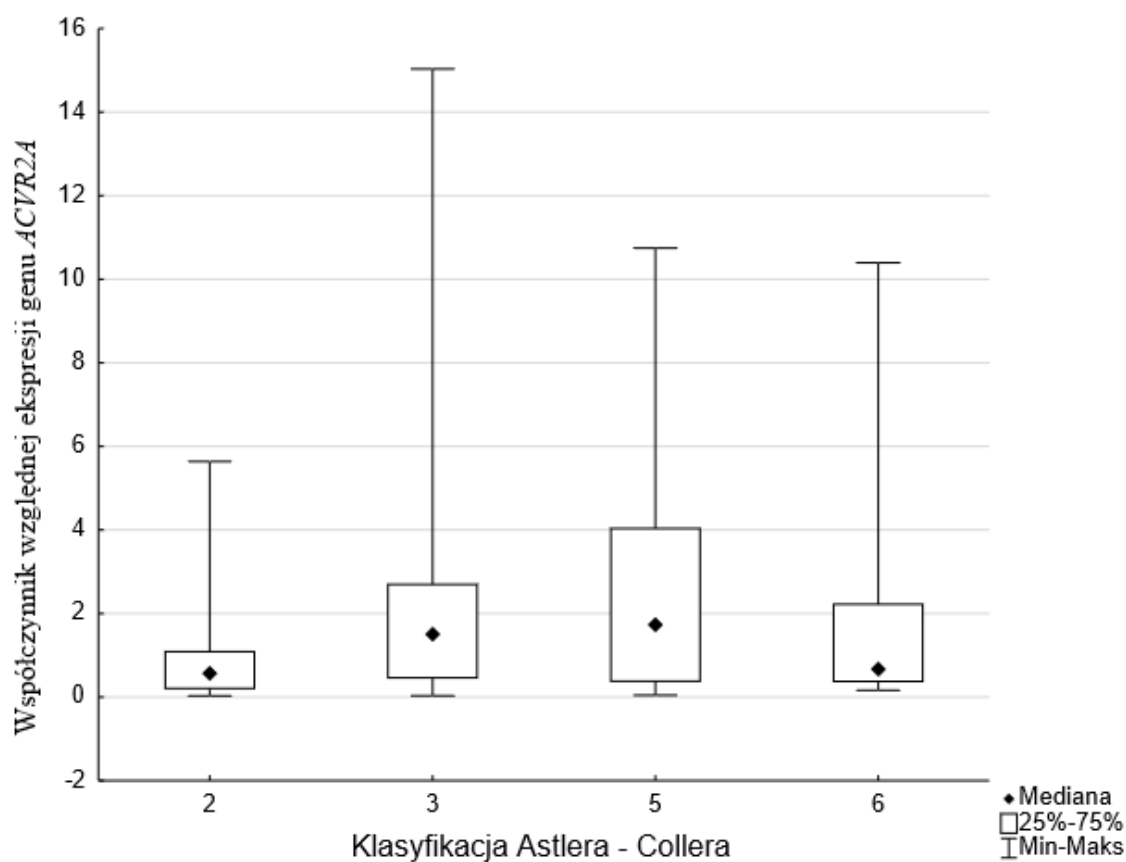
nowotworu wg kryteriów Astlera-Collera. Z uwagi na niewystarczającą ilość pacjentów o stopniach I i IV klasyfikacji, nie ujęto ich w analizach statystycznych.

Tabela 36: Względne poziomy ekspresji badanych genów a stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji Astlera-Collera.

Gen	Stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji Astlera-Collera	Liczebność (N)	Odsetek [%]	Wartość p
ACVR2A	II	22	28	0,3739
	III	25	32	
	V	20	25	
	VI	12	15	
TGFB1	II	16	33	0,0211
	III	14	29	
	V	11	22	
	VI	8	16	

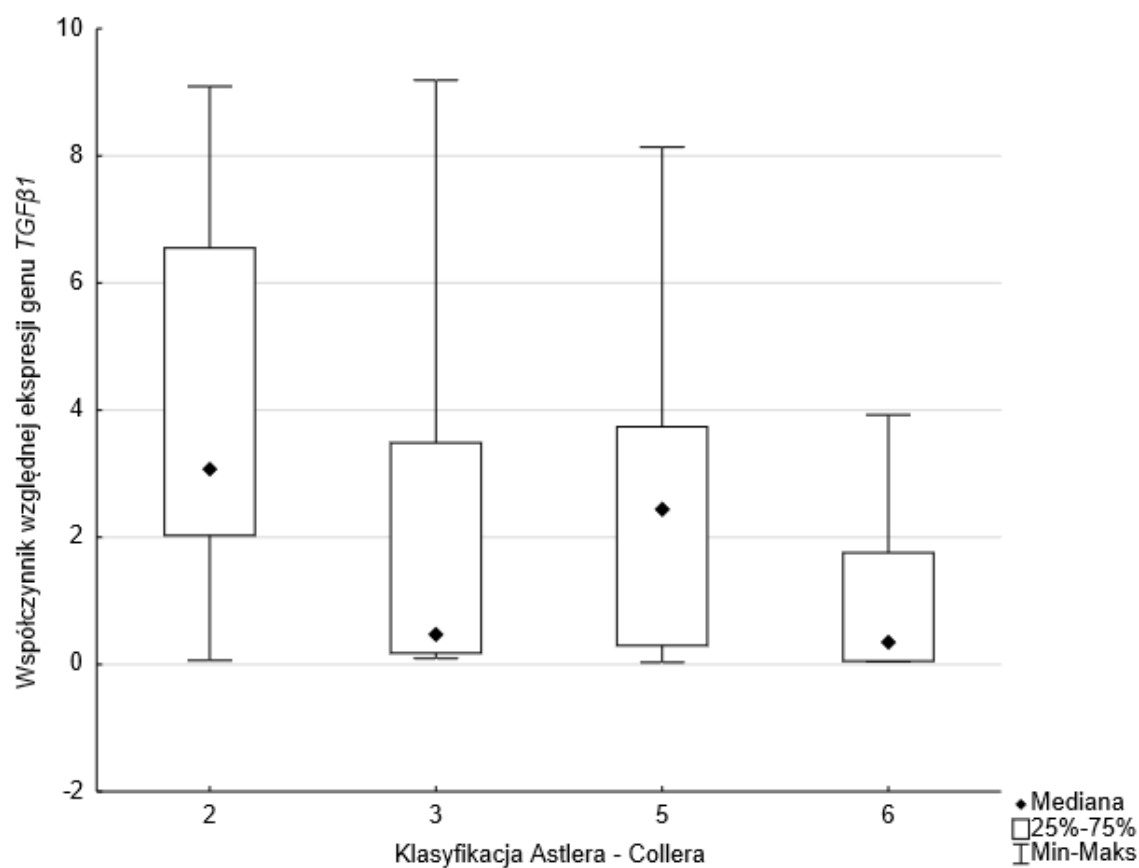
Z analizy statystycznej przeprowadzonej testem Kruskala-Wallisa wynikało, że względny poziom ekspresji genu *ACVR2A* nie różnił się pomiędzy poszczególnymi stopniami zaawansowania klinicznego ($p=0,3739$).

Rycina 40: Względne poziomy ekspresji genu *ACVR2A* a stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji Astlera-Collera.



Odmienny wynik uzyskano analizując mediany względnego poziomu transkryptu genu *TGFB1*. W toku postępowania statystycznego dowiedziono, iż względny poziom ekspresji tego genu różnił się w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji Astlera-Collera a zależność ta była statystycznie znamienna ($p=0,0211$).

Rycina 41: Względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* a stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji Astlera-Collera.



Do oceny zależności między stopniami zaawansowania klinicznego wykorzystano konserwatywny test *post-hoc* Dunn z poprawką Benjamini-Hochberga, który porównywał wartości median względnych poziomów ekspresji genu.

Tabela 37: Porównanie median względnych poziomów ekspresji genu *TGFB1* pomiędzy różnymi stopniami zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji Astlera-Collera z wykorzystaniem testu *post-hoc* Dunn z poprawką Benjamini-Hochberga.

	II°	III°	V°
III°	0,2474		
V°	0,2756	0,7453	
VI°	0,0420	0,2756	0,2756

Porównanie wykazało istotną statystycznie różnicę względnych poziomów ekspresji genu *TGFB1* pomiędzy pacjentami z II oraz VI stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu ($p=0,0420$). Względny poziom transkryptu genu *TGFB1* u pacjentów o II° zaawansowania klinicznego był wyższy niż u pacjentów o VI° zaawansowania raka jelita grubego. Otrzymane wyniki sugerują, że obniżenie poziomu ekspresji analizowanego genu może przyczyniać się do postępu choroby.

WZGLĘDNE POZIOMY EKSPRESJI GENÓW *ACVR2A* I *TGFB1* A STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA KLINICZNEGO NOWOTWORU WG KLASYFIKACJI TNM

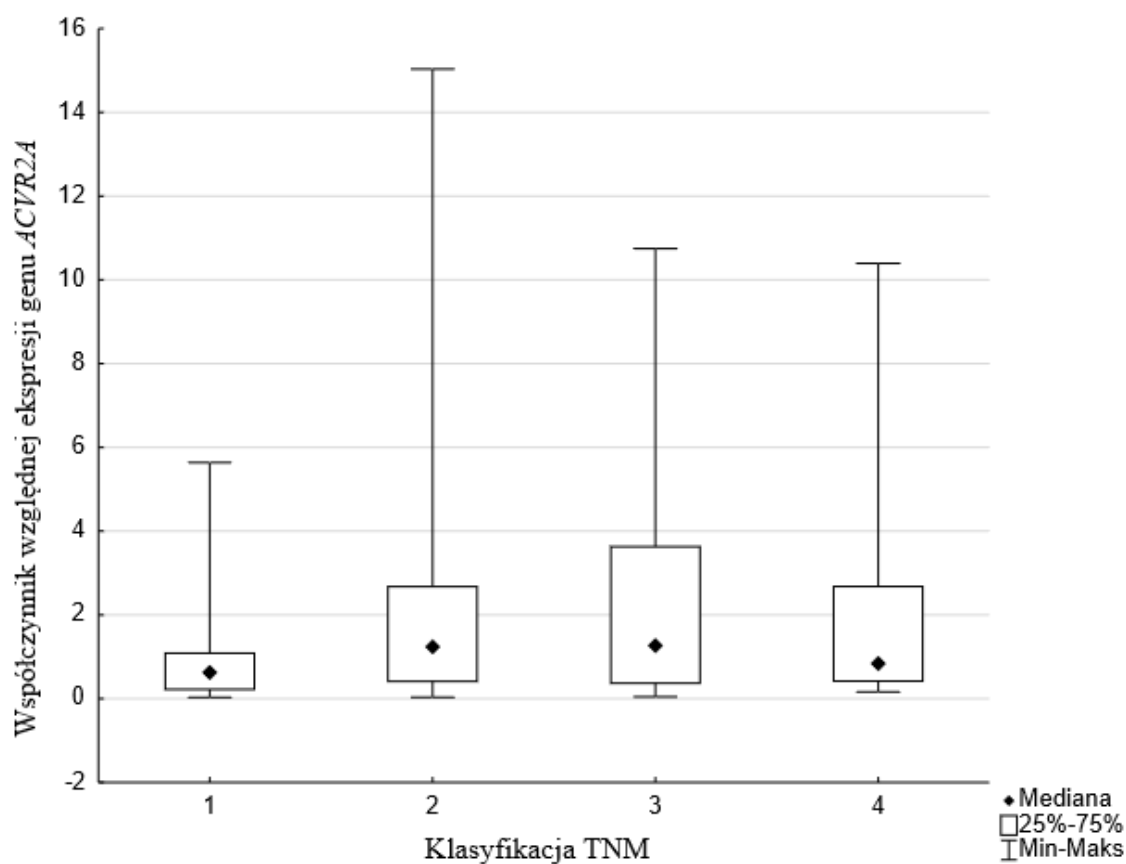
Do celów statystycznych uwzględniono 81 pacjentów, u których oceniano względny poziom ekspresji genu *ACVR2A* oraz 50 pacjentów poddanych analizie poziomemu transkryptu genu *TGFB1*. Badani zostali podzieleni na 4 grupy odpowiadające stopniom zaawansowania klinicznego klasyfikacji TNM.

Tabela 38: Względne poziomy ekspresji badanych genów a stopień zaawansowania klinicznego wg TNM.

Gen	Stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM		Odsetek [%]	Wartość p
	Liczebność (N)			
<i>ACVR2A</i>	I	21	25,926	0,6917
	II	24	29,630	
	III	21	25,926	
	IV	15	18,518	
<i>TGFB1</i>	I	16	32	0,0113
	II	12	24	
	III	13	26	
	IV	9	18	

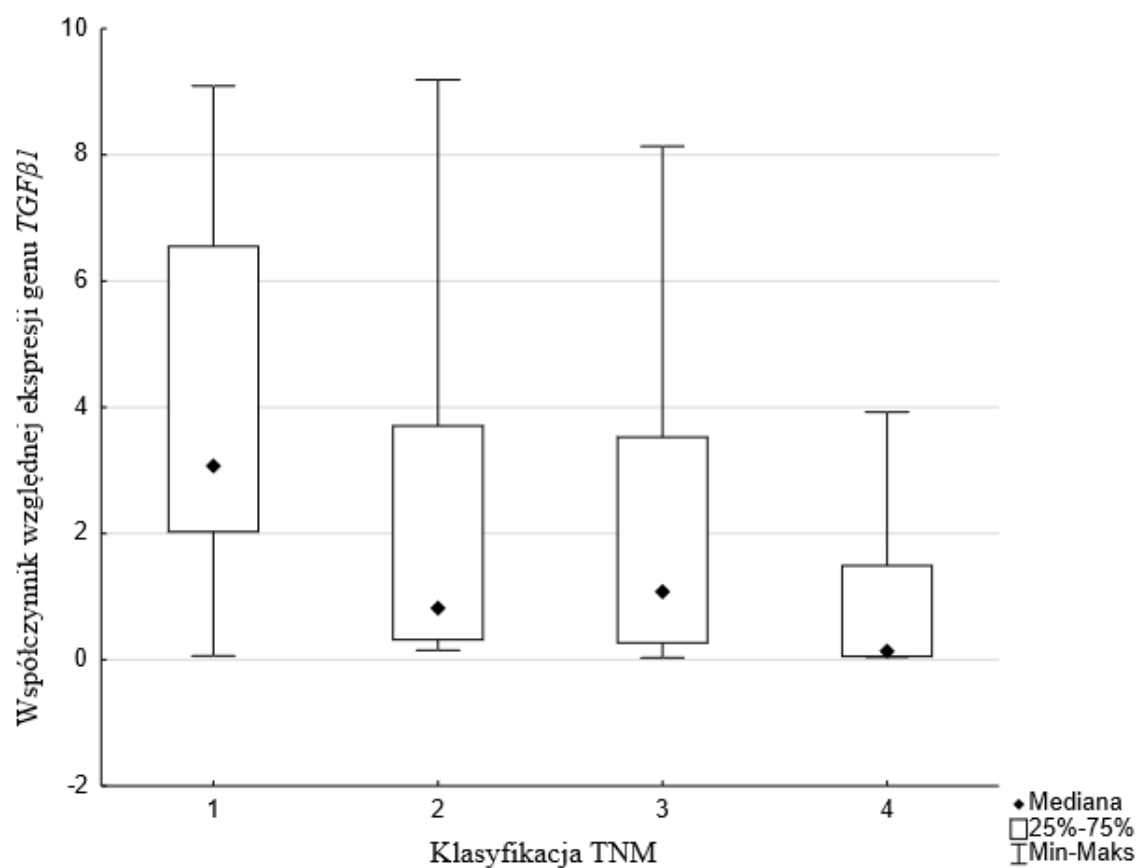
Przeprowadzona testem Kruskala-Wallisa analiza porównawcza median względnych poziomów ekspresji genu *ACVR2A* nie wykazała żadnych istotnych statystycznie zależności pomiędzy różnymi stopniami zaawansowania klinicznego klasyfikacji TNM ($p=0,6917$).

Rycina 42: Względne poziomy ekspresji genu *ACVR2A* a stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM.



W kolejnej analizie danych potwierdzono, że mediany względnych poziomów transkryptu genu *TGFB1* były istotnie różne w poszczególnych stopniach zaawansowania klinicznego raka jelita grubego ($p=0,0113$). Może to świadczyć o potencjalnym wpływie tego genu na progresję kancerogenezy.

Rycina 43: Względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* a stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM.



Do oceny zależności między stopniami zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM wykorzystano konserwatywny test *post-hoc* Dunn z poprawką Benjamini-Hochberga, który porównywał wartości median względnych poziomów ekspresji genu.

Tabela 39: Porównanie median względnych poziomów ekspresji genu *TGFB1* pomiędzy różnymi stopniami zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM z wykorzystaniem testu *post-hoc* Dunn z poprawką Benjamini-Hochberga.

	I ^o	II ^o + III ^o
II ^o +III ^o	0,0814	
IV ^o	0,0090	0,0814

Wykazano istotną statystycznie różnicę względnych poziomów ekspresji genu *TGFB1* pomiędzy stopniami I i IV klasyfikacji TNM ($p=0,0090$). U pacjentów z I^o zaawansowania klinicznego odnotowywano wyższe względne poziomy transkryptu genu *TGFB1* niż u pacjentów ze stopniem IV.

Zaobserwowano również tendencję do wyższych względnych poziomów ekspresji genu *TGFB1* w stopniu I w porównaniu do stopnia II i III oraz tych ostatnich względem stopnia IV. Zależności te jednak nie były istotne statystycznie ($p=0,0814$).

Uzyskane wyniki przemawiają za tym, że obniżenie poziomu ekspresji genu *TGFB1* może być jednym z czynników sprzyjających progresji raka jelita grubego.

WZGLĘDNE POZIOMY EKSPRESJI GENÓW *ACVR2A* I *TGFB1* A WIELKOŚĆ I GŁĘBOKOŚĆ NACIEKANIA ŚCIANY JELITA PRZEZ NOWOTWÓR

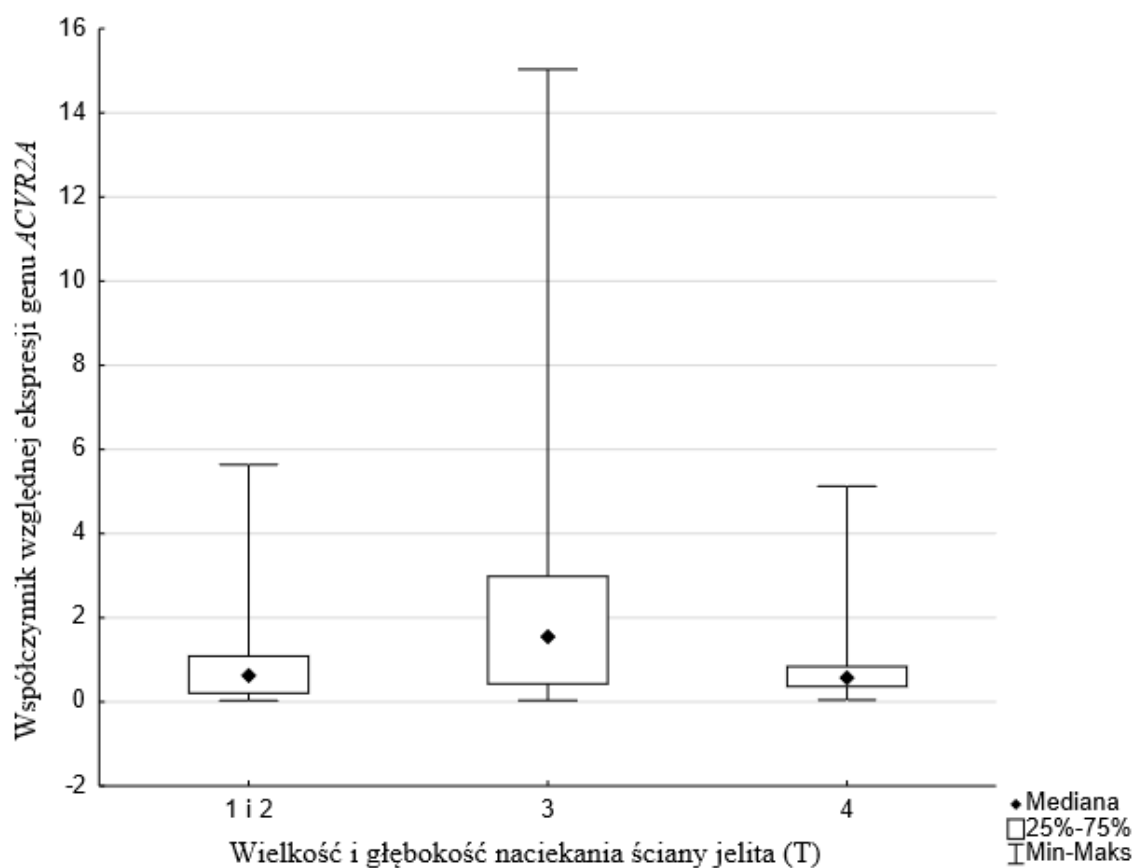
Pierwszym analizowanym parametrem klasyfikacji TNM pod kątem jednorodności median względnych poziomów mRNA badanych genów była cecha T mówiąca o wielkości zmiany pierwotnej i penetracji ściany jelita przez nowotwór. Na potrzeby analizy danych, mało liczna grupa pacjentów o stopniu T1 została włączona do grupy T2.

Tabela 40: Względne poziomy ekspresji badanych genów a wielkość i głębokość naciekania ściany jelita przez nowotwór.

Gen	Cecha T	Liczebność (N)	Odsetek [%]	Wartość p
ACVR2A	T1 i T2	23	28,4	0,1342
	T3	52	64,2	
	T4	6	7,4	
TGFB1	T1 i T2	17 (6+11)	34	0,0206
	T3	27	54	
	T4	6	12	

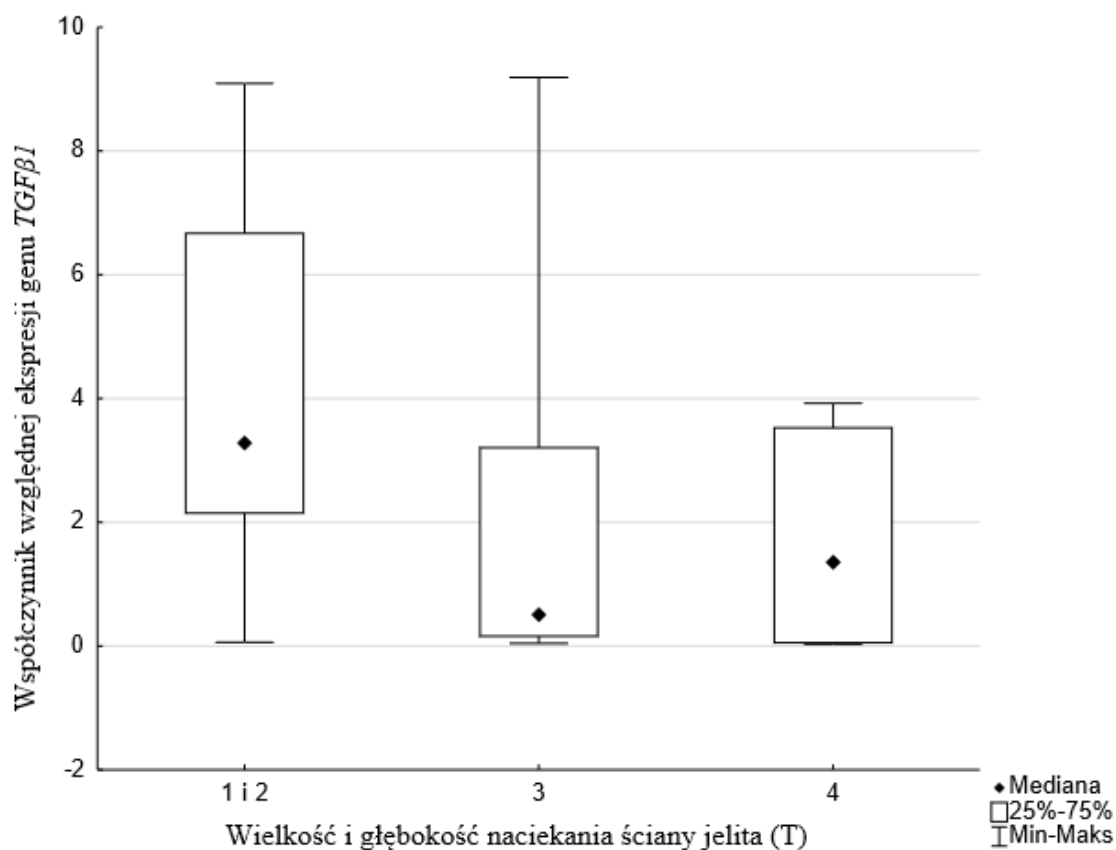
Analiza statystyczna wykonana testem Kruskala-Wallisa nie wykazała różnic pomiędzy względnymi poziomami ekspresji genu *ACVR2A* a cechą T klasyfikacji TNM ($p=0,1342$).

Rycina 44: Względne poziomy ekspresji genu *ACVR2A* a wielkość i głębokość naciekania ściany jelita przez nowotwór.



Zaobserwowano korelację pomiędzy względnymi poziomami mRNA genu *TGFB1* a cechą T klasyfikacji TNM. Zależność ta była statystycznie znamienna ($p=0,0206$). Najwyższe względne poziomy ekspresji stwierdzono w stopniach T1 i T2, co może świadczyć o hamującym wpływie tego genu na wielkość i głębokość nacieku nowotworowego.

Rycina 45: Względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* a wielkość i głębokość naciekania ściany jelita przez nowotwór.



Do oceny zależności między cechą T klasyfikacji TNM a medianami względnych poziomów ekspresji genu *TGFB1* wykorzystano konserwatywny test *post-hoc* Dunn z poprawką Benjamini-Hochberga.

Tabela 41: Porównanie median względnych poziomów ekspresji genu *TGFB1* pomiędzy różnymi stopniami T klasyfikacji TNM z wykorzystaniem testu *post-hoc* Dunn z poprawką Benjamini-Hochberga.

	T1 i T2	T3
T3	0,0261	
T4	0,0866	0,8438

Potwierdzono istotną statystycznie różnicę median względnego poziomu transkryptu genu *TGFB1* pomiędzy grupą T1 i T2 a grupą T3 ($p=0,0261$). Pacjenci z nowotworem T1 lub T2 odznaczali się wyższymi względnymi poziomami transkryptu genu *TGFB1* niż chorzy ze stopniem T3. Zaobserwowano jednocześnie tendencję do uzyskiwania wyższych względnych poziomów ekspresji analizowanego genu w nowotworach T1 lub T2 względem raków o stopniu T4, jednak weryfikowana zależność nie była istotna statystycznie ($p=0,0866$).

Otrzymane wyniki mogą świadczyć o potencjalnym wpływie obniżonej ekspresji genu *TGFB1* na powstawanie raków jelita grubego o większych rozmiarach i głębokości nacieku nowotworowego.

WZGLĘDNE POZIOMY EKSPRESJI GENÓW *ACVR2A* I *TGFB1* A ZAJĘCIE REGIONALNYCH WĘZŁÓW CHŁONNYCH

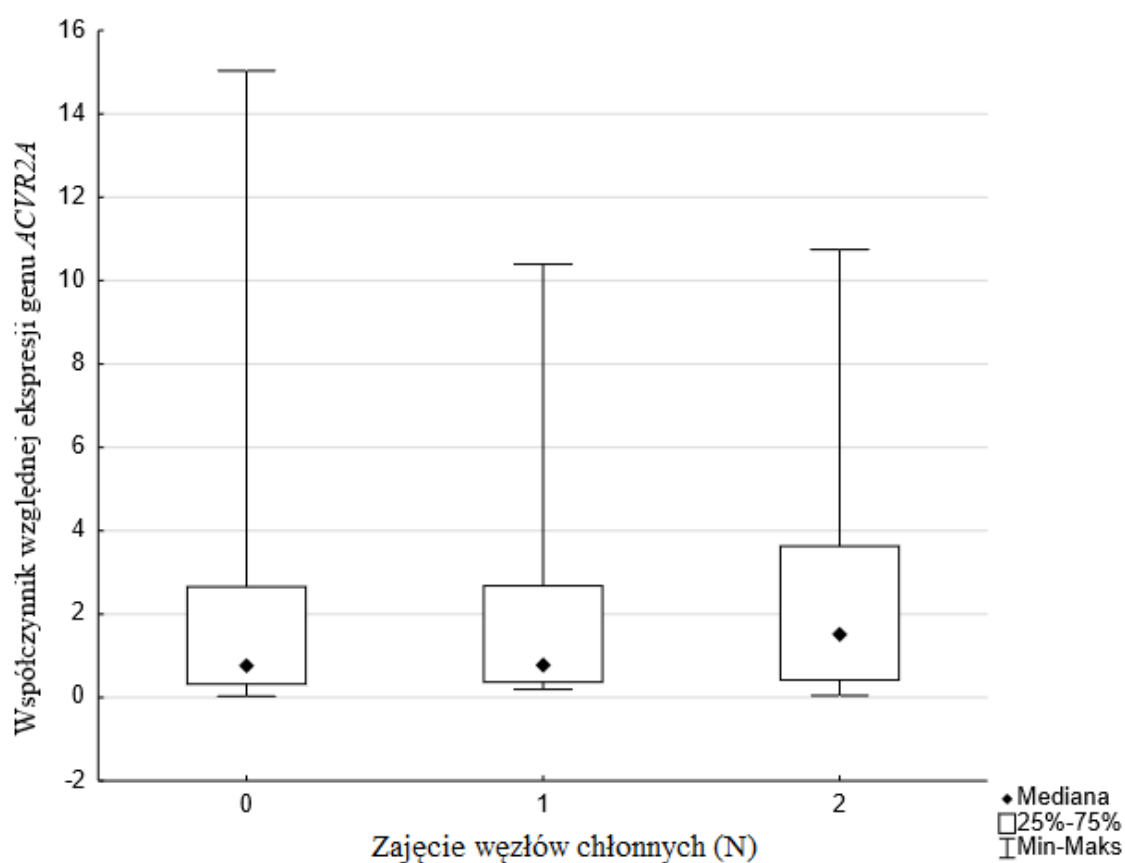
Kolejnym ocenianym parametrem klasyfikacji TNM była cecha N mówiąca o obecności komórek nowotworowych w regionalnych węzłach chłonnych. Do analizy statystycznej włączono 77 pacjentów z określonym względnym poziomem ekspresji genu *ACVR2A* oraz 48 pacjentów z ocenionym ilościowo poziomem ekspresji genu *TGFB1*.

Tabela 42: Względne poziomy ekspresji badanych genów a zajęcie regionalnych węzłów chłonnych.

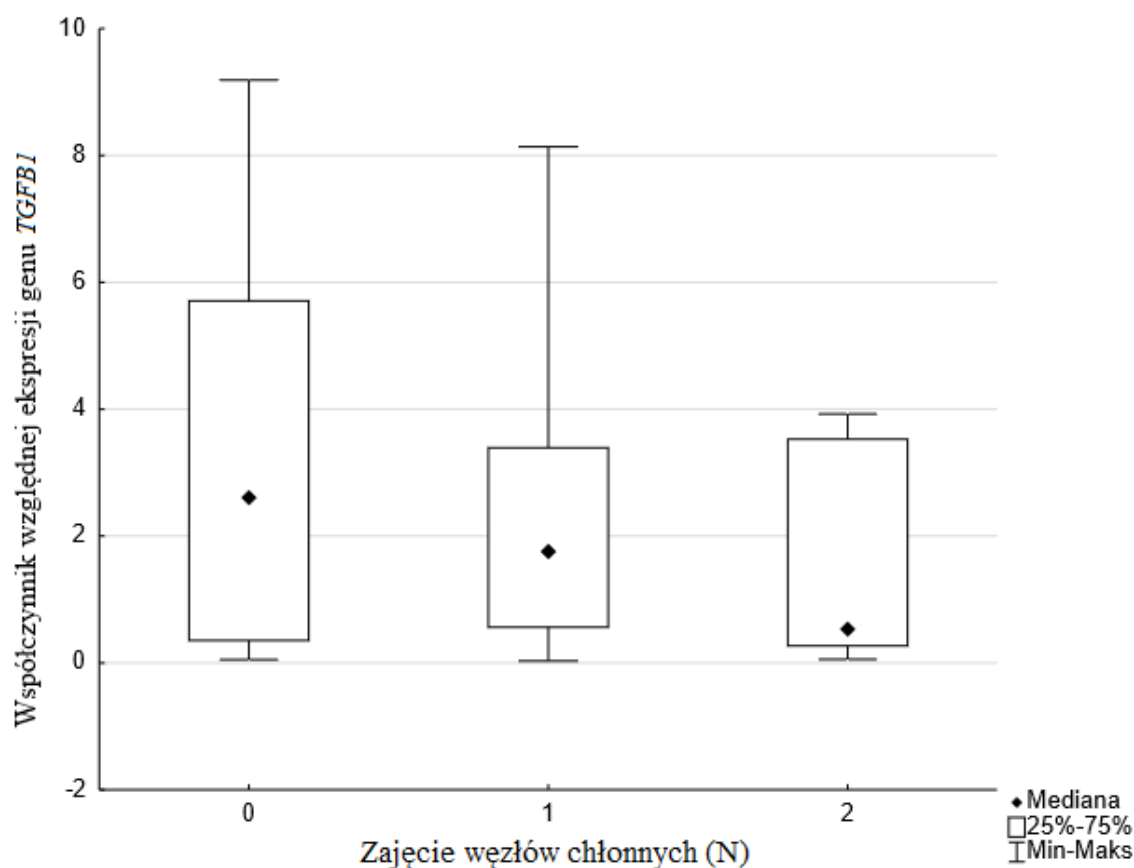
Gen	Stopień N	Liczebność (N)	Odsetek [%]	Wartość p
<i>ACVR2A</i>	N0	46	60	0,5218
	N1	13	17	
	N2	18	23	
<i>TGFB1</i>	N0	30	62,5	0,4884
	N1	8	16,7	
	N2	10	20,8	

Zastosowany test Kruskala-Wallisa wykazał brak istotnych statystycznie różnic w poziomach ekspresji genów *ACVR2A* i *TGFB1* w różnych stadiach N klasyfikacji TNM ($p=0,5218$ dla genu *ACVR2A* oraz $p=0,4884$ dla genu *TGFB1*).

Rycina 46: Względny poziom ekspresji genu *ACVR2A* a zajęcie regionalnych węzłów chłonnych.



Rycina 47: Względny poziom ekspresji genu *TGFB1* a zajęcie regionalnych węzłów chłonnych.



WZGLĘDNE POZIOMY EKSPRESJI GENÓW *ACVR2A* I *TGFB1* A OBECNOŚĆ PRZERZUTÓW ODLEGŁYCH

Ostatnim elementem klasyfikacji TNM podlegającym ocenie była cecha M świadcząca o obecności lub braku przerzutów odległych.

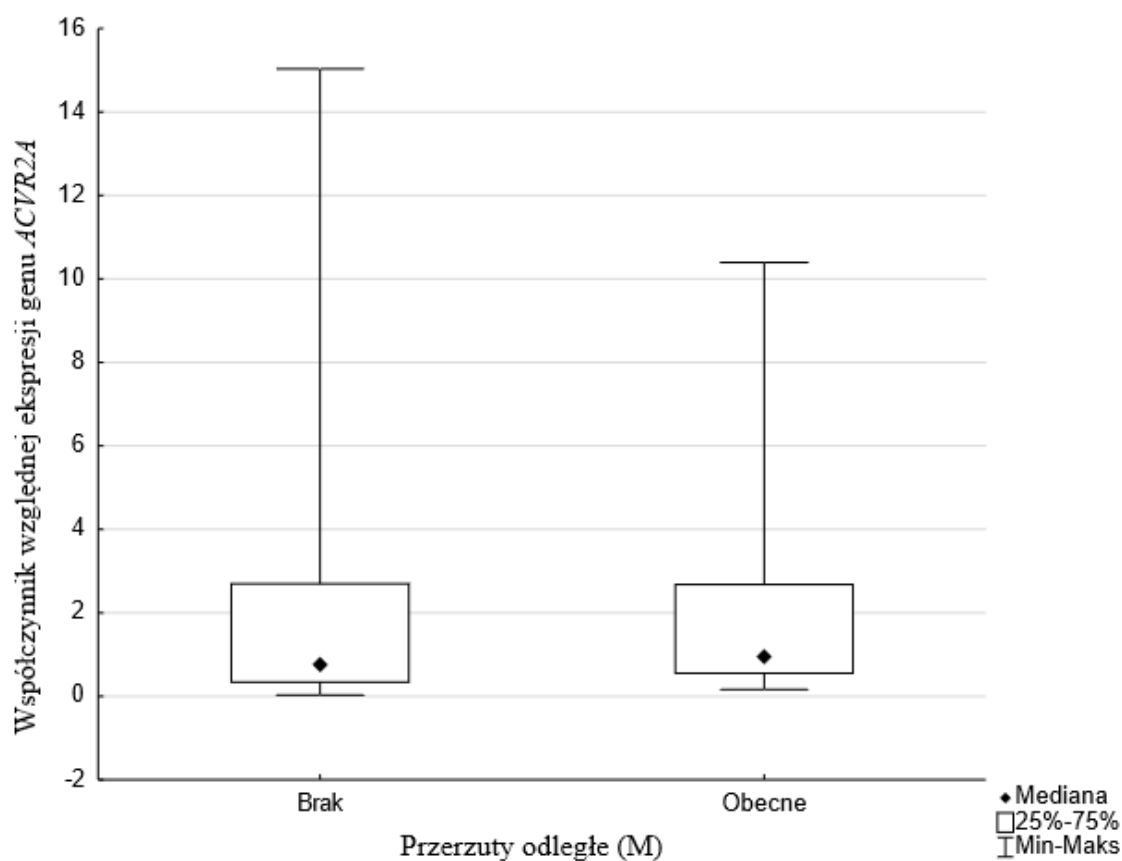
Dane uwzględnione w analizie statystycznej pochodziły od 80 pacjentów, u których oceniano względny poziom mRNA genu *ACVR2A* oraz 48 pacjentów, u których badano poziom ekspresji genu *TGFB1*. We wszystkich przypadkach ogniska przerzutowe raka jelita grubego zlokalizowane były w wątrobie.

Tabela 43: Względne poziomy ekspresji badanych genów a obecność przerzutów odległych.

Gen	Stopień M	Liczebność (N)	Odsetek [%]	Wartość p
ACVR2A	M0	66	82,5	0,6807
	M1	14	17,5	
TGFB1	M0	41	85	0,0120
	M1	7	15	

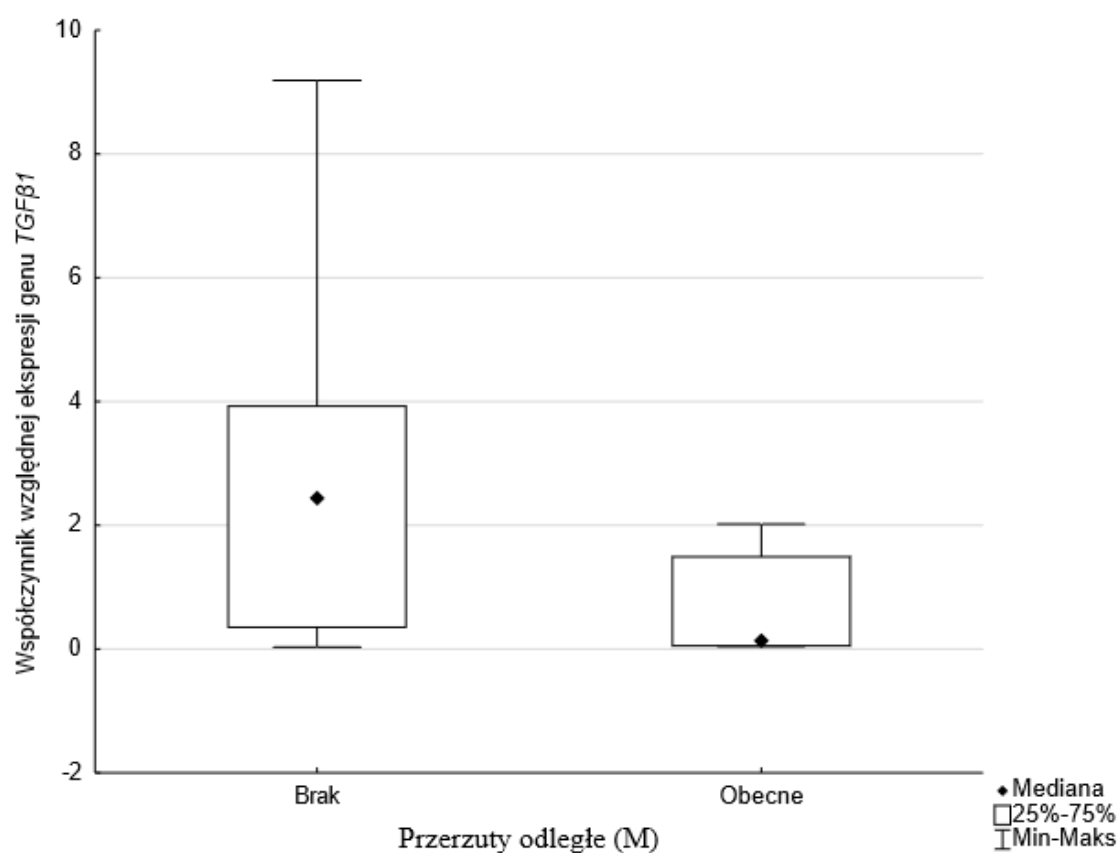
Przeprowadzona testem U Manna-Whitneya analiza porównawcza nie wykazała zależności między względnymi poziomami ekspresji genu *ACVR2A* a obecnością przerzutów odległych. ($p=0,6807$).

Rycina 48: Względne poziomy ekspresji genu *ACVR2A* a obecność przerzutów odległych.



Dowodzono jednak, że względne poziomy transkryptu genu *TGFB1* różniły się u pacjentów w zależności od obecności przerzutów odległych ($p=0,0120$). Pacjenci bez stwierdzonych przerzutów do wątroby charakteryzowali się wyższymi względnymi poziomami ekspresji analizowanego genu, co może wskazywać na protekcyjną rolę *TGFB1* w procesie tworzenia przerzutów.

Rycina 49: Względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* a obecność przerzutów odległych.



WZGLĘDNE POZIOMY EKSPRESJI GENÓW *ACVR2A* I *TGFB1* A ZAJĘCIE NACZYŃ KRWIONOŚNYCH PRZEZ NOWOTWÓR

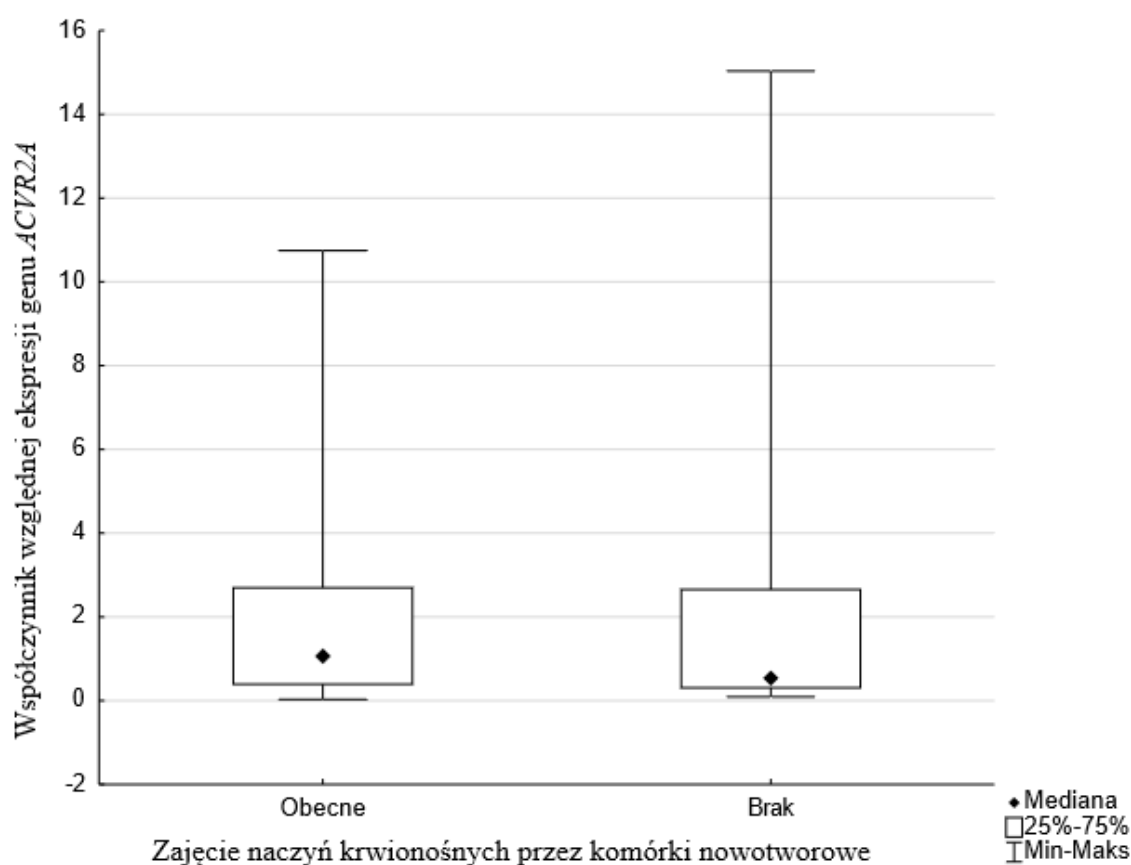
Potwierdzona histopatologicznie obecność komórek nowotworowych w naczyniach krwionośnych jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w przebiegu raka jelita grubego. Grupa badana, w której oceniano względny poziom transkryptu genu *ACVR2A* składała się z 81 pacjentów, natomiast w przypadku genu *TGFB1* grupę stanowiło 50 pacjentów.

Tabela 44: Względne poziomy ekspresji badanych genów a zajęcie naczyń krwionośnych.

Gen	Zajęcie naczyń krwionośnych	Liczebność (N)	Odsetek [%]	Wartość p
<i>ACVR2A</i>	Brak	30	37	0,2798
	Obecne	51	63	
<i>TGFB1</i>	Brak	15	30	0,0125
	Obecne	35	70	

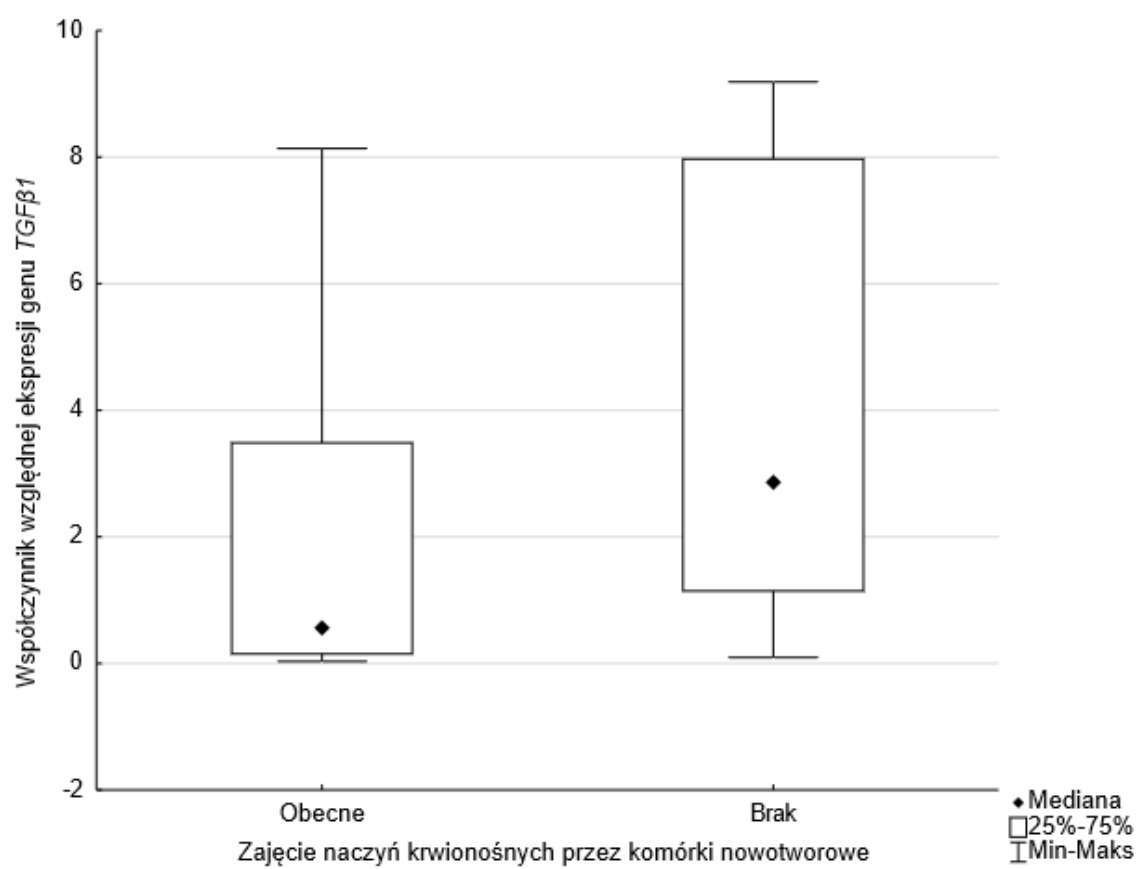
Przeprowadzona testem U Manna-Whitneya analiza statystyczna dowiodła, że względny poziom ekspresji genu *ACVR2A* nie był związany z obecnością komórek nowotworowych w naczyniach krwionośnych ($p=0,2798$).

Rycina 50: Względne poziomy ekspresji genu *ACVR2A* a zajęcie naczyń krwionośnych przez nowotwór.



Analiza statystyczna wykazała występowanie zależności między względnymi poziomami ekspresji genu *TGFB1* a zajęciem naczyń krwionośnych przez nowotwór ($p=0,0125$). Stwierdzono wyższe względne poziomy transkryptu genu *TGFB1* w przypadku raków bez zajęcia naczyń krwionośnych przez komórki nowotworowe, co może przemawiać za udziałem badanego genu w procesie nadawania komórkom zdolności migracyjnych, a następnie tworzenia wtórnych ognisk nowotworowych w narządach odległych.

Rycina 51: Względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* a zajęcie naczyń krwionośnych przez nowotwór.



WZGLĘDNE POZIOMY EKSPRESJI GENÓW *ACVR2A* I *TGFB1* A OBECNOŚĆ NACIEKU LIMFOCYTARNEGO W TKANCE NOWOTWOROWEJ

Pobrane śródoperacyjnie fragmenty tkanek były sprawdzane pod kątem obecności w masie nowotworowej nacieku limfocytarnego, który jest pozytywnym wskaźnikiem prognostycznym zaawansowanego raka jelita grubego.

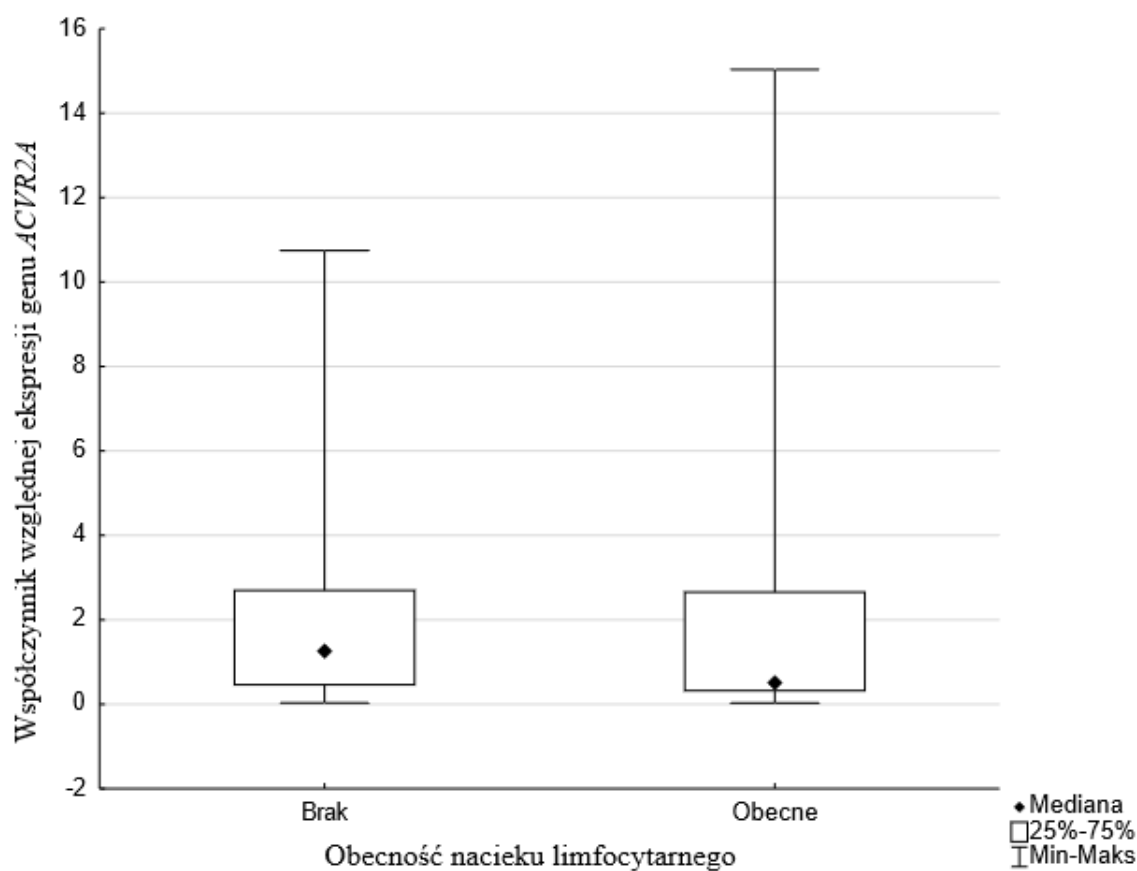
W dalszej kolejności oceniano względne poziomy ekspresji genów *ACVR2A* (N=81) oraz *TGFB1* (N=50) i porównywano je z naciekiem limfocytarnym w tkance.

Tabela 45: Względne poziomy ekspresji badanych genów a obecność nacieku limfocytarnego.

Gen	Naciek limfocytarny	Liczebność (N)	Odsetek [%]	Wartość p
<i>ACVR2A</i>	Brak	46	57	0,1236
	Obecny	35	43	
<i>TGFB1</i>	Brak	30	60	0,0087
	Obecny	20	40	

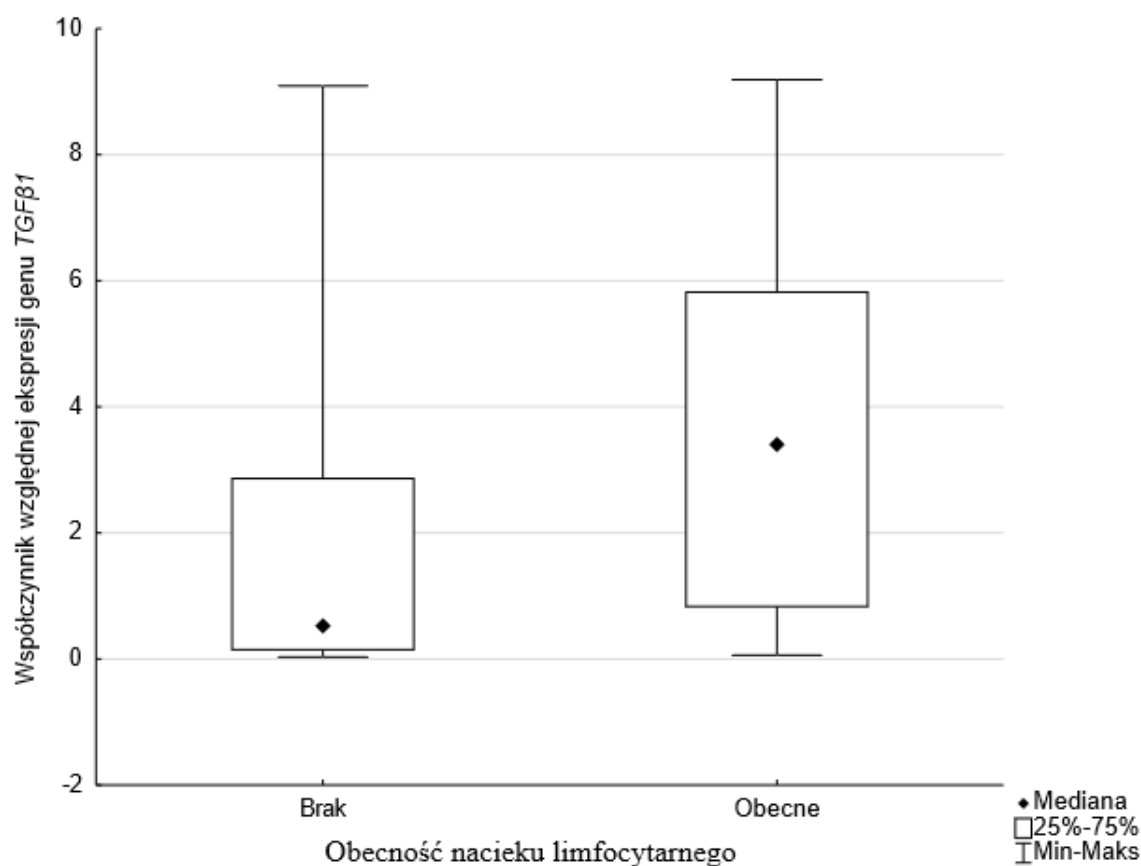
Analiza porównawcza przeprowadzona testem U Manna-Whitneya nie wykazała korelacji między względnymi poziomami ekspresji genu *ACVR2A* a obecnością nacieku limfocytarnego w tkance nowotworowej ($p=0,1236$).

Rycina 52: Względne poziomy ekspresji genu *ACVR2A* a obecność nacieku limfocytarnego w tkance nowotworowej.



Analiza statystyczna dowiodła, że względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* różniły się w zależności od obecności limfocytów w tkance nowotworowej ($p=0,0087$). Zaobserwowano wyższe względne poziomy mRNA genu *TGFB1* u osób z naciekiem limfocytarnym, co może świadczyć o jego istotnej roli w regulacji odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko nowotworowi.

Rycina 53: Względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* a obecność nacieku limfocytarnego w tkance nowotworowej.



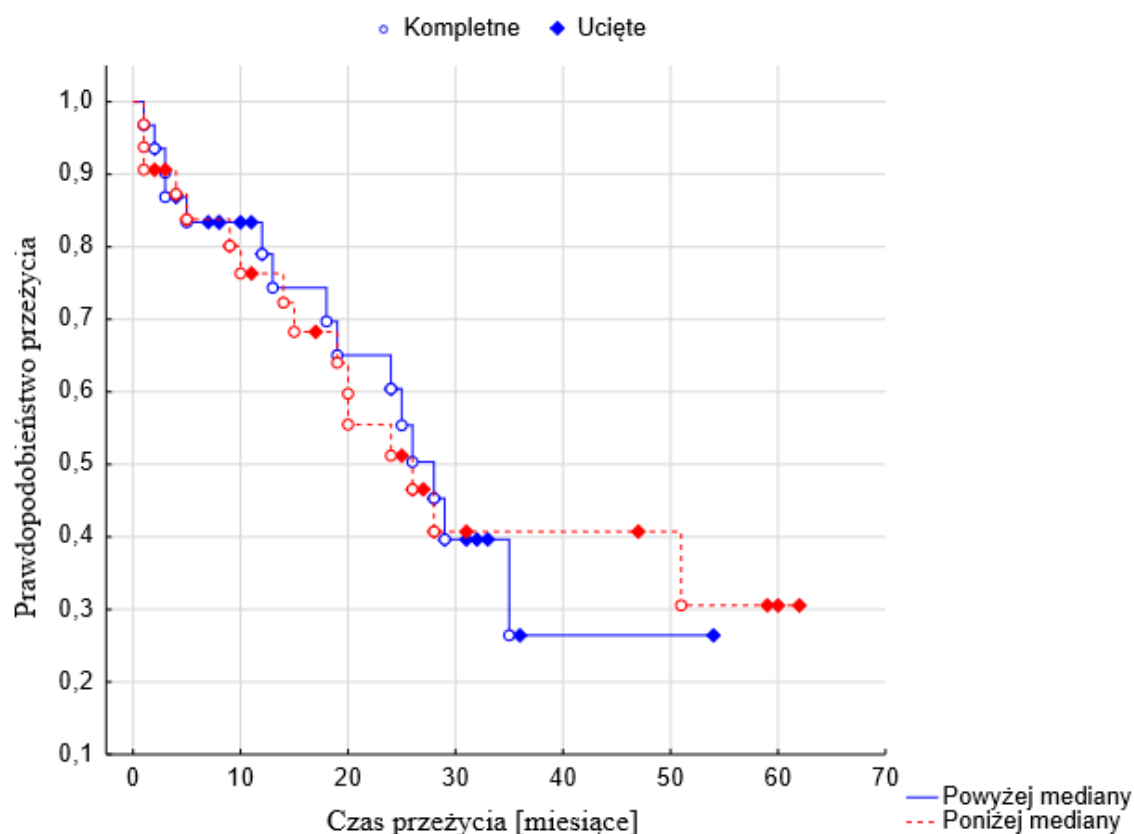
WZGLĘDNE POZIOMY EKSPRESJI GENÓW *ACVR2A* I *TGFB1* A PRZEŻYCIE PACJENTÓW

Dane dotyczące przeżycia pacjentów dostępne były dla grupy 64 osób, u których oceniano względny poziom ekspresji genu *ACVR2A* oraz dla 40 chorych, u których określano względny poziom transkryptu genu *TGFB1*.

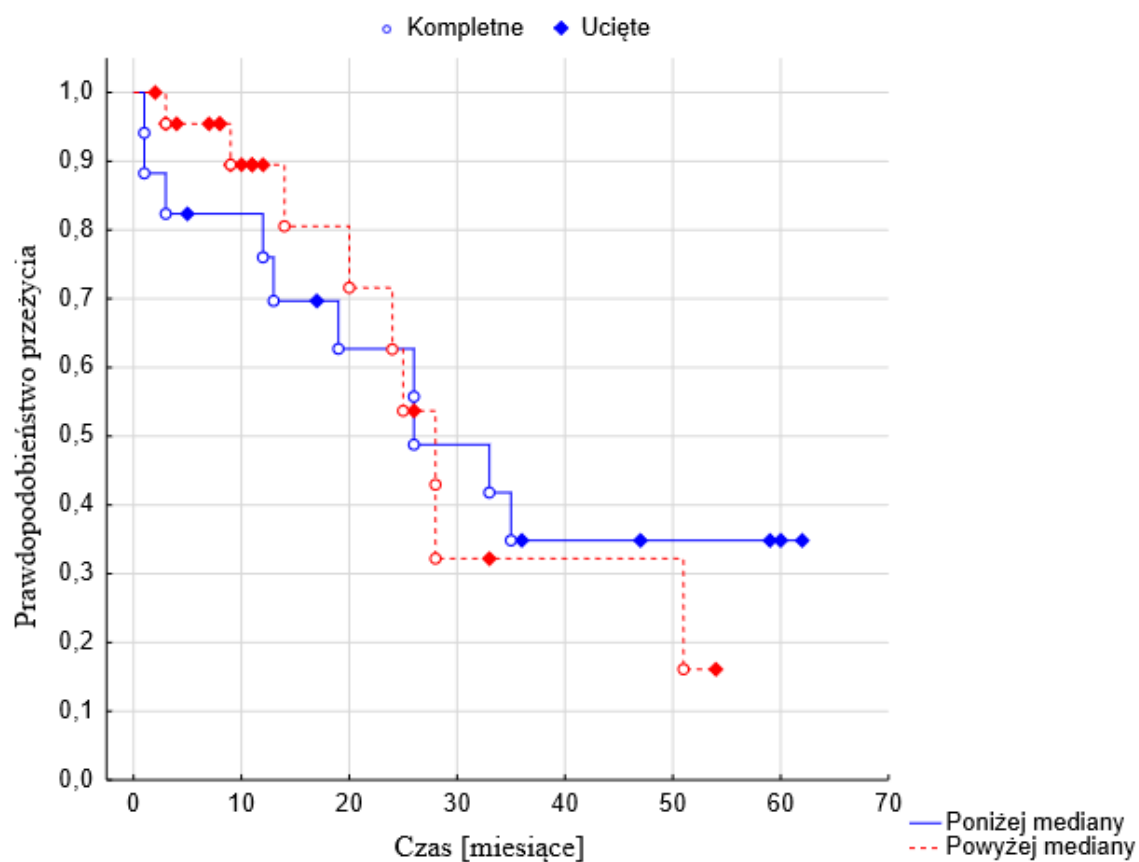
Zamiarem porównania przeżywalności dokonano podziału populacji na dwie grupy względem mediany wartości Ct otrzymanych po reakcji real-time PCR dla każdego z badanych genów. W przypadku genu *ACVR2A* mediana wartości Ct wyniosła 0,8016, natomiast dla genu *TGFB1* była równa 1,6990.

Na podstawie analizy przeżycia pacjentów dokonanej testem log-rank nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic czasów przeżycia w zależności od względnych poziomów ekspresji badanych genów (dla genu *ACVR2A* $p=0,7903$, dla genu *TGFB1* $p=0,5257$). Poniżej przedstawiono krzywe prawdopodobieństwa przeżycia Kaplana-Meiera pacjentów z rakiem jelita grubego, uwzględniające również obserwacje ucięte.

Rycina 54: Względne poziomy ekspresji genu *ACVR2A* a prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów.



Rycina 55: Względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* a prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów.



11.2. Ocena metylacji w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* w powiązaniu z parametrami demograficzno – patologicznymi pacjentów

Zaobserwowane zależności w przypadku analizy porównawczej względnego poziomu ekspresji genu *TGFB1* z cechami demograficzno-patologicznymi pacjentów skłoniły do poszukiwania mechanizmów zaangażowanych w regulację ekspresji badanego genu.

Jednym z procesów mogących wpływać na przebieg transkrypcji genów jest metylacja DNA. Polega ona na przenoszeniu grup metylowych na cytozyny znajdujące się w obrębie bogatej w dinukleotydy CpG sekwencji promotorowej genu, w wyniku czego dochodzi do zahamowania transkrypcji.

Celem sprawdzenia czy przyczyną zmian poziomu transkryptu genu *TGFB1* było przyłączanie reszt metylowych w regionie od -235 do +22 nukleotydu, przeprowadzono jakościową ocenę metylacji tego obszaru.

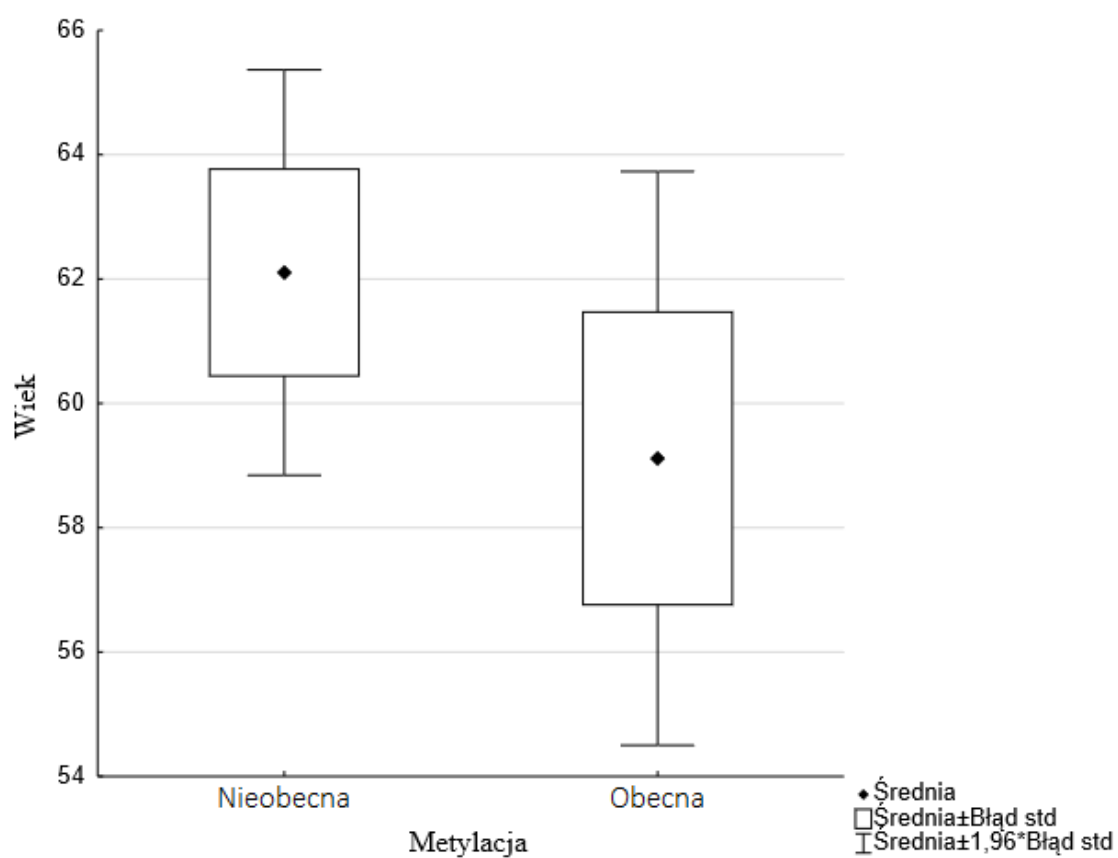
METYLACJA REGIONU PROMOTOROWEGO GENU *TGFB1* A WIEK PACJENTÓW

Analiza metylacji genu *TGFB1* została przeprowadzona na 64 próbach DNA pochodzących od pacjentów z potwierdzonym histopatologicznie rakiem jelita grubego. U wszystkich oceniono obecność metylacji wysp CpG w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1*.

W grupie badanej metylację regionu promotorowego potwierdzono w 26 przypadkach (40,6%), natomiast 38 (59,4%) było pozbawionych w obserwowanym obszarze 5-metylocytozyn.

Średnia wieku pacjentów, u których potwierdzono metylację w obrębie wysp CpG poprzedzających gen *TGFB1* wynosiła 59 lat i była niższa od średniej wieku badanych bez metylacji (62 lata).

Rycina 56: Częstość metylacji w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* a wiek pacjentów.



Nie wykazano istotnej statystycznie zależności między wiekiem pacjentów a obecnością metylowanych cytozyn w obrębie promotora genu *TGFB1* ($p=0,2894$).

METYLACJA REGIONU PROMOTOROWEGO GENU *TGFB1* A PŁEĆ PACJENTÓW

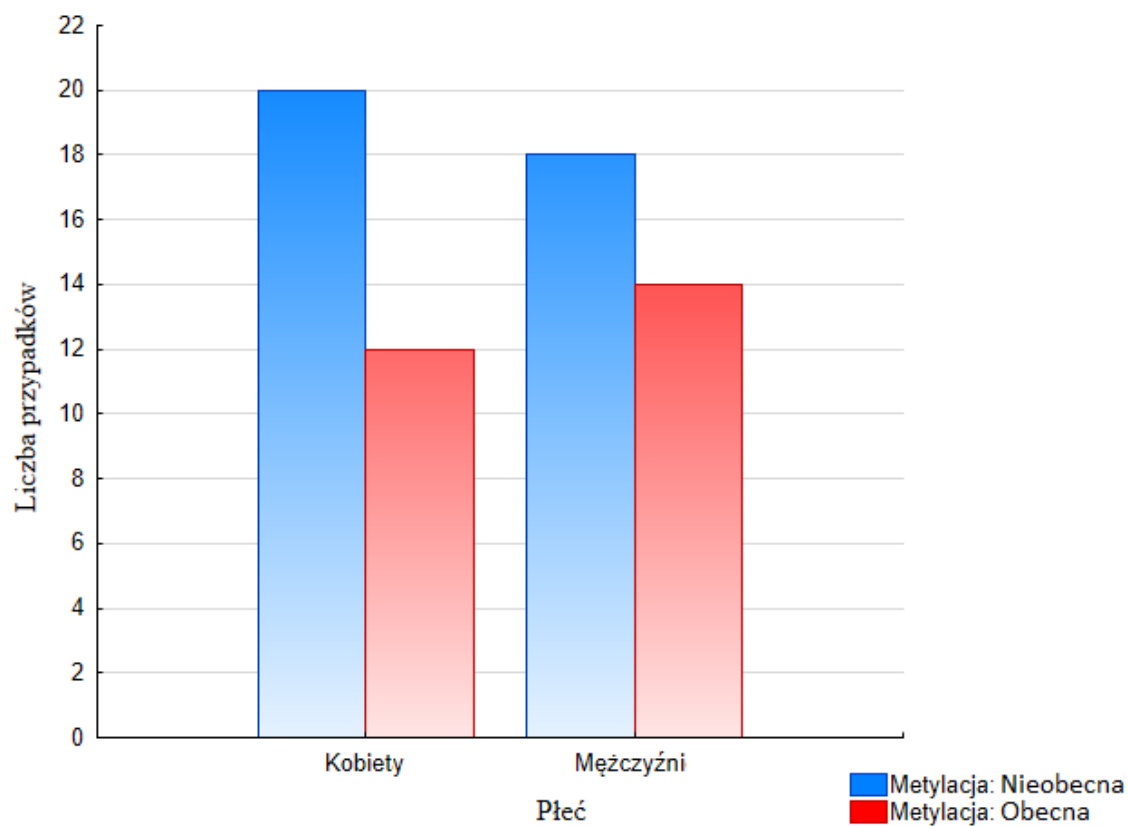
Badana populacja składała się z 32 kobiet oraz tylu samych mężczyzn. W obu grupach zaobserwowano przewagę pacjentów, u których nie stwierdzono metylacji regionu promotorowego genu *TGFB1*.

Tabela 46: Częstość metylacji wysp CpG regionu promotorowego genu *TGFB1* a płeć pacjentów.

Płeć	Metylacja	Liczebność (N)	Odsetek [%]
Kobiety	Nieobecna	20	62,5
	Obecna	12	37,5
Suma		32	
Mężczyźni	Nieobecna	18	56,25
	Obecna	14	43,75
Suma		32	

Przeprowadzona testem χ^2 analiza statystyczna nie potwierdziła istotnej statystycznie zależności pomiędzy porównywanymi cechami ($p=0,6107$).

Rycina 57: Częstość metylacji w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* w grupie kobiet i mężczyzn.



METYLACJA REGIONU PROMOTOROWEGO GENU *TGFB1* A UMIEJSCOWIENIE NOWOTWORU

Spośród 63 pacjentów, 40 posiadało nowotwór zlokalizowany w kątnicy lub okrężnicy, a 23 w końcowym odcinku jelita grubego.

W obrębie pierwszej grupy, większość pacjentów (N=26) nie wykazywała metylacji regionu promotorowego badanego genu. Natomiast w przypadku raków zlokalizowanych w odbytnicy 52% pacjentów (N=12) posiadało metylację w obrębie sekwencji DNA poprzedzającej gen *TGFB1*.

Tabela 47: Częstość metylacji wysp *CpG* regionu promotorowego genu *TGFB1* a umiejscowienie nowotworu.

Umiejscowienie nowotworu	Metylacja	Liczebność (N)	Odsetek [%]
Kątnica lub okrężnica	Nieobecna	26	65
	Obecna	14	35
Suma		40	
Odbytnica	Nieobecna	11	48
	Obecna	12	52
Suma		23	

Przeprowadzone testem V^2 porównanie nie wykazało istotnej statystycznie zależności między częstością metylacji regionu promotorowego genu *TGFB1* a umiejscowieniem raka jelita grubego ($p=0,1860$).

METYLACJA REGIONU PROMOTOROWEGO GENU *TGFB1* A PODTYP HISTOPATOLOGICZNY RAKA JELITA GRUBEGO

W obrębie badanej grupy dysponowano wiedzą o podtypie histopatologicznym raka jelita grubego u 61 pacjentów. Większość stanowiły przypadki gruczolakoraków cewkowych (N=44), natomiast gruczolakoraki śluzotwórcze i cewkowo-śluzotwórcze były nieliczne (odpowiednio N=8 i N=9).

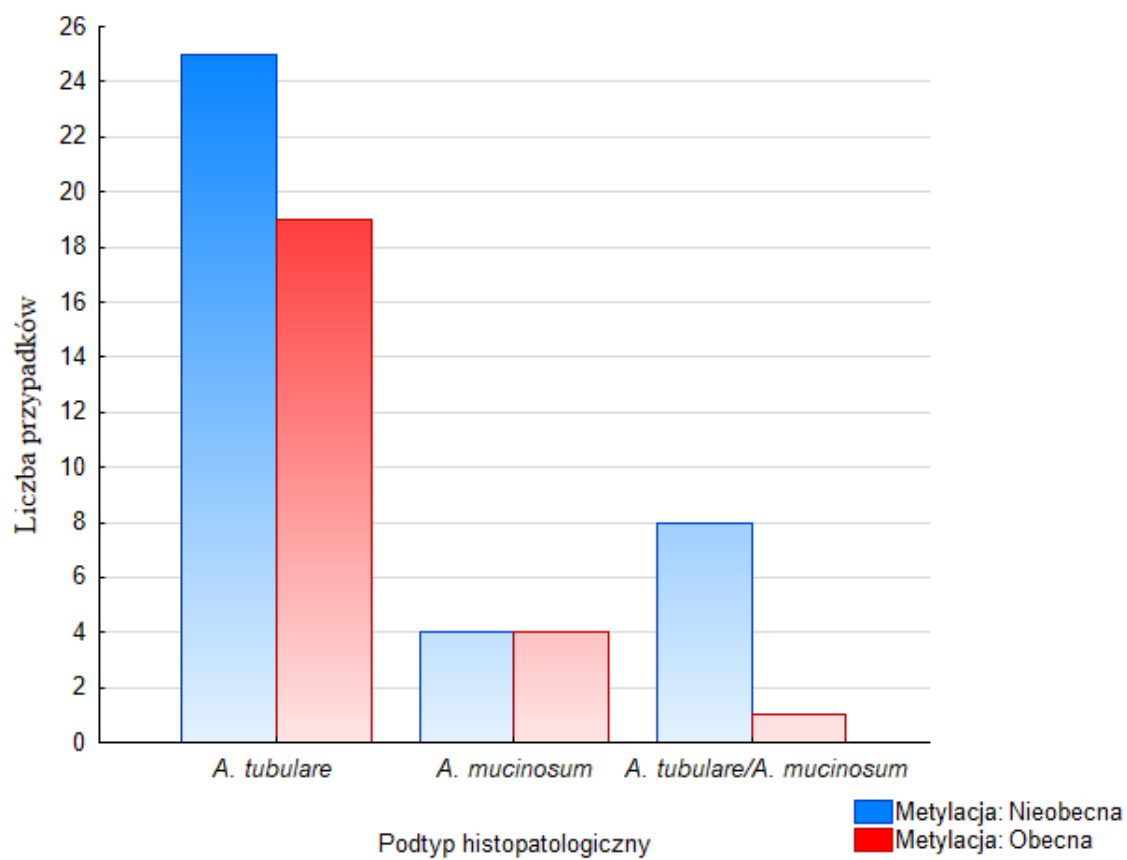
Częściej stwierdzano obecność 5-metylocytozyn w obrębie wysp CpG genu *TGFB1* w gruczolakorakach cewkowych i cewkowo-śluzotwórczych, natomiast w gruczolakorakach śluzotwórczych metylację równie często wykluczano co potwierdzano.

Tabela 48: Częstość metylacji wysp CpG regionu promotorowego genu *TGFB1* a podtyp histopatologiczny nowotworu.

Podtyp histopatologiczny	Metylacja	Liczebność (N)	Odsetek [%]
<i>Adenocarcinoma</i>	Nieobecna	25	57
<i>tubulare</i>	Obecna	19	43
Suma		44	
<i>Adenocarcinoma</i>	Nieobecna	4	50
<i>mucinosum</i>	Obecna	4	50
Suma		8	
<i>Adenocarcinoma</i>	Nieobecna	8	89
<i>tubulare/mucinosum</i>	Obecna	1	11
Suma		9	

Analiza statystyczna przeprowadzona testem χ^2 dowiodła brak istotnej zależności między częstością metylacji w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* a podtypem histopatologicznym raka jelita grubego ($p=0,1606$).

Rycina 58: Częstość metylacji w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* a podtyp histopatologiczny nowotworu.



METYLACJA REGIONU PROMOTOROWEGO GENU *TGFB1* A ZŁOŚLIWOŚĆ HISTOLOGICZNA RAKA JELITA GRUBEGO WG WHO

Do porównania częstości metylacji regionu promotorowego genu *TGFB1* ze stopniem złośliwości histologicznej komórek nowotworowych uwzględniono dane pochodzące od 63 pacjentów. Z powodu zbyt małej liczby raków jelita grubego o stopniu złośliwości histologicznej G1 (N=4) zdecydowano o połączeniu grup G1 i G2.

Tabela 49: Częstość metylacji wysp *CpG* regionu promotorowego genu *TGFB1* a stopień złośliwości histologicznej raka jelita grubego wg WHO.

Stopień złośliwości histologicznej	Metylacja	Liczebność (N)	Odsetek [%]
G1 i G2	Nieobecna	29	66
	Obecna	15	34
Suma		44	
G3	Nieobecna	8	42
	Obecna	11	58
Suma		19	

Zaobserwowano większą częstość metylowanych cytozyn regionu promotorowego w nowotworach słabo zróżnicowanych w odróżnieniu do raków o dobrym i umiarkowanym stopniu zróżnicowania komórkowego.

Wykonana testem V^2 analiza statystyczna nie potwierdziła zależności pomiędzy grupą G1 i G2 a grupą G3 ($p=0,0806$).

Rycina 59: Częstość metylacji w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* a stopień złośliwości histologicznej raka jelita grubego wg WHO.



METYLACJA REGIONU PROMOTOROWEGO GENU *TGFB1* A STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA KLINICZNEGO NOWOTWORU WG KLASYFIKACJI ASTLERA-COLLERA

W badanej populacji najliczniejszą grupę stanowili pacjenci z rakiem jelita grubego o III stopniu klasyfikacji Astlera-Collera (N=18). Mniej liczne grupy tworzyli pacjenci w II stadium zaawansowania klinicznego (N=16) a także w V i VI, które składały się z 14 badanych. W grupach z I^o oraz IV^o zaawansowania odnotowano po jednym przypadku.

Tabela 50: Częstość metylacji wysp *CpG* regionu promotorowego genu *TGFB1* a stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji Astlera-Collera.

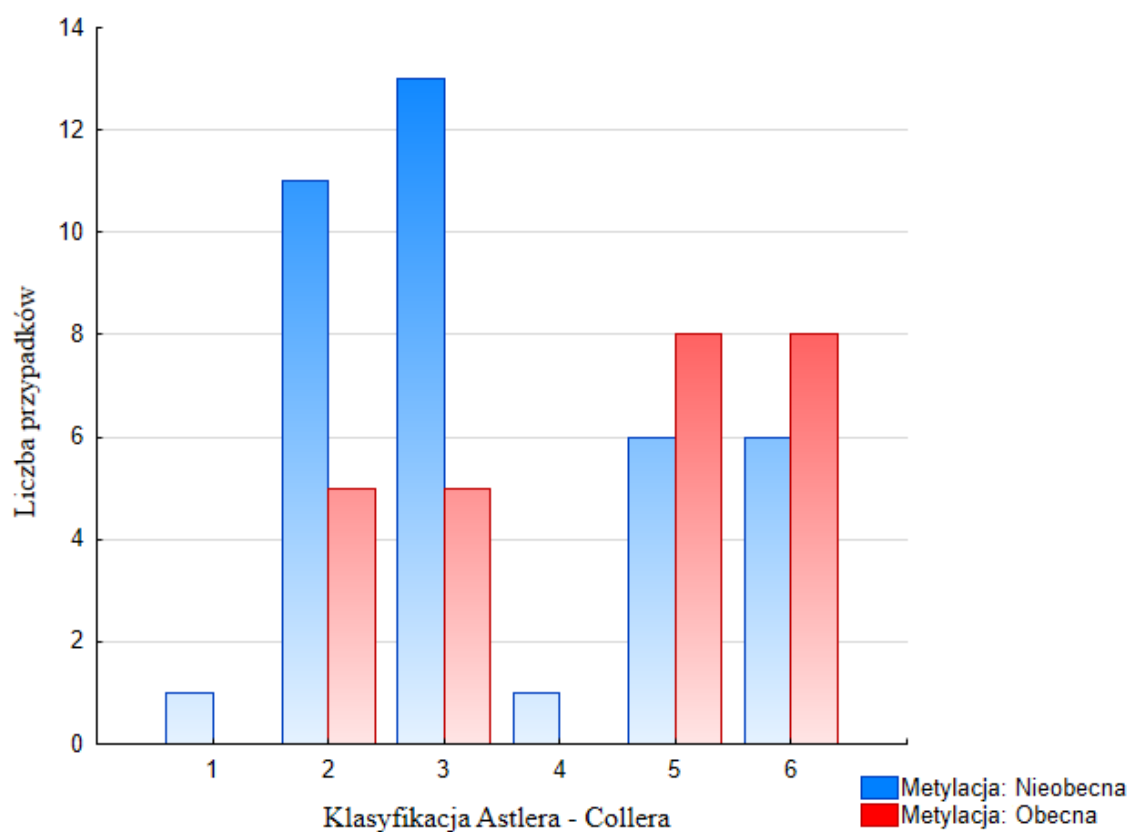
Stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji Astlera-Collera			
	Metylacja	Liczebność (N)	Odsetek [%]
I	Nieobecna	1	100
	Obecna	0	0
Suma		1	
II	Nieobecna	11	69
	Obecna	5	31
Suma		16	
III	Nieobecna	13	72
	Obecna	5	28
Suma		18	
IV	Nieobecna	1	100
	Obecna	0	0
Suma		1	
V	Nieobecna	6	43
	Obecna	8	57
Suma		14	
VI	Nieobecna	6	43
	Obecna	8	57
Suma		14	

W stadium V i VI zaawansowania klinicznego zaobserwowano przewagę pacjentów z metylacją w obrębie wysp *CpG* (57%), w odróżnieniu od II i III stopnia (odpowiednio 31% i 28%), w których więcej pacjentów manifestowało się brakiem 5-metylocytozyn w tym obszarze genomu.

Zaobserwowana tendencja może wskazywać na epigenetyczne podłoże regulacji ekspresji genu *TGFB1* w przypadku nowotworów o najwyższych stopniach zaawansowania klinicznego. Test zgodności χ^2 nie wykazał jednak zależności pomiędzy

obecnością metylacji regionu promotorowego badanego genu a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu wg klasyfikacji Astlera-Collera ($p=0,2736$).

Rycina 60: Częstość metylacji w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* a stopień zaawansowania klinicznego nowotworu wg klasyfikacji Astlera-Collera.



METYLACJA REGIONU PROMOTOROWEGO GENU *TGFB1* A STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA KLINICZNEGO NOWOTWORU WG KLASYFIKACJI TNM

Do oceny statystycznej porównującej częstość metylacji regionu promotorowego genu *TGFB1* ze stopniem zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM włączono 64 pacjentów. Wszystkie stopnie zaawansowania choroby nowotworowej charakteryzowały się podobną liczebnością (N=15 dla I^o, N=16 dla II^o i III^o oraz N=17 dla IV^o).

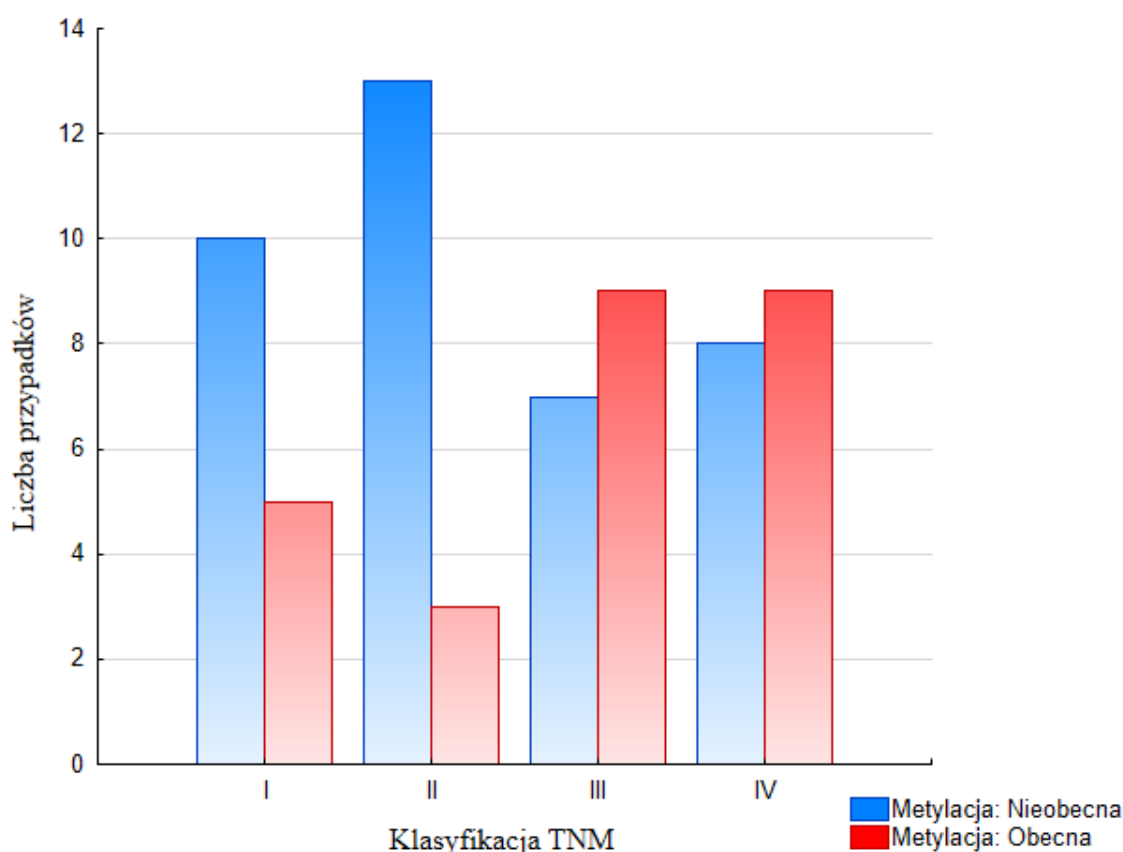
Tabela 51: Częstość metylacji wysp CpG regionu promotorowego genu *TGFB1* a stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM.

Stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM			
	Metylacja	Liczebność (N)	Odsetek [%]
I	Nieobecna	10	67
	Obecna	5	33
Suma		15	
II	Nieobecna	13	81
	Obecna	3	19
Suma		16	
III	Nieobecna	7	44
	Obecna	9	56
Suma		16	
IV	Nieobecna	8	47
	Obecna	9	53
Suma		17	

Podobnie jak w przypadku systemu oceny Astlera-Collera, również w klasyfikacji TNM zaobserwowano częściej występującą metylację obszaru regulującego ekspresję genu *TGFB1* w najbardziej zaawansowanych nowotworach o III i IV stopniu zaawansowania

klinicznego (odpowiednio 56% i 53%) w porównaniu do raków we wcześniejszych stadiach I^o i II^o (odpowiednio 33% i 19%). Jednakże zależność ta okazała się statystycznie nieistotna (test χ^2 , $p=0,1026$).

Rycina 61: Częstość metylacji w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* a stopień zaawansowania klinicznego nowotworu wg klasyfikacji TNM.



W kolejnych etapach analizowano poszczególne składowe klasyfikacji TNM. Dysponowano danymi dotyczącymi wielkości i głębokości naciekania ściany jelita od 64 pacjentów. Z uwagi na małą liczbę badanych w grupie T1 do celów statystycznych połączono kategorie T1 i T2.

Najliczniejszą grupą byli pacjenci ze stopniem T3 (N=41). Z kolei stopnie T1 i T2 oraz T4 były mniej liczne i obejmowały odpowiednio 16 i 7 przypadków.

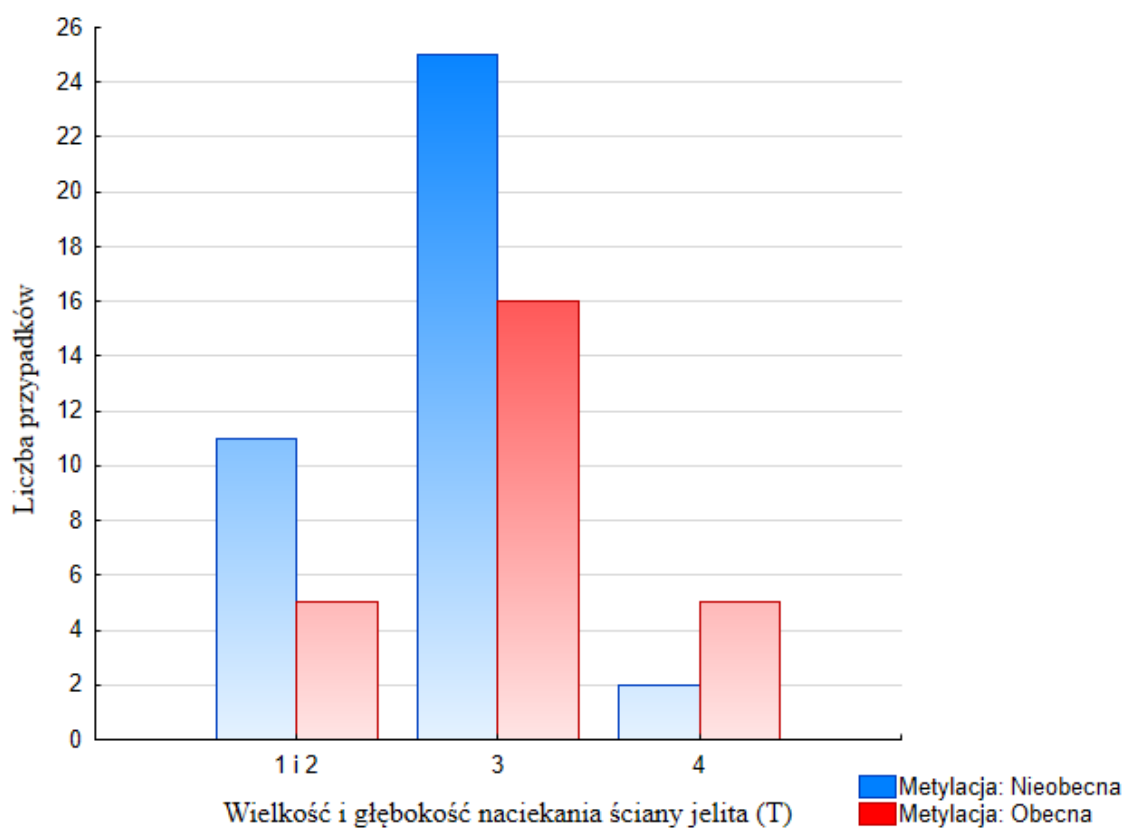
Tabela 52: Częstość metylacji wysp *CpG* regionu promotorowego genu *TGFB1* a wielkość i głębokość naciekania ściany jelita przez nowotwór.

Cecha T	Metylacja	Liczebność (N)	Odsetek [%]
T1 i T2	Nieobecna	11	69
	Obecna	5	31
Suma		16	
T3	Nieobecna	25	61
	Obecna	16	39
Suma		41	
T4	Nieobecna	2	29
	Obecna	5	71
Suma		7	

W grupach T1 i T2 oraz T3 obserwowano przewagę przypadków bez cech metylacji wysp *CpG* badanego fragmentu genomu (odpowiednio 69% i 61%) w przeciwieństwie do grupy o stopniu T4, w której częściej dochodziło do przyłączania grupy metylowej w sekwencji promotorowej genu *TGFB1* (71%). Może to świadczyć o tym, że metylacja prowadząca do wyciszenia ekspresji badanego genu sprzyja powstawaniu bardziej rozległych raków jelita grubego.

Test χ^2 nie wykazał jednak istotnych statystycznie różnic częstości metylacji w różnych stopniach cechy T ($p=0,1845$).

Rycina 62: Częstość metylacji w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* a wielkość i głębokość naciekania ściany jelita przez nowotwór.



Spośród 59 pacjentów, u których oceniano obecność komórek nowotworowych w regionalnych węzłach chłonnych, 33 zostało zaklasyfikowanych do grupy N0, 13 do grupy N1 i tylko samo do grupy N2.

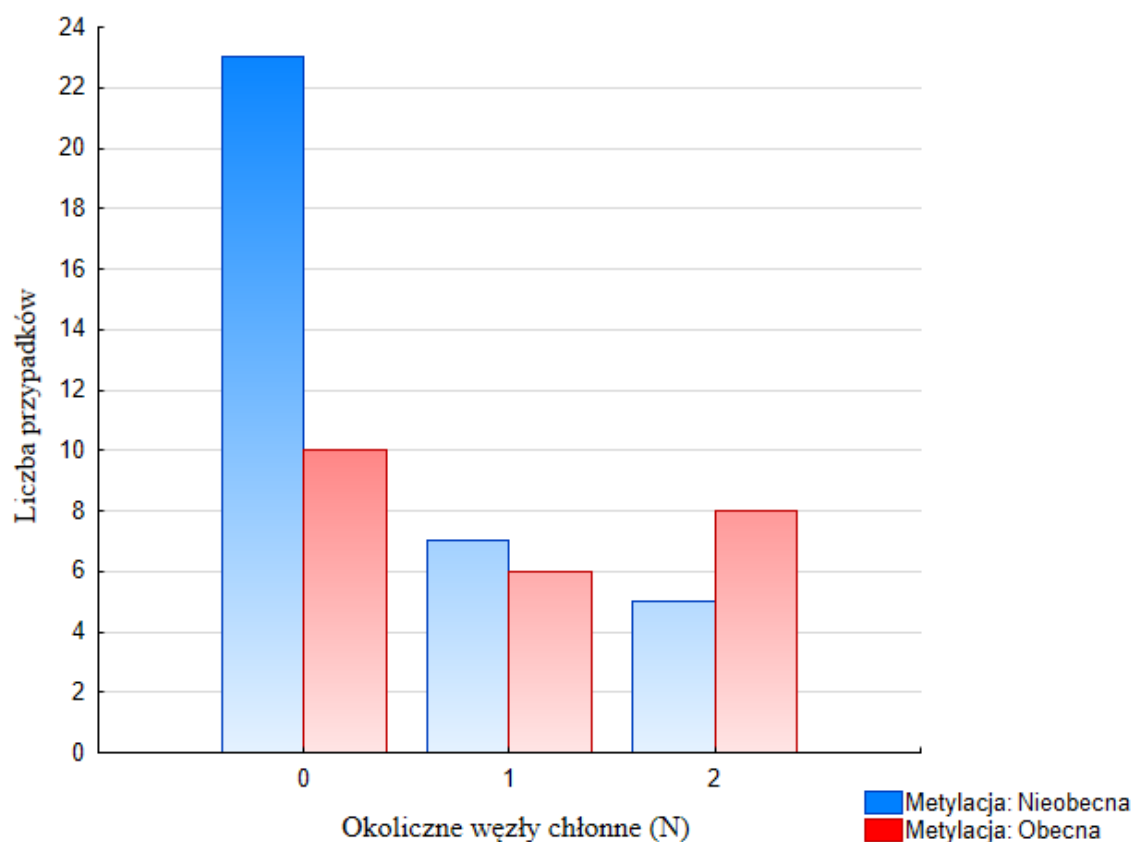
Tabela 53: Częstość metylacji wysp CpG regionu promotorowego genu *TGFB1* a zajęcie regionalnych węzłów chłonnych.

Cecha N	Metylacja	Liczebność (N)	Odsetek [%]
N0	Nieobecna	23	70
	Obecna	10	30
Suma		33	
N1	Nieobecna	7	54
	Obecna	6	46
Suma		13	
N2	Nieobecna	5	38
	Obecna	8	62
Suma		13	

W grupie N0 z niezajętymi nowotworowo węzłami chłonnymi u 70% pacjentów obserwowano brak metylacji regionu promotorowego genu *TGFB1*. W grupie N1 nieznacznie więcej badanych wykazywało brak grup metylowych w analizowanym obszarze (54%) a w populacji pacjentów z co najmniej 4 zajętymi węzłami (N2) 62% przypadków charakteryzowało się zmetylowanymi cytozynami w obrębie wysp CpG badanego genu. Może to sugerować przypuszczenie, że nasilona metylacja regionu promotorowego tego genu sprzyja zajęciu węzłów chłonnych przez nowotwór.

Wykazano jednak, że grupy N0, N1 i N2 nie różniły się pod względem częstości metylacji regionu promotorowego genu *TGFB1* (test χ^2 , $p=0,1368$).

Rycina 63: Częstość metylacji w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* a zajęcie regionalnych węzłów chłonnych.



W obrębie grupy badanej, u 47 pacjentów nie wykryto peryferyjnych ognisk metastatycznych, podczas gdy potwierdzono je u 15 badanych.

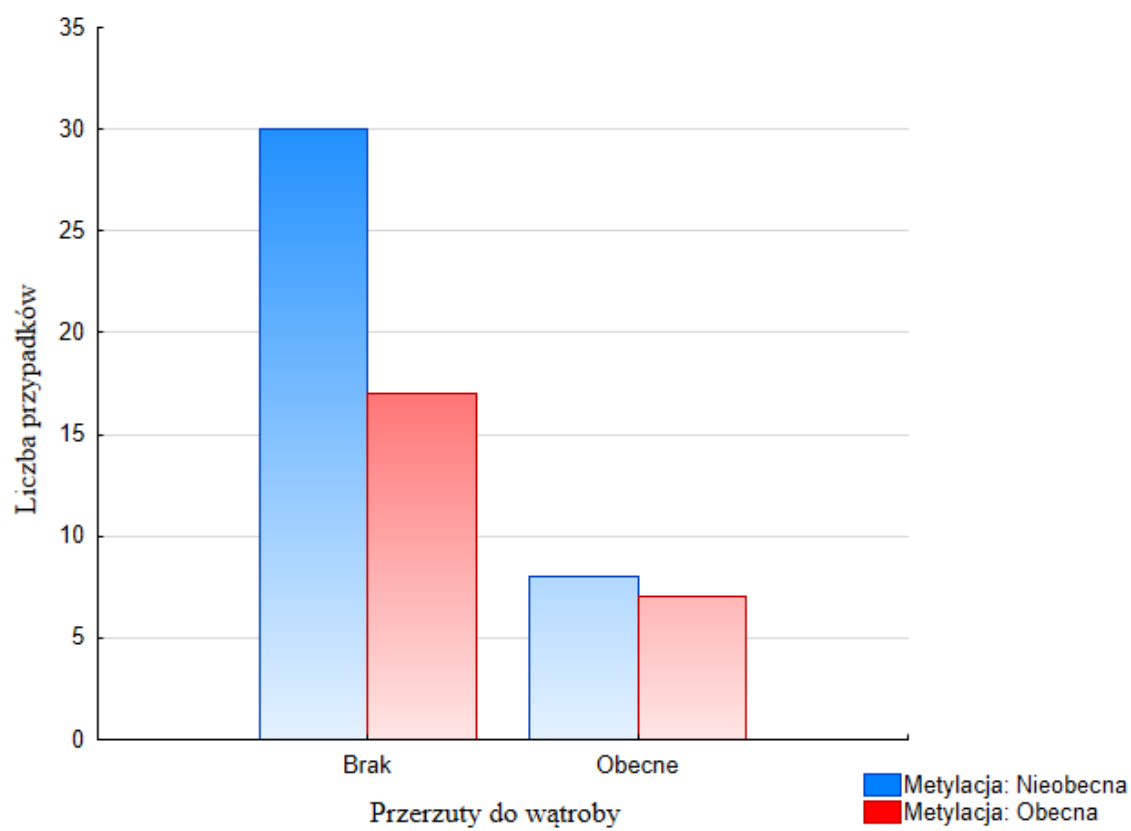
We wszystkich obserwowanych przypadkach przerzuty odległe lokalizowały się w wątrobie.

Tabela 54: Częstość metylacji wysp *CpG* regionu promotorowego genu *TGFB1* a obecność przerzutów odległych.

Cecha M	Metylacja	Liczebność (N)	Odsetek [%]
M0	Nieobecna	30	64
	Obecna	17	36
Suma		47	
M1	Nieobecna	8	53
	Obecna	7	47
Suma		15	

W obu analizowanych grupach stwierdzono przewagę pacjentów bez metylacji wysp *CpG* genu *TGFB1*. Przeprowadzone testem V^2 porównanie częstości metylacji regionu promotorowego badanego genu z obecnością przerzutów do narządów odległych nie wykazało istotnych statystycznie zależności ($p=0,4710$).

Rycina 64: Częstość metylacji w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* a obecność przerzutów odległych.



METYLACJA REGIONU PROMOTOROWEGO GENU *TGFB1* A ZAJĘCIE NACZYŃ KRWIONOŚNYCH PRZEZ NOWOTWÓR

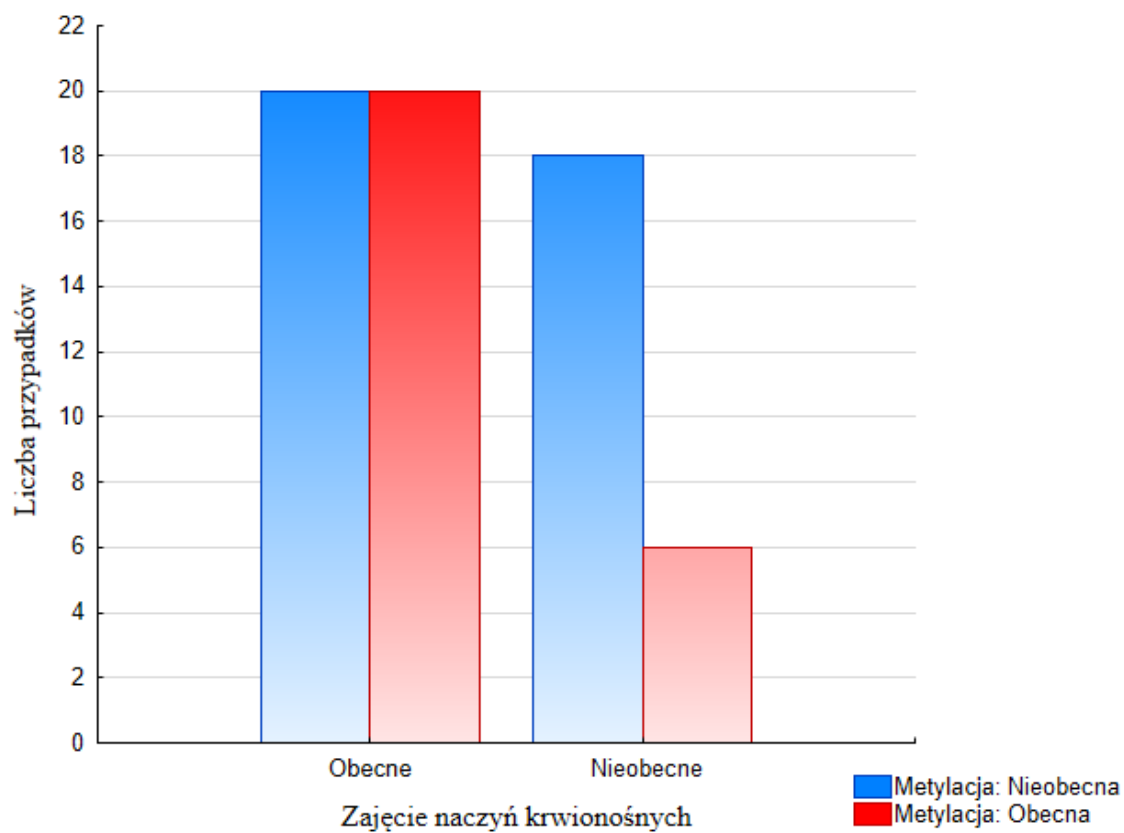
Wśród 40 pacjentów ze stwierdzonym zajęciem naczyń krwionośnych połowa posiadała metylowane cytozyny w obrębie wysp CpG badanego genu. Z kolei w 24-osobowej grupie bez zajętych naczyń stwierdzono niższą, sięgającą 25% częstość występowania 5-metylocytozyn.

Tabela 55: Częstość metylacji wysp CpG regionu promotorowego genu *TGFB1* a zajęcie naczyń krwionośnych przez nowotwór.

Zajęcie naczyń krwionośnych	Metylacja	Liczebność (N)	Odsetek [%]
Obecne	Nieobecna	20	50
	Obecna	20	50
Suma		40	
Nieobecne	Nieobecna	18	75
	Obecna	6	25
Suma		24	

Pomimo zauważalnej tendencji do większej częstości metylacji ocenianego obszaru w nowotworach z inwazją naczyniową, dokonana testem V^2 analiza statystyczna nie potwierdziła zależności pomiędzy porównywanymi cechami ($p=0,0505$). Można jednak przypuszczać, że metylacja regionu promotorowego wyciszająca ekspresję *TGFB1* sprzyja zajęciu naczyń krwionośnych przez nowotwór.

Rycina 65: Częstość metylacji w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* a zajęcie naczyń krwionośnych przez nowotwór.



METYLACJA REGIONU PROMOTOROWEGO GENU *TGFB1* A OBECNOŚĆ NACIEKU LIMFOCYTARNEGO W TKANCE NOWOTWOROWEJ

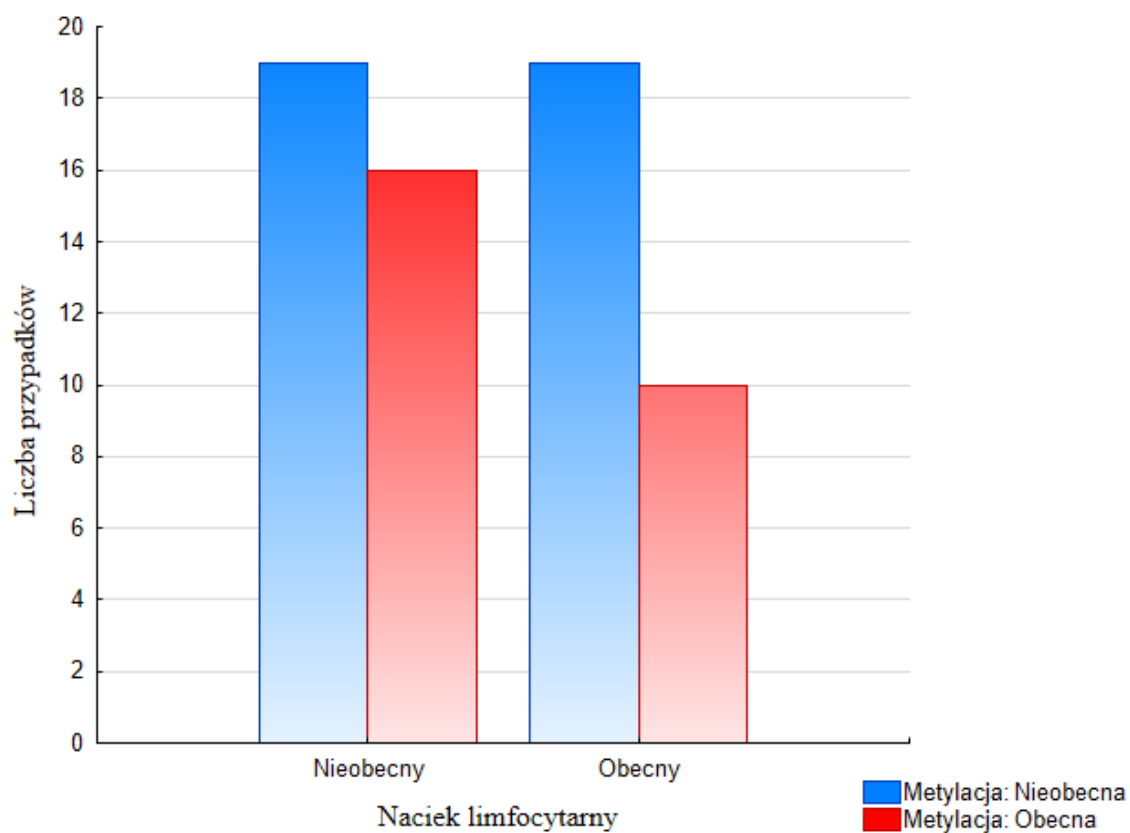
U 64 pacjentów porównano częstość metylacji cytozyn w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* z obecnością nacieku limfocytarnego w tkance nowotworowej. Spośród nich 29 posiadało naciek limfocytarny a 35 była go pozbawiona.

Tabela 56: Częstość metylacji wysp *CpG* regionu promotorowego genu *TGFB1* a naciek limfocytarny w tkance nowotworowej.

Obecność nacieku limfocytarnego	Metylacja	Liczebność (N)	Odsetek [%]
Obecny	Nieobecna	19	66
	Obecna	10	34
Suma		29	
Nieobecny	Nieobecna	19	54
	Obecna	16	46
Suma		35	

Częstość metylacji regionu promotorowego badanego genu wynosiła 34% w grupie z naciekiem limfocytów w obrębie tkanki nowotworowej i wzrastała do 46% u osób bez obecności komórek odpornościowych. Test χ^2 nie wykazał istotnej statystycznie zależności pomiędzy porównywanymi parametrami ($p=0,3624$).

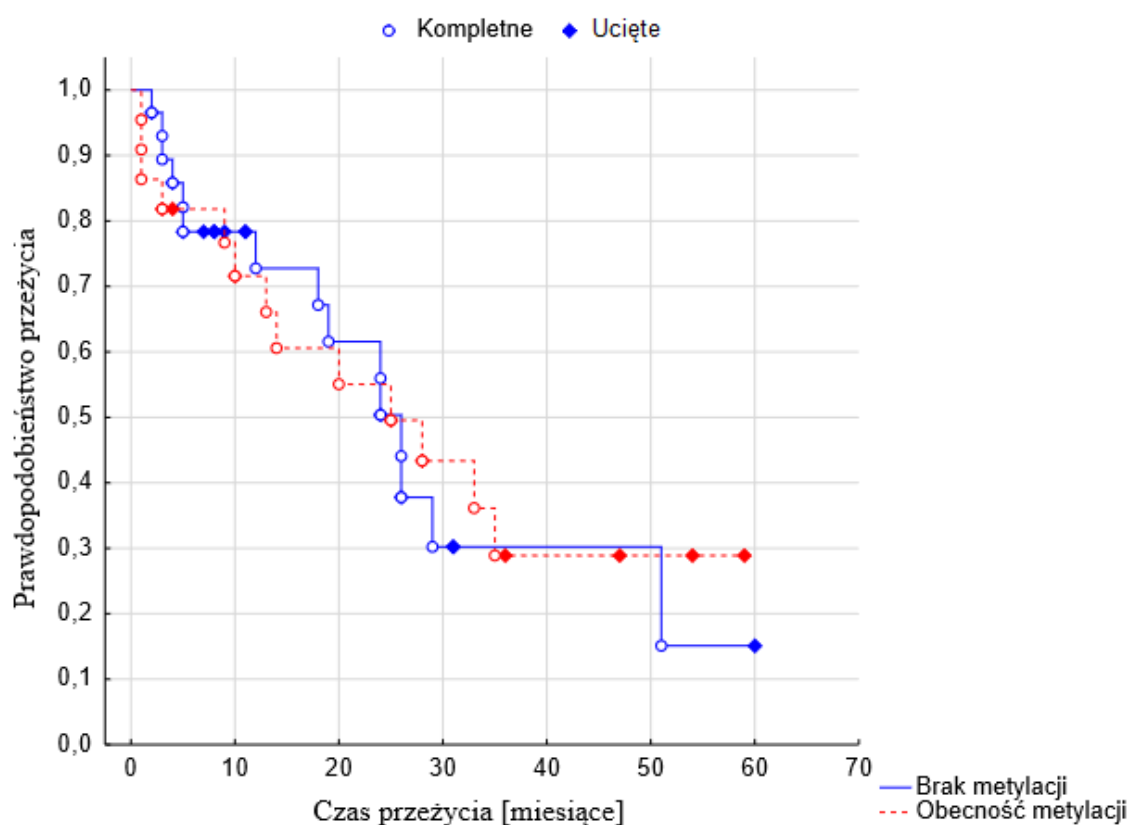
Rycina 66: Częstość metylacji w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* a obecność nacieku limfocytarnego w tkance nowotworowej.



METYLACJA REGIONU PROMOTOROWEGO GENU *TGFB1* A PRZEŻYCIE PACJENTÓW

Porównano przeżywalność pacjentów w zależności od statusu metylacji wysp CpG analizowanego obszaru. Na wykresie Kaplana-Meiera (Rycina 67) przedstawiono czasy przeżycia 22 pacjentów z potwierdzoną jakościowo obecnością grup metylowych w regionie promotorowym oraz 29 pacjentów bez metylacji.

Rycina 67: Metylacja regionu promotorowego genu *TGFB1* a prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów.

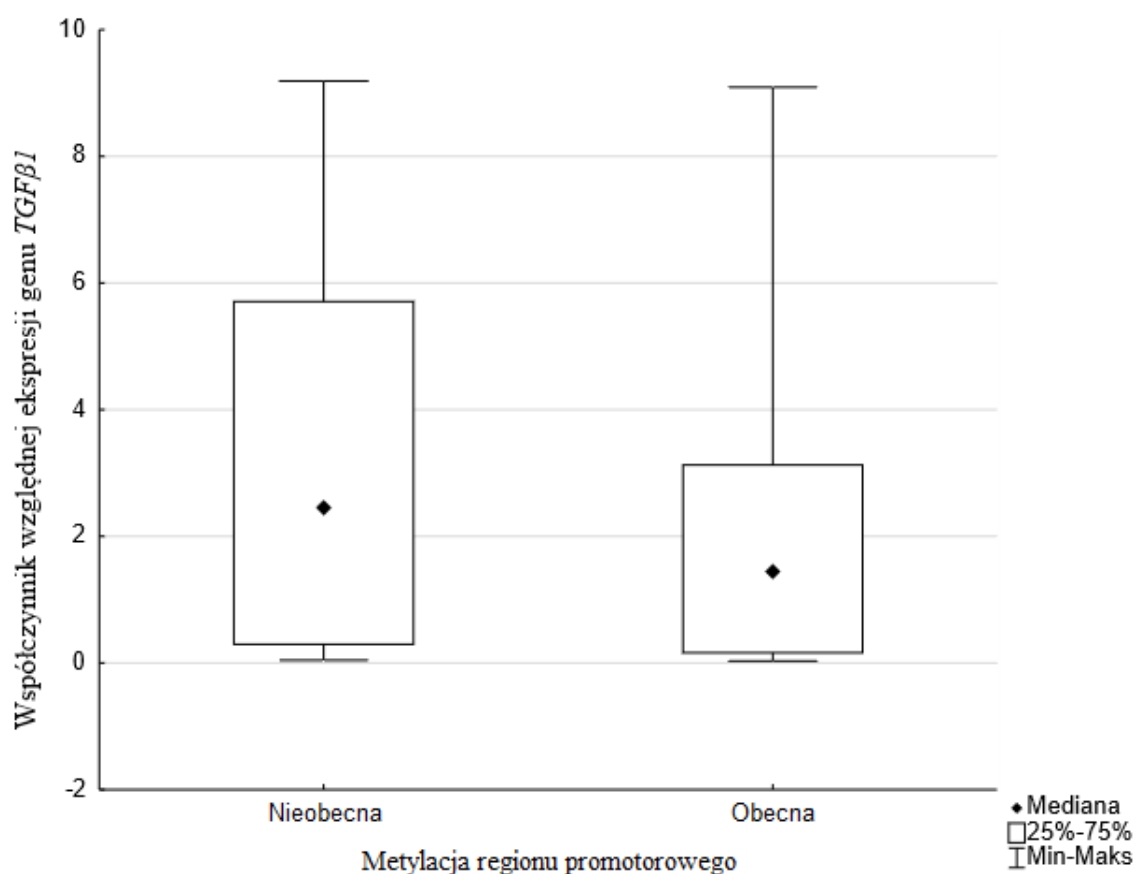


Z przeprowadzonej testem log-rank analizy statystycznej wynikało, że czas przeżycia pacjentów nie był zależny od obecności metylacji w obrębie regionu promotorowego genu *TGFB1* ($p=0,8000$).

METYLACJA REGIONU PROMOTOROWEGO GENU *TGFB1* A WZGLĘDNY POZIOM EKSPRESJI

Końcowym etapem oceny statystycznej było porównanie częstości metylacji regionu promotorowego genu *TGFB1* ze względnym poziomem ekspresji tego genu. W tym celu zestawiono wartości środkowe punktów Ct pochodzące od 23 pacjentów nie wykazujących metylacji oraz 24 badanych z potwierdzoną w reakcji MS-PCR obecnością grup metylowych w tym obszarze.

Rycina 68: Względny poziom ekspresji genu *TGFB1* a obecność metylacji regionu promotorowego tego genu.



Przeprowadzone testem U Manna-Whitneya porównanie nie wykazało różnic w poziomach względnej ekspresji genu *TGFB1* między obserwowanymi grupami ($p=0,2825$).

12. Podsumowanie wyników

W wyniku przeprowadzonych analiz statystycznych potwierdzono zależność względnego poziomu mRNA genu *ACVR2A* od umiejscowienia zmiany nowotworowej. Dowiedziono, że uzyskane poziomy ekspresji badanego genu były wyższe w rakach odbytnicy niż pozostałych odcinkach jelita grubego.

Nie wykazano korelacji względnego poziomu ekspresji tego genu z parametrami demograficznymi, jak: wiek, płeć i wywiad rodzinny oraz pozostałymi cechami patologicznymi, takimi jak: stopień zaawansowania klinicznego wg Astlera-Collera, stopień zaawansowania wg klasyfikacji TNM wraz z odrębną oceną każdej z jej cech, złośliwość histologiczna, podtyp histopatologiczny, zajęcie naczyń krwionośnych przez komórki nowotworowe, obecność nacieku limfocytarnego w obrębie raka oraz czas przeżycia pacjentów do zgonu.

Analiza dokonana dla genu *TGFB1* wykazała znamiennej statystycznie zależność względnego poziomu ekspresji od stopnia zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji Astlera-Collera. Potwierdzono występowanie wyższych poziomów ekspresji badanego genu w rakach o II stopniu zaawansowania w porównaniu do nowotworów o największej progresji (VI^o).

Podobne wyniki uzyskano w przypadku klasyfikacji TNM, gdzie również względne poziomy ekspresji badanego genu były wyższe w stopniu I zaawansowania niż w stopniu IV.

Dodatkowo poszczególne rangi cech T i M klasyfikacji TNM różniły się względnymi poziomami transkryptu genu *TGFB1*. Udowodniono wyższe względne poziomy mRNA w nowotworach T1 i T2 w porównaniu do stopnia T3 oraz wyższe względne poziomy transkryptu w rakach niedających przerzutów odległych (M0).

Ponadto wyższy względny poziom ekspresji badanego genu wiązał się z brakiem inwazji naczyniowej przez komórki rakowe oraz obecnością limfocytów w tkance nowotworowej.

Nie udowodniono wpływu pozostałych cech demograficznych i patologicznych na względny poziom transkrypcji tego genu.

Przeprowadzona została również ocena jakościowa metylacji wysp CpG regionu promotorowego genu *TGFB1*, którą porównano z wyżej wymienionymi parametrami.

Jedyną bliską istotności statystycznej zależnością była tendencja do częstszej obecności metylacji u pacjentów z zajętej przez komórki nowotworowe naczyńiami

krwionośnymi. Przy zestawieniu częstości metylacji z pozostałymi cechami demograficzno-patologicznymi nie wykazano żadnych zależności. Nie potwierdzono także wpływu metylacji na ekspresję genu *TGFB1*.

13. Dyskusja

Szlak sygnałowy transformującego czynnika wzrostu β zaangażowany jest w wiele fizjologicznych procesów komórkowych. Zaburzenia ekspresji genów w obrębie szlaku TGF- β zaangażowane są w patogenezę chorób tkanki łącznej np. zespołu Marfana, Ehlersa-Danlosa i Loeysa-Dietza [Lewandowski, 2015]. Odnotowuje się je również w nowotworach, gdzie mogą pełnić rolę zarówno supresorów jak i czynników promujących kancerogenezę. Zaburzenia szlaku TGF- β stwierdzano między innymi w raku płuc, piersi, pęcherza moczowego, trzustki oraz czerniaku. Udowodniono również, że zmiany molekularne w obrębie tego szlaku są jednymi z częstszych w raku jelita grubego [Coates, 2017].

Pomimo tego, że poszczególne elementy szlaku TGF- β zostały poznane już ponad dwie dekady temu, wciąż aktualne pozostają pytania dotyczące mechanizmów kontrolujących tę ścieżkę sygnałową, jak i wyjaśnienie udziału jej poszczególnych składowych w procesach patofizjologicznych.

Do rodziny białek szlaku TGF- β należy między innymi transformujący czynnik wzrostu $\beta 1$. Ta wyzwalana w czasie odpowiedzi immunologicznej cytokina charakteryzuje się dużym plejotropizmem działania. Reguluje wzrost i różnicowanie komórek poprzez intensyfikowanie podziałów komórek pochodzenia mezenchymalnego (np. fibroblastów) lub ich spowalnianie, jak ma to miejsce w przypadku komórek nabłonkowych, hematopoetycznych czy endotelialnych. Może także decydować o zapoczątkowaniu procesu apoptozy, stymulować procesy regeneracji tkanek, gojenia się ran, tworzenia nowych naczyń krwionośnych oraz syntezy składników macierzy zewnątrzkomórkowej np. kolagenu typu I [Zi, 2019; Stalińska, 2005]. TGF- $\beta 1$ związany jest chociażby z rozwojem postępującego zwłóknienia wątroby, który może prowadzić do marskości. Może też przyczyniać się do rozwoju raka dróg żółciowych a nawet zaburzeń psychicznych np. schizofrenii [Huang, 2016; Amoli, 2019].

Analizując wyniki przeprowadzonych w pracy badań nie zauważono istotnych zależności między względnym poziomem transkryptu genu *TGFB1* a parametrami demograficznymi, takimi jak wiek, płeć czy wywiad rodzinny w kierunku raka jelita grubego. Nie zaobserwowano również wpływu lokalizacji zmiany nowotworowej

na uzyskane względne poziomy ekspresji genu. Co więcej, nie zależały one od podtypu histopatologicznego ani stopnia złośliwości histologicznej raka jelita grubego. W przypadku tej ostatniej cechy zauważono jedynie tendencję do osiągania wyższych względnych poziomów transkryptu *TGFB1* w rakach umiarkowanie zróżnicowanych (G2) względem nowotworów o najmniejszym zróżnicowaniu (G3). Jednak zależność ta nie spełniała kryteriów istotności statystycznej ($p=0,0687$).

Względny poziom mRNA *TGFB1* korelował natomiast z zaawansowaniem klinicznym raka jelita grubego. Według klasyfikacji Astlera-Collera nowotwory o II^o, a wg klasyfikacji TNM o I^o zaawansowania klinicznego charakteryzowały się znamienne wyższymi poziomami transkryptu *TGFB1* niż te w odpowiednio VI i IV stopniu. Zauważono jednocześnie tendencję do osiągania wyższych względnych poziomów ekspresji genu w rakach o I^o zaawansowania wg TNM niż w rakach o stopniu II i III ($p=0,0814$).

Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z opisywanym w piśmiennictwie zjawiskiem określanym mianem „paradoksu szlaku TGF- β ”. Liczne doniesienia wskazują, że w początkowych etapach nowotworzenia szlak TGF- β działa supresyjnie, a wraz z postępem choroby zaczyna pełnić rolę onkogeną [Ramachandran, 2018; Chen, 2020; Talar, 2013]. Dotychczas przeprowadzono wiele badań mających wyjaśnić przyczyny tego zjawiska. Warto chociażby wspomnieć o zdolności TGF- β do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 [Yan, 2017; Stalińska, 2005] poprzez hamowanie aktywności cyklinozależnych kinaz, takich jak p15, p21 i p57. Aktywność kinaz jest dodatkowo osłabiana przez wywołaną działaniem TGF- β zmniejszoną syntezą c-MYC [Zhao, 2018; Talar, 2013]. Wraz ze wzrostem liczby mutacji w obrębie genów kodujących białka szlaku TGF- β i genów docelowych funkcje supresorowe przebiegają mniej wydajnie. Zachowana pozostaje jednak wrażliwość komórek na działanie onkogenne np. na sygnalizację przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego. Nabywana jest również zdolność do przebudowywania macierzy zewnątrzkomórkowej, syntezy chemokin, angiogenezy czy ucieczki spod mechanizmów kontrolnych układu immunologicznego [Ramachandran, 2018; Chen, 2020; Talar, 2013]. Zmiana funkcji na promotorową może być również efektem oddziaływań TGF- β z innymi szlakami sygnałowymi, takimi jak RAS-ERK, PI3K-AKT, NOTCH i Hedgehog. Dodatkowo drogi sygnałowe INF- γ i TNF- α nasilają ekspresję

inhibitorowych białek przekąźnikowych I-SMAD. Na skutek inhibicji ekspresji białka DKK1 dochodzi takżę do aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej WNT [Talar, 2013].

We wczesnych fazach kancerogenezy przeważają funkcje przeciwzapalne, cytostatyczne i proapoptotyczne, których celem jest ochrona przed możliwością przekazania mutacji kolejnym klonom komórek [Ramachandran, 2018; Chen, 2020; Talar, 2013]. Obserwowany w wynikach wysoki względny poziom ekspresji w początkowych stadiach zaawansowania może być więc elementem odpowiedzi supresorowej zapobiegającej utrwaleniu zmian genetycznych komórki. Obserwowane wraz z postępm choroby obniżenie ekspresji genu *TGFB1* może być istotnym momentem w patogenezie raka jelita grubego pozwalającym na jego dalszy rozwój. Potwierdzają to wyniki Zhao i wsp., zgodnie z którymi TGF- β 1 obniżał ekspresję genu kodującego VEGF i blokował wzrost enterocytów linii komórkowej raka jelita grubego. Potwierdzono takżę, że TGF- β 1 hamując wytwarzanie COX-2 i PGE2 nasilał proces apoptozy [Zhao, 2019]. Może to sugerować, że obserwowane w najbardziej zaawansowanych nowotworach osłabienie ekspresji *TGFB1* wiąże się z utratą kontroli nad tym procesem.

Supresorowy wpływ TGF- β na komórki prawidłowe został udokumentowany w wielu badaniach, jednak w komórkach zmienionych nowotworowo uwidacznia się jego rola promująca proces kancerogenezy. Mogą o tym świadczyć wysokie względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* w najmniej zaawansowanych klinicznie rakach jelita grubego. Uzyskane dane mogą wskazywać, że zahamowanie sygnalizacji TGF- β jest jednym z ważniejszych czynników dla uzyskania proliferacji komórek nowotworowych, o czym mówią doniesienia innych zespołów badawczych [Suzuki, 2013]. Z przeprowadzonego na linii komórkowej raka piersi doświadczenia wynika, że TGF- β zmniejsza ekspresję genów *ATM*, *MSH2* i *BRCA1* biorących udział w odpowiedzi na uszkodzenia w obrębie DNA. Obniżenie poziomów tych genów umożliwia komórkom ucieczkę spod mechanizmów kontrolnych i pozwala na ich nieograniczoną proliferację [Zhao, 2018; Liu, 2014]. Z kolei badania przeprowadzone przez zespół Qin i wsp. na linii komórkowej raka prostaty dowodzą, że TGF- β już we wstępnych etapach nowotworzenia działa stymulująco na proces kancerogenezy [Qin, 2016]. U pacjentek ze stwierdzonym rakiem piersi zwiększona ilość transkryptu *TGFB1* promowała rozwój nowotworowych komórek macierzystych a dodatkowo zwiększała ich oporność

na chemioterapię [Huang, 2016]. W innej grupie pacjentek z rakiem piersi zauważono zwiększenie ruchliwości komórek i wyższe prawdopodobieństwo tworzenia przerzutów po zastosowaniu radioterapii. Tłumaczy się to wrażliwością komórek nowotworowych na promieniowanie, w wyniku czego dochodzi do uwalniania TGF- β 1 z kompleksów LLC. Zablokowanie funkcji tego białka znosiło te efekty [Bouquet, 2011]. Z tego powodu uzyskiwana wysoka ekspresja genu *TGFB1* u pacjentów z nisko zaawansowanymi rakami jelita grubego może być więc negatywnym wskaźnikiem rokowniczym przebiegu choroby. Co więcej, selektywne hamowanie przekazywania TGF- β na jej wczesnych etapach może okazać się nową strategią terapeutyczną.

Z drugiej strony istnieją dowody mówiące, że dysfunkcja bądź utrata sygnalizacji TGF- β sprzyja postępowi nowotworu a wzmocnienie przekazywania działa korzystnie na rokowanie i zapobieganie progresji raka jelita grubego na jego początkowych etapach [Chen QZ, 2017; Yang Lei, 2018]. Rozbieżność wyników badań może tłumaczyć występowanie w mikrośrodowisku nowotworowym cytokin w postaci dużych konglomeratów białkowych, o trudnej do przewidzenia z poziomu transkryptu genu aktywności. Obecność nieaktywnych kompleksów LLC zdaje się być jedną z form modulacji przekazywania szlaku TGF- β . Niewątpliwym ograniczeniem przedstawionych badań jest brak informacji o aktywności białkowej TGF- β 1 a interpretując wyniki należy mieć na uwadze, że zwiększona ekspresja *TGFB1* nie musiała być równoznaczna ze wzrostem sygnalizacji inicjowanej cytokiną.

Mimo, że według wielu źródeł wysoka ekspresja genu *TGFB1* była opisywana w rakach jelita grubego z krótkim czasem przeżycia, w przeprowadzonym badaniu nie zauważono wpływu poziomu ekspresji na przeżywalność pacjentów [Zi, 2019]. Uzyskane w pracy wyniki były tożsame z uzyskanymi przez zespół Coates i wsp. [Coates, 2017].

Analizując poszczególne cechy klasyfikacji TNM nie odnotowano zależności względnych poziomów ekspresji genu *TGFB1* od obecności przerzutów w poszczególnych piętrach regionalnych węzłów chłonnych. Zaobserwowano jednak, że korelowały one z wielkością i głębokością nacieku nowotworowego oraz obecnością przerzutów w wątrobie. Wyższe poziomy mRNA stwierdzane były u pacjentów z nowotworami o stopniach T1 i T2 niż T3. Dodatkowo zauważalna była tendencja

do uzyskiwania wyższych względnych poziomów ekspresji w rakach o stopniach T1 i T2 względem T4. Istotnie wyższe względne poziomy transkryptu opisywano także u pacjentów bez obecności przerzutów do wątroby (M0).

Liczne doniesienia potwierdzają, że w początkowych stadiach zaawansowania choroby wysokie stężenia TGF- β 1 działają hamująco na proliferację komórek nowotworowych, co może tłumaczyć uzyskiwane w rakach T1 i T2 poziomy transkryptu genu kodującego to białko [Senturk, 2010]. Może to wynikać z faktu, że zwiększona ekspresja genu *TGFB1* pośredniczy w działaniu przeciwnowotworowym związanym z wtórną inaktywacją sygnalizacji PI3K-AKT [Chen QZ, 2017]. Otrzymane wyniki jednocześnie sugerują, że wyciszenie ekspresji tego genu obserwowane wraz z postępem choroby wiąże się z rozwojem nowotworów o większych rozmiarach i głębokości nacieku ściany jelita grubego. Może to być powiązane z utratą funkcji supresorowej białek odpowiedzialnych za hamowanie cyklu komórkowego w fazie G1. Potwierdzają to doniesienia zespołu badawczego kierowanego przez Yu, który zaobserwował w modelu zwierzęcym, że równoczesna inaktywacja genu supresorowego *Pten* i *Tgfbr2* powodowała zahamowanie apoptozy i zwiększoną proliferację komórek wskutek zmniejszonej ekspresji inhibitorów cyklinozależnych kinaz Co więcej, potwierdzono, że utrata *Pten* i *Tgfbr2* wiązała się z częstszym tworzeniem przerzutów u myszy. Kodowany przez gen *TGFBR2* receptor T β R-II jest aktywowany przez TGF- β 1, dlatego należy domniemywać, że utrata funkcji tej cytokiny u ludzi wywoła podobne do opisanych wyżej efekty [Yu, 2014].

Zaangażowanie elementów szlaku TGF- β w tworzeniu przerzutów zostało wielokrotnie potwierdzone w nowotworach płuc, tarczycy, prostaty, pęcherza moczowego, przełyku oraz jelita grubego [Hao, 2017; Wan, 2017; Qin, 2016; Chen W, 2017; Jing, 2016; Wang, 2015]. Wśród podstaw molekularnych wpływających na progresję i zdolność do tworzenia przerzutów upatruje się działanie czynnika TGF- β , który zwiększając ekspresję VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) i CTGF (ang. *connective tissue growth factor*) stymuluje proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Neoangiogeneza napędzana jest dodatkowo aktywacją metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 oraz wyciszaniem ich tkankowego inhibitora TIMP (ang. *tissue inhibitor of metalloproteases*) [Hua, 2015; Talar, 2013]. Dzięki procesowi angiogenezy, komórki nowotworowe zyskują nieograniczony dostęp do niezbędnych dla ich wzrostu

składników odżywczych, co sprzyja inwazyjności i tworzeniu przerzutów odległych [Chen, 2020].

Do powstania rozsiaanej choroby nowotworowej niezbędne jest nabycie przez komórki nabłonkowe cech typowych dla komórek mezenchymalnych, które uzyskują w procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego [Chruścik, 2018]. TGF- β 1 odpowiedzialny jest za nabywanie tych cech przez komórki nowotworowe. Związane jest to ze zwiększoną ekspresją takich czynników transkrypcyjnych jak SNAIL1/2 (ang. *human snail homolog 1/2*), HMGA2 (ang. *high mobility group AT-hook 2*), ZEB1/2 (ang. *zinc finger E-box binding homeobox 1/2*) i TWIST1 (ang. *twist basic helix-loop-helix transcription factor 1*) [Chen, 2020; Liu, 2017; Talar, 2013]. Efektem tego jest utrata przez komórki funkcji białek adhezyjnych E-kadheryny i γ -kateniny na rzecz zwiększonej ekspresji markerów mezenchymalnych tj. wimentyny i N-kadheryny [Wang, 2015; Gurzu, 2019]. Sprzyja to utracie polarności komórek i rozrywaniu połączeń pomiędzy nimi. Nabywają dzięki temu cech typowych dla komórek mezenchymalnych, o większej mobilności i zdolności do migracji [Chruścik, 2018]. Dostępnych jest wiele doniesień potwierdzających, że TGF- β 1 zaangażowany jest w proces tworzenia przerzutów [Yi, 2016; Asiri, 2018]. W przeprowadzonym na liniach komórkowych raka jelita grubego doświadczeniu potwierdzono, że TGF- β 1 zwiększał ekspresję regulatorów EMT, takich jak *Slug*, *Snail* i *Sox4*, co prowadziło do tworzenia przerzutów do wątroby [Bu, 2015]. W badaniu zespołu Asiri i wsp. stymulacja komórek TGF- β 1 wiązała się ze wzrostem ekspresji białek Cten, ROCK1, Src, Snail i N-kadheryny i jednoczesnym zahamowaniem ekspresji E-kadheryny. Skutkowało to wzrostem migracji, inwazyjności i proliferacji komórek. Wyciszenie aktywności TGF- β 1 przeciwdziało tym procesom, co jest zastanawiające w kontekście uzyskanych w pracy wyników [Asiri, 2018]. Doniesienia te sugerują, że *TGFB1* wpływa na nasilenie procesów proliferacyjnych i nabywanie zdolności do tworzenia przerzutów. W przypadku badanych pacjentów inicjacja tych procesów mogła zachodzić już na początkowych etapach rozwoju nowotworu i poprzedzać wyciszenie transkrypcji tego genu [Wang XL, 2019].

Otrzymane w pracy wyniki korespondują również z wysokimi względnymi poziomami ekspresji *TGFB1* w nowotworach bez zajęcia naczyń krwionośnych. Początkowe wysokie ilości transkryptu genu mogą inicjować inwazję naczyniową na wczesnym etapie rozwoju nowotworu, co jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym. Może

również potwierdzać udział genu *TGFB1* w zwiększaniu zdolności migracyjnej komórek oraz tworzeniu wtórnych ognisk raka w narządach odległych. Tłumaczy się to zdolnością TGF- β 1 do regulacji funkcji integryn m.in. α V, β 1 i β 3 oraz promowaniu EMT [Asiri, 2018]. Dodatkowo, istnieją badania mówiące, że inaktywacja sygnalizacji TGF- β wiąże się z redukcją ilości i szerokości naczyń krwionośnych. Zastosowany w modelu zwierzęcym inhibitor T β R-I powodował zmniejszenie rozmiaru i stopnia zaawansowania nowotworu oraz uniemożliwiał tworzenie przerzutów do wątroby [Tauriello, 2018; Chen, 2020].

Każdy nowotwór jest zbiorem patologicznych komórek nowotworowych, leukocytów, fibroblastów, komórek nabłonkowych i śródbłonna, które tworzą specyficzne mikrośrodowisko (TME, ang. *tumor microenvironment*). Pochodzące z komórek zmienionych nowotworowo czynniki wzrostu i cytokiny, w tym TGF- β , działają nie tylko autokrynnie, ale również parakrynnie, dzięki czemu tworzą optymalne warunki dla rozwoju nowotworu [Wang XL, 2019]. W ramach przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej organizmu w obrębie tkanki nowotworowej dochodzi do zwiększonej rekrutacji limfocytów. W pochodzących od pacjentów tkankach raka jelita grubego zaobserwowano, że obecność nacieku limfocytarnego korelowała z wyższymi względnymi poziomami ekspresji genu *TGFB1*.

Istnieją badania potwierdzające, że nadekspresja genu *TGFB1* sprzyja częstszemu występowaniu chorób autoimmunologicznych np. toczenia rumieniowatego układowego i twardziny układowej [Stępień-Wyrobiec, 2008]. W chorobach nowotworowych z kolei tłumi przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną poprzez supresję limfocytów T i B, komórek NK oraz makrofagów [Chen, 2020]. Pokazuje to badanie przeprowadzone u pacjentów z zaawansowanym rakiem jelita grubego, u których nadekspresja *TGFB1* towarzyszyła zmniejszonej liczbie limfocytów T oraz blokowaniem nabywania przez nie fenotypu Th1 [Tauriello, 2018]. Immunosupresyjne działanie TGF- β jest ważnym elementem promującym komórki nowotworowe do zwiększonej inwazyjności i tworzenia przerzutów [Chruścił, 2018]. Na tej podstawie należy wysnuć wniosek, że obserwowane w nowotworach M0 wysokie poziomy mRNA genu *TGFB1* mogą być czynnikiem wspomagającym dalszy rozwój raka.

W koordynowaniu przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej istotną rolę zdają się pełnić komórki dendrytyczne, które rozpoznają antygeny komórek nowotworowych i indukują skierowaną przeciwko nim odpowiedź limfocytów T. Pod wpływem syntetyzowanych przez nowotwór cytokin przeciwzapalnych, tj. TGF- β 1, VEGF, IL-4, IL-6, IL-10, PGE2 (ang. *prostaglandin E2*), komórki dendrytyczne tracą zdolność do prezentowania antygeny i aktywowania limfocytów T a wspierają w ten sposób ucieczkę komórek rakowych spod nadzoru immunologicznego [Gulubova, 2018; Cui, 2015]. Dodatkowo, TGF- β 1 koordynuje różnicowanie limfocytów T regulatorowych i pomocniczych zależnie od jego stężenia. Wysoka ekspresja tej cytokiny tłumi odpowiedź limfocytów Th na rzecz zwiększonej indukcji limfocytów Treg wykazujących ekspresję czynnika transkrypcyjnego Foxp3, które tłumią odpowiedź immunologiczną i sprzyjają nowotworzeniu [Stanilova, 2018; Li, 2006]. Zwiększona infiltracja limfocytów Treg w obrębie TME może w ten sposób tworzyć korzystną niszę dla rozwoju raka [Toor, 2019; Gyori, 2018]. Tłumaczyłoby to również obserwowane wyższe względne poziomy ekspresji *TGFB1* w tkankach posiadających naciek limfocytny. Nie stoją one w sprzeczności z dotychczasowymi doniesieniami mówiącymi o immunosupresyjnej roli TGF- β 1, gdyż duża część obecnych w tkance nowotworowej limfocytów może stanowić frakcja limfocytów Treg. Takiej samej obserwacji dokonał zespół Toor i wsp., który zauważył znaczny wzrost liczby limfocytów Treg Foxp3⁺ w tkance nowotworowej w porównaniu do skrawków pobranych z innego odcinka jelita grubego.

Do chwili obecnej nie jest znany wpływ dysproporcji pomiędzy poszczególnymi subpopulacjami limfocytów T na rokowanie pacjentów [Toor, 2019]. Uważa się jednak, że zwiększony naciek komórek Treg w tkance wynikający z nadekspresji genu *TGFB1* może być niekorzystnym czynnikiem prognostycznym [Saito, 2016]. Wskazują na to wysokie stężenia limfocytów T regulatorowych Foxp3⁺ we krwi obwodowej pacjentów onkologicznych, które ulegały obniżeniu po zastosowaniu leczenia [Li, 2006]. Celem zweryfikowania hipotezy mówiącej o zwiększonym udziale limfocytów Treg względem Th, należałoby wykonać dodatkowe badania immunohistochemiczne tkanek określające fenotyp limfocytów.

Obiektem wielu prowadzonych badań będących w fazie przedklinicznej i klinicznej stało się zahamowanie nadmiernej aktywności szlaku sygnałowego TGF- β .

Stosowane w nich leki z jednej strony mogłyby wspomóc układ immunologiczny w walce z nowotworem, a z drugiej strony pomogłyby w zahamowaniu tworzenia naczyń krwionośnych przez nowotwór. Do blokowania sygnalizacji mogą być wykorzystywane oligonukleotydy antysensowne, monoklonalne przeciwciała neutralizujące TGF- β czy inhibitory kinazy tyrozynowej [Chen, 2020]. Do wyciszania ekspresji TGF- β można stosować cytokiny o przeciwnym działaniu lub wprowadzać do genomu geny odpowiedzialne za syntezę białka I-SMAD oraz wadliwych receptorów blokujących przekaznictwo dokomórkowe [Stępień-Wyrobiec, 2008].

Nasilenie procesów proliferacji, angiogenezy, nadanie komórkom nowotworowym zdolności do migracji oraz hamowanie lokalnej odpowiedzi immunologicznej korelowały ze zmianą poziomu transkryptu genu *TGFB1*. Zrodziło to jednak wiele pytań dotyczących mechanizmów nadzorujących ekspresję tego genu. Wśród nich wymienia się czynniki epigenetyczne, takie jak modyfikacja białek histonowych czy metylacja cytozyn regionów promotorowych i regulatorowych genów. Do zbadania w jaki sposób dochodzi do regulacji ekspresji badanego genu przeprowadzono jakościową ocenę metylacji wysp CpG regionu promotorowego genu *TGFB1*.

Wyciszanie genów poprzez metylację jest jednym z najczęstszych mechanizmów epigenetycznych regulujących proces transkrypcji. Istotą metylacji jest przeniesienie za pomocą metylotransferaz DNA grup metylowych na zasady cytozynowe znajdujące się w obrębie dinukleotydów CpG – nazywanych wyspami CpG – z wytworzeniem 5-metylocytozyn (5mC). Metylacja promotorowego lub regulatorowego regionu genu związana jest z zaburzonym wiązaniem czynników transkrypcyjnych i wyciszeniem ekspresji. Odpowiada między innymi za inaktywację chromosomu X, ale może być również jednym z czynników rozwoju nowotworów. Szczególnie niebezpieczna jest hipermetylacja genów strategicznych dla poprawnego przebiegu cyklu komórkowego, apoptozy czy naprawy błędów w sekwencji DNA [Shao, 2006].

Nadal niewiele wiadomo w jaki sposób modulowana jest ekspresja genu *TGFB1*. Głównym regulatorem jego transkrypcji jest obszar między niepodlegającym translacji rejonem 5'UTR a pierwszym eksonem. Mówi się również o wpływie metylacji

w pozycjach +91, +115, +145, +151 od miejsca startu transkrypcji [Yang Liling, 2018].

Zmiana wzoru metylacji promotora genu *TGFB1* powodująca jego zwiększoną transkrypcję związana jest z postępującą jaskrą oraz nefropatią cukrzycową [McDonnell, 2016; Yang Liling, 2018]. Z kolei hipermetylacja skutkująca inaktywacją genu korelowała z inwazyjnością raków prostaty i zdolnością do przerzutów nowotworów płuc [Shah, 2008]. W pracy dokonano oceny metylacji wysp CpG w obszarze od -235 do +22 nukleotydu od miejsca rozpoczęcia transkrypcji. Obecność grup metylowych w obrębie analizowanego regionu potwierdzono w 40,6% przypadków. Zbliżone wartości uzyskał inny zespół, który stwierdził metylację w 44,0% przypadków raka płuc. Jednak wyniki te odbiegały znacząco od pacjentów z rakiem prostaty o częstości metylacji sięgającej aż 82,0%. Prezentowane w pracy wyniki nie potwierdziły związku metylacji ocenianego obszaru z ekspresją genu ani cechami demograficzno-patologicznymi pacjentów. Zespół Shah i wsp. zauważył jednak, że większa częstość metylacji wysp CpG była charakterystyczna dla inwazyjnych raków prostaty i przerzutujących nowotworów płuc [Shah, 2008].

Liczne badania potwierdzają udział czynników epigenetycznych, w tym metylacji, w regulacji ekspresji genu *TGFB1*. Niemniej jednak, metylacja nie musiała zachodzić jedynie w tym analizowanym obszarze, mogła bowiem odbywać się równolegle w innych miejscach regulatorowych. Dlatego w kolejnych etapach badań należy wykluczyć możliwość dołączania reszt metylowych w obrębie pozostałych regionów wpływających na poziom ekspresji badanego w pracy genu.

Warto również uwzględnić rolę pozostałych czynników epigenetycznych. W procesie metylacji biorą również udział białka SMAD, które modulują czynność koaktywatorów transkrypcyjnych CBP, p300 i GCN5. Wpływają również na kompleks białek demetylujących DNA (DNMT, ang. *DNA demethylating complex*) oraz na acetylotransferazy (HATs, ang. *histon acetyl transferase*) i deacetylazy histonowe (HDACs, ang. *histon deacetylases*) [Talar, 2013]. Jedną z nich, deacetylaza histonowa 3 (HDAC3), modyfikuje chromatynę jądrową dzięki czemu ekspresja genu *TGFB1* zostaje wyciszona [Lewandowski, 2015].

Cząsteczki mikroRNA, które mają zdolność do degradacji mRNA lub represji translacyjnej również wpływają na modulację ekspresji genów. Doniesienia wskazują

na udział tych cząsteczek w patogenezie wielu typów nowotworów. Udokumentowano między innymi zdolność $TGF-\beta 1$ do regulacji transkrypcji kilku mikroRNA, m. in. miR-155, miR-192, miR-216a, miR-217 czy klastra miR-23a/27a/24 [Zhang, 2017]. Badania przeprowadzone na liniach komórkowych raka żołądka, płuc czy prostaty potwierdziły, że $TGF-\beta 1$ indukował transkrypcję miR-574-3p, który hamował proliferację, migrację i inwazję komórek [Zhang, 2017; Ishikawa, 2014; Su, 2012; Chiyomaru, 2013]. Pozwala to domniemywać, że obniżenie ekspresji *TGFB1* w zaawansowanych rakach jelita grubego, skutkujące osłabieniem aktywności supresorowego miR-574-3p, predysponowało do szybszego wzrostu nowotworu. Tworzy się w ten sposób pole do zastosowania terapii opartej na lekach modulujących nie tylko aktywność $TGF-\beta 1$, ale również wybranych cząsteczek mikroRNA. Pierwsze próby zostały podjęte przez zespół Xu i wsp., który spostrzegł w nowotworach złośliwych wyciszenie ekspresji miR-490-3p, działającego na $T\beta R-I$ i MMP-2/9. Wywołanie nadekspresji tej cząsteczki w linii komórkowej raka jelita grubego hamowało inwazyjność i zdolność do tworzenia przerzutów przez komórki, co tym samym potwierdzało supresyjną rolę miR-490-3p [Xu, 2015]. Podobne działanie przypisuje się, aktywowanej przez $TGF-\beta 1$ cząsteczce miR-1269a, która promowała tworzenie przerzutów raka jelita grubego. Jej zwiększoną ekspresję odnotowywano szczególnie w późnych stadiach choroby. Co więcej, zespół Bu i wsp. wykazał, że ekspresja tego mikroRNA związana była z wyższym ryzykiem nawrotu choroby [Bu, 2015]. Z kolei obniżona ekspresja miR-133b w raku piersi była związana z wysokim stopniem zaawansowania i obecnością przerzutów w węzłach chłonnych. Z drugiej strony nadekspresja tej cząsteczki działała hamująco na *TGFB1* i tłumiała zdolność komórek do proliferacji i inwazyjności [Wang S, 2019]. Podobny wpływ na *TGFB1* wywoływały inne mikroRNA, np. miR-335-5p [Du, 2019]. W badaniu przeprowadzonym na tkankach raka jelita grubego zaobserwowano, że obniżona ekspresja *TGFB1* korelowała z nadekspresją miR-130b i niskim stężeniem integryny $\alpha 5$, ważnej w kontekście tworzenia przerzutów. Po 24-godzinnej inkubacji komórek z $TGF-\beta 1$ zaobserwowano ich zwiększoną migrację i spadek ekspresji miR-130b, co sugeruje, że wysoka ekspresja tego genu promuje zdolność migracyjną komórek poprzez hamowanie miR-130b [Yi, 2016].

Efektywność szlaku sygnałowego $TGF-\beta$ zależna jest od receptorów, rodziny białek SMAD oraz czynników transkrypcyjnych. Przedmiotem kolejnych analiz był,

kodujący białko receptorowe II typu, gen *ACVR2A*. Receptor ten rozpoczyna kaskadę sygnalizacyjną $\text{TGF-}\beta$ skierowaną do jądra komórkowego [Stalińska, 2005]. Jego indukcja może rozpoczynać się od przyłączenia szeregu ligandów, po którym następuje fosforylacja receptora typu I, a następnie białek SMAD-2/3 lub SMAD-1/5/8. Te, tworząc kompleks ze SMAD-4 przemieszczają się do jądra komórki, gdzie regulują transkrypcję genów [Olsen, 2015].

Istnieje wiele doniesień wskazujących na współuczestnictwo genu *ACVR2A* w różnych stanach patologicznych. Potwierdzono wpływ obniżonej ilości transkryptu tego genu na ryzyko rozwinięcia u kobiet ciężarnych stanu przedrzucawkowego, co tłumaczy się dysfunkcją proliferacji i przepuszczalności śródbłonna naczyń [Glotov, 2019; Thulluru, 2015]. Sprawne działanie receptorowe niezbędne jest również dla zachowania prawidłowego procesu mielinizacji neuronów, a dysfunkcje na tym poziomie mogą być podłożem zaburzeń neurologicznych np. stwardnienia rozsianego [Dillenburg, 2018].

Porównując względny poziom mRNA genu *ACVR2A* z parametrami demograficzno-patologicznymi dostrzeżono jedynie różnice wynikające z umiejscowienia nowotworu. W badanej populacji stwierdzano wyższe względne poziomy ekspresji genu *ACVR2A* u pacjentów z rakiem jelita grubego zlokalizowanym w odbytnicy niż we wcześniejszych odcinkach jelita grubego.

Należy zwrócić uwagę, za przekaznictwo których ligandów odpowiada receptor *ACVR2A* i z jakimi konsekwencjami może się wiązać jego zmieniona aktywność. Najwyższe powinowactwo wykazują względem niego aktywiny A i B, GDF-8, GDF-11 oraz BMP-10. Zatem jedną z przyczyn zwiększonej ekspresji receptora może być odpowiedź na wzmożone przekaznictwo wynikające z obecności ligandów istotnych w procesie kancerogenezy, włóknienia czy utraty masy kostno-mięśniowej. Obserwowana u pacjentów z rakiem odbytnicy nadekspresja *ACVR2A* mogła wiązać się z nasilonym procesem zapalnym, zmianami zwłóknieniowymi czy tworzeniem przerzutów indukowanych sygnalizacją aktywiny A [Aykul, 2016; Jin, 2018]. Tym samym, wyższy poziom ekspresji *ACVR2A* mógłby potencjalnie przyczyniać się do szybszej progresji raka odbytnicy i pogarszać rokowanie. Z drugiej strony, niższe względne poziomy ekspresji u pacjentów z nowotworami kątncy i okrężnicy mogły wynikać z obecności czynników inhibitorowych np. miR-15a/miR-16.

W badanej grupie nie zaobserwowano jednak zmian częstości powstawania przerzutów oraz wyższej umieralności wynikającej z lokalizacji nowotworu, dlatego ACVR2A nie może być traktowany jako potencjalny marker prognostyczny raka jelita grubego. Potwierdzają to dodatkowo statystyki *Surveillance Epidemiology and End Results*, według których odsetki 5-letnich przeżyć pacjentów z rakiem odbytnicy i okrężnicy są do siebie zbliżone [Jin, 2018; Szmidt, 2010]. Receptor ACVR2A pośredniczy również w transdukcji sygnalizacji inicjowanej BMP-2. Jednoczesny brak tego receptora oraz innego receptora II typu – BMPR2 – całkowicie znosił wpływ tej cytokiny [Bai, 2017]. Według innych badań, obniżona ekspresja ACVR2A może przyczyniać się do zahamowania proliferacji komórek śródbłonna naczyniowego i zwiększenia jego przepuszczalności [Yong, 2018]. Może to potencjalnie wspomagać tworzenie przerzutów przez nowotwory, jednak w obserwowanej grupie nie stwierdzono tej zależności.

Kolejną przyczyną dostrzeżonych różnic ekspresji ACVR2A mogą być odmienności w budowie anatomicznej odbytnicy i pozostałych odcinków jelita grubego. Według dostępnych danych, u 30% pacjentów po operacyjnym usunięciu raka odbytu dochodzi do wznowy w ciągu 2 lat od zabiegu. W związku z tym, można wysnuć hipotezę mówiącą, że silniejsza sygnalizacja związana z receptorem ACVR2A wiąże się z większym ryzykiem nawrotu choroby. Celem potwierdzenia tej tezy, należałoby poddać obserwacji pacjentów z rakiem odbytnicy pod kątem częstości wznów miejscowych i porównać otrzymane wyniki z grupą chorych z rakiem kątnicy i okrężnicy.

W przypadku pacjentów z rakiem jelita grubego najczęściej dochodzi do wyciszenia przekąźnictwa sygnałowego w wyniku mutacji lub utraty heterozygotyczności genów kodujących receptory błonowe T β R-I i T β R-II oraz białka SMAD-4 [Talar, 2013]. Utrata funkcji białka Co-SMAD jest powszechna w rakach jelita grubego i stwierdzana nawet u 30% chorych. Co więcej, zjawisko to jest typowe dla raków najbardziej zaawansowanych i o złym rokowaniu [Zhao, 2018]. W innym badaniu zaobserwowano u pacjentów z nowotworem jelita grubego wyższe poziomy ekspresji T β R-I oraz wyższe stężenia cytokiny TGF- β ocenianej immunohistochemicznie. Korespondowało to jednocześnie z wyższym stopniem zaawansowania choroby i ryzykiem tworzenia przerzutów [Talar, 2013].

Dostępne są inne doniesienia wskazujące na powszechność mutacji genów kodujących białka SMAD szczególnie w kontekście chorób nowotworowych. Wynika z nich, że aż połowa pacjentów z rakiem trzustki posiada dysfunkcję SMAD-4. Około 16% osób z rakiem jelita grubego posiada obniżoną aktywność białkową Co-SMAD a blisko 6% mutacje w obrębie genu kodującego SMAD-2. W tym ostatnim przypadku, regionem szczególnie podatnym na zmiany jest domena MH2, czego rezultatem jest brak możliwości oddziaływania z białkiem pośredniczącym SMAD-4. Mutacje w obrębie genów kodujących białka SMAD wiążą się wyższym stopniem zaawansowania nowotworu oraz obecnością przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych [Witkowska, 2014]. Przeprowadzone przez zespół Ramachandrana i wsp. badania wykazały, że białka SMAD-1 i SMAD-5 są niezbędne komórkom nowotworowym w procesie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego i tworzenia przerzutów odległych. Z tego powodu, analizując zaburzenia szlaku TGF- β należy brać pod uwagę możliwość współwystępowania zmian pozostałych elementów ścieżki sygnalizacyjnej [Ramachandran, 2018].

Należy również uwzględniać złożoność szlaku TGF- β , ponieważ nawet dobrze poznane do tej pory ścieżki sygnalizacyjne mogą wymykać się spośród przyjętych od dawna schematów i przebiegać w sposób niekanoniczny. Jako przykład może posłużyć badanie Ramachandran i wsp., z którego wynika, iż TGF- β indukuje fosforylację nie tylko białek SMAD-2 i SMAD-3, ale również SMAD-1 oraz SMAD-5 regulujących geny zależne od BMP. Według tego badania przeprowadzonego na ludzkiej linii komórkowej raka sutka, białka te ulegają fosforylacji poprzez receptor ACVR1 aktywowany przez TGF- β . Co więcej, stwierdzono, że nawet 25% transkryptomu, który reguluje TGF- β zależny jest od aktywacji SMAD-1 i SMAD-5. Ponadto wykazano, że ich silna fosforylacja indukowana TGF- β sprzyja przemianie komórek epitelialnych w mezenchymalne [Ramachandran, 2018].

Po utworzeniu kompleksu białka SMAD transportowane są przez błonę jądrową do jądra, gdzie we współpracy z koaktywatorami (np. białkiem p300) oraz korepresorami transkrypcyjnymi (np. białkiem p107) regulują ekspresję określonych genów. Wpływają między innymi na ekspresję genów *CDKN1A*, *CDKN2B*, *ATF3*, *ID1*. Potwierdzono wpływ TGF- β na obniżenie poziomu ekspresji protoonkogenu *C-myc* oraz jego produktu białkowego. Przekłada się to na wzrost

ekspresji cykliny D1, która powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S. TGF- β może również blokować przejście komórek z fazy G2 w mitozę poprzez ograniczenie aktywności CDK2 [Stalińska, 2005].

14. Wnioski

Uzyskane w pracy wyniki uprawniają do wyciągnięcia następujących wniosków:

- a) wykazano wyższe względne poziomy ekspresji genu *ACVR2A* w rakach odbytnicy niż okrężnicy i kątnicy, co może świadczyć o udziale badanego genu w rozwoju nowotworów końcowego odcinka jelita grubego;
- b) nie stwierdzono związku między względnymi poziomami ekspresji genu *ACVR2A* a pozostałymi cechami demograficzno-patologicznymi pacjentów, takimi jak: wiek, płeć, wywiad rodzinny, wielkość i głębokość naciekania ściany jelita, zajęcie regionalnych węzłów chłonnych, obecność przerzutów odległych, stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM i Astlera-Collera, stopień złośliwości histologicznej, podtyp histopatologiczny, zajęcie naczyń krwionośnych przez nowotwór, obecność nacieku limfocytarnego oraz czas przeżycia pacjentów;
- c) potwierdzono wyższe względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* u pacjentów z I stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu wg klasyfikacji TNM w porównaniu do badanych ze stopniem IV, co przemawia za udziałem badanego genu w początkowych etapach rozwoju raka jelita grubego;
- d) odnotowano wyższe względne poziomy transkryptu genu *TGFB1* u pacjentów z II stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu wg klasyfikacji Astlera-Collera niż u osób ze stopniem VI, co sugeruje udział genu w początkowych etapach kancerogenezy;
- e) wyższy względny poziom ekspresji genu *TGFB1* związany był z rakami o mniejszej wielkości i głębokości naciekania ściany jelita przez nowotwór (stopnie T1 i T2), co może wskazywać na hamujący wpływ genu na wzrost i proliferację komórek nowotworowych;
- f) wyższy względny poziom mRNA genu *TGFB1* wiązał się z brakiem przerzutów do wątroby, co może przemawiać za udziałem genu w hamowaniu zdolności migracyjnej komórek rakowych;
- g) stwierdzono wyższe względne poziomy ekspresji genu *TGFB1* u pacjentów bez zajętych nowotworowo naczyń krwionośnych, co może świadczyć o protekcyjnym działaniu genu w procesie tworzenia przerzutów;

- h) wyższy względny poziom transkryptu genu *TGFB1* korelował z obecnością nacieku limfocytarnego w obrębie tkanki nowotworowej, który jest korzystnym czynnikiem rokowniczym w przebiegu raka jelita grubego;
- i) nie zaobserwowano zależności między względnymi poziomami ekspresji genu *TGFB1* a pozostałymi cechami demograficzno-patologicznymi, takimi jak: wiek, płeć, wywiad rodzinny, umiejscowienie nowotworu, zajęcie regionalnych węzłów chłonnych, stopień złośliwości histologicznej, podtyp histopatologiczny oraz czas przeżycia pacjentów;
- j) nie potwierdzono wpływu obecności metylacji regionu promotorowego genu *TGFB1* w obszarze od -235 do +22 nukleotydu od miejsca rozpoczęcia transkrypcji na względny poziom ekspresji badanego genu, co może wskazywać na przyłączanie reszt metylowych w innych obszarach regionu promotorowego lub na udział pozostałych czynników regulujących proces transkrypcji;
- k) nie wykazano związku między obecnością metylacji regionu promotorowego genu *TGFB1* w obszarze od -235 do +22 nukleotydu od miejsca rozpoczęcia transkrypcji a cechami demograficzno-patologicznymi, co wskazuje na brak wpływu tego procesu na zapadalność i patomechanizm rozwoju raka jelita grubego.

Kolejny etap badań będzie obejmował ocenę metylacji pozostałych obszarów regionu promotorowego genu *TGFB1* a także analizę innych mechanizmów epigenetycznych mogących wpływać na jego ekspresję, w tym modyfikacje potranslacyjne białek histonowych oraz uczestnictwo niekodujących cząsteczek RNA, takich jak siRNA oraz miRNA.

Otrzymane wyniki pozwolą na lepsze poznanie mechanizmów regulujących ekspresję genu *TGFB1*. W przyszłości mogą one zostać wykorzystane do opracowania markerów epigenetycznych raka jelita grubego lub stać się celem terapii personalizowanej.

15. Streszczenie

Po nowotworach płuc i piersi rak jelita grubego jest trzecim najczęściej diagnozowanym nowotworem na świecie a jednocześnie drugim o najwyższej śmiertelności. Niewielką część raków jelita grubego stanowią dziedziczne nowotwory jelita grubego, rozwijające się na tle zespołu Lyncha czy rodzinnej polipowatości gruczolakowej (FAP). Jednak zdecydowaną większość przypadków stanowią sporadyczne raki jelita grubego związane ze starszym wiekiem, niską aktywnością fizyczną, niewłaściwym sposobem odżywiania oraz spontanicznymi zmianami na poziomie molekularnym.

Proces powstawania raka jelita grubego trwa wiele lat a do jego rozwoju dochodzi najczęściej na tle gruczolaka. Wśród czynników mogących wpływać na transformację nowotworową prawidłowego nabłonka jelita grubego wymieniane są elementy szlaku sygnałowego TGF- β , istotne z punktu widzenia regulacji wzrostu, różnicowania, migracji i apoptozy komórek. W szlak ten zaangażowane są receptory oraz białka pośredniczące SMAD przekazujące informację do jądra komórkowego, w którym dochodzi do regulacji ekspresji docelowych genów.

Przedmiotem pracy była ocena względnych poziomów ekspresji genów *ACVR2A* oraz *TGFB1* wchodzących w skład szlaku TGF- β , a także genu *RUNX3* kodującego jeden z jądrowych czynników transkrypcyjnych. Do tego celu wykorzystywano metodę real-time PCR, a w przypadku genu *TGFB1* dokonano dodatkowo jakościowej oceny metylacji wysp CpG regionu promotorowego za pomocą techniki MS-PCR. Materiałem do badań były fragmenty tkankowe pozyskane okołoperacyjnie od 84 pacjentów z potwierdzonym histopatologicznie rakiem jelita grubego.

Otrzymane w pracy wyniki w powiązaniu z cechami demograficzno-patologicznymi wykazały wyższe względne poziomy transkryptu genu *ACVR2A* w rakach odbytnicy w porównaniu do okrężnicy i kątnicy. Może to wskazywać na jego zaangażowanie w rozwój nowotworów końcowego odcinka jelita grubego. W przypadku genu *TGFB1* zaobserwowano wyższe względne poziomy mRNA u pacjentów o niskim stopniu zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji Astlera-Collera (II^o) oraz TNM (I^o) niż u chorych z rakami o największej progresji, co sugeruje jego istotną rolę we wczesnych etapach rozwoju nowotworu. Dodatkowo, potwierdzono wyższe względne poziomy ekspresji *TGFB1* w rakach o stopniach T1 i T2 w porównaniu do stopnia T3, jak również w nieprzerzutujących rakach jelita

grubego (M0). Może to świadczyć o hamującym wpływie *TGFB1* na wzrost i proliferację komórek oraz osłabianiu ich zdolności migracyjnych, a w konsekwencji inicjowaniu procesu tworzenia przerzutów odległych. Co więcej, z wyższymi względnymi poziomami transkryptu tego genu wiązała się obecność limfocytów w tkance nowotworowej oraz brak zajęcia naczyń krwionośnych przez komórki rakowe, co może potwierdzać ochronną rolę genu *TGFB1* w procesie powstawania przerzutów odległych.

Nie udało się potwierdzić sposobu regulacji ekspresji genu *TGFB1* oceniając metylację w obrębie regionu promotorowego, dlatego w dalszych analizach należy dążyć do ustalenia mechanizmów nadzorujących ten proces. Ich określenie mogłoby przyczynić się w przyszłości do opracowania nowych strategii leczniczych lub stać się nowym narzędziem prognostycznym w raku jelita grubego.

16. Summary

After lung and breast cancer, colorectal cancer is the third most commonly diagnosed cancer in the world and the second highest mortality rate. A small proportion of colorectal cancers are hereditary and develop from Lynch syndrome or familial adenomatous polyposis (FAP). However, the vast majority of cases are sporadic colorectal cancers associated with older age, low physical activity, improper diet and spontaneous changes at the molecular level.

The process of colon cancer formation lasts for many years and its development is most often caused by adenoma. Among the factors that may influence the neoplastic transformation of the normal colon epithelium, elements of the TGF- β signaling pathway are mentioned, which are important from the point of view of cell growth regulation, differentiation, migration and apoptosis. This pathway includes receptors and SMAD mediating proteins that transmit information to the nucleus where the expression of target genes is regulated.

The subject of the study was to evaluate the relative expression levels of the *ACVR2A* and *TGFB1* genes that are components of the TGF- β pathway, and the *RUNX3* gene encoding one of the nuclear transcription factors. For this purpose, the real-time PCR method was used, and in the case of the *TGFB1* gene an additional qualitative assessment of CpG island methylation of the promoter region was performed by using the MS-PCR technique. The material for the study was tissue fragments acquired perioperatively from 84 patients with histopathologically confirmed colorectal cancer.

The results obtained in the study in connection with demographic and pathological features showed higher relative levels of the *ACVR2A* gene transcript in rectal cancers compared to the colon and cecum. This may indicate its involvement in the development of end-colon cancers. In the case of the *TGFB1* gene, higher relative mRNA levels were observed in patients with low clinical advancement according to the Astler-Coller (II^o) and TNM (I^o) classifications than in patients with the most progressive cancers that suggest its significant role in the early stages of tumor development. Additionally, higher relative expression levels of *TGFB1* were confirmed in tumors with stage T1 and T2 compared to T3 as well as in non-metastatic colorectal cancers (M0). This may indicate the inhibitory effect of *TGFB1* on the growth and proliferation of cells, weakening their migratory capacity and initiating the process

of distant metastasis. Moreover, the presence of lymphocytes in the neoplastic tissue and the lack of blood vessel invasion by cancer cells were associated with higher relative transcript levels of this gene, which may confirm the protective role of the *TGFB1* in the process of distant metastasis.

It was not possible to verify the method of regulating the *TGFB1* gene expression by assessing the methylation within the promoter region, therefore further analyzes should aim at establishing the mechanisms regulating this process. Their determination could contribute to the development of new treatment strategies or become a new prognostic tool in colorectal cancer.

17. Piśmiennictwo

ACVR2A gene, baza danych GeneCards: <https://linkd.pl/armm>, dostęp on-line 24.09.2020.

Amoli M, Khatami F, Arzaghi S, Enayati S, Nejatisafa A: Over-expression of *TGF- β 1* gene in medication free Schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*, 2019; 99; s. 265-270.

Asiri A, Raposo T, Alfahed A, Ilyas M: *TGF β 1*-induced cell motility but not cell proliferation is mediated through Cten in colorectal cancer. *International Journal of Experimental Pathology*, 2018; 99(6); s. 323-330.

Aykul S, Martinez-Hackert E: Transforming Growth Factor- β Family Ligands Can Function as Antagonists by Competing for Type II Receptor Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 2016; 291(20); s. 10792-10804.

Bai L, Chang HM, Cheng JC, Chu G, Leung P, Yang G: ALK2/ALK3-BMPR2/ACVR2A Mediate BMP2-Induced Downregulation of Pentraxin 3 Expression in Human Granulosa-Lutein Cells. *Endocrinology*, 2017; 158(10); s. 3501-3511.

Bal J: *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2013; s. 259-334.

Bouquet F, Pal A, Pilones K, Demaria S, Hann B, Akhurst R, Babb J, Lonning S, DeWyngaert J, Formenti S i wsp.: *TGF β 1* inhibition increases the radiosensitivity of breast cancer cells *in vitro* and promotes tumor control by radiation *in vivo*. *Clinical Cancer Research*, 2011; 17(21); s. 6754-6765.

Bu P, Wang L, Chen K-Y, Rakhilin N, Sun J, Closa A, Tung K-L, King S, Varanko A, Xu Y i wsp.: miR-1269 promotes metastasis and forms a positive feedback loop with *TGF- β* . *Nature Communications*, 2015; 6(1); 6879.

Chen QZ, Li Y, Shao Y, Zeng YH, Ren WY, Liu RX, Zhou LY, Hu XL, Huang M, He F i wsp.: *TGF- β 1*/PTEN/PI3K signaling plays a critical role in the anti-proliferation effect of tetrandrine in human colon cancer cells. *International Journal of Oncology*, 2017; 50(3); s. 1011-1021.

Chen W, Zhao K, Miao C, Xu A, Zhang J, Zhu J, Su S, Wang Z: Silencing Trim59 inhibits invasion/migration and epithelial-to-mesenchymal transition via *TGF- β* /Smad2/3 signaling pathway in bladder cancer cells. *OncoTargets and Therapy*, 2017; 10; s. 1503-1512.

Chen Y, Di C, Zhang X, Wang J, Wang F, Yan JF, Xu C, Zhang J, Zhang Q, Li H,

Yang H, Zhang H: Transforming growth factor β signaling pathway: A promising therapeutic target for cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 2020; 235(3); s. 1903-1914.

Chruścik A, Gopalan V, Lam A: The clinical and biological roles of transforming growth factor beta in colon cancer stem cells: A systematic review. *European Journal of Cell Biology*, 2018; 97(1); s. 15-22.

Chiyomaru T, Yamamura S, Fukuhara S, Hidaka H, Majid S, Saini S, Arora S, Deng G, Shahryari V, Chang I i wsp.: Genistein Up-Regulates Tumor Suppressor MicroRNA-574-3p in Prostate Cancer. *PLoS One*, 2013; 8(3); e58929.

Coates R, Gardner J-A, Gao Y, Cortright V, Mitchell J, Ashikaga T, Skelly J, Yang M: Significance of positive and inhibitory regulators in the TGF- β signaling pathway in colorectal cancers. *Human Pathology*, 2017; 66; s. 34-39.

Cui C, Feng H, Shi X, Wang Y, Feng Z, Liu J, Han Z, Fu J, Fu Z, Tong H: Artesunate down-regulates immunosuppression from colorectal cancer Colon26 and RKO cells in vitro by decreasing transforming growth factor β 1 and interleukin-10. *International Immunopharmacology*, 2015; 27(1); s. 110-121.

Damjanov I, Fan F: *Cancer Grading Manual*. Second Edition. Springer, Berlin 2013; s. 51-58.

Derynck R, Rhee L, Chen E, van Tilburg A: Intron-exon structure of the human transforming growth factor- β precursor gene. *Nucleic Acids Research*, 1987; 15(7); 3188.

Dillenburg A, Ireland G, Holloway R, Davies C, Evans F, Swire M, Bechler M, Soong D, Yuen T, Su G i wsp.: Activin receptors regulate the oligodendrocyte lineage in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 2018; 135(6); s. 887-906.

Domagała W, Chosia M, Urańska E: *Atlas histopatologii. Tajemniczy świat chorych komórek człowieka*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2006; s. 56.

Dotan E, Cohen S: Challenges in the Management of Stage II Colon Cancer. *Seminars in Oncology*, 2011; 38 (4); s. 511-520.

Du W, Tang H, Lei Z, Zhu J, Zeng Y, Liu Z, Huang J: miR-335-5p inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer via ROCK1. *Respiratory Research*, 2019; 20(1); 225.

Francuz T, Czajka-Francuz P, Cisoń-Jurek S, Wojnar J: Rola zapalenia w patogenezie raka jelita grubego. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2016; 70; s. 360-366.

Glotov A, Kazakov S, Vashukova E, Pakin V, Danilova M, Nasykhova Y, Masharsky A, Mozgovaya E, Ereemeeva D, Zainullina M i wsp.: Targeted sequencing analysis of *ACVR2A* gene identifies novel risk variants associated with preeclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2019; 32(17); s. 2790-2796.

Gulubova M, Aleksandrova E, Vlaykova T: Promoter polymorphisms in *TGFB1* and *IL10* genes influence tumor dendritic cells infiltration, development and prognosis of colorectal cancer. *The Journal of Gene Medicine*, 2018; 20(2-3); e3005.

Gurzu S, Kobori L, Fodor D, Jung I: Epithelial Mesenchymal and Endothelial Mesenchymal Transitions in Hepatocellular Carcinoma: A Review. *Biomed Research International*, 2019; 2962580.

Gyori D, Lim EL, Grant F, Spensberger D, Roychoudhuri R, Shuttleworth S, Okkenhaug K, Stephens L, Hawkins P: Compensation between CSF1R⁺ macrophages and Foxp3⁺ Treg cells drives resistance to tumor immunotherapy. *JCI Insight*, 2018; 3(11); e120631.

Hao Y, Yang X, Zhang D, Luo J, Chen R: Long noncoding RNA LINC01186, regulated by TGF- β /SMAD3, inhibits migration and invasion through Epithelial-Mesenchymal-Transition in lung Cancer. *Gene*, 2017; 608; s. 1-12.

Hata A, Chen Y-G: TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016; 8(9); a022061.

Hill C: Transcriptional Control by the SMADs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016; 8(10); a022079.

Hua Y, Zhang W, Xie Z, Xu N, Lu Y: MMP-2 Is Mainly Expressed in Arterioles and Contributes to Cerebral Vascular Remodeling Associated with TGF- β 1 Signaling. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2015; 59(3); s. 317-325.

Huang CK, Aihara A, Iwagami Y, Yu T, Carlson R, Koga H, Kim M, Zou J, Casulli S, Wands J: Expression of transforming growth factor β 1 promotes cholangiocarcinoma development and progression. *Cancer Letters*, 2016; 380(1); s. 153-162.

Ishikawa K, Ishikawa A, Shoji Y, Imai T: A Genotoxic Stress-Responsive miRNA, miR-574-3p, Delays Cell Growth by Suppressing the Enhancer of Rudimentary Homolog Gene *in Vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014; 15(2); s. 2971-2990.

Itatani Y, Kawada K, Sakai Y: Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Colorectal Cancer and Its Tumor Microenvironment. *International Journal*

of Molecular Sciences, 2019; 20(23); 5822.

Jeziorski A: Onkologia. Podręcznik dla pielęgniarek. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005; s. 27.

Jin W, Chen F, Wang K, Song Y, Fei X, Wu B: miR-15a/miR-16 cluster inhibits invasion of prostate cancer cells by suppressing TGF- β signaling pathway. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018; 104; s. 637-644.

Jing C, Ma G, Li X, Wu X, Huang F, Liu K, Liu Z: MicroRNA-17/20a impedes migration and invasion via TGF- β /ITGB6 pathway in esophageal squamous cell carcinoma. American Journal of Cancer Research, 2016; 6(7); s. 1549-1562.

Kołos M, Nasierowska-Guttmejer A, Wasążnik-Jędras A: The pathomorphologist's role in the era of personalised therapy regarding the case of colorectal tumours. Nowotwory. Journal of Oncology, 2016; 66; s. 386-395.

Kruś S, Skrzypek-Fakhour E: Patomorfologia kliniczna. Podręcznik dla studentów. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007; s. 462.

Leszczyński S, Pilch-Kowalczyk J: Diagnostyka obrazowa. Układ trawienny. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2012; s. 379-389.

Lewandowski S, Janardhan H, Trivedi C: Histone Deacetylase 3 Coordinates Deacetylase-independent Epigenetic Silencing of Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) to Orchestrate Second Heart Field Development. Journal of Biological Chemistry, 2015; 290(45); s. 27067-27089.

Li M, Wan Y, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell R: Transforming Growth Factor- β Regulation of Immune Responses. Annual Review of Immunology, 2006; 24; s. 99-146.

Liu L, Zhou W, Cheng C-T, Ren X, Somlo G, Fong M, Chin A, Li H, Yu Y, Xu Y i wsp.: TGF β Induces "BRCAness" and Sensitivity to PARP Inhibition in Breast Cancer by Regulating DNA-Repair Genes. Molecular Cancer Research, 2014; 12(11); s. 1597-1609.

Liu S, Chen S, Zeng J: TGF- β signaling: A complex role in tumorigenesis (Review). Molecular Medicine Reports, 2017; (1); s. 699-704.

Markowitz S, Bertagnolli M: Molecular Basis of Colorectal Cancer. New England Journal of Medicine, 2009; 361 (25); s. 2449-2460.

McDonnell F, McNally S, Clark A, O'Brien C, Wallace D: Increased Global DNA Methylation and Decreased TGF β 1 Promoter Methylation in Glaucomatous Lamina Cribrosa Cells. Journal of Glaucoma, 2016; 25(10); s. e834-e842.

Mojarad E, Kuppen P, Aghdaei H, Zali M: The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 2013; 6 (3); s. 120-128.

Murphy K, Zhang S, Geiger T, Hafez M, Bacher J, Berg K, Eshleman J: Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2006; 8 (3); s. 305-311.

Nguyen H, Duong HQ: The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy (Review). *Oncology Letters*, 2018; 16 (1); s. 9-18.

Nojadeh J, Sharif S, Sakhinia E: Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI Journal*, 2018; 17; s. 159-168.

Obraz błony śluzowej jelita uzyskany metodą NBI, strona internetowa: <https://linkd.pl/zuaa>, dostęp on-line 24.09.2020.

Olsen O, Wader K, Hella H, Mylin A, Turesson I, Nesthus I, Waage A, Sundan A, Holien T: Activin A inhibits BMP-signaling by binding ACVR2A and ACVR2B. *Cell Communication and Signaling*, 2015; 13: 27.

Partyka R, Łobejko I, Uttecht-Pudęłko A, Kocot J, Kokocińska D, Jałowiecki P: Rak jelita grubego – główne czynniki indukujące karcynogenezę. *Chirurgia Polska*, 2010; 12, 2; s. 85-88.

Pino M, Chung D: The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, Jun 2010, 138(6); s. 2059-2072.

Qin T, Barron L, Xia L, Huang H, Villarreal M, Zwaagstra J, Collins C, Yang J, Zwieb C, Kodali R i wsp.: A novel highly potent trivalent TGF- β receptor trap inhibits early-stage tumorigenesis and tumor cell invasion in murine Pten-deficient prostate glands. *Oncotarget*, 2016; 7(52); s. 86087-86102.

Ramachandran A, Vizán P, Das D, Chakravarty P, Vogt J, Rogers K, Müller P, Hinck A, Sapkota G, Hill C: TGF- β uses a novel mode of receptor activation to phosphorylate SMAD1/5 and induce epithelial-to-mesenchymal transition. *Elife*, 2018; 7; e31756.

Rawla P, Sunkara T, Barsouk A: Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Review*, 2019; 14 (2); s. 89-103.

Robertson I, Rifkin D: Regulation of the Bioavailability of TGF- β and TGF- β -Related Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016; 8(6):a021907.

RUNX3 gene, strona internetowa: <https://linkd.pl/ar7d>, dostęp on-line 24.09.2020.

RUNX3 gene, baza danych OMIM: <https://linkd.pl/ar7e>, dostęp on-line 24.09.2020.

Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, Maeda Y, Hamaguchi M, Ohkura N, Sato E i wsp.: Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nature Medicine*, 2016; 22(6); s. 679-684.

Senturk S, Mumcuoglu M, Gursay-Yuzugullu O, Cingoz B, Akcali K, Ozturk M: Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. *Hepatology*, 2010; 52(3); s. 966-974.

Shah J, Shao G, Hei T, Zhao Y: Methylation screening of the *TGFBI* promoter in human lung and prostate cancer by methylation-specific PCR. *BMC Cancer*, 2008; 8: 284.

Shao G, Berenguer J, Borczuk A, Powell C, Hei T, Zhao Y: Epigenetic inactivation of *Betaig-h3* gene in human cancer cells. *Cancer Research*, 2006; 66(9); s. 4566-4573.

Solnica B: Diagnostyka laboratoryjna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2014; s. 295-297.

Srivastava R: Atlas on Narrow Band Imaging in Upper Aerodigestive Tract Lesions. Springer, Singapore 2019; s. 7-10.

Stalińska L, Ferenc T: Rola TGF- β w regulacji cyklu komórkowego. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2005; 59; s. 441-449.

Stanilova S, Stanilov N, Julianov A, Manolova I, Miteva L: Transforming growth factor- β 1 gene promoter -509C/T polymorphism in association with expression affects colorectal cancer development and depends on gender. *PLoS One*, 2018; 13(8); e0201775.

Stępień-Wyrobiec O, Hrycek A, Wyrobiec G: Transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-beta) – budowa, mechanizmy oddziaływania oraz jego rola w patogenezie tocznia rumieniowatego układowego. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2008; 62; s. 688-693.

Su Y, Ni Z, Wang G, Cui J, Wei C, Wang J, Yang Q, Xu Y, Li F: Aberrant expression of microRNAs in gastric cancer and biological significance of miR-574-3p. *International Immunopharmacology*, 2012; 13(4); s. 468-475.

Suzuki T, Dai P, Hatakeyama T, Harada Y, Tanaka H, Yoshimura N, Takamatsu T: TGF- β Signaling Regulates Pancreatic β -Cell Proliferation through Control of Cell Cycle Regulator p27 Expression. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 2013; 46(2); s. 51-58.

Szczeklik A: Interna Szczeklika: Podręcznik chorób wewnętrznych. Medycyna Praktyczna, Kraków 2017; s. 1015-1044.

Szmidt J, Kuźdzał J, Gruca Z, Krawczyk M, Lampe P, Polański J: Podstawy chirurgii. Podręcznik dla lekarzy specjalizujących się w chirurgii ogólnej. Tom 2, wydanie 2. Medycyna Praktyczna, Kraków 2010; s. 777-819.

Talar B, Czyż M: Rola szlaków sygnałowych TGF- β w nowotworach. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2013; 67; s. 1008-1017.

Tauriello D, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llargo A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, Sevillano M, Ibiza S, Cañellas A, Hernando-Momblona X i wsp.: TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*, 2018; 554(7693); s. 538-543.

TGFB1 gene, baza danych *Genetics Home Reference*: <https://linkd.pl/ar7f>, dostęp on-line 24.09.2020.

Thanki K, Nicholls M, Gajjar A, Senagore A, Qiu S, Szabo C, Hellmich M, Chao C: Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications. *Int Biol Biomed J*, 2017; 3 (3); s. 105-111.

Thulluru H, Michel O, Oudejans C, van Dijk M: *ACVR2A* promoter polymorphism rs1424954 in the Activin-A signaling pathway in trophoblasts. *Placenta*, 2015; 36(4); s. 345-349.

Tobias E, Connor M, Smith M: *Genetyka Medyczna*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2013; s. 185-198.

Toor S, Murshed K, Al-Dhaheri M, Khawar M, Abu Nada M, Elkord E: Immune Checkpoints in Circulating and Tumor-Infiltrating CD4⁺ T Cell Subsets in Colorectal Cancer Patients. *Frontiers in Immunology*, 2019; 10; 2936.

Tokarz P, Błasiak J: Znaczenie metylacji DNA profilu epigenetycznego komórek jelita grubego w ich transformacji nowotworowej = Role of DNA methylation in colorectal Cancer. *Postępy Biochemii*, 2013; 59 (3); s. 267-279.

Tomasetti C, Li L, Vogelstein B: Stem cell divisions somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* 2017; 355 (6331): 1330–1334.

Udział czynników molekularnych w patogenezie raka jelita grubego, baza danych KEGG: <https://linkd.pl/z2df>, dostęp on-line 24.09.2020.

Walton K, Johnson K, Harrison C: Targeting TGF- β Mediated SMAD Signaling for the Prevention of Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 2017; 8:461.

Wan F, Peng L, Zhu C, Zhang X, Chen F, Liu T: Knockdown of Latent Transforming Growth Factor- β (TGF- β)-Binding Protein 2 (LTBP2) Inhibits Invasion and Tumorigenesis in Thyroid Carcinoma Cells. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 2017; 25(4); s. 503-510.

Wang P: Suppression of DACH1 promotes migration and invasion of colorectal cancer via activating TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015; 460(2); s. 314-319.

Wang S, Huang M, Wang Z, Wang W, Zhang Z, Qu S, Liu C: MicroRNA-133b targets TGF β receptor I to inhibit TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis by suppressing the TGF- β /SMAD pathway in breast cancer. *International Journal of Oncology*, 2019; 55(5); s. 1097-1109.

Wang XL, Huang C: Difference of TGF- β /Smads signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of normal colonic epithelial cells induced by tumor-associated fibroblasts and colon cancer cells. *Molecular Biology Reports*, 2019; 46(3); s. 2749-2759.

Witkowska M, Smolewski P: Białka z rodziny SMAD: współczesna wiedza na temat ich ekspresji i potencjalnej roli w chorobach nowotworowych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2014; 68; s. 301-309.

Wrana J, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J: Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*, 1994; 370(6488); s. 341-347.

Wronkowski Z, Brużewicz S (red.): Nowotwory jelita grubego. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.

Xu X, Chen R, Li Z, Huang N, Wu X, Li S, Li Y, Wu S: MicroRNA-490-3p inhibits colorectal cancer metastasis by targeting TGF β R1. *BMC Cancer*, 2015; 15:1023.

Yamada T, Hasler W, Inadomi J, Anderson M, Brown R: Podręcznik gastroenterologii. Czelej, Lublin 2006; s. 465-492.

Yan X, Xiong X, Chen Y-G: Feedback regulation of TGF- β signaling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2017; 50(1); s. 37-50.

Yang Liling, Zhang Q, Wu Q, Wei Y, Yu J, Mu J, Zhang J, Zeng W, Feng B: Effect of TET2 on the pathogenesis of diabetic nephropathy through activation of transforming growth factor β 1 expression via DNA demethylation. *Life Sciences*, 2018; 207; s. 127-137.

Yang Lei, Liu Z, Tan J, Dong H, Zhang X: Multispectral imaging reveals hyper active TGF- β signaling in colorectal cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 2018; 19(2); s. 105-112.

Yi R, Li Y, Wang F, Gu J, Isaji T, Li J, Qi R, Zhu X, Zhao Y: Transforming growth factor (TGF) β 1 acted through miR-130b to increase integrin α 5 to promote migration of colorectal cancer cells. *Tumor Biology*, 2016; 37(8); s. 10763-10773.

Yong H, Murthi P, Brennecke S, Moses E: Genetic Approaches in Preeclampsia. *Methods in Molecular Biology*, 2018; 1710; s. 53-72.

Yu M, Trobridge P, Wang Y, Kannurn S, Morris SM, Knoblauch S, Grady WM: Inactivation of TGF- β signaling and loss of *PTEN* cooperate to induce colon cancer *in vivo*. *Oncogene*, 2014; 33(12); s. 1538-1547.

Zakrzewski P: Zaburzenia kaskady transformujących czynników wzrostu typu β w wybranych patologich człowieka. *Folia Medica Lodziensia*, 2012; 39(2); s. 265-292.

Zhang R, Wang M, Sui P, Ding L, Yang Q: Upregulation of microRNA-574-3p in a human gastric cancer cell line AGS by TGF- β 1. *Gene*, 2017; 605; s. 63-69.

Zhao M, Mishra L, Deng C-X: The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 2018; 14(2); s. 111-123.

Zhao Y, Xia S, Cao C, Du X: Effect of TGF- β 1 on apoptosis of colon cancer cells via the ERK signaling pathway. *Journal of the Balkan Union of Oncology*, 2019; 24(2); s. 449-455.

Zhuo C, Hu D, Li J, Yu H, Lin X, Chen Y, Zhuang Y, Li Q, Zheng X, Yang C: Downregulation of Activin A Receptor Type 2A Is Associated with Metastatic Potential and Poor Prognosis of Colon Cancer. *Journal of Cancer*, 2018; 9(19); s. 3626-3633.

Zi Z: Molecular Engineering of the TGF- β Signaling Pathway. *Journal of Molecular Biology*, 2019; 431(15); s. 2644-2654.

WYKAZ PUBLIKACJI:

1. **Wodziński D**, Wosiak A, Pietrzak J, Świechowski R, Jeleń A, Balcerczak E (2019): Does the expression of the *ACVR2A* gene affect the development of colorectal cancer? *Genetics and Molecular Biology*, 42(1), 32-39.
2. Pietrzak J, Mirowski M, Jeleń A, Świechowski R, **Wodziński D**, Niebudek K, Balcerczak E (2019): Decreased *MMP1* gene expression in acute myeloid leukaemia. *Molecular Biology Reports*, 46(2), 2293-2298.
3. Świechowski R, Jeleń A, Mirowski M, Talarowska M, Gałęcki P, Pietrzak J, **Wodziński D**, Balcerczak E (2019): Estimation of *CYP3A4*1B* single nucleotide polymorphism in patients with recurrent Major Depressive Disorder. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 7(6), 1-7.
4. Młudzik P, Pietrzak J, Saed L, **Wodziński D**, Franiak-Pietryga I, Mirowski M (2016): Elektroforetyczna identyfikacja proteinaz cysteinowych w surowicach pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową (PBL) z wykorzystaniem biotynylowanego jodoacetamidu. *Folia Medica Lodziensia*, 41(1), 35-52.
5. Wosiak A, **Wodziński D**, Kolasa M, Sałagacka-Kubiak A, Balcerczak E (2016): *SMAD-4* gene expression in human colorectal cancer: Comparison with some clinical and pathological parameters. *Pathology - Research and Practice*, 213(1), 45-49.
6. Pietrzak J, **Wodziński D**, Franiak-Pietryga I, Mirowski M (2015): Charakterystyka elektroforetyczna aktywności metaloproteinazowej surowicy pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową – badania wstępne. *Folia Medica Lodziensia*, 42(1), 49-62.
7. **Wodziński D**, Kraszula Ł, Pietruczuk M (2015): Metody immunochemiczne w medycznym laboratorium diagnostycznym. *Badanie i Diagnoza*, 21: 49-53.

WYKAZ DONIESIEŃ ZJAZDOWYCH:

1. „Role of c20917t polymorphism at *SMAD3* gene in colorectal cancer in Polish population - preliminary research” Niebudek K, Wtorek K, **Wodziński D**, Jesionek-Kupnicka D, Balcerczak E, Mirowski M, Żebrowska-Nawrocka M; Polish Scientific Networks: Science & Medicine, 21-23.06.2018, Łódź.
2. “Ocena polimorfizmu *CYP3A4*1B* u pacjentów cierpiących na zaburzenia depresyjne nawracające” Świechowski R, Jeleń A, Pietrzak J, **Wodziński D**, Balcerczak E; The International Conference of Natural and Medical Sciences: Young Scientists, PhD Students and Students, 01-03.12.2017, Lublin.
3. „Inhibition of key cancerogenesis proteolytic enzymes – metalloproteinases in patients with acute myeloid leukemia by ions of selected metals” Pietrzak J, Reczulski R, **Wodziński D**, Świechowski R, Jeleń A, Mirowski M; XXIst Gliwice Scientific Meetings, 17-18.11.2017, Gliwice.
4. “Expression of *ABCG2* gene in gastric ulcers and gastric cancer” **Wodziński D**, Pietrzak J, Świechowski R; Juvenes Pro Medicina, 22-23.04.2016, Łódź.
5. “Assessment of *SMAD4* gene expression in case of colorectal cancer – preliminary research” Pązik M, **Wodziński D**; Juvenes Pro Medicina, 22-23.04.2016, Łódź.
6. “Metalloproteinases activity of serum of patients with chronic lymphocytic leukemia” Pietrzak J, **Wodziński D**, Świechowski R; Juvenes Pro Medicina, 22-23.04.2016, Łódź.
7. “Expression of *ABCC1* gene in patients with depression” Świechowski R, Pietrzak J, **Wodziński D**; Juvenes Pro Medicina, 22-23.04.2016, Łódź.

Łódź, dn. 24.09.2020 r.

Damian Wodziński
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
al. T. Kościuszki 4, Łódź 90-419
Zakład Biochemii Farmaceutycznej
i Diagnostyki Molekularnej

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem wyłącznym twórcą, w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim (Dz. U. z 1994 r. Nr 24, poz. 83), rozprawy doktorskiej pt.: „Ocena ekspresji wybranych czynników szlaku TGF- β w raku jelita grubego.”

Równocześnie wyrażam zgodę na nieodpłatne udostępnienie wymienionej pracy Bibliotece Głównej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W tym celu zobowiązuję się przekazać pracę w formie pisemnej oraz w formie elektronicznej (plik formatu PDF na oznaczonej zgodnie z wymogami Rektora Uniwersytetu płycie CD) dla celów archiwizacyjnych.

Podpis