

Małgorzata Andrzejewska

**Tkankowa ekspresja
insulinopodobnego czynnika
wzrostu 1 (IGF-1)
w nowotworach jelita
grubego**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. ALDONA KASPRZAK

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik Katedry i Zakładu: Prof. dr hab. med. Maciej Zabel

Poznań 2015

Składam serdeczne podziękowania

Panu Profesorowi Maciejowi Zabłowi

Kierownikowi Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu za stworzenie doskonałych warunków pracy i umożliwienie realizacji badań w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej.

Pani Profesor Aldonie Kasprzak

za inspirację do poszerzania wiedzy i poznawania nowych technik histologicznych, wiarę we mnie i stałą opiekę nad wykonywanymi badaniami oraz szereg cennych wskazówek i uwag przy pisaniu niniejszej rozprawy.

Doktorowi Witoldowi Szaflarskiemu

za wprowadzenie mnie w tajniki techniki biologii molekularnej, wsparcie merytoryczne, życzliwość i wszelką pomoc przy opracowywaniu wyników.

Magister Agnieszce Seraszek-Jaros

z Zakładu Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej UMP za nieocenioną pomoc w statystycznym opracowywaniu wyników moich badań.

Praca została realizowana częściowo z grantu KBN nr N N401 009437; częściowo z funduszy działalności statutowej nr 502-01-02229373-5360.

SPIS TREŚCI

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	Str. 7
1. WSTĘP	Str. 10
1.1. Epidemiologia i etiologia raka jelita grubego	Str. 10
1.2. Patogeneza raka jelita grubego	Str. 11
1.3. Patomorfologia raka jelita grubego	Str. 13
1.3.1. Klasyfikacja histologiczna raka jelita grubego	Str. 13
1.4. Składniki systemu insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF)	Str. 20
1.4.1. Budowa i funkcja IGF-1	Str. 21
1.4.2. Receptor IGF typu I (IGF-1R) i ścieżka sygnałowa w systemie IGF-1	Str. 22
1.4.3. Budowa genu IGF-1 i alternatywny splicing	Str. 24
1.4.3.1. Biologiczna rola izoform mRNA i pro-peptydów IGF-1	Str. 28
1.5. Szlak sygnałowy IGF a kancerogeneza jelita grubego	Str. 30
1.5.1. Surowicze stężenie IGF-1 w raku jelita grubego	Str. 31
1.5.2. Lokalna produkcja IGF-1 w raku jelita grubego	Str. 33
1.5.3. Nowe strategie leczenia raka jelita grubego z wykorzystaniem wyników badań nad systemem IGF-1	Str. 37
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	Str. 39
3. MATERIAŁY I METODY	Str. 40
3.1. Pacjenci	Str. 40
3.2. Materiał tkankowy i stosowane odczynniki	Str. 44
3.3. Metody badań	Str. 44
3.3.1. Barwienie hematoksyliną i eozyną (H+E)	Str. 44
3.3.2. Technika immunohistochemiczna (IHC)	Str. 44
3.3.3. Ocena ekspresji białek	Str. 48
3.3.4. Badania z zastosowaniem RT-PCR	Str. 49
3.3.5. Metody statystyczne	Str. 53
3.3.6. Zagadnienia bioetyczne	Str. 54
4. WYNIKI	Str. 55
4.1. Dane kliniczne grupy badanej	Str. 55
4.2. Ocena złośliwości histologicznej (ang. <i>grade</i>) i stopnia zaawansowania zmian (ang. <i>stage</i>) u pacjentów z CRC	Str. 57
4.3. Ocena histologiczna CLR (ang. <i>Crohn's disease-like reaction</i>) w grupie badanej	Str. 61

4.4. Ekspresja tkankowa całkowitego mRNA IGF-1 oraz izoform (wariantów) mRNA powstałych w alternatywnym splicingu w grupie badanej	Str. 62
4.4.1. Procentowy udział transkryptów klasy I (P1) i II (P2) w całkowitej ekspresji genu IGF-1	Str. 62
4.4.2. Procentowy udział izoform mRNA IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C w całkowitej ekspresji genu IGF-1	Str. 63
4.4.3. Ilościowa ekspresja mRNA IGF-1 i wariantów transkryptów w grupie badanej i w kontroli	Str. 64
4.4.4. Porównanie wzajemnej ilościowej ekspresji izoform mRNA IGF-1 w obrębie danej grupy	Str. 67
4.4.4.1. Grupa badana (CRC)	Str. 67
4.4.4.2. Grupa kontrolna	Str. 68
4.5. Ekspresja mRNA antygenu proliferacyjnego Ki-67 w grupie CRC i w kontroli	Str. 69
4.6. Korelacje pomiędzy wzajemną ekspresją izoform mRNA IGF-1 w grupie CRC i w kontroli	Str. 70
4.7. Immunohistochemiczna (IHC) analiza lokalizacji i nasilenia ekspresji IGF-1 oraz wybranych białek proliferacyjnych i wskaźników apoptozy	Str. 72
4.7.1. Białko IGF-1	Str. 72
4.7.2. Antygen proliferacyjny Ki-67	Str. 73
4.7.3. Pozostałe białka proliferacyjne: PCNA i cyklina D1	Str. 74
4.7.4. Białka proapoptotyczne: p53 i kaspaza-3	Str. 74
4.7.5. Białko antyapoptotyczne Bcl2	Str. 74
4.7.6. Białko AKT	Str. 75
4.8. Korelacje pomiędzy ekspresją IGF-1 (mRNA i białko) a ekspresją wybranych białek proliferacji komórkowej i apoptozy w grupie CRC	Str. 75
4.9. Korelacje pomiędzy ekspresją IGF-1 (mRNA i białko) a ekspresją wybranych białek proliferacji komórkowej i apoptozy w grupie kontrolnej	Str. 77
4.10. Ekspresja IGF-1 (mRNA, białko) oraz Ki-67 (mRNA, białko) a wybrane dane kliniczne pacjentów z rakiem jelita grubego (CRC)	Str. 78
4.10.1. Ekspresja IGF-1 i Ki-67 a stopień złośliwości histologicznej (ang. <i>grade</i>)	Str. 78
4.10.2. Ekspresja markerów proliferacji komórkowej i apoptozy a stopień złośliwości histologicznej (ang. <i>grade</i>)	Str. 80
4.10.3. Ekspresja IGF-1, Ki-67, białek proliferacji komórkowej oraz apoptozy a nasilenie zmian zapalnych (parametr CLR) w grupie badanej (CRC)	Str. 80
4.10.4. Porównanie ekspresji wybranych składników osi IGF (mRNA i białko) oraz markerów proliferacyjnych i apoptozy w rakach o typie śluzotwórczym i pozostałych nowotworach jelita grubego	Str. 83
4.10.5. Ekspresja IGF-1 i Ki-67 a makroskopowy typ raka jelita grubego	Str. 84
4.10.6. Ekspresja markerów proliferacji komórkowej i apoptozy a makroskopowy typ raka jelita grubego	Str. 85

4.10.7. Ekspresja IGF-1 i Ki-67 a lokalizacja raka jelita grubego	Str. 86
4.10.8. Ekspresja markerów proliferacji komórkowej i apoptozy a umiejscowienie raka jelita grubego	Str. 88
4.10.9. Ekspresja IGF-1 i Ki-67 a klasyfikacja TNM raka jelita grubego	Str. 88
4.10.10. Ekspresja markerów proliferacji komórkowej i apoptozy a klasyfikacja TNM raka jelita grubego	Str. 90
4.11. Ekspresja IGF-1(mRNA, białko), różne izoformy mRNA IGF-1 oraz ekspresja Ki-67(mRNA, białko) a podstawowe wyniki badań pracownianych	Str. 91
4.12. Ekspresja IGF-1 oraz Ki-67 na poziomie mRNA u pacjentów żyjących i zmarłych w ciągu 5 lat od rozpoznania choroby	Str. 91
4.13. Dane kliniczne grupy porównawczej (zmiany nienowotworowe jelita grubego, „pseudoguzy”)	Str. 93
4.13.1. Tkankowa ekspresja całkowitego mRNA IGF-1 oraz izoform splicingowych: P1, P2 oraz IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C	Str. 95
4.13.1.1. Procentowy udział transkryptów klasy I (P1) i II (P2) w całkowitej ekspresji genu IGF-1	Str. 95
4.13.1.2. Procentowy udział wariantów transkryptów A, B i C IGF-1 w całkowitej ekspresji genu IGF-1	Str. 95
4.14. Porównanie ilościowej ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 i wariantów splicingowych IGF-1 u chorych z grupy porównawczej (pseudoguzy vs. kontrola)	Str. 97
4.15. Porównanie wzajemnej ilościowej ekspresji izoform mRNA IGF-1 w obrębie danej grupy	Str. 100
4.15.1. Grupa porównawcza – pseudoguzy	Str. 100
4.15.2. Grupa porównawcza – kontrola	Str. 101
4.16. Korelacje pomiędzy wzajemną ekspresją różnych izoform mRNA IGF-1 w grupie porównawczej (pseudoguzy) i w kontroli	Str. 102
4.17. Ekspresja mRNA antygeny proliferacyjnego Ki-67 w grupie porównawczej	Str. 104
4.18. Immunohistochemiczna ekspresja białka IGF-1 oraz markerów proliferacji komórkowej i białek apoptozy w grupie porównawczej	Str. 104
4.18.1. Korelacje pomiędzy ekspresją składników osi IGF-1 (mRNA i białko), Ki-67 (mRNA, białko) a markerami proliferacji komórkowej, apoptozy i białka AKT w zmianach nienowotworowych (pseudoguzy)	Str. 105
4.19. Korelacje pomiędzy ekspresją różnych izoform mRNA IGF-1 i całkowitego mRNA IGF-1 a wynikami badań laboratoryjnych w grupie porównawczej	Str. 107
4.19.1. Ekspresja IGF-1 (białko, różne izoformy mRNA) a nasilenie zmian zapalnych (ang. <i>grading</i>) w grupie porównawczej	Str. 107
4.20. Porównanie ekspresji transkryptów IGF-1, mRNA Ki-67 pomiędzy grupą badaną (CRC) a porównawczą (pseudoguzy jelita grubego)	Str. 109
4.20.1. Porównanie odsetkowego udziału izoform mRNA w grupie CRC i pseudoguzach jelita grubego	Str. 109

4.20.2. Porównanie ilościowej ekspresji w grupie CRC i pseudoguzach jelita grubego	Str. 109
4.21. Porównanie immunohistochemicznej ekspresji białka IGF-1, białek proliferacji i apoptozy komórek oraz białka AKT pomiędzy grupą badaną a porównawczą	Str. 111
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA	Str. 113
5.1. Analiza ekspresji różnych izoform mRNA IGF-1 (IGF-1P1, IGF-1P2, IGF-1A, IGF-1B, IGF-1C)	Str. 114
5.2. Analiza ekspresji IGF-1 na poziomie białka	Str. 120
5.3. Analiza immunohistochemicznej ekspresji białek proliferacyjnych i apoptozy w rakach jelita grubego i w zmianach nienowotworowych	Str. 123
6. PODSUMOWANIE	Str. 131
7. WNIOSKI KOŃCOWE	Str. 132
8. STRESZCZENIE	Str. 133
9. SUMMARY	Str. 135
10. PIŚMIENNICTWO	Str. 138
11. ANEKS	Str. 157
12. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ	Str. 159

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW STOSOWANYCH W TEKŚCIE

aa	(ang. <i>amino acids</i>) - aminokwasy
AFP	(ang. <i>alpha-fetoprotein</i>) – alfa-fetoproteina
AJCC	(ang. <i>American Joint Committee on Cancer</i>) - Amerykański Wspólny Komitet ds. Raka
AKT	(ang. <i>serine/threonine-specific protein kinase</i>) – kinaza serynowo-treoninowa
APC	(ang. <i>adenomatous polyposis coli</i>) – gruczolakowaty polip okrężnicy
APC	(ang. <i>antigen presenting cell</i>) - komórka prezentująca antygen
Asp	(ang. <i>aspartic acid</i>) – kwas asparaginowy
Bad	białko pobudzające apoptozę
Bcl-2	białko zapobiegające apoptozie
B2M	(ang. <i>beta-2-microglobulin</i>) – beta-2-mikroglubulina
BRAF	(ang. <i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>) – protoonkogen <i>B-Raf</i>
BSA	(ang. <i>bovine serum albumin</i>) - albumina surowicy wołowej
cDNA	(ang. <i>complementary DNA</i>) - komplementarny DNA
c-FOS	komórkowy protoonkogen, należący do genów wczesnej odpowiedzi komórkowej. Koduje czynnik transkrypcyjny FOS; podjednostka czynnika transkrypcyjnego AP-1 (<i>activating protein-1</i>)
CIN	(ang. <i>chromosomal instability</i>) – niestabilność chromosomów
CIMP	(ang. <i>CpG island methylator phenotype</i>) – fenotyp metylatora wysp CpG
CLR	(ang. <i>Crohn's disease-like reaction</i>) – reakcja z obecnością grudek chłonnych jak w chorobie Crohna
CRC	(ang. <i>colorectal carcinoma</i>) - rak jelita grubego i odbytnicy
DAB	(ang. <i>3,3'-diaminobenzidine</i>) - 3,3'-diaminobenzydyna
FAP	(ang. <i>familial adenomatous polyposis</i>) - rodzinna polipowatość jelit
GAPDH	(ang. <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>) - dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego
GH	(ang. <i>growth hormone</i>) – hormon wzrostu
HPRT (HPGRT)	(ang. <i>hypoxanthineguanine phosphoribosyltransferase</i>) – fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa
HPV	(ang. <i>Human Papilloma Virus</i>) - wirus brodawczaka ludzkiego

HSPs	(ang. <i>heat shock proteins</i>) – białka szoku termicznego
IGF-1	(ang. <i>insulin-like growth factor-1</i>) - insulinopodobny czynnik wzrostu-1
IGF BPs	(ang. <i>insulin-like growth factor binding proteins</i>) – białka wiążące IGF
IHC	(ang. <i>Immunohistochemistry</i>) - immunohistochemia
IL	(ang. <i>interleukin</i>) – interleukina
IR	(ang. <i>Insulin Receptor</i>) – receptor insulinowy
JNK	(ang. <i>c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase</i>) – kinaza białkowa <i>c-Jun</i> na końcu N aktywowana stresem
KLF6	(ang. <i>Krüppel-like factor 6</i>) – antyonkogen kodowany przez gen KLF6 u człowieka
K-RAS	(ang. <i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>) - gen, który po mutacji w komórkach rakowych stymuluje wzrost guza
MAPK	(ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i>) – kinaza białkowa aktywowana przez mitogen
MGF	(ang. <i>mechano growth factor</i>) – mechaniczny czynnik wzrostu
MIN	(ang. <i>microsatellite instability</i>) - niestabilność mikrosatelitarna
MMR	(ang. <i>mismatch repair</i>) - naprawa niesparowanych zasad
MRLP 19	(ang. <i>mitochondrial ribosomal protein L19</i>) – 39S mitochondrialne białko rybosomów L19 u ssaków
mRNA	(ang. <i>messenger RNA</i>) - informacyjny RNA
miRNA	(ang. <i>microRNA</i>) - małe, jednoniciowe cząsteczki RNA
HNPCC	(ang. <i>non-polyposis colorectal cancer</i>) - dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością, zespół Lyncha
MUTYH	(ang. <i>E. coli MutY homolog</i>) – gen kodujący glikozylazę DNA zaangażowaną w proces naprawy uszkodzeń oksydacyjnych DNA
NF-κB	(ang. <i>nuclear factor-kappa B</i>) – czynnik jądrowy kappa B
PBS	(ang. <i>phosphate buffered saline</i>) - sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PCNA	(ang. <i>proliferating cell nuclear antigen</i>) – jądrowy antygen proliferujących komórek
PCR	(ang. <i>polymerase chain reaction</i>) – łańcuchowa reakcja polimerazy
PKA/C	(ang. <i>protein kinase A/C</i>) – kinaza białkowa A/C
PI-3K	(ang. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>) – kinaza 3-fosfatydilinozytolu
PPI	(ang. <i>a protein-protein interaction</i>) – sieć współdziałań białko-białko

PTEN	(ang. <i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i>) - ludzkie białko kodowane przez gen supresorowy <i>PTEN</i> zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 10
Real time RT-PCR	(ang. <i>real time reverse transcription polymerase chain reaction</i>) - reakcja odwrotnej transkrypcji z następującą po niej reakcją łańcuchowej polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym
SSA/P	(ang. <i>sessile serrated adenomas or polyps</i>) - siedzący ząbkowany gruczolak lub polip
STATs	(ang. <i>signal transducers and activators of transcription family proteins</i>) – rodzina transduktorów sygnału i aktywatorów transkrypcji
TGF-β	(ang. <i>transforming growth factor β</i>) - transformujący czynnik wzrostu β
TNF-α	(ang. <i>tumor necrosis factor α</i>) - czynnik martwicy nowotworów α
TNM	(ang. <i>tumor, modus, metastases</i>) – guz (pierwotny), węzeł (chłonny), przerzuty (odległe)
TNFRI	(ang. <i>tumor necrosis factor α type 1 receptor</i>) - receptor typu 1 TNF- α
TP53	(ang. <i>tumor protein 53</i>) - czynnik transkrypcyjny o własnościach supresora nowotworowego
Treg	(ang. <i>regulatory T cells</i>) - limfocyty T regulatorowe
UICC	(ang. <i>International Union Against Cancer</i>) - Międzynarodowa Unia Walki z Rakiem
VEGF	(ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>) - naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu
vs.	(łac. <i>versus</i>) - kontra
Wnt	(ang. <i>Wg =wingless; Int-1= - Integration-1</i>) – bezskrzydły; białko integracji-1; białka <i>Wg</i> i <i>Int-1</i> są homologiczne u <i>Drosophila melanogaster</i> i ssaków; skrót <i>Wnt</i> powstał z połączenia nazw <i>Wg</i> i <i>Int</i>
WT-1	(ang. <i>Wilms' tumor-1</i>) - białko kodowane przez gen <i>WT-1</i> , które prawdopodobnie negatywnie reguluje transkrypcję genów stymulujących wzrost. Mutacje tego genu występują we wrodzonych i sporadycznych postaciach guza Wilmsa

W przypadku powszechnego używania skrótów angielskich w literaturze, zwroty te pozostawiono w oryginalnym brzmieniu.

1. WSTĘP

1.1. Epidemiologia i etiologia raka jelita grubego

Rak jelita grubego i odbytnicy (ang. *colorectal cancer*, CRC) jest jednym z najczęstszych i najgroźniejszych nowotworów złośliwych na świecie. Odpowiada za wysoką liczbę zgonów każdego roku [Ferlay i wsp., 2010; Brenner i wsp., 2014; Bosman i Yan, 2014]. W ciągu ostatnich lat stanowi on trzeci najczęściej diagnozowany nowotwór u człowieka. Biorąc pod uwagę płeć, jest on również trzecim najczęściej wykrywanym nowotworem u mężczyzn (po raku płuc i prostaty) i drugim u kobiet (po raku piersi) [Siegel i wsp., 2011; Fleming i wsp., 2012]. Dane epidemiologiczne wskazują na ciągły wzrost zachorowań na CRC [Ferlay i wsp., 2010; Kubiak i wsp., 2014]. CRC dotyczy głównie społeczeństwa krajów wysoko rozwiniętych. Przeżywalność 5-letnia dotyczy ok. 60-95% pacjentów z wczesnymi fazami choroby, spada natomiast znacznie (ok. 35%) przy obecności przerzutów do węzłów chłonnych [Kanthan i wsp., 2012; Brenner i wsp., 2014]. W Polsce 5-letnie przeżycia nie przekraczają 50% [Kubiak i wsp., 2014].

Wiele danych epidemiologicznych podaje niezmiennie, iż większość diagnozowanych CRC dotyczy osób starszych tj. powyżej 50-60 roku życia [Klimczak i wsp., 2014; Mogoanta i wsp., 2014]. Wśród innych czynników ryzyka rozwoju CRC wymienia się m.in. nieprawidłową dietę i otyłość, palenie tytoniu, nadmierną konsumpcję alkoholu, małą aktywność fizyczną, obecność przewlekłych, zapalnych schorzeń jelit (*colitis ulcerosa*, choroba Leśniowskiego-Crohna), niedostateczną ekspozycję na promieniowanie słoneczne (niedobór witaminy D3) oraz uwarunkowane genetycznie zmiany prowadzące do dysplazji komórek błony śluzowej jelita grubego [Giovannucci i wsp., 2003; Huang i Chen, 2009; Hady i wsp., 2010; Horvath i wsp., 2010; Bosman 2014; Brenner i wsp., 2014; Sax i wsp., 2014].

W Polsce nowotwór jelita grubego jest aktualnie drugim pod względem częstości występowania i umieralności u obu płci [Klimczak i wsp., 2014; Kubiak i wsp., 2014]. Alarmującym wiekiem dla rozpoznania CRC jest zakres tzw. „wieku średniego” (45-64 rok życia), szczególnie u mężczyzn [Nowacki i wsp., 2007; Hady i wsp., 2010]. Aż 75% zachorowań na CRC w Polsce przypada na osoby powyżej 60 roku życia. W ostatnich 35 latach nastąpił prawie 4-krotny wzrost liczby zachorowań na CRC u mężczyzn i ok. 3-krotny u kobiet. Najwyższy współczynnik zachorowalności w latach 1999-2010 (ok. 33/100 000) zanotowano w woj. dolnośląskim [Kubiak i wsp., 2014]. W każdym regionie Polski zauważa się obecnie tendencję wzrostową także w liczbie zgonów na CRC [Klimczak i wsp., 2014; Kubiak i wsp., 2014]. Ryzyko zgonu wzrasta wraz z wiekiem i maksymalne wartości osiąga

po 80 roku życia. Pod względem liczby zgonów na CRC w Polsce w latach 1999-2010 ze wszystkich regionów kraju, najwyższy współczynnik (19,5/100 000) notowano w województwie wielkopolskim [Kubiak i wsp., 2014]. W związku z wzrastającą liczbą starszych osób w kraju, rosnącymi trendami zapadalności na CRC, od 2000 roku wdrożony, a od 2005 roku na mocy ustawy, realizowany jest w Polsce Program Badań Przesiewowych wczesnego wykrywania CRC.

Rak jelita grubego dotyczyć może okrężnicy, zgięcia esiczo-odbytniczego, odbytnicy i odbytu. Według międzynarodowej klasyfikacji chorób ICD-10, rak jelita grubego określany jest kodem z zakresu C18-C21 [www.onkologia.org].

Z danych epidemiologicznych wynika, iż CRC jest nowotworem, który ciągle wymaga czujnego monitorowania i okresowego wykonywania badań przesiewowych, zwłaszcza u pacjentów z czynnikami ryzyka.

1.2. Patogeneza raka jelita grubego

W patogenezie CRC nadal wiele zagadnień jest niewyjaśnionych. Wymienione wcześniej czynniki ryzyka rozwoju CRC odgrywają rolę w inicjowaniu zmian tkankowych i wzroście guza, ale mechanizmy molekularne są nadal słabo poznane.

Aktualnie wiadomo, iż CRC jest heterogennym i molekularnie bardzo złożonym schorzeniem [Jass 2007; Fearon 2011; Patai i wsp., 2013]. Książkowo opisuje się trzy główne koncepcje kancerogenezy jelita grubego u człowieka [przegląd tematu: Bosman i Yan, 2014]. Charakterystyczne morfologiczne etapy rozwoju CRC obejmują klasyczną drogę tj. na podłożu przemiany klasycznego gruczolaka w raka, tzw. „*adenoma-carcinoma sequence*”, opisaną przez Vogelsteina i wsp. w 1988 roku. Zgodnie z tą tradycyjną koncepcją jedynymi zmianami przednowotworowymi prowadzącymi do rozwoju CRC są gruczolakowate polipy (ang. *adenomatous polyps*) [Vogelstein i wsp., 1988]. Inne zmiany takie jak hiperplastyczne polipy (ang. *hyperplastic polyps*) obecne głównie w części dystalnej jelita grubego, uznawane były w większości za zmiany łagodne [Goldman i wsp., 1970]. Stosunkowo niedawno wykazano, iż polipy te, wraz z podgrupą zwaną polipami „ząbkowanymi” (ang. *serrated polyps*), należy również uznać za prekursorów CRC [Patai i wsp., 2013]. Uważa się obecnie, że aż 10-20% raków jelita grubego powstaje w tej alternatywnej drodze, zwanej „*serrated pathway*” o własnym profilu genetycznym i epigenetycznym. Ze zmian epigenetycznych centralną rolę w formowaniu się CRC z tych zmian prekursorowych odgrywa zaburzona metylacja DNA [Jass 2007; Patai i wsp., 2013].

Istotą klasycznej drogi kancerogenezy jest niestabilność chromosomów (ang. *chromosomal instability*, CIN). Występuje ona w ok. 80% CRC [Kinzler i Vogelstein, 1996]. Na poziomie genetycznym rolę zasadniczą odgrywa mutacja genu APC (ang. *adenomatous polyposis coli*), odpowiedzialnego za rozwój rodzinnej polipowatości jelit (ang. *familial adenomatous polyposis*, FAP) [Powell i wsp., 1992; Cottrell i wsp., 1992]. Mutacja tego genu uaktywnia ścieżkę kanoniczną szlaku Wnt [Giles i wsp., 2003]. Uaktywnienie szlaku Wnt obserwuje się wcześniej w kancerogenezie jelita grubego, już na poziomie zmian polipowatych. Poza inaktywacją obu alleli APC, kluczowe w tej drodze rozwoju CRC, są również późniejsze mutacje genu K-RAS i BRAF w ścieżce sygnałowej MAPK [Tian i wsp., 2013]. W około 70% przypadków CRC odnotowuje się także mutacje TP53 z aktywacją telomerazy. Aktywacja ścieżki sygnałowej TGF- β dotyczy prawdopodobnie przypadków związanych z przerzutowaniem CRC. Opisano również zmiany w genie MUTYH [Bosman i Yan, 2014].

Drugą koncepcją kancerogenezy jelita grubego na poziomie zmian molekularnych jest tzw. ścieżka MIN (ang. *microsatellite instability*). W odróżnieniu od CIN, zmiany morfologiczne charakteryzują się niewielką aneuploidią, a typowym przykładem jest zespół Lyncha [Lynch i wsp., 1988]. Istotą zmian jest mutacja genów kodujących białka zaangażowane w *mismatch repair* (MMR), a w sekwencji rozwoju CRC nie występują wrodzone polipy. Proces transformacji nowotworowej jednak jest podobny jak w ścieżce CIN, tzn. z rozwojem najpierw gruczolaka. Nowotwory powstałe w ścieżce CIN cechują się lepszą prognozą i zróżnicowaną odpowiedzią na chemioterapię.

Trzecią koncepcją rozwoju CRC jest tzw. ścieżka CIMP (ang. *CpG island methylator phenotype*) [Teodoridis i wsp., 2008]. Nieznane są jednak czynniki inicjujące tę drogę. Związana jest ona ze wspomnianymi polipami o charakterystycznej mikroskopowej strukturze „ząbkowanego” brzegu błony śluzowej, wcześniej uznawanymi za przerostowe łagodne polipy. Po udowodnieniu roli tych zmian w kancerogenezie nazwano je *sessile serrated adenomas or polyps* (SSA/P) [Snover, 2011; Patai i wsp., 2013]. Zmiany te są narażone na hipermetylację reszt cytozyny w obrębie wysp CpG. W rozwoju CRC wg tej koncepcji, również obserwowano mutacje BRAF oraz metylacje promotorów wielu genów. Ścieżkę tę nazywa się także alternatywną drogą rozwoju sporadycznych raków jelita grubego (tzw. „*hyperplastic polyp-carcinoma sequence*”), a na poziomie zmian molekularnych cechują ją niestabilność mikrosatelitarna o różnym zasięgu (tzw. *CIMP-high* i *CIMP-low*) [Jass 2007; Bosman i Yan, 2014]. W CRC opisano także mutacje o charakterze delecji somatycznych dotyczących nici DNA (poly dA: dT) [Ionov i wsp., 1993].

Z klinicznego punktu widzenia największe ryzyko zachorowania na CRC dotyczy osób z zespołem Lyncha (dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością) lub z zespołami polipowatości jelita grubego. Zespół Lyncha jest przyczyną 1-3% wszystkich zachorowań, a u osób z tym zespołem bezwzględne ryzyko zachorowania na CRC wynosi od 30-70% [Lynch i de la Chapelle, 2003]. Zwiększone ryzyko dotyczy osób z obecnością polipów gruczołowych jelita grubego, z chorobami zapalnymi jelita grubego, przebyłym CRC lub występowaniem tego raka u członków najbliższej rodziny w wieku poniżej 50 roku życia. Umiarkowane i każde ryzyko zachorowania dotyczy praktycznie całej populacji. Wiąże się bowiem z wiekiem powyżej 50 lat i konsekwencjami niezdrowego stylu życia, który prowadzi do otyłości i innych zaburzeń metabolicznych z produkcją kilkudziesięciu białek o działaniu promującym transformację nowotworową [Huang i Chen, 2009; Potemski 2010].

Z danych z piśmiennictwa na temat patogenezy CRC wynika, iż w klasycznej drodze rozwoju CRC (gruczolak-rak) dochodzi głównie do utraty kontroli nad proliferacją, a w szlaku tzw. neoplazji „ząbkowanej” najbardziej charakterystyczne jest uszkodzenie mechanizmów apoptozy [Orłowska i Pachlewski, 2014].

1.3. Patomorfologia raka jelita grubego

1.3.1. Klasyfikacja histologiczna raka jelita grubego

Prawidłowa ocena histologiczna guzów jelita grubego, ze względu na jego dużą heterogenność, odgrywa niezwykle ważną rolę prognostyczną i jest podstawą do włączenia odpowiedniej terapii. Cechy morfologiczne CRC są dokładnie opisane, a kwestie kontrowersyjne dyskutowane w piśmiennictwie [Barresi i wsp., 2014; Maguire i Sheahan, 2014]. Z klinicznego punktu widzenia ważna jest obserwacja, iż podobne stadium histologicznego zaawansowania guza może dawać inny przebieg choroby u indywidualnego chorego. Stąd też tradycyjne przyjęcie za miernik prognostyczny tylko stopnia zaawansowania guza (ang. *stage, staging*) może być niewystarczające.

Do opisowych cech morfologicznych o obiecującej roli prognostycznej według najnowszej literatury przedmiotu, należą oprócz stopnia złośliwości guza (ang. *tumor grade*), także inne cechy, jak np. tzw. pączkowanie guza (ang. *tumor budding*), depozyty guza (ang. *tumor deposits*), stopień regresji guza (ang. *tumor regression grade*), zakres inwazji naczyń i nerwów oraz zajęcia otrzewnej [Barresi i wsp., 2014; Maguire i Sheahan, 2014]. Z wymienionych cech morfologicznych najbardziej popularna, choć obarczona pewnym

stopniem subiektywizmu jest ocena stopnia złośliwości histologicznej guza (ang. *grade*). System WHO do oceny tego parametru w CRC bierze pod uwagę odsetek tworzenia struktur gruczołowych (ang. *gland formation*). Dobrze zróżnicowane *adenocarcinoma* mają >95% struktur gruczołowych (i oceniane są jako *grading 1, G1*), średnio zróżnicowane (*G2*) – 50-95% tych struktur, słabo zróżnicowane (*G3*) posiadają 5-50% gruczołów w swej budowie, a CRC niezróżnicowane – mniej niż 5% tych struktur (*G4*) [Hamilton i Aaltonen, 2000]. W przypadku występowania podtypów *mucinous adenocarcinoma* oraz *signet-ring cell carcinoma* obie grupy zaliczane są jako słabo zróżnicowane i uzyskują 3 stopień złośliwości histologicznej (*grade 3*) [Hamilton i Aaltonen, 2000; Bruckner i wsp., 2010]. Ueno i wsp. zaproponowali bardziej obiektywną ocenę systemu *grading* CRC, bazującą na podawaniu liczby tzw. słabo zróżnicowanych skupisk komórkowych (ang. *poorly differentiated clusters*) w obrębie podścieliska nowotworu. Słabo zróżnicowany CRC ma posiadać co najmniej 5 komórek nowotworowych rozproszonych w podścielisku guza, które nie tworzą struktur gruczołowych [Ueno i wsp., 2012]. System ten nadaje się również do wiarygodniejszej diagnostyki histologicznej w przypadku przedoperacyjnych biopsji jelita grubego [Barresi i wsp., 2014].

Klasyfikacja WHO z 2000 roku, obejmująca histologiczne typy CRC wyróżnia osiem klasycznych form tego nowotworu (Tabela 1) [Hamilton i Aaltonen, 2000]. Jest ona nadal obowiązująca z pewnymi modyfikacjami. Klasyfikacja z 2010 roku redefiniuje pojęcie wewnątrz nabłonkowej neoplazji (ang. *intraepithelial neoplasia*) i dysplazji, wprowadza pewne zmiany w nomenklaturze oraz diagnostyce CRC. Dodaje nowe podtypy CRC, takie jak: *serrated adenocarcinoma*, *cribriform comedo type adenocarcinoma* oraz *micropapillary adenocarcinoma* [Bosman i wsp., 2010; Aust 2011] [Tabela 1 – podtypy 9-11]. Zmiany dotyczą także nomenklatury i klasyfikacji neuroendokrynowych guzów przewodu pokarmowego. Nowa klasyfikacja WHO uściśla stopień złośliwości dla *mucinous* oraz *signet ring carcinomas*, biorąc pod uwagę ścieżkę MIN (określanej także jako MSI), jako te o lepszej (wysoki stopień MIN) i o gorszej prognozie (niski stopień MIN lub jego brak). Dokładniej scharakteryzowano również zmiany polipowate i gruczolaki jelita grubego [Aust 2011].

W 85%-90% przypadków CRC mamy do czynienia z rakiem gruczołowym (gruczolakorak, ang. *adenocarcinoma*) o różnym stopniu zróżnicowania. Około 20% z nich to raki słabo

zróżnicowane lub niezróżnicowane o gorszym rokowaniu. Gorzej rokuje także raki wytwarzające dużą ilość śluzu [Bosman i wsp., 2010].

Tabela 1. Klasyfikacja histologiczna raka jelita grubego wg Światowej Organizacji Zdrowia (2000) [Hamilton i Aaltonen, 2000; Bosman i wsp., 2010].

Klasyfikacja histologiczna	
1.	Rak gruczołowy (<i>adenocarcinoma</i>)
2.	Rak gruczołowy śluzotwórczy (<i>adenocarcinoma mucinosum</i>)
3.	Rak sygnetokomórkowy (<i>signet ring cell carcinoma</i>)
4.	Rak drobnokomórkowy (<i>carcinoma microcellulare</i>)
5.	Rak płaskonabłonkowy (<i>squamous cell carcinoma</i>)
6.	Rak gruczołowo-płaskonabłonkowy (<i>adenosquamous carcinoma</i>)
7.	Rak rdzeniasty (<i>medullary carcinoma</i>)
8.	Rak niezróżnicowany (<i>carcinoma nondifferentiatum</i>)
9.	Rak gruczołowy ząbkowany (<i>serrated adenocarcinoma</i>)
10.	Rak gruczołowy sitowaty typu czopiastego (<i>cribriform comedo type adenocarcinoma</i>)
11.	Rak gruczołowy mikrobrodawkowy (<i>micropapillary adenocarcinoma</i>)

Klasyfikacja makroskopowa zaawansowanego raka jelita grubego wyróżnia cztery jego typy [Nowacki i wsp., 2007] (Tabela 2).

Tabela 2. Klasyfikacja makroskopowa zaawansowanego raka jelita grubego [Nowacki i wsp., 2007].

Klasyfikacja makroskopowa	
1.	Polipowaty
2.	Owrzodziały i grzybiasty
3.	Owrzodziały i zwężający
4.	Rozległe naciekający

Stopień zaawansowania raka jelita grubego (ang. *stage*) określa się na podstawie trzech tradycyjnych klasyfikacji (Tabela 3). Tradycyjna i najslynniejsza klasyfikacja wg Cuthberta E. Dukes'a, podana w 1932 roku, choć jest nadal stosowana, podlegała licznym modyfikacjom [Dukes, 1932; Astler i Coller, 1954; Kyriakos 1985; Akkoka i wsp., 2014; Perea i wsp., 2014]. Rokowanie jest tym lepsze im niższy *stage* według Dukes'a.

Tabela 3. Najczęściej stosowane klasyfikacje zaawansowania zmian (ang. *stage*) w raku jelita grubego – oryginalna wg Dukes'a i zmodyfikowana przez Astler-Collera [Dukes 1932; Astler i Coller, 1954].

Klasyfikacja Dukes'a	
A	nowotwór nie przekracza ściany jelita
B	nowotwór przekracza ścianę jelita do surowicówki lub tkanki tłuszczowej około odbytniczej
C	przerzuty w węzłach chłonnych
D	przerzuty odległe
Klasyfikacja Astler – Collera	
A	rak ograniczony do błony podśluzowej
B1	rak dochodzi do błony mięśniowej, ale jej nie przekracza
B2	rak nacieka całą ścianę jelita, bez zajęcia węzłów chłonnych
C1	jak w B1, ale z zajęciem węzłów chłonnych
C2	jak w B2, ale z zajęciem węzłów chłonnych
D	przerzuty odległe

Dla celów klinicznych najpowszechniej wykorzystywana jest amerykańska i/lub międzynarodowa klasyfikacja (system) TNM wg AJCC i UICC (ang. *American Joint Committee on Cancer* oraz *International Union Against Cancer*, odpowiednio), oceniająca stopień zaawansowania zmian w CRC. Klasyfikacja ta odnosi się wyłącznie do złośliwych nowotworów (raków), a rozpoznanie choroby powinno być potwierdzone badaniem histopatologicznym. Klasyfikacja ta opiera się na ocenie trzech kategorii: T - głębokości lokalnej inwazji guza pierwotnego, N – zajęcia regionalnych węzłów chłonnych oraz M – obecności przerzutów odległych (Tabela 4) [Edge i wsp., 2010; Sobin i wsp., 2010].

Tabela 4. Klasyfikacja kliniczna TNM raków okrężnicy i odbytnicy wg UICC i AJCC z 2010 roku [Edge i wsp., 2010; Sobin i wsp., 2010].

Klasyfikacja TNM	
Cecha T (ang. <i>tumor</i>) - guz pierwotny	
TX	nie można ocenić guza pierwotnego
T0	nie stwierdza się guza pierwotnego
Tis	rak przedinwazyjny
T1	guz nacieka błonę podśluzową
T2	guz nacieka warstwę mięśniową
T3	guz nacieka warstwę mięśniową właściwą i błonę surowiczą lub tkankę okołookrężniczą
T4	guz przerasta błonę surowiczą oraz nacieka sąsiednie narządy
Cecha N (ang. <i>noduli</i>) - regionalne węzły chłonne	
NX	nie można ocenić węzłów chłonnych
N0	nie stwierdza się przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych
N1	przerzuty obecne w 1-3 regionalnych węzłach chłonnych
N2	przerzuty obecne w 4 i więcej regionalnych węzłach chłonnych
Cecha M (ang. <i>metastases</i>) - przerzuty odległe	
MX	nie można ocenić przerzutów odległych
M0	nie stwierdza się obecności przerzutów odległych
M1	stwierdza się przerzuty odległe

Porównanie przedstawionych systemów klasyfikacji stopnia zaawansowania CRC można znaleźć w dostępnym piśmiennictwie [Potemski 2010] (Tabela 5).

Tabela 5. Porównanie systemów klasyfikacji stopnia zaawansowania CRC [Potemski 2010, zmodyfikowany].

Wg Dukes'a	Wg Aster-Collera	Wg UICC/AJCC (TNM)
-	-	0
A	A	I
A	B1	
B	B2	IIA
B	B2	IIB
B	B3	IIC
C	C1	IIIA
C	C1, C2	IIIB
C	C2, C3	IIIC
-	D	IV

W opisie zmian histologicznych CRC, należy podkreślić rolę komórek „limfoidalnych” infiltrujących podścielisko guza lub obecnych w tkance tłuszczowej otaczającej jelito grube jako czynników prognostycznych tego nowotworu [Graham i Appelman, 1990; Harrison i wsp., 1995; Klintrup i wsp., 2005]. Związek procesu nowotworowego z zapaleniem znany jest od Galena [Kiziltaş i wsp., 2008], a potwierdzany także w przypadku kancerogenezy jelita grubego w wielu modelach badawczych [Josse i wsp., 2014]. Jakościowa ocena nacieków zapalnych ma również znaczenie w prognozowaniu i decyzjach terapeutycznych w CRC [Klintrup i wsp., 2005]. Już badania z lat 80. i 90-tych XX wieku pokazały, iż prawidłowa błona śluzowa jelita grubego zawiera rozsiane komórki limfatyczne, takie jak limfocyty T, komórki plazmatyczne, makrofagi, komórki prezentujące antygen (ang. *antigen presenting cells*, APC) klasy II i eozynofile [Luebbbers i wsp., 1985; Lee i wsp., 1988; Banner i wsp., 1993]. W raku jelita grubego badano rolę wszystkich tych komórek, w tym licznych subpopulacji limfocytów, eozynofiliów, neutrofilów i komórek dendrytycznych [Banner i wsp., 1993; Fernández-Aceñero i wsp., 2000; Moezzi i wsp., 2000; Kiziltaş i wsp., 2008; Richards i wsp., 2012; Roxburgh i McMillan, 2012]. Generalnie uważa się, że obecność

licznych komórek w naciekach zapalnych w tzw. froncie inwazji (ang. *invasive front*) guza jest lepsza prognostycznie [Harrison i wsp., 1995; Klintrup i wsp., 2005; Deschoolmeester i wsp., 2010; Richards i wsp., 2012]. Są jednak doniesienia, w których pokazano, iż obecność licznych dojrzałych CD208-pozytywnych komórek dendrytycznych we froncie inwazji guza wiąże się z krótszym czasem przeżycia pacjentów [Sandel i wsp., 2005].

W przypadku eozynofiliów, obserwuje się tendencję do zmniejszania się liczby tych komórek w sekwencji od *adenoma* do *carcinoma* jelita grubego [Fernández-Aceñero i wsp., 2000; Moezzi i wsp., 2000; Kiziltaş i wsp., 2008]. A te z raków jelita grubego, które mają wyższą liczbą eozynofiliów w naciekach zapalnych, cechują się lepszą prognozą [Fernández-Aceñero i wsp., 2000]. Dodatkowo opisuje się dużą heterogenność tych komórek i zróżnicowaną dystrybucję w obrębie samego guza [Pretlow i wsp., 1984].

W mysim modelu kancerogenezy na tle zapalenia jelita grubego (ang. *colitis-associated cancer*) odkryto niedawno, że przewlekła forma zapalenia skutkuje wyraźnymi zmianami w ekspresji jednoniciowych, krótkich RNA (miRNA). Wykazano, iż przewlekłe zapalenie jelita grubego indukowane chemicznie [*azoxymethane*(AOM)/*dextran sulfate sodium* (DDS)] powoduje spadek ekspresji miR-133a i miR-143/145. W tym modelu badawczym aktywacji ulegała głównie ścieżka PI3K/Akt wraz z insulinopodobnym czynnikiem wzrostu 1 (ang. *insulin-like growth factor 1*, IGF-1). Wyniki tych badań można odnieść także do jednego z mechanizmów kancerogenezy ludzkiego CRC [Josse i wsp., 2014].

Podobnie jak w przypadku danych z epidemiologii, etiologii i patogenezy CRC u człowieka, również ocena histologiczna wraz z unowocześnianiem systemów oceny zaawansowania zmian, ma służyć opracowaniu skuteczniejszych form leczenia raka i wydłużyć chorym życie. Jest to zadanie trudne, ponieważ również na poziomie tkanki, CRC cechuje niezwykła heterogenność zmian komórkowych (komórki guza i nacieków zapalnych). Proces zapalny w jelicie może doprowadzać do dysregulacji komórkowo-swoistych miRNA i na tej drodze dodatkowo aktywować ścieżki sygnałowe m.in. PI3K/Akt, która może bezpośrednio odpowiadać za etap przejścia w raka.

1.4. Składniki systemu insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF)

System insulinopodobnych czynników wzrostu (IGF-ów) pełni ważną funkcję autokrynową, parakrynową i endokrynową w regulacji komórkowej proliferacji i różnicowania, a tym samym promocji wzrostu różnych tkanek i narządów [Jones i Clemmons, 1995]. IGF-y mają strukturę i aktywność biologiczną podobną do insuliny, pełniąc funkcję hormonów plejotropowych. Insulinopodobne działanie IGF-ów dotyczy m.in. stymulowania utleniania glukozy i lipogenezy oraz hamowania lipolizy, ale stanowi jedynie 1-2% aktywności insuliny. Główna aktywność biologiczna tych białek jest znacznie szersza niż insuliny, bo dotyczy stymulacji syntezy DNA, RNA i białek w hodowlach tkankowych. Wyróżnia się dwa podstawowe białka, tj. IGF-1 i IGF-2 (zwane uprzednio somatomedynami), których synteza zachodzi głównie w wątrobie i które posiadają ok. 50% sekwencji identycznej z insuliną [Daughday i Rotweien, 1989]. Wykazano jednak, iż w odróżnieniu od insuliny produkowanej w jednym narządzie, produkcja IGF-ów może odbywać się w wielu narządach organizmu człowieka i wiele tkanek jest wrażliwych na autokrynowe działanie tego czynnika wzrostu [Humbrel 1990].

Inną cechą odróżniającą IGF-y od insuliny jest występowanie swoistych dla IGF-ów białek wiążących (ang. *insulin-like growth factor binding proteins*, IGF BPs), których podstawową rolą jest lokalna modulacja działania IGF-ów. Zapobiegają hipoglikemii indukowanej przez IGF-1. Dotychczas zidentyfikowano 6 rodzajów białek wiążących (IGF BP-1-6) [Zarilli i wsp., 1994; Murphy 1998; KostECKA i Blahovec, 1999]. Do podstawowych działań IGF BPs należy modulowanie działania IGF-1 i IGF-2 głównie poprzez interakcje z receptorami dla tych czynników oraz z receptorem insulinowym (ang. *insulin receptor*, IR). Ponadto przedłużają one czas półtrwania IGF-ów, magazynują je w wybranych tkankowych kompartmentach, hamują działania IGF-ów poprzez obniżanie dostępności receptorów lub nasilają mitogenezę i migrację komórek w zależności od potrzeb. Biorą udział w transporcie oraz interakcjach z innymi czynnikami wzrostu, m.in. TGF- β [Murphy 1998]. Najpowszechniej występującym IGF BP, krążącym we krwi jest IGF BP-3 i wiąże ono ponad 95% IGF-ów. Białko to występuje w formie dimeru i tworzy kompleks z kwasolabilną podjednostką białkową (ang. *acid-labile subunit*, ALS) [Murphy 1998]. IGF BP-2, -3 i -5 posiadają sygnał lokalizacji jądrowej i mogą wpływać na aktywność transkrypcji. Samo IGF BP-3 może działać jako inhibitor wzrostu komórek poprzez oddziaływanie na proliferację i migrację komórek [Scharf i wsp., 2001]. W krążeniu krwi, ponad 90% cząsteczek IGF-1 jest

związane z IGF BP-3 w kompleksie o wielkości 150 kD, a efekt biologiczny wywierać może tylko wolny IGF-1, który dyfunduje przez *endothelium* do tkanek [Jones i Clemmons, 1995]. IGF-y wywierają wpływ na komórkę poprzez specyficzne wiązanie się do różnych receptorów błonowych: (1) typu I – IGF-1R (ang. *insulin-like growth factor I receptor*), (2) typu II (IGF-2R), (3) receptora dla insuliny (IR) oraz (4) receptora hybrydowego, zbudowanego w połowie z części receptora IGF-1R, zaś w drugiej połowie z IR [Soos i wsp., 1990; Baserga 2003; Siddle 2011]. W większości działań, zarówno IGF-1, jak i IGF-2, pośredniczy receptor typu I (IGF-1R). Receptor ten, poza pośrednictwem w mitogennych i antyapoptotycznych działaniach IGF-ów, może samodzielnie wpływać na transformację komórki [Baserga 2003]. Do systemu IGF zalicza się również enzymy proteolityczne IGF BP (ang. *IGF BP proteases*) [Collett-Solberg i Cohen, 1996; Hwa i wsp., 1999]. Wykazano, że proteazy te wywierają bezpośredni wpływ na komórki poprzez własne receptory, niezależnie od działania IGF-ów [Collett-Solberg i Cohen, 1996].

Trzy z wymienionych składników systemu IGF (IGF-1, IGF BP-3, ALS) wytwarzane są głównie w wątrobie. IGF-1 i ALS produkowane są przez hepatocyty, a IGF BP-3 głównie przez komórki Browicza-Kupffera [Chin i wsp., 1994; Rosenfeld i wsp., 1994].

1.4.1. Budowa i funkcja IGF-1

Porównując oba ligandy tj. IGF-1 i IGF-2, głównym czynnikiem wzrostu jest IGF-1, zwany do końca lat 70-tych XX wieku, somatomedyną C [Rinderknecht i Humbel, 1978]. IGF-1 to białko sekrecyjne o m.c. 7649 Da, zbudowane z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, zawierającego 70 aminokwasów, wywierające niebywale zróżnicowany wpływ na komórki i tkanki [Zarrilli i wsp., 1994; LeRoith 1997; LeRoith i wsp., 2001]. IGF-1 jest czynnikiem wzrostu o wielu odmiennych, tkankowo-specyficznych funkcjach, zaangażowanym w rozwój narządów i tkanek, wzrost postnatalny i regulację homeostazy, a także przeżycie organizmu [Obrępańska-Stęplowska 2005; Szewczuk i wsp., 2009; Maki 2010; Vassilakos i wsp., 2014].

W okresie postnatalnym hepatocyty są głównym źródłem IGF-1 w odpowiedzi na wytwarzany przez przysadkę mózgową hormon wzrostu (ang. *growth hormone*, GH). Na produkcję i wydzielanie IGF-1 wpływ mogą mieć również inne hormony (insulina, hormony płciowe) oraz takie czynniki jak m.in.: wiek, płeć, rytm dobowy *circadian*, dieta i odżywianie, czynniki genetyczne, niedostateczne leczenie wybranych schorzeń (głównie chorób wątroby) oraz ciężkie uszkodzenia wielonarządowe [Juul 2003; Józefiak i wsp., 2008; Suwała i wsp., 2010; Sax i wsp., 2014].

IGF-1 produkowany w wątrobie wykazuje głównie działanie endokrynowe, a IGF-1 syntetyzowany przez inne tkanki działa para- i/lub autokrynowo. Syntezę IGF-1 wykryto również w nerkach, płucach, sercu i jądrach [D'Ercole i wsp., 1984], a także w mózgu, tarczycy, gonadach i jelicie grubym [Khandwala i wsp., 2000]. Produkcję IGF-1 (mRNA i białko) oraz obecność IGF-1R wykazano także w wielu komórkach narządów limfatycznych, począwszy od monocytów/makrofagów poprzez komórki NK, aż do różnych subpopulacji limfocytów T i B [Kooijman i wsp., 1992; Clark 1997; Szewczuk i wsp., 2009; Weigent 2013]. Bioaktywność tego czynnika wzrostu wykazano w śledzionie szczura oraz w ludzkiej linii komórek hodowanych z chłoniaka histocytoowego U937 [przeгляд tematu: Weigent 2013]. Wykrywano obecność IGF-1 także w transformowanych limfocytach B i T. Co warto podkreślić, różne izoformy mRNA IGF-1 oraz propeptydy IGF-1 wykazano w makrofagach u myszy [Weigent 2013]. IGF-1 bezpośrednio stymuluje limfocyty T regulatorowe (Treg) do produkcji cytokin przeciwzapalnych (IL-10), co ma znaczenie w protekcji skóry przed procesami autoimmunizacji [Johannesson i wsp., 2014].

IGF-1 należy również do tzw. adipokin - białek, które wraz z leptyną, insuliną, interleukiną 6 (IL-6) są produkowane także przez komórki tkanki tłuszczowej. Może to mieć związek etiologiczny z występowaniem raka jelita grubego, nazywanym niekiedy *obesity-associated cancer* [Fenton i Birmingham, 2010]. IGF-1 produkowany w makrofagach bezpośrednio stymuluje proliferację komórkową poprzez drogę sygnałową Erk i Akt [Fritz i wsp., 2011].

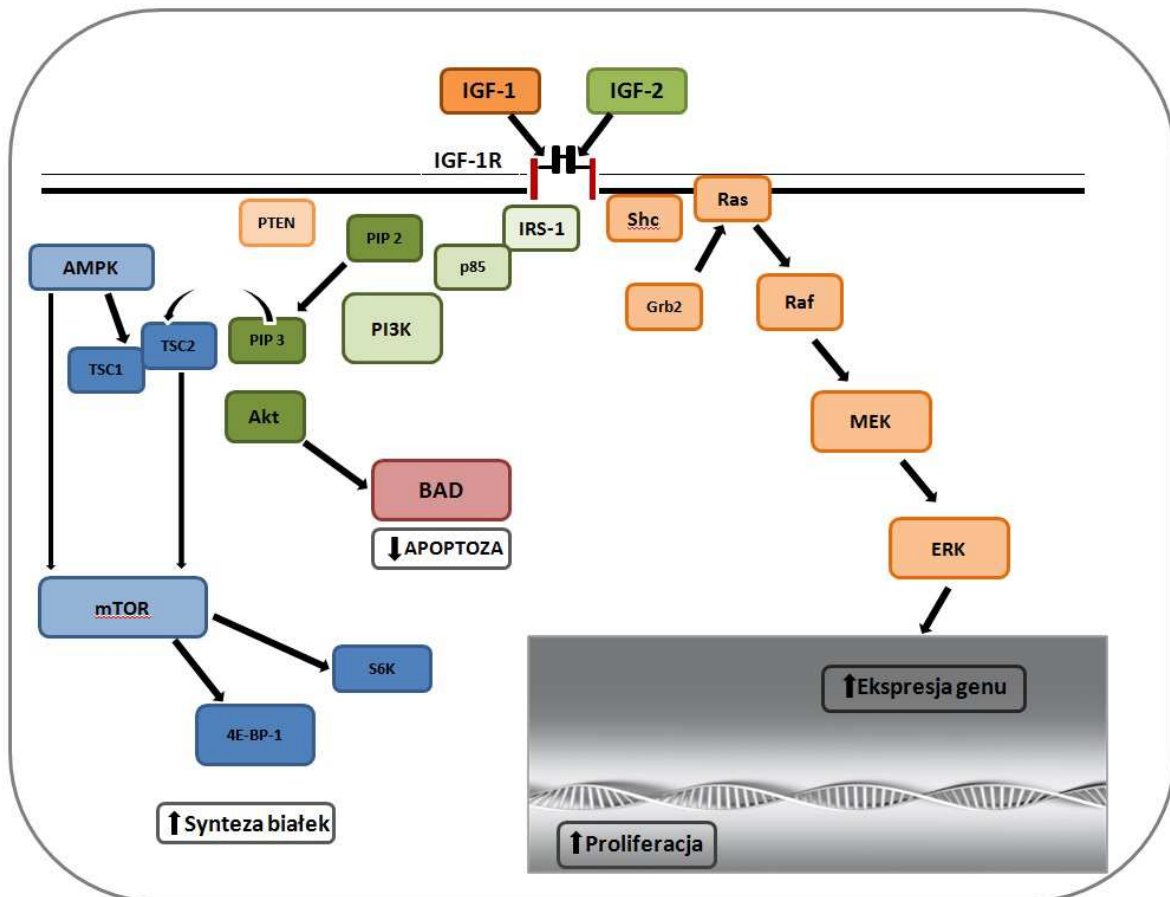
1.4.2. Receptor IGF typu I (IGF-1R) i ścieżka sygnałowa w systemie IGF-1

Gen IGF-1R składa się z 21 egzonów i zlokalizowany jest na chromosomie 15q25-26. Syntetyzowany jest jako jednołańcuchowa preproteina, zbudowana z 1367 aminokwasów, z której usuwany jest 30-aminokwasowy peptyd sygnałowy. Reszta cząsteczki jest glikozylowana, cięta na dwie podjednostki α i β , połączone mostkami dwusiarczkowymi. Receptor ten ma największe powinowactwo do IGF-1 a kilkukrotnie niższe do IGF-2 [Stewart i Rotwein, 1996]. Jak wspomniano, receptor IGF-1 typu I (IGF-1R) występuje w wątrobie głównie na komórkach niemięszkowych wątroby (komórki Browicza-Kupffera, miofibroblasty i komórki gwiaździste wątroby) [Scharf i wsp., 2001]. Receptor IGF-1R ma właściwości kinazy tyrozyny i pośredniczy w różnych, tkankowo-specyficznych działaniach IGF-1. W swym fizjologicznym działaniu IGF-1 wiąże się silniej z IGF-1R niż z receptorem insulinowym. Wiązanie z podjednostką α IGF-1R prowadzi do fosforylacji reszt tyrozyny i aktywacji kinazy tyrozyny, co kolejno prowadzi do fosforylacji białka IRS-1 (ang. *insulin receptor substrate*) i powoduje uruchomienie kaskady reakcji licznych kinaz

z wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych, przede wszystkim ścieżki MEK/ERK i PI3K/Akt [Grimberg 2003; Delafontaine i wsp., 2004; Cohen 2006; Samani 2007; Maki 2010; Siddle 2011] (Rycina 1). Aktywacja kinaz z obu tych ścieżek jest zależna również od fosforylacji białka adaptorowego Shc i skutkuje aktywacją kinazy PI3K (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*) oraz białka Ras [przegląd tematu: Siddle 2011]. Ścieżki te odpowiadają za stymulowanie komórkowego wzrostu i proliferacji, co wiąże się ściśle z kancerogenezą [Samani 2007; Józefiak i wsp., 2008, Maki 2010]. Wykazano, że usunięcie genu kodującego IGF-1R lub hamowanie jego ekspresji znosi transformację komórki *in vitro* [Baserga 1995]. Za hamowanie apoptozy komórek odpowiada uruchomienie ścieżki Bad/Bcl-2.

IGF-1 wywiera mitogenne działanie przede wszystkim poprzez wpływ na zwiększanie syntezy DNA i stymulację ekspresji głównie cykliny D1, która przyspiesza przejście cyklu komórkowego z fazy G1 do S [Le Roith i wsp., 2001]. Reguluje ekspresję niektórych protoonkogenów (*c-FOS*, *c-JUN*). Ponadto działa antyapoptotycznie oraz moduluje odpowiedź immunologiczną organizmu poprzez regulację produkcji cytokin (IL-3 i IL-14), które biorą udział w regulacji wzrostu komórki [Zarilli R i wsp., 1994; Le Roith i wsp., 2001]. IGF-1 współdziała z licznymi cząsteczkami wewnątrz- i zewnątrzkomórkowymi, w tym produktami genów supresorowych (*P53*, *PTEN*, *WT1*) [Józefiak i wsp., 2008]. Aktywuje także antyonkogen zwany *KLF6* (ang. *Krüppel-like factor-6*), który jest zmutowany w wielu rakach. W linii komórek raka jelita grubego aktywacja tego czynnika poprzez IGF-1 jest zależna od białka p53 [Bentov i wsp., 2008].

Generalnie uważa się, iż gen IGF-1 ulegając ekspresji reguluje wzrost pre-, okołoi postnatalny, a samo białko reguluje ekspresję ponad 50 genów związanych z proliferacją i różnicowaniem komórek [Le Roith i wsp., 2001; Szewczuk i wsp., 2009].



Rycina 1. Schemat przekazywania sygnału przez IGF-1.

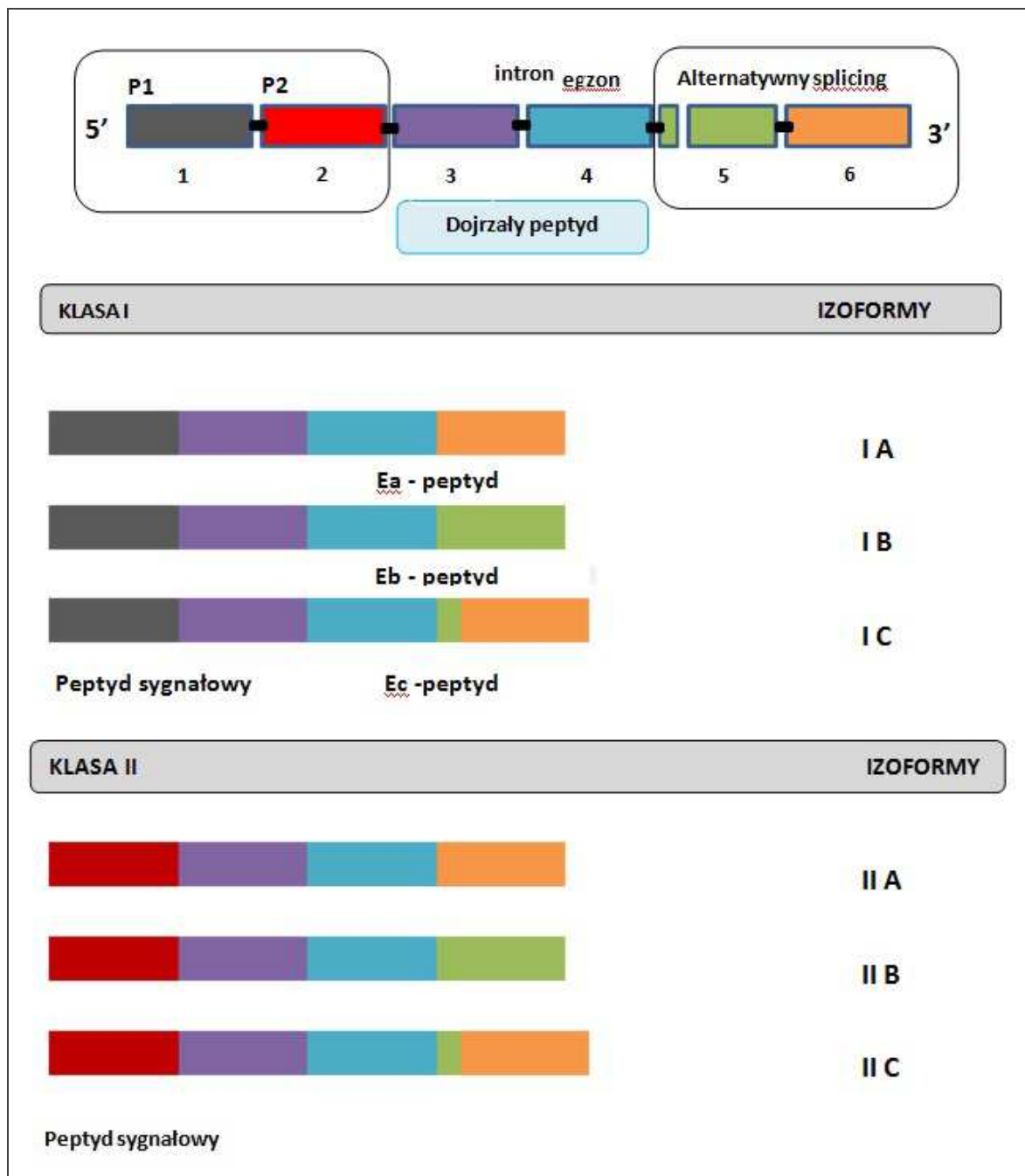
IGF-1 przyłącza się do podjednostki α IGF-1R, co prowadzi do fosforylacji tyrozyny i aktywacji kinazy tyrozyny, co kolejno prowadzi do przyłączenia białek IRS-1 i Shc do podjednostki β receptora. Skutkuje to uruchomieniem kaskady reakcji wielu kinaz z wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych, przede wszystkim ścieżki PI3K/Akt i Ras/Raf/MEK/ERK. Prowadzi to do stymulacji translacji i produkcji białek, aktywacji cyklu komórkowego i proliferacji oraz do zahamowania apoptozy [na podstawie Donovan i Kummar, 2008, zmodyfikowany].

1.4.3. Budowa genu IGF-1 i alternatywny splicing

Gen IGF-1 u człowieka jest pojedynczy, zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 12 (12 q22-24.1) i obejmuje obszar ponad 90 kbp genomowego DNA [Höppener i wsp., 1985; Rothwein 1986; Zhu i wsp., 1999; Oberbauer 2013]. Pomimo, iż podlega alternatywnemu splicingowi, wszystkie transkrypty kodują to samo dojrzałe białko IGF-1 i tzw. E-peptyd na końcu karboksylowym (3'). U gryzoni tworzone są dwa E-peptydy, a u człowieka trzy [Barton 2006a].

Gen IGF-1 posiada wiele miejsc inicjacji transkrypcji oraz różne sygnały poliadenylacji, co pozwala na tworzenie licznych wariantów (izoform) mRNA. W strukturze genu występuje 6 egzonów (opisywanych jako 1, 2, 3, 4, 5 i 6) i 5 krótkich intronów [Adamo 1995; Mittanck

i wsp., 1997; Zhu i wsp., 1999]. Na końcu 5' genu IGF-1, dwa promotory w połączeniu z alternatywnymi miejscami startu transkrypcji generują powstanie izoform mRNA klasy I (1) i II (2) [Adamo i wsp. 1991; Simmons i wsp., 1993]. Na końcu 3' alternatywny splicing przyczynia się do powstania co najmniej 3 transkryptów [Bell i wsp., 1986; Jansen i wsp., 1983, Rotweien i wsp. 1986; Shavlakadze i wsp. 2005]. Egzon 3 koduje część peptydu sygnałowego i dojrzały peptyd wspólny dla wszystkich izoform, a egzon 4 koduje resztę peptydu dojrzałego i proksymalną część domeny E. Zdaniem niektórych autorów może być tworzonych 9 izoform mRNA IGF-1 [Shavlakadze i wsp., 2005], jednak u człowieka i myszy wyróżnia się sześć głównych izoform mRNA IGF-1. Klasa I transkryptów używa egzonu 1 jako liderowego, natomiast transkrypty klasy II mają swoje miejsca inicjacji na egzonie 2. Ekspresja i układ nukleotydów w egzonie 5 i 6 determinuje tworzenie wariantów (izoform) mRNA opisywanych jako A, B i C w obrębie klasy I i II [Barton 2006a; Temmermann i wsp., 2010] (Rycina 2).



Rycina 2. Schemat budowy ludzkiego genu IGF-1 i jego alternatywny splicing.

Gen IGF-1 zawiera 6 egzonów i tworzy różne warianty (izoforny) splicingowe. Transkrypcja rozpoczyna się z promotora 1 (P1), zlokalizowanego w egzonie 1, lub z promotora 2 (P2) (egzon 2). Pozwala to na wyodrębnienie dwóch klas transkryptów – klasy I i klasy II. Egzony 3 i 4 są niezmiennie i kodują dojrzałe białko IGF-1. Egzony 5 i 6 podlegają alternatywnemu splicingowi. Izoforna mRNA A obejmuje egzon 6, B egzon 5, zaś w skład izoforny C wchodzi fragment egzonu 5 i egzon 6. Trzy różne E-peptydy są kodowane przez trzy różne warianty (izoforny) pre-IGF-1 mRNA: Ea (egzon 6), Eb (egzon 5) i Ec (fragment egzonu 5 i 6) [na podstawie Vassilakos i wsp., 2014; zmodyfikowany].

Transkrypcja *IGF-1* kontrolowana jest przez dwa promotory, nazywane P1 i P2, znajdujące się odpowiednio w 1 i 2 egzonie [Adamo i wsp., 1991; Adamo i wsp., 1993; Adamo 1995]. W zależności od aktywowanego w transkrypcji danej cząsteczki promotora P1 lub P2 wyróżniamy transkrypty klasy I i klasy II. Z promotora P1 tworzone jest ponad 90% transkryptów u ssaków [Zarilli i wsp., 1994]. Na modelu szczurzym wykazano, że transkrypty z P1 obecne są we wszystkich badanych tkankach i pozostają pod kontrolą czynników innych niż GH [Adamo 1995], zaś powstające z P2 występują głównie w wątrobie. Uważa się, że te ostatnie kodują endokrynową formę IGF-1, pozostającą pod kontrolą GH. W ludzkiej wątrobie dwa różne mRNA IGF-1 po raz pierwszy scharakteryzował Rotwein i wsp. a wcześniej Jansen i wsp. podali sekwencję cDNA dla całkowitego IGF-1 produkowanego w wątrobie [Jansen i wsp., 1983; Rotwein i wsp., 1986]. Z zastosowaniem ludzkiego cDNA dla IGF-1, zostały wyizolowane i scharakteryzowane w dojrzalej wątrobie szczura także dwa rodzaje cDNA dla IGF-1. Wzrost mRNA IGF-1 obserwowano po podaniu GH także w tkankach pozawątrobowych [Roberts i wsp., 1987]. Biochemiczne mechanizmy kontrolujące użycie danego promotora *IGF-1* nie są dokładnie zbadane. Wcześniej twierdzono, iż peptydy sygnałowe powstające z transkryptów klasy II są włączone w uwalnianie IGF-1 do krążenia, jednak obecne badania to wykluczają. Uważa się, że do utrzymania stężeń krążącego IGF-1 potrzebny jest inny system wewnętrznej kompensacji. Stosunkowo niedawne badania dowodzą ponadto, iż IGF-1 w okresie okołourodzeniowym jest niezbędny do przeżycia organizmu, co również było przedmiotem dyskusji w licznych pracach [Temmerman i wsp., 2010].

Dojrzałe białko IGF-1 kodowane jest przez egzony 3 i 4. Egzony 5 i 6 podlegają alternatywnemu splicingowi i u człowieka kodują trzy C-końcowe peptydy E: Ea (egzon 6), Eb (egzon 5) i Ec (fragment egzonu 5 i 6) [Zarilli i wsp., 1994; Barton 2006a].

Jak wspomniano, w wyniku ekspresji genowej *IGF-1* w większości tkanek ssaków powstaje wiele rodzajów mRNA, które kodują zarówno krążące, jak i tkankowo-specyficzne izoformy białka IGF-1 [Adamo 1995; Barton 2006a]. Dominuje transkrypt określany jako IGF-1Ea, kolejnym jest IGF-1Eb oraz IGF-1Ec (zwany również *Mechano Growth Factor*, MGF). W krążeniu przeważającym peptydem jest także wariant powstały z izoformy IGF-1Ea [Shavlakadze i wsp., 2005]. Należy wspomnieć, iż nazwa MGF została pierwotnie wprowadzona przez Goldspinka dla określenia izoformy mRNA powstałej z 5 egzonu w mięśniach u królika [Goldspink 1999]. Późniejsze badania sekwencji nukleotydowych wykazały tożsamość MGF z ludzką izoformą mRNA IGF-1C i IGF-1B u gryzoni. Co ciekawe, badania wykazały obecność tej izoformy mRNA także w innych, poza tkanką

mięśniową, narządach np. w wątrobie [Chew i wsp., 1995]. Obecność różnych transkryptów IGF-1 świadczy o tkankowo-specyficznym auto- i/lub parakrynowym działaniu oraz odrębnej regulacji obu promotorów genu, jednak dokładna rola izoform mRNA IGF-1 nie jest znana. Kontrola okresu półtrwania różnych mRNA IGF-1 oraz procesu translacji odbywa się również pod nadzorem tzw. białek wiążących RNA (ang. *RNA-binding proteins, RBPs*). Przypisuje się im ważną rolę w modulowaniu stabilności mRNA, w tym mRNA IGF-ów oraz ich receptorów [przegląd tematu: Lee i Gorospe, 2010].

Prekursor białkowy IGF-1 u szczura występuje również w dwóch wariantach (izoformach): IGF-1A (zawierającej 153 aminokwasy) oraz IGF-1B (zawierającej 195 aminokwasów), różniących się końcem cząsteczki, z którą związany jest peptyd E. Prekursory te przetwarzane są w identyczne cząsteczki dojrzałego IGF-1 [Barton 2006a]. W badaniach *in vitro* wykazano, iż cząsteczka pro-IGF-1A posiadająca dwa potencjalne miejsca N-glikozylacji w domenie E, jest glikozylowana, zaś prohormon IGF-1B nie podlega glikozylacji [Bach i wsp., 1990]. Wszystkie formy potranslacyjnej obróbki mogą wywierać wpływ na biologiczną aktywność IGF-1. Wykazano również, że domena Ea (EA) pro-IGF-1 oraz aminowy koniec domeny E w pro-IGF-2 są najbardziej zachowawcze. Natomiast C-końcowa część domen Eb i Ec cząsteczki pro-IGF-1 (produkowanej w alternatywnym splicingu) są bardzo zmienne [Wallis 2009].

Dojrzała cząsteczka IGF-1 (i IGF-2), podobnie jak proinsulina, zbudowana jest z tzw. domen B, C, i A (koniec aminowy) oraz dodatkowej domeny D na końcu karboksylowym, która nie jest obecna w proinsulinie [Daughday i Rotweien, 1989] i jest wysoce konserwatywnym białkiem u różnych gatunków [Shavlakadze i wsp., 2005; Wallis 2009]. Domena C dojrzałego białka IGF-1 jest odpowiedzialna za łączenie z receptorem [Gauguin i wsp., 2008] a domena B za wiązanie z białkami wiążącymi IGF-1 (IGF BPs) [Magee i wsp., 1999].

1.4.3.1. Biologiczna rola izoform mRNA i pro-peptydów IGF-1

Biologiczne znaczenie powstawania różnych izoform mRNA IGF-1 jest słabo poznane. Przez dość długi czas stawiano hipotezę, iż działanie egzonu 1 jest preferowane w aktywności auto- i parakrynowej IGF-1, a egzon 2 reprezentuje sekrecyjną i endokrynną funkcję. Podawano dowody eksperymentalne oraz hipotezy dlaczego tak się uważa [przegląd tematu: Oberbauer 2013].

Fizjologiczna rola różnych izoform mRNA i samych peptydów prekursorowych IGF-1 jest opisana najlepiej w tkance mięśniowej szkieletowej zarówno u gryzoni, jak i u człowieka. Warianty te pełnią funkcje w rozwoju, regeneracji mięśnia oraz utrzymaniu prawidłowej

masy mięśniowej [Hammed i wsp., 2003; Shavlakadze i wsp., 2005; Barton 2006a; Matheny i wsp., 2010; Kandalla i wsp., 2011]. Szczególną rolę odgrywa w tkance mięśniowej izoforma IGF-1Ec (MGF), która posiada unikalną domenę E zbudowaną u człowieka z 49 par zasad. Jej odpowiednikiem u gryzoni (78% homologii) jest izoforma IGF-1Eb o długości 52 par zasad [Lund i wsp., 1991; Siegfried i wsp., 1992; Chew i wsp., 1995; Kandalla i wsp., 2011]. Powstała nawet ciekawa *hipoteza MGF* [Matheny i wsp., 2010]. Zakłada ona, iż w procesie regeneracji mięśni szkieletowych po uszkodzeniu lub nadmiernych ćwiczeniach poziom specyficznych wariantów mRNA IGF-1 powstałych z egzonu 5 (IGF-1Eb u gryzoni, Ec u ludzi) wzrasta powyżej poziomu sprzed uszkodzenia. Ekspresja ta spada po wielu dniach na korzyść izoformy mRNA IGF-1Ea [Matheny i wsp., 2010]. Udział pozostałych wariantów mRNA, tj. IGF-1Eb oraz IGF-1Ea jest związany odpowiednio z początkową i końcową fazą proliferacji mioblastów. Większa ilość izoformy mRNA IGF-1Eb wiąże się z ekspresją markerów komórek satelitarnych mięśni, a ekspresja mRNA IGF-1Ea koreluje z różnicowaniem w dojrzałe włókna mięśni szkieletowych [Matheny i wsp., 2010]. Hameed i wsp. wykazali natomiast zmniejszoną produkcję MGF u osób starszych, w przeciwieństwie do młodych osób po fizycznych ćwiczeniach. Badania wskazują na oddzielną regulację produkcji MGF i izoformy IGF-1Ea w ludzkich mięśniach szkieletowych [Hameed i wsp., 2003]. Potwierdzają to późniejsze obserwacje, które świadczą o bardziej efektywnym udziale tej izoformy w promocji mięśniowej hipertrofii u młodszych osobników [Barton 2006b]. Niedawne badania z zastosowaniem syntetycznego MGF (zbudowanego z 24 aminokwasów) w hodowanych komórkach mięśniowych wskazują na aktywowanie mięśniowych komórek satelitarnych, nasilenie ich proliferacji i fuzji w regenerujących mięśniach. Zastosowanie tej izoformy mRNA IGF-1 może w przyszłości pomóc w zapobieganiu lub opóźnianiu sarkopenii u starszych osób [Kandalla i wsp., 2011]. Inni autorzy wykazują, że ilość mRNA IGF-1Ec wzrasta również po uszkodzeniu mięśnia sercowego w czasie pozawałowego remodelingu mięśnia [Vassilakos i wsp., 2014]. Sugeruje się wreszcie kardioprotekcyjną rolę izoformy zwanej „mIGF-1” (peptyd powstały z klasy I transkryptów i będący C-kończącym odcinkiem Ea) przed oksydacyjnym i hipertroficznymi stresami [Vinciguerra i wsp., 2009]. Podobnie jak transkrypty IGF-1, liczne prekursorowe peptydy IGF-1 mogą modulować aktywność, stabilność lub bioaktywność dojrzałej cząsteczki IGF-1 lub pełnić funkcje niezależne [Barton 2006a; Oberbauer 2013]. Sugerowano, że produkcja dojrzałego białka IGF-1 może być niezależna od ekspresji samych izoform. Zespół pod kierunkiem Elisabeth R. Barton na linii komórek mięśniowych C2C12 wykazał, iż oba pre-peptydy E (EA i EB) nie są niezbędne do sekrecji IGF-1, ale promują zwiększone wychwytywanie dojrzałego białka

z medium hodowlanego do wnętrza komórek. Modułują więc i być może nasilają bioaktywność IGF-1 lub pełnią dodatkowe funkcje w komórce [Pfeffer i wsp., 2009]. Ta sama grupa badaczy jednak później dowiodła, że E-peptydy mają niewiele swojej niezależnej aktywności, bo za efekty mitogenne na tkankę mięśniową odpowiada IGF-1R [Brisson i Barton, 2012]. Inni badacze również zastanawiali się czy formy prekursorowe peptydów IGF-1 mogą aktywować receptor IGF-1. Badania na modelu mysich mięśni szkieletowych wykazały, iż dominującymi propeptydami IGF-1 są nieglikozylowana forma pro-IGF-1 i postać glikozylowana pro-peptydu z utrzymaną domeną E. Badania funkcjonalne wykazały, iż w porównaniu z dojrzałą cząsteczką IGF-1, nieglikozylowana forma pro-IGF-I (Eb) ma podobną zdolność aktywowania IGF-1R, natomiast forma glikozylowana (Ea) wręcz redukuje aktywność receptora [Durzyńska i wsp., 2013]. U człowieka forma prekursorowa pro-IGF-Eb powstająca z egzonu 3, 4 i 5 nie jest wydzielana, ale akumuluje się w jąderku, co może sugerować funkcję autokrynową tej izoformy białka [Tan i wsp., 2002].

Prowadząc dalsze badania nad rolą pro-peptydów IGF-1, Park i wsp. w modelu mięśnia atroficznego (po dłuższym nieużywaniu) wykazali niedawno, iż lepsza w promowaniu wzrostu mięśnia szkieletowego i odzyskaniu jego funkcji jest dojrzała cząsteczka białka IGF-1 (bez końca COOH, bez E-peptydu), a nie pro-peptyd IGF-1A z zachowaną domeną E [Park i wsp., 2014].

W tkance nerwowej opisuje się neuroprotekcijną funkcję krótkich peptydów, powstałych w wyniku ekspresji genowej *IGF-1*, które cechuje dobra penetracja przez barierę krew-mózg i które mogą służyć także celom terapeutycznym. Sam IGF-1 wpływa na rozwój mózgu oraz mielinizację włókien nerwowych [przegląd tematu: Górecki i wsp., 2007].

Rola biologiczna różnych wariantów mRNA IGF-1 oraz prepeptydów jest intensywnie badana w raku prostaty, piersi, szyjki macicy i jelita grubego [Armakolas i wsp., 2010; Koczorowska i wsp., 2011; Koczorowska 2012; Kasprzak i wsp., 2013; Philippou i wsp., 2013]. Podkreśla się różnice w ekspresji wariantów mRNA IGF-1 w tkankach zmienionych nowotworowo i kontrolnych oraz rolę różnych izoform mRNA jako potencjalnych regulatorów kancerogenezy.

1.5. Szlak sygnałowy IGF a kancerogeneza jelita grubego

Od wielu dekad badania z dziedziny nauk podstawowych oraz klinicznych pokazują związek pomiędzy składnikami systemu IGF a neoplazją [Khandwala i wsp., 2000; LeRoith i Roberts, 2003; Alexia i wsp., 2004; Samani i wsp., 2007]. Wykazuje się wzrost stężenia IGF-1 i niższe poziomy IGF BPs jako związane z ryzykiem wystąpienia raka prostaty, piersi i jelita grubego,

ale dokładne korelacje pomiędzy ekspresją IGF-ów a ryzykiem konkretnego raka pozostają nieznane [Maki 2010]. W przypadku CRC dowiedziono roli nadwagi i otyłości w patogenezie nowotworu, co ściśle związane jest z uruchomieniem ścieżki sygnałowej PI3K/Akt. Otyłość zwiększa stężenie insuliny a obniża stężenie IGF BP-1, co skutkuje wzrostem stężenia IGF-1 [przegląd tematu: Huang i Chen, 2009]. Nadal bada się związki pomiędzy rodzajem diety a surowiczymi stężeniami IGF-1 w rozwoju i progresji CRC [Giovannucci i wsp., 2003]. Wykazywano, iż zarówno główne źródła białka zwierzęcego (mleko, ryby, drób, ale nie czerwone mięso), jak i białko roślinne są związane ze zwiększonymi surowiczymi stężeniami IGF-1 [Giovannucci i wsp., 2003]. Niedawne badania w modelu zwierzęcym to potwierdziły, wykazując iż duża ilość mięsa z kurczaka (ale nie wołowiny) w żywieniu szczurów jest skorelowana ze wzrostem stężenia IGF-1 i insuliny [Toden i wsp., 2010].

1.5.1. Surowicze stężenie IGF-1 w raku jelita grubego

Dowody na związek pomiędzy surowiczym stężeniem IGF-1 lub innych składników osi IGF (IGF-2, IGF-1R, IGF BP-3) a rozwojem zmian przednowotworowych (*adenoma*) i CRC zawdzięczamy licznym pracom epidemiologicznym z ostatnich dwóch dekad [Ma i wsp., 1999; Weber i wsp., 2002; Nakamura i wsp., 2004; Kaczka i wsp., 2007; Gao i wsp., 2012; Soubry i wsp., 2012; Janiak i wsp., 2013]. Pozycją najczęściej cytowaną i opatrzoną licznymi komentarzami [Burroughs i wsp., 1999; Renehan i wsp., 1999; Khandwala i wsp., 2000] zaraz po ukazaniu się wyników badań, jest publikacja Ma i wsp. z 1999 roku. Korzystając z dość dużej liczby surowic (n=200) mężczyzn chorych na raka jelita grubego, wykazano w niej względną korelację między ryzykiem rozwoju CRC i podwyższonym stężeniem IGF-1. Korelacja ta utrzymywała się po roku i dalszych 6 latach obserwacji. Mężczyźni z wyższym stężeniem białka wiążącego IGF-1 (IGF BP-3) mieli natomiast mniejsze ryzyko rozwoju CRC [Ma i wsp., 1999]. Kolejne badania również dowiodły, iż podwyższone stężenie IGF-1 w surowicy krwi jest dodatkowo skorelowane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju guzów jelita grubego [Giovannucci 1999; 2001; Kaaks i wsp., 2000; Wu i wsp., 2002; Donovan i Kummar, 2008; Józefiak i wsp., 2008]. Negatywną korelację z ryzykiem wystąpienia CRC wykazano później dla stężenia innych białek wiążących IGF-y, tj. IGF BP-1 i IGF BP-2 [Kaaks i wsp., 2000]. Tłumaczono to faktem, iż stale podwyższone stężenia insuliny i IGF-ów (w tym IGF-1), związane z „zachodnim” trybem życia, zwiększają ryzyko wystąpienia tego nowotworu prawdopodobnie poprzez obniżanie IGF BP-1 i zwiększoną bioaktywność IGF-1 [Kaaks i wsp., 2000]. Jak wiadomo, w odróżnieniu od insuliny, zmiany w stężeniu IGF-1 wpływające na regulację metabolizmu komórkowego, mogą pojawiać się po długim czasie

i są długotrwałe. Restrykcje żywieniowe obniżające stężenie IGF-1, tak u ludzi, jak i gryzoni, redukują proces nowotworzenia [Thissen i wsp., 1994; Giovannucci 2001]. Pierwsze badania nad związkiem IGF-1 a rozwojem CRC w populacji chińskiej (135 chorych) przeprowadzono na początku XXI wieku [Probst-Hensch i wsp., 2001]. Nie ujawniły one związku pomiędzy stężeniem IGF-1 a ryzykiem rozwoju CRC, w odróżnieniu od takich zależności w przypadku surowiczego stężenia IGF-2 oraz IGF BP-3 w tym raku.

Wyższe surowicze stężenie IGF-1 w porównaniu z kontrolą, obserwowano także u polskich pacjentów z CRC. Dodatkowo były one istotnie wyższe u chorych z rakami usytuowanymi po stronie lewej jelita grubego (dystalne) w porównaniu ze stroną prawą (proksymalne) oraz w guzie o wysokim stopniu zróżnicowania [Kaczka i wsp., 2007]. Autorzy konkludują swe obserwacje wnioskiem, iż IGF-1 uczestniczy we wczesnych stadiach kancerogenezy jelita grubego [Kaczka i wsp., 2007]. Badania polskie obejmowały jednak niedużą grupę pacjentów z CRC (n=17) i osób zdrowych (n=12).

Dostępne są również wyniki badań na znacznie większych grupach chorych (metaanalizy). I tak, metaanaliza z 9 badań prospektywnych wykonana pod kierunkiem Rinaldi i wsp na grupie 1121 chorych wykazała jedynie umiarkowaną korelację pomiędzy zwiększonym stężeniem IGF-1 a całkowitym ryzykiem rozwoju CRC. Zależność taka była widoczna głównie u młodszych pacjentów i tych z niskim spożyciem mleka w diecie [Rinaldi i wsp., 2010]. Nieco później Chi i wsp. zanalizowali ponad 5 tysięcy chorych z CRC i blisko 9,5 tysiąca kontroli w blisko 20 badaniach i potwierdzili etiologiczny związek między podwyższonym stężeniem IGF-1 (i IGF-2) oraz zwiększonym ryzykiem rozwoju CRC [Chi i wsp., 2013]. Ryzyko to dotyczy bardziej rasy kaukaskiej. W odróżnieniu od pracy Probst-Hensch i wsp. (2001), którzy analizowali populację orientálną pod kątem stężeń IGF-1 i ryzyka CRC, najnowsze badania autorów chińskich na dużej liczbie chorych (ponad 600) i osób zdrowych (n=650) potwierdziły podwyższone stężenia IGF-1, a także współczynnika IGF-1/IGF BP-3 u chorych z rakiem jelita grubego w porównaniu ze zdrowymi osobnikami [Jiang i wsp., 2014]. Autorzy sugerują, iż badanie IGF-1 we krwi obwodowej pacjentów może być wczesnym wskaźnikiem rozwoju raka u człowieka. Ponadto wskazują na rolę otyłości centralnej (ang. *waist-to-hip ratio*, WHR) połączonej ze zmianami w surowiczych stężeniach IGF-1 i IGF BP-3 u tych chorych w inicjowaniu i progresji CRC [Jiang i wsp., 2014]. Podobne wyniki uzyskała grupa badaczy rosyjskich na blisko 100 chorych z CRC. Wykazali oni zwiększone surowicze stężenia IGF-1 i IGF BP-2, a obniżone stężenia IGF BP-3. U mężczyzn dodatkowo wykazano wzrost stężenia IGF-2. Czułość IGF-1 jako markera diagnostycznego oszacowano na 80%, a swoistość (specyficzność) na 75%, na poziomie

stężenia 140 ng/ml. Parametry te nie dały jednak korelacji z podstawowymi klinicznymi i morfologicznymi wykładnikami zaawansowania CRC [Kushlinski i wsp., 2014]. Badano również surowicze stężenia IGF-1 u chorych z CRC w powiązaniu z dystrybucją polimorfizmu genu receptora IGF-1 +3179G/A (rs 2229765). Korelacja występowała częściej pomiędzy obecnością tego polimorfizmu IGF-1R i bardziej zaawansowanym CRC niż rakiem we wczesnych fazach. Wykazano obniżone stężenia IGF-1 u pacjentów z genotypem GG, a podwyższone w przypadku genotypu dominującego (AA/AG) [Stanilov i wsp., 2014]. Autorzy potwierdzają korelacje pomiędzy stężeniem IGF-1 i dodatkowo występowaniem polimorfizmów IGF-1R w progresji CRC. Inne badania z 2015 roku wskazują na wręcz negatywne korelacje pomiędzy surowiczym stężeniem IGF-1 i IGF BP-3 a ryzykiem rozwoju CRC, zaś pozytywną zależność ze stężeniem surowiczego C-peptydu [Pankaj i wsp., 2015].

W podsumowaniu można stwierdzić, iż badania nad surowiczym stężeniem IGF-1 jako kluczowym wskaźnikiem ryzyka CRC prowadzone są od wielu lat. Przynoszą one niekiedy niespójne wyniki, wynikające najprawdopodobniej z heterogenności samego nowotworu oraz czynników wpływających na produkcję samego IGF-1. Większość badaczy wskazuje jednak, że podwyższone stężenia IGF-1 można uznać za marker kancerogenezy jelita grubego i to już na etapie rozwoju zmian łagodnych (*adenoma*) [Gao i wsp., 2012; Soubry i wsp. 2012; Janiak i wsp., 2013]. Tylko nieliczne prace wykazują negatywną korelację pomiędzy stężeniem IGF-1 i IGF BP-3 a ryzykiem rozwoju CRC [Pankaj i wsp., 2015] czy nawrotu gruczolaka jelita grubego [Flood i wsp., 2008]. W przewlekłych zmianach zapalnych żołądka i jelit, w tym niektórych przypadkach określanych jako potencjalnie przednowotworowe (choroba Leśniowskiego-Crohna, *colitis ulcerosa*, zapalenia żołądka i dwunastnicy, grzybice i zapalenia na tle wirusowym) wykazano również niższe stężenia IGF-1 i IGF-2 oraz IGF BP-3 u chorych w porównaniu z zdrowymi osobnikami [Baricević i wsp., 2006].

Dalszych badań wymaga sprawdzenie hipotez dotyczących szczegółowej roli krążących peptydów w przewidywaniu transformacji nowotworu jelita grubego.

1.5.2. Lokalna produkcja IGF-1 w raku jelita grubego

Biologiczna aktywność IGF-ów jest wynikiem zintegrowanego współdziałania krążącego IGF-1 i białek wiążących (IGF BPs) oraz lokalnie produkowanych IGF-ów, IGF BPs i proteaz IGF BP [Giovannucci 2001]. Ekspresję komórkową składników systemu IGF badano zarówno w zdrowych komórkach jelita grubego, jak i wielu liniach komórek nowotworowych tej części przewodu pokarmowego postulując, iż istnieje choć jakaś podgrupa CRC, która

podlega autokrynowej regulacji systemu IGF-1/IGF-1R. I tak, porównanie lokalnej produkcji składników systemu IGF w różnych odcinkach prawidłowego jelita grubego, wykazało zróżnicowaną regulację produkcji mRNA IGF-1 i IGF-1R w błonie śluzowej, z przewagą ekspresji wszystkich komponent osi IGF (z wyjątkiem IGF-2) w odbytnicy w porównaniu z okrężnicą wstępującą. Nie było związku pomiędzy surowiczym stężeniem IGF-1 i IGF-2 a lokalnie produkowanymi transkryptami IGF-ów w zdrowej śluzówce jelita grubego [Vrieling i wsp., 2009].

Obecność receptorów dla IGF-1 wykazano także zarówno na prawidłowych komórkach błony śluzowej jelita grubego, jak i na komórkach nowotworowych [Pollak i wsp., 1987; Guo i wsp., 1992]. IGF-1 oddziaływać może zarówno w czasie zmian przednowotworowych, jak i na późniejszych etapach kancerogenezy. Jest jednym z czynników wpływających na komórkowy *turnover* [Giovannucci 2001]. Szczególnie widoczny mitogenny wpływ IGF-1 na komórki wykazano w kolonocytach pacjentów z akromegalią, u których stwierdza się hipersekrecję GH, IGF-1 i wzmożoną proliferację komórkową [Cats i wsp., 1996]. Ponadto, w liniach komórkowych raka jelita grubego stwierdzono fakt nasilania ruchliwości i migracji komórek w przebiegu transformacji nowotworowej jelita grubego. W wyjaśnianiu mechanizmu tego zjawiska sugerowano, iż nadprodukcja i aktywacja IGF-1R odbywa się poprzez aktywację niereceptorowej kinazy tyrozynowej c-Src, będącej protoonkogenem [Sekharam i wsp., 2003] i/lub wymaga aktywacji c-Met oraz systemu uPA/uPAR (ang. *urokinase plasminogen/urokinase plasminogen receptor*) [Bauer i wsp., 2005]. IGF-1 zwiększa również produkcję *vascular endothelial growth factor* (VEGF), czynnika angiogenego podtrzymującego wzrost nowotworu [Warren i wsp., 1996; Akagi i wsp., 1998]. Według niektórych badaczy IGF-1 wpływa wprost na zwiększenie transkrypcji genu VEGF [Akagi i wsp., 1998], inni opisują pośredni wpływ IGF-1 na indukcję ekspresji VEGF poprzez nasilanie syntezy transaktywatora genu VEGF, czynnika HIF-1 α (ang. *hypoxia-inducible factor 1*) w ludzkich komórkach CRC. Indukcja aktywności białka HIF-1 α przez IGF-1 odbywa się za pośrednictwem ścieżki MAP/PI3K [Fukuda i wsp., 2002]. Na mysiej linii komórek rakowych jelita grubego (MCLM), wykazano wpływ IGF-1 na hamowanie apoptozy komórek indukowanej przez czynniki cytotoksyczne (aktynomycyna, lowastatyna, doksorubicyna), co może skutkować również nabywaniem oporności wielolekowej komórek CRC [Guo i wsp., 1998]. Nadekspresja IGF-1R i współdziałającego z nim IGF-1 jest również niezbędna dla przeżycia transformowanych komórek [Baserga 1995; Giovannucci 2001]. Wykazano pozytywne korelacje pomiędzy podwyższoną ekspresją IGF-1 oraz IGF-1R

w tkankach CRC a gęstością naczyń limfatycznych, przerzutowaniem do węzłów chłonnych oraz klinicznym zaawansowaniem guza (klasyfikacja TNM) [Li i wsp., 2013].

Podwyższona lokalna produkcja białek IGF-1/IGF-2 oraz IGF-1R przez guzy w czasie progresji CRC jest dowodem na ważny udział składników systemu IGF w neogenezie [Tennant i wsp. 1996; Giovannucci 1999; Baserga 1995; 2003; Peters i wsp., 2003; Li i wsp., 2013], jednak jej wartość prognostyczna jest nieznana.

Obecność IGF-1 i innych białek osi IGF (IGF-2, IGF-1R) wykazuje się za pomocą metod immunohistochemicznych oraz hybrydocytochemicznych w kolonocytach prawidłowych oraz w komórkach nowotworowych jelita grubego [Tricoli i wsp., 1986; Freier i wsp., 1999; Michell i wsp., 1997; Bustin i wsp., 2002; Peters i wsp., 2003; Nosho i wsp., 2004; Oshima i wsp., 2008; Kasprzak i wsp., 2012; 2013; Li i wsp., 2013]. Wyniki tych badań są jednak niespójne. Na przykład zespołowi Michell i wsp. nie udało się wykazać ekspresji IGF-1 i IGF-2 w hodowanych prawidłowych kolonocytach i błonie śluzowej od pacjentów z CRC [Michell i wsp., 1997]. Kolejni badacze wykazali taką ekspresję oraz pozytywne korelacje pomiędzy występowaniem IGF-1 i IGF-2 oraz pomiędzy ekspresją IGF-1 a Ki-67 [Peters i wsp., 2003]. Występują spore różnice pomiędzy odsetkiem pozytywnych guzów/tkanek z ekspresją tkankową IGF-1, od 7,5% [Peters i wsp., 2003], poprzez ok. 50% [Kasprzak i wsp., 2013] do 80% CRC [Shiratsuchi i wsp., 2011]. Dotyczy to również wykrywania lokalnej ekspresji receptora IGF-1 (IGF-1R), którą demonstrowano u blisko 100% pacjentów [Peters i wsp., 2003] lub jedynie u 66% [Shiratsuchi i wsp., 2011]. Autorzy konkludują, iż jednoczesne występowanie ekspresji obu IGF-ów oraz receptora IGF-1 świadczy o auto-/parakrynowej stymulacji komórek neoplastycznych [Peters i wsp., 2003]. Może sugerować związek pomiędzy lokalną produkcją IGF-1 a gęstością naczyń w CRC [Bustin i wsp., 2002] czy świadczyć o wzroście ekspresji IGF-1/IGF-1R wraz z wielkością i średnicą guza [Shiratsuchi i wsp., 2011]. Li i wsp. wykazali, iż podwyższona tkankowa ekspresja IGF-1 oraz IGF-1R w CRC koreluje pozytywnie z przerzutowaniem guza do węzłów chłonnych oraz z zaawansowaniem raka (klasyfikacja TNM) [Li i wsp., 2013].

Podobnie do wykrywania białka IGF-1, również detekcja transkryptów IGF-1 jest dość zmienna. Dysponujemy wynikami prac, w których nie udało się wykazać mRNA IGF-1 ani w zdrowych, ani w nowotworowych tkankach jelita grubego [Freier i wsp., 1999] lub obserwowano jedynie niewiele zwiększoną ekspresję RNA IGF-1 (3-5 razy) i to jedynie u 20% pacjentów z CRC w porównaniu z kontrolą [Tricoli i wsp., 1986]. Są również prace demonstrujące obniżoną w stosunku do kontroli ekspresję mRNA IGF-1 [Oshima i wsp., 2008; Kasprzak i wsp., 2013]. Biorąc pod uwagę samą częstość wykrywania transkryptu

IGF-1 w tkankach CRC, wynosi ona około 50% przypadków [Bustin i wsp., 2002; Noshi i wsp., 2004]. Jedni z autorów potwierdzają negatywną korelację pomiędzy ekspresją mRNA IGF-1 i mRNA PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*), c-Myc oraz Cox-2 i VEGF [Bustin i wsp., 2002]. Inni z badaczy wykazują istotne pozytywne korelacje pomiędzy ekspresją transkryptu IGF-1 i wynikami badania histologicznego pacjentów z CRC [Noshi i wsp., 2004].

Co do ekspresji mRNA receptora IGF-1 (IGF-1R), wykazywano generalnie większą ekspresję transkryptu receptora w polipach oraz rakach jelita grubego w porównaniu z kontrolą [Freier i wsp., 1999; Oshima i wsp., 2008; Zhang i wsp., 2013], co nie zawsze korelowało z surowiczymi stężeniami IGF-1. Istnieją prace, w których ekspresja IGF-1R korelowała pozytywnie z występowaniem inwazji naczyń żylnych i przerzutami do wątroby [Oshima i wsp., 2008].

Bardziej jednorodne w porównaniu z IGF-1, są wyniki badań nad lokalną ekspresją IGF-2 w CRC. W większości prac wykazywano zdecydowanie większą ekspresję mRNA IGF-2 (10-50x), a samą jej obecność u większej liczby pacjentów z CRC niż w kontroli [Tricoli i wsp., 1986; Freier i wsp., 1999; Noshi i wsp., 2004].

Aktualnie jedne z najczęściej prowadzonych prac badawczych nad patogenezą CRC z udziałem osi IGF dotyczą wykazywania potencjalnych związków pomiędzy zmianami genetycznymi tych składników a ryzykiem wystąpienia CRC. Próbuje się zweryfikować hipotezę o dziedziczeniu różnych wariantów genu IGF-1 i wpływie takich zmian na rozwój CRC. Z różnymi etapami kancerogenezy jelita grubego łączy się występowanie polimorfizmów odpowiednich genów osi IGF [Pechlivanis i wsp., 2007; Wong i wsp., 2008; Feik i wsp., 2010]. Jednym badaczom nie udawało się uchwycić takich związków w polimorfizmach *IGF-1* i *IGF BP-3* [Pechlivanis i wsp., 2007]. Inni, u pacjentów z CRC z populacji chińskiej z Singapuru z „zachodnim” stylem zachowania, wykazywali częściej obecność SNP (ang. *single-nucleotide polymorphism*) IGF-1-2995 C/A w promotorze *IGF-1* [Wong i wsp., 2008]. Natomiast praca na ponad 3000 chorych rasy kaukaskiej z różnie zaawansowanymi zmianami nowotworowymi jelita grubego, wykazała pozytywną korelację dla ryzyka wystąpienia CRC w przypadku nosicielstwa genotypu SNP rs6214 IGF-1 [Feik i wsp., 2010]. Meta-analiza dotycząca badania polimorfizmów genu IGF-1 (CA)19 oraz IGF BP-3-202A/ jako czynników ryzyka nowotworów (CRC, piersi, prostaty i płuc) na populacji blisko 8 tys. chorych i ponad 11 tys. osobach zdrowych dowiodła, iż z dwóch badanych polimorfizmów tylko polimorfizm *IGF-1* jest potencjalnym „kandydatem” wrażliwości na

nowotwory (w tym jelita grubego), niezależnie od czynników środowiskowych, zwłaszcza u Azjatów [Quan i wsp., 2014]. Co interesujące, długie niekodujące RNA (lncRNAs) - transkrypty odkrytego niedawno nowego genu zwanego *colorectal neoplasia differentially expressed* (CRNDE) są regulowane przez insulinę i IGF-y, należą też do celów (ang. *target*) w ścieżkach PI3K/Akt/mTOR oraz Raf/MAPK [Ellis i wsp., 2014]. Ważne obserwacje o udziale osi IGF-1 poczyniono również odnośnie dziedzicznych niepolipowatych zmian nowotworowych jelita grubego (ang. *non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC) w populacji australijskich, i co warte podkreślenia, także polskich pacjentów [Reeves i wsp., 2008]. Wykazano, że obecność powtórzeń CA (ang. *cytosine-adenine*) w genie IGF-1 u jej nosicieli jest ważnym czynnikiem modyfikującym inicjację HNPCC. Jest to tym samym pierwszy wykryty polimorfizm genu, dla którego uzyskano zgodność co do wyników niezależnie od różnic populacyjnych [Reeves i wsp., 2008].

1.5.3. Nowe strategie leczenia raka jelita grubego z wykorzystaniem wyników badań nad systemem IGF

Odkąd wiadomo, że system IGF jest zaangażowany w działanie pro-proliferacyjne i antyapoptotyczne w wielu nowotworach złośliwych, stał się on ważnym celem leczenia anty-nowotworowego. Wyróżnia się trzy główne strategie takiego leczenia: (1) blokadę receptora IGF-1R lub IR z zastosowaniem monoklonalnych przeciwciał; (2) hamowanie aktywności kinazy tyrozynowej IGF-1R (antagoniści ATP i nie-ATP) oraz (3) neutralizację liganda z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych. W próbach są również oligonukleotydy antysensowne lub rekombinowane białka wiążące IGF (IGF BPs) dla zahamowania działania receptora IGF-1 i receptora insulinowego (IR) [Ewing i Goff, 2010; Luo i Xu, 2014; Singh i wsp., 2014]. Zarówno w przypadku przeciwciał anti-IGF-1R, jak i inhibitorów aktywności kinazy tyrozynowej tego receptora, prowadzone są od kilku lat różne próby przedkliniczne i kliniczne (faza I, faza II) [przegląd tematu: Ewing i Goff, 2010]. Ostatnie doniesienia opisują próby przedkliniczne lub kliniczne I fazy z zastosowaniem konkretnych preparatów. Stosowane są humanizowane przeciwciała monoklonalne anti-IGF-1R o nazwie *Cixutumumab* i *Dalotuzumab* (MK-0646; h7C10) oraz *Linsitinib* (OSI-906) - inhibitor zarówno IGF-1R, jak i IR [Leiphakpam i wsp., 2014; Wilky i wsp., 2015]. Preparaty te są potencjalnymi antyrakowymi środkami w tzw. IGF-1R-zależnych rakach jelita grubego (z nadekspresją receptora). W II fazie klinicznych badań są przeciwciała anti-IGF-1R o nazwie *robatumumab* w leczeniu pacjentów z zaawansowanymi stadiami CRC, opornych na chemioterapię [Lin i wsp., 2014]. Wyniki tych form leczenia nie są jednak

satysfakcjonujące, co wynika przede wszystkim z występowania izoform receptorów (np. izoformy A IR), obecności hybrydowych receptorów IGF-1R i IR oraz występowania hybryd z innymi receptorami o aktywności kinazy tyrozynowej [Luo i Xu, 2014; Singh i wsp., 2014].

Podsumowując omawiany problem, można stwierdzić, iż w raku jelita grubego wykazuje się znaczący udział bardzo licznych ścieżek sygnałowych (w tym z udziałem IGF-1), które funkcjonują nieprawidłowo. Leczenie anty-IGF będzie skuteczniejsze być może w powiązaniu z innymi preparatami anty-nowotworowymi. Wymagana jest i będzie dokładna kwalifikacja do takiego leczenia, obejmująca badanie choćby ekspresji niektórych markerów ze szlaku IGF [Ewing i Goff, 2010].

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Rak jelita grubego (ang. *colorectal cancer*, CRC) w skali globalnej jest jednym z najczęstszych i najgroźniejszych nowotworów złośliwych. W Polsce nowotwór jelita grubego jest aktualnie drugim pod względem częstości występowania i umieralności u obu płci. Poznano główne szlaki sygnałowe prowadzące do rozwoju tego nowotworu. Heterogenność zmian w CRC tak pod względem morfologicznym, jak i molekularnym, jest wyzwaniem do podejmowania dalszych badań nad patogenezą tej neoplazji.

Szlak sygnałowy insulinopodobnego czynnika wzrostu (ang. *insulin-like growth factor*, IGF) odgrywa istotną rolę w kancerogenezie wielu nowotworów, w tym CRC. Świadczą o tym biologiczne właściwości IGF-ów (IGF-1 i 2), receptora IGF-1 (IGF-1R) i białek wiążących IGF-y (IGF BPs), które odpowiadają za nasiloną proliferację i hamowanie apoptozy komórek. Wyniki badań epidemiologicznych wskazują na rolę zwiększonego surowiczego stężenia IGF-1 jako czynnika złej prognozy w CRC. Na poziomie tkanki zwraca się uwagę na rolę zwiększonej ekspresji IGF-2 oraz IGF-1R jako głównych markerów kancerogenezy. Rozpracowuje się udział polimorfizmów genu IGF-1 w danej populacji oraz innych składników drogi sygnałowej PI3K/Akt w powstawaniu raka jelita grubego.

Ludzki gen IGF-1 złożony z 6 egzonów podlega złożonej obróbce potranskrypcyjnej (alternatywny *splicing*), w wyniku której powstaje sześć wariantów (izoform) mRNA. Wszystkie rodzaje transkryptów stanowią matrycę do syntezy białek prekursorowych IGF-1. Ekspresja różnych izoform mRNA i białek IGF-1 jest tkankowo-specyficzna. Na eksperymentalnych modelach CRC wykazano autokrynowe wydzielanie IGF-1. Mechanizmy alternatywnego *splicing*u w tym typie guza są niejasne. Rola lokalnej ekspresji wariantów mRNA i pro-peptydów IGF-1 w CRC w kontekście ich wykorzystania w praktyce klinicznej oraz dla celów poznawczych wymaga dokładniejszego scharakteryzowania.

Cele badań

1. Analiza tkankowej ekspresji IGF-1 (izoformy mRNA, białko) w nowotworach jelita grubego (CRC), zmianach nienowotworowych i w kontrolnym jelicie grubym.
2. Badanie korelacji pomiędzy tkankową ekspresją IGF-1 (izoformy mRNA, białko) a aktywnością proliferacyjną oraz wykładnikami apoptozy w badanych grupach.
3. Odniesienie ekspresji tkankowej IGF-1 do wybranych danych klinicznych pacjentów z badanych grup.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Pacjenci

Do badań zakwalifikowano grupę 31 chorych z nowotworami jelita grubego i odbytnicy (CRC) (grupa badana), 17 pacjentów ze zmianami nienowotworowymi jelita grubego (grupa porównawcza), diagnozowanych i leczonych chirurgicznie w Katedrze Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Onkologii Gastroenterologicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2010-2015. Pacjenci zakwalifikowani do badań w ramach obecnej pracy nie byli leczeni uprzednio innymi metodami (radio- czy chemioterapia). Z badań wykluczono pacjentów z przewlekłymi chorobami metabolicznymi (cukrzyca), innymi nowotworami w chwili rozpoznania CRC, niewydolnością nerek czy wątroby. U trzech pacjentów stwierdzano hiperglikemię na czczo, trzech pacjentów leczyło nadciśnienie krwi, jeden miał stabilną wadę serca, u jednego stwierdzono torbiel jednej nerki, jeden miał nadczynność tarczycy w wywiadzie. Nie było pacjentów z ostrymi zakażeniami w chwili zabiegów operacyjnych. Tylko jeden pacjent miał dodatni wywiad w kierunku przewlekłego zakażenia wirusem C zapalenia wątroby (HCV). Wszyscy pacjenci byli seronegatywni w kierunku HBV. Nie dysponowano informacjami na temat stylu życia, ewentualnego palenia papierosów czy nadużywania alkoholu.

Histologiczny typ nowotworu jelita grubego został ustalony w rutynowych badaniach diagnostycznych przeprowadzonych przez patologów z Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Rozpoznanie histopatologiczne wraz z oceną stopnia złośliwości nowotworu jelita grubego postawiono na podstawie obowiązującej w chwili rozpoznania klasyfikacji CRC wg WHO [Hamilton i Aaltonen, 2000; Bosman i wsp., 2010].

Z dostępnych danych klinicznych grupy badanej do pracy brano pod uwagę: rozpoznanie histopatologiczne, stopień histologicznej złośliwości guza - *grade* (G), anatomiczną lokalizację guza, ocenę punktową w skali Dukes'a i Astlera i Collera, ocenę w klasyfikacji TNM, wiek, płeć pacjenta oraz podstawowe wyniki badań pracownianych (liczba leukocytów, płytek krwi i stężenie glukozy). Nie dysponowano wartościami BMI (ang. *body mass index*) pacjentów w chwili wykonywania zabiegu operacyjnego.

Typ makroskopowy guza określono jako płaski, kiedy średnica guza w największym wymiarze nie przekraczała 3 cm, natomiast gdy średnica ta była ≥ 3 cm, taki typ określano jako guz wypukły.

U czterech chorych (dwie kobiety, dwóch mężczyzn) w chwili operacji stwierdzano występowanie odległych przerzutów nowotworowych (wszystkie do wątroby), sześciu pacjentów z całej grupy badanej zmarło w analizowanym okresie czasu.

Wśród chorych z grupy badanej było 7 kobiet i 24 mężczyzn, najmłodszy pacjent miał 32 lata, a najstarszy 89 lat.

Grupę porównawczą stanowiło 17 pacjentów z polipowatością jelita grubego (3 osoby), gruczolakiem jelita grubego (dwie osoby), przewlekłymi aktywnymi zmianami zapalnymi: z *colitis ulcerosa* (n=4) i chorobą Leśniowskiego-Crohna (n=8). Najmłodszy pacjent miał lat 19, najstarszy – 55. W tej grupie chorych dysponowano podobnymi danymi klinicznymi, jak w przypadku pacjentów z CRC, z odpowiednio zmodyfikowaną oceną histopatologiczną.

Charakterystykę grup z podaniem rozpoznania histopatologicznego zawarto w Tabelach 1 i 2.

Tabela 1. Histologiczne typy nowotworu i wybrane dane kliniczne pacjentów z CRC (grupa badana).

Nr	Wiek(lata)/płeć	Rozpoznanie histologiczne	Umiejscowienie	Grade*
1.	89/m	<i>Adenocarcinoma neuroendocrinale, mixed</i>	P	3
2.	78/m	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	D	2
3.	53/m	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	D	2
4.	56/m	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	D	2
5.	75/m	<i>Adenocarcinoma coli in situ</i>	D	-
6.	56/k	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	D	2
7.	68/m	<i>Adenocarcinoma tubulare partim mucinosum</i>	P	3
8.	77/m	<i>Adenocarcinoma mucinosum</i>	P	3
9.	69/m	<i>Adenocarcinoma tubulare partim mucinosum</i>	D	2
10.	67/k	<i>Adenocarcinoma recti</i>	D	2
11.	51/m	<i>Adenocarcinoma tubulovillosum partim</i>	P	2
12.	64/k	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	D	2
13.	32/m	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	P	2
14.	64/m	<i>Adenocarcinoma tubulare bifocale coli</i>	D	2
15.	72/k	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	P	2
16.	58/m	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	D	2
17.	72/m	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	D	2
18.	63/m	<i>Adenocarcinoma tubulare bifocale et</i>	D	3
19.	77/m	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	P	3
20.	55/m	<i>Adenocarcinoma tubulare partim mucinosum</i>	D	3
21.	74/m	<i>Adenocarcinoma tubulare partim mucinosum</i>	P	2
22.	52/m	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	D	2
23.	54/m	<i>Adenocarcinoma tubulare recti</i>	D	2
24.	77/m	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	D	2
25.	73/m	<i>Adenocarcinoma tubulovillosum coli</i>	D	2
26.	63/m	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	P	2
27.	65/k	<i>Adenocarcinoma tubulare partim mucinosum</i>	D	3
28.	75/m	<i>Adenocarcinoma tubulovillosum coli</i>	D	2
29.	79/m	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	P	1
30.	47/k	<i>Adenocarcinoma tubulare coli</i>	D	2
31.	62/k	<i>Adenocarcinoma mucinosum coli</i>	D	3

Objaśnienia: P – proksymalny odcinek jelita grubego; D - dystalny odcinek jelita grubego;
* - skala oceny złośliwości (*grade*) wg Hamilton i Aaltonen, 2000 i Bosman i wsp., 2010

Tabela 2. Rozpoznanie histologiczne i wybrane dane kliniczne u pacjentów z nienowotworowymi zmianami jelita grubego (grupa porównawcza).

Nr chorego	wiek (lata)/płeć	Rozpoznanie histologiczne	Umiejscowienie zmian	Cechy dysplazji
1.	22/k	<i>Polypositas coli</i>	P	1
2.	22/k	<i>Adenoma tubulo-villosum</i>	P	1
3.	40/m	<i>Polypus inflammatorius; colitis ulcerosa</i>	P	0
4.	55/m	<i>Morbus Leśniowski-Crohn</i>	P	0
5.	39/m	<i>Morbus Leśniowski-Crohn</i>	P	0
6.	23/m	<i>Morbus Leśniowski-Crohn</i>	P	0
7.	31/m	<i>Morbus Leśniowski-Crohn</i>	P	0
8.	28/k	<i>Morbus Leśniowski-Crohn</i>	P	0
9.	43/m	<i>Polypositas coli; diverticulosis coli</i>	P	0
10.	19/m	<i>Polypus inflammatorius; colitis ulcerosa</i>	P	1
11.	31/k	<i>Polypus inflammatorius; colitis ulcerosa</i>	P	1
12.	32/k	<i>Morbus Leśniowski-Crohn</i>	P	0
13.	24/m	<i>Polypus inflammatorius; colitis ulcerosa</i>	P, D	0
14.	35/m	<i>Polypositas coli</i>	P, D	1
15.	35/m	<i>Adenoma tubulo-villosum</i>	P, D	1
16.	25/m	<i>Morbus Leśniowski-Crohn</i>	P	0
17.	43/k	<i>Morbus Leśniowski-Crohn</i>	P	0

Objaśnienia: P – proksymalny odcinek jelita grubego; D - dystalny odcinek jelita grubego; 1 – obecne cechy dysplazji komórek; 0 – cechy dysplazji niewidoczne morfologicznie

3.2. Materiał tkankowy i stosowane odczynniki

Wykorzystany do badań materiał stanowiły fragmenty następujących tkanek:

- (1) guzów pooperacyjnych jelita grubego z CRC (grupa badana, n=31);
- (2) ściany jelita grubego ze zmianami zapalnymi („pseudopolipami“, polipami zapalnymi), gruczolakami i/lub polipowatością jelita grubego (grupa porównawcza, pseudoguzy; n=17);
- (3) prawidłowej ściany jelita grubego pobranej w odległości co najmniej 15 cm od zmiany nowotworowej w przypadku CRC (kontrola 1);
- (4) prawidłowej ściany jelita grubego oddalonej co najmniej 15 cm od nienowotworowych zmian (kontrola 2).

Wszystkie tkanki zostały utrwalone w roztworze zbuforowanej 10% formaliny, następnie zatopione w parafinie i skrojone na skrawki o grubości 5µm, umieszczone na szkiełkach podstawowych SuperFrost/Plus.

Skrawki parafinowe zostały poddane następującym badaniom:

- Barwienie hematoksyliną i eozyną (H+E)
- Reakcje immunocytochemiczne z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał pierwszorzędowych (Tabela 3).

3.3. Metody badań

3.3.1. Barwienie hematoksyliną i eozyną (H+E)

Barwienie hematoksyliną i eozyną (H+E) wykonano w sposób rutynowy.

W barwieniu tym zweryfikowano stopień złośliwości histologicznej (*grade*) raków jelita grubego (grupa badana) w skali od 1-4 [Hamilton i Aaltonen, 2000 i Bosman i wsp., 2010].

W ramach pracy oceniono również nasilenie zmian zapalnych towarzyszących guzom nowotworowym w centralnych obszarach CRC oraz w tzw. froncie inwazji (ang. *invasive front*) [Klintrup i wsp., 2005]. Wszystkie preparaty z CRC oceniono dodatkowo pod kątem

obecności lub braku tzw. *Crohn's-like reaction* (CLR) czyli obecności skupisk tkanki „limfoidalnej” (przypominających grudki chłonne) zlokalizowanych poza frontem inwazji (najczęściej w mięśniówce właściwej oraz w tkance tłuszczowej otaczającej jelito grube). Intensywność CLR opisano zgodnie z danymi z piśmiennictwa [Grahami i Appelman, 1990; Klintrup i wsp., 2005] w 3-stopniowej skali: brak widocznych nacieków z komórek limfoidalnych (*grading* 0), reakcję zapalną o słabej aktywności/nasileniu (*grading* 1) oraz intensywną reakcją zapalną (*grading* 2) [Graham i Appelman, 1990].

W przypadku grupy porównawczej oceniono stopień nasilenia zmian zapalnych (*grading*) w zmianach nienowotworowych jelita grubego, stosując 6-punktową klasyfikację nasilenia ostrych i przewlekłych zmian zapalnych (*grading*) wg Geboesa i wsp. [Geboes i wsp., 2000]. Przedstawiała się ona następująco: 0 – wyłącznie zmiany strukturalne; 1 – przewlekłe zapalenie; 2 – obecność neutrofilów w *lamina propria*; 3 – obecność neutrofilów w nabłonku jelitowym; 4 – destrukcja krypt; 5 – nadżerki i owrzodzenia błony śluzowej [Geboes i wsp., 2000].

Barwienie H+E preparatów histologicznych wszystkich pacjentów i grup, pozwoliło na zakwalifikowanie ich do analizy immunohistochemicznej.

3.3.2. Technika immunohistochemiczna (IHC)

Badania IHC przeprowadzono w oparciu o nowy system detekcyjny w immunohistochemii tzw. *new polymer-based IHC* z zastosowaniem systemu EnVision++ [Sabattini i wsp., 1998] oraz podanych w Tabeli 3, przeciwciał swoistych.

Tabela 3. Przeciwciała pierwszorzędowe stosowane w badaniach immunohistochemicznych wraz ze specyfikacjami.

Przeciwciało	Wykrywany antygen/immunogen	Typ przeciwciała, producent	Rozcieńczenie
Anti-human IGF-1	Ludzkie białko IGF-1	Monoklonalne, mysie antyludzkie, Inc.; klon: 56408; R&D Systems	1:500
Anty-AKT-pS473	Serynowo-treoninowa kinaza białkowa AKT jest głównym przekaźnikiem sygnału w szlaku 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K); przeciwciała rozpoznają specyficzne dla fosforylacji białka, m.c. 60kD	Monoklonalne królicze antyludzkie, klon 14-5; Dako	1: 20
Anty-Ki-67	Ludzkie rekombinowane białko odpowiadające fragmentowi 1002 bp Ki-67 cDNA	Monoklonalne mysie antyludzkie, klon MIB-1; Dako	1:1
Anty-PCNA	Znakuje ludzkie komórki wykazujące ekspresję PCNA 36 kDa	Monoklonalne mysie; klon PC10; Dako	1: 200
Anty-cyklina D1	Rekombinowana ludzka cyklina D1 o pełnej długości; rozpoznawany epitop zlokalizowany jest pomiędzy aa 151-165 w centralnej domenie białka	Monoklonalne mysie antyludzkie, gotowe do użycia, klon DCS-6; Dako	1:1
Anty-p53	Rekombinowane ludzkie białko p53 typu dzikiego	Monoklonalne mysie antyludzkie, klon DO-7; Dako	1:1
Anty-kaspaza-3	Specyficzne proteazy cysteinowe uczestniczące w inicjacji i przeprowadzaniu apoptozy; Wykrywa aktywną postać kaspazy-3, „rozciętą” w Asp175	Monoklonalne królicze, klon 269518; R&D Systems	1: 500
Anty-Bcl 2	Białko antyapoptotyczne	Monoklonalne mysie antyludzkie, klon 124; Dako	1: 50

Reakcje immunocytochemiczne przeprowadzono zgodnie z poniższymi etapami:

- 1) Odparafinowanie i nawodnienie preparatów w ksylenie i szeregu alkoholi o malejącym stężeniu (2x100%, 90%, 85%, 80%, 70%)
- 2) Płukanie w wodzie bieżącej – 10 min.

- 3) Blokowanie aktywności endogennej peroksydazy za pomocą 1% H₂O₂ w wodzie destylowanej – 30 min.
- 4) Płukanie w wodzie bieżącej – 10 min.
- 5) Płukanie w wodzie destylowanej – 10 min.
- 6) Inkubacja w normalnej surowicy koziej (1:20, Dako) – 30 min.
- 7) Inkubacja ze swoistymi przeciwciałami – 18 godz./4°C, a następnie przez jedną godzinę w temp. pokojowej
- 8) Płukanie w roztworze soli fizjologicznej zbuforowanej fosforanami (PBS) – 3x3 min.
- 9) Inkubacja w roztworze zawierającym dekstran skoniugowany z peroksydazą i wtórne przeciwciała kozie przeciwko immunoglobulinom króliczym i mysim (Dako REAL EnVision/HRP, Rabbit/Mouse, Dako) – 20 min.
- 10) Płukanie w PBS-ie – 3x3min.
- 11) Inkubacja z 3-3' diaminobenzzydynam (DAB) (Dako REAL DAB, Dako) – 5-7 min.
- 12) Płukanie w wodzie bieżącej – 10 min.
- 13) Płukanie w wodzie destylowanej – 10 min.
- 14) Odwodnienie w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu (70%, 80%, 85%, 90%, 2x100%) i w ksylenie
- 15) Zamknięcie preparatów za pomocą histofluidu (Marienfeld) i szkiełek nakrywkowych

Większość preparatów podbarwiano przez 2 minuty hematoksyliną, następnie płukano w wodzie bieżącej i destylowanej (po 10 min.), jako etap poprzedzający odwodnienie preparatów. W tzw. wewnętrznych kontrolach negatywnych zastępowano specyficzne przeciwciała przez surowice odpowiedniego gatunku w roztworze PBS z dodatkiem 0,1% albumin bydlęcych (BSA) i 15mM azydku sodu.

Przeciwciała takie jak: anty-AKT, anty-Ki-67, anty-PCNA, anty-Bcl-2 wymagały dodatkowego odsłaniania determinant antygenowych za pomocą wysokiej temperatury. Procedura polegała na zastosowaniu po etapach odparafinowania i nawodnienia, dodatkowego etapu gotowania preparatów w 10mM buforze cytrynianowym w kuchence mikrofalowej o mocy 700W przez 15 minut. Następnie preparaty płukano w PBS-ie i od pkt. 3 prowadzono reakcję według standardowej procedury.

Pozytywną kontrolę na wykrywanie białka IGF-1 stanowiły fragmenty prawidłowej wątroby ludzkiej na szkiełkach podstawowych w tkankowym panelu dostępnym komercyjnie (*Tissue Microarray Panel*, Cybrdi Inc., Maryland, USA) (n=6). Wyniki reakcji

immunocytochemicznej na wątrobie zdrowej nie podlegały ocenie ilościowej, a jedynie jakościowej ocenie lokalizacji IGF-1.

3.3.3. Ocena ekspresji białek

3.3.3.1. Półilościowa ocena ekspresji białek

Ocenę reakcji immunohistochemicznych na wykrywanie IGF-1, białka proapoptotycznego kaspazy-3, białka antyapoptotycznego Bcl-2 oraz białka AKT przeprowadzono wykorzystując półilościową, 12-punktową skalę IRS (ang. *immunoreactive score*) według Remmele i Stegner [Remmele i Stegner, 1987]. Oceniano liczbę komórek z pozytywną reakcją cytoplazmatyczną (*PP - percentage of positive cells*) oraz nasilenie reakcji (*SI - staining intensity*) w co najmniej dziesięciu polach widzenia mikroskopu świetlnego Olympus BH-2 przy oryginalnym powiększeniu obiektywu 40x. Iloczyn PP i SI stanowił wartość końcową ocenianej reakcji (Tabela 4). Ostateczny wynik uzyskano biorąc pod uwagę średnią wartość z 10 pól widzenia.

Tabela 4. Skala IRS (ang. *immunoreactive score*) (0-12 punktów) wg Remmele i Stegner [Remmele i Stegner, 1987].

<i>PP: LICZBA KOMÓREK IMMUNOPOZYTYWNYCH</i>	<i>SI: INTENSYWNOŚĆ REAKCJI</i>
0: brak komórek z pozytywną reakcją	0: brak reakcji barwnej
1: do 10% komórek z pozytywną reakcją	1: słabo nasilona reakcja barwna
2: 11 do 50% komórek z pozytywną reakcją	2: średnio nasilona reakcja barwna
3: 51 do 80% komórek z pozytywną reakcją	3: intensywna reakcja barwna
4: >80% komórek z pozytywną reakcją	
PP x SI	

Końcowa wartość równa: 1-2 - oznaczała słabą reakcję,
 3-4 - średnią reakcję,
 6-12 - intensywną reakcję immunocytochemiczną.

Analizę ekspresji tkankowej wybranych markerów proliferacji komórkowej (Ki-67, PCNA, cyklina D1) i białka p53 (reakcja wyłącznie jądrowa) przeprowadzono z zastosowaniem półilościowej, zmodyfikowanej 4-stopniowej skali według Gatter i wsp. [Gatter i wsp., 1986]

(Tabela 5). Do analizy statystycznej pod uwagę brano średni odsetek komórek immunopozytywnych z 10 pól widzenia z danego preparatu (grupa badana/kontrola) i zmianach nienowotworowych (grupa porównawcza), przy oryginalnym powiększeniu obiektywu mikroskopu świetlnego Olympus BH-2 40x.

W przypadku kontroli 2 (kontrola grupy porównawczej), zrezygnowano z ilościowej oceny reakcji immunohistochemicznej w tej podgrupie, wykorzystując dla zasadniczych celów pracy wyłącznie wyniki uzyskane techniką RT-PCR.

Tabela 5. Skala wg Gatter i wsp., zmodyfikowana [Gatter i wsp., 1986].

- 1: do 10% komórek z pozytywną reakcją
- 2: 11 do 25% komórek z pozytywną reakcją
- 3: 26 do 50% komórek z pozytywną reakcją
- 4: 51 do 75% komórek z pozytywną reakcją

3.3.4. Badania z zastosowaniem techniki RT-PCR

Uzyskane w czasie zabiegów operacyjnych fragmenty tkanek (grupa badana, porównawcza i kontrola 1 i 2 w obszarze marginesu zdrowego jelita grubego) umieszczano w *RNA Stabilization Solution* (RNAlater) (*RNAlater®*, *Applied Biosystems*) i zamrażano w temperaturze -80°C . Frakcję całkowitego RNA izolowano za pomocą TRI Reagent® Solution (*Applied Biosystems*) zgodnie z załącznikiem 1 (Aneks – załącznik nr 1), a następnie oczyszczano ze śladowych zanieczyszczeń DNA z użyciem kitu *GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx)*. Oznaczenia ilościowego RNA dokonano za pomocą spektrofotometrii. Całkowity RNA był oceniany poprzez pomiar optycznej gęstości w fali o długości 260 nm, a informacje o czystości próbki analizowano korzystając ze wskaźnika 260/280 nm, który dla próbek o wysokiej czystości powinien wynosić $>1,8$ (*NanoDrop® ND-1000*, *ThermoScientific*). Kolejno sprawdzono jakość RNA za pomocą elektroforezy na 1% żelu agarozowym z bromkiem etydyny. Ostatecznie wszystkie próbki RNA były umieszczane w wodzie wolnej od RNaz w temperaturze -80°C do późniejszego wykorzystania.

Izolacja całkowitego RNA i synteza cDNA

Reakcję odwrotnej transkrypcji przygotowywano w komorze laminarnej, a do syntezy cDNA na matrycy całkowitego RNA (ok. 1,0 µg) zgodnie z protokołem producenta wykorzystano komercyjny zestaw *First Strand cDNA Synthesis Kit #1612 (Thermo SCIENTIFIC, Fermentas)*. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono na 1 µg całkowitego RNA z każdej próbki przy użyciu 1µl *Random Hexamer Primer* i dopełniono oczyszczoną wodą (DEPC) do całkowitej objętości 11 µl i wstępnie preinkubowano przez 5 min. w temperaturze 65°C przy użyciu aparatu *Biometra Thermocycler*. Następnie próbki schłodzono w lodzie i przeniesiono do nowych probówek dodając: *5x Reaction Buffer* (4µl), *RiboLock™ RNase Inhibitor* (20 U/µl) (2µl), *10mM DTP Mix* (2µl), *M-MuL V Reverse Transcriptase* (20 U/µl) (2 µl) i inkubowano w temperaturze 42°C przez 60 min. (*Biometra Thermocycler*). Uzyskany w ten sposób cDNA przechowywano w -20°C lub natychmiast wykorzystywano do dalszej analizy - ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym.

Oznaczenie bezwzględnej liczby kopii mRNA

Przygotowanie krzywej wzorcowej do oznaczenia liczby kopii mRNA

cDNA wszystkich izoform IGF1 (IGF-1P1, IGF-1P2, A, B, C, osobna krzywa dla każdej z izoform) (Rycina 1) było amplifikowane używając specyficznych starterów (primerów). Produkty PCR były analizowane w 2% żelu agarozowym w celu potwierdzenia ich specyficzności, a następnie produkty PCR były oczyszczane za pomocą *GeneMATRIX PCR/DNA Clean-Up Purification Kit* (EURx). Stężenie produktów PCR mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop® ND-200 przy długości fali 260 nm. Uzyskane stężenia były podstawą do obliczenia stężenia molowego (ilości cząsteczek) za pomocą równania Avogadro:

$$DNA(\text{copy}) = \frac{6.02 \times 10^{23} (\text{copies mol}^{-1}) \times DNA \text{ amount (g)}}{DNA \text{ length (bp)} \times 660 (\text{g mol}^{-1} \text{ bp}^{-1})}$$

Następnie przygotowywano szereg dziesięciokrotnych rozcieńczeń produktów PCR, obejmujące stężenia od 1×10^7 cząsteczek w 1 µl do 10 cząsteczek w 1 µl. Dla każdego

stężenia przeprowadzono co najmniej dwie niezależne reakcje PCR w czasie rzeczywistym, w której uzyskiwano parametr (C_t).

Następnie przygotowano wykres opisujący logarymiczną zależność pomiędzy stężeniem produktów a parametrem C_t .

Ostatecznie obliczano równanie opisujące logarymiczną zależność stężenia produktów i parametrów C_t , która była podstawą do obliczenia stężenia produktów pochodzących z RNA izolowanych od pacjentów. Dzięki temu uzyskiwano bezwzględne wartości dla każdego z pacjentów, które następnie można było porównywać.

Dodatkowo, w celu normalizacji wyników, zastosowano geny o niezmiennym stopniu ekspresji w każdej komórce – geny referencyjne (ang. *housekeeping genes*). W badaniach zastosowano następujące z nich: β -actin, B2M, GAPDH, HPRT1, MRLP19, których ekspresja została uśredniona celem skorygowania ekspresji badanych genów.

Technika *Real-time PCR* (RT-PCR)

1 μ l danego cDNA lub DNA dodano do mieszaniny reakcyjnej złożonej z 12,5 μ l 2x Maxima® SYBR Green/ROX qPCRMaster Mix (Fermentas), 1 μ l specyficznej pary starterów (f.c. 0,3 μ M) i 10,5 μ l H₂O. Sekwencje starterów dla oceny całkowitego RNA IGF-1 oraz izoform mRNA IGF-1, genów referencyjnych w obecnej pracy, zostały pierwotnie opracowane przez M. Koczorowską [Koczorowska 2012] i opublikowane przez autorkę także w piśmiennictwie [Koczorowska i wsp., 2011]. Dla celów obecnych badań startery zamówione zostały w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów, Instytutu Biochemii i Biofizyki, Polskiej Akademii Nauk w Warszawie (Tabela 6).

Tabela 6. Sekwencje nukleotydów i specyfikacja starterów zastosowanych w badaniach *real-time PCR*.

Zastosowanie	Długość produktu (par zasad)	Sekwencje
Całkowity IGF-1	160	5'-CATGTCCTCCTCGCATCTCT-3' (F)
		5'-ATACCCTGTGGGCTTGTGTA-3' (R)
Klasa I (P1) IGF-1	102	5'-CAGCAGTCTTCCAACCCA-3' (F)
		5'-CACAGCGCCAGGTAGAAGAGATGC-3' (R)
Klasa II (P2) IGF-1	101	5'-CACCTACAGTGAAGATGCACACC-3' (F)
		5'-CGTCTCCGGTCCAGCCGTGGC-3' (R)
IGF-1A	144	5'-TCGTGGATGAGTGCTGCTTCCG-3' (F)
		5'-TCAAATGTA CTTCTTCTGGGTCTTG-3' (R)
IGF-1B	140	5'-ATCTACCAACAAGAACACG-3' (F)
		5'-TACTTCCAATCTCCCTCC-3' (R)
IGF-1C	126	5'-ACCAACAAGAACACGAAGTC-3' (F)
		5'-CATGTCACTCTTCACTCCTC-3' (R)
Geny referencyjne:		
GAPDH	199	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3' (F)
		5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3' (R)
HPRT	156	5'-CTGAGGATTTGGAAAGGGTG-3' (F)
		5'-AATCCAGCAGGTCAGCAAAC-3' (R)
B2M	137	5'-CTCACGTCATCCAGCAGAGA-3' (F)
		5'-AAGACAAGTCTGAATGCTCCA-3' (R)
MRLP19	171	5'-ACTTTATAATCCTCGGGTC-3' (F)
		5'-ACTTTCAGCTCATTAACAG-3' (R)
β-aktyna	169	5'-TCTGGCACCACACCTTCTAC-3' (F)
		5'-GATAGCACAGCCTGGATAGC-3' (R)

Objaśnienia: GAPDH (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) – dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego; HPRT (HPGRT) (ang. *hypoxanthineguanine phosphoribosyltransferase*) – fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa; B2M (ang. *beta-2-microglobulin*) – beta-2-mikroglubulina; MRLP19 (ang. *mitochondrial ribosomal protein L19*) - 39S mitochondrialne białko rybosomów L19 u ssaków

Reakcje PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono w probówkach *twin.tec real-time PCR plater* zamknięte za pomocą folii. Reakcja zachodziła w termocyklerze *Mastercycler ep realplex²* (Eppendorf). Korzystano z następującego programu PCR: (1) denaturacja wstępna 95°C, 10 min. (2) denaturacja 95°C, 15 s, (3) wiązanie starterów 60°C, 30 s, (4) reakcja polimerazy – wydłużanie produktów 72°C, 30 s. Stosowano 40-50 cykli powtarzając procesy 2-4. Dodatkowo specyficzność powstających produktów badano poprzez wykres krzywej topnienia (ang. *melting curve*) oraz produkty analizowano w 2% żelu agarozowym (stwierdzano, czy powstający produkt odpowiada założonym odległościom pomiędzy starterami). Wszystkie reakcje PCR były powtarzane dwu lub trzykrotnie (trzykrotnie w przypadku, kiedy wyniki różniły się o więcej niż 15%).

3.3.5. Metody statystyczne

Obliczenia statystyczne wykonano dzięki współpracy z Zakładem Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. med. Elżbieta Kaczmarek).

W pierwszym etapie analizy statystycznej weryfikowano zgodność wszystkich uzyskanych wyników z rozkładem Gauss'a przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Większość badanych parametrów nie miała rozkładu normalnego. Następnie obliczono parametry statystyki opisowej (średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, medianę oraz wartość minimalną i maksymalną). Parametry obliczane z zastosowaniem skal półilościowych przedstawiono za pomocą mediany, wartości minimalnej (min.) i maksymalnej (maks.).

Wyniki analizy metodą RT-PCR porównywano w grupie badanej (CRC) i kontroli od tych samych pacjentów (kontrola 1), grupie porównawczej (zmiany nienowotworowe, pseudoguzy) i kontroli od tych samych pacjentów (kontrola 2), grupie badanej i porównawczej. Dla zmiennych niepowiązanych stosowano test Manna-Whitneya (test nieparametryczny dla zmiennych niepowiązanych dla dwóch grup). W przypadku zmiennych powiązanych zastosowano test Wilcoxon.

Dla porównania ekspresji białek wyrażonych w skali IRS oraz wg Gatter i wsp. zastosowano test Friedmana i kolejno test Dunn'a. Zastosowano również test Kruskala-Wallisa i gdy występowały różnice - dodatkowo test wielokrotnych porównań (test Dunn'a). Do porównania procentowego udziału izoform mRNA IGF-1 w całkowitej ekspresji genu IGF-1, zastosowano test różnic między dwoma wskaźnikami struktury. Korelację rang Spearmana zastosowano do skojarzenia wartości zmiennych. Obliczenia wykonano

w programie STATISTICA v. 10.0 firmy StatSoft. Wyniki uznano za statystycznie istotne przy poziomie istotności (p) <0,05.

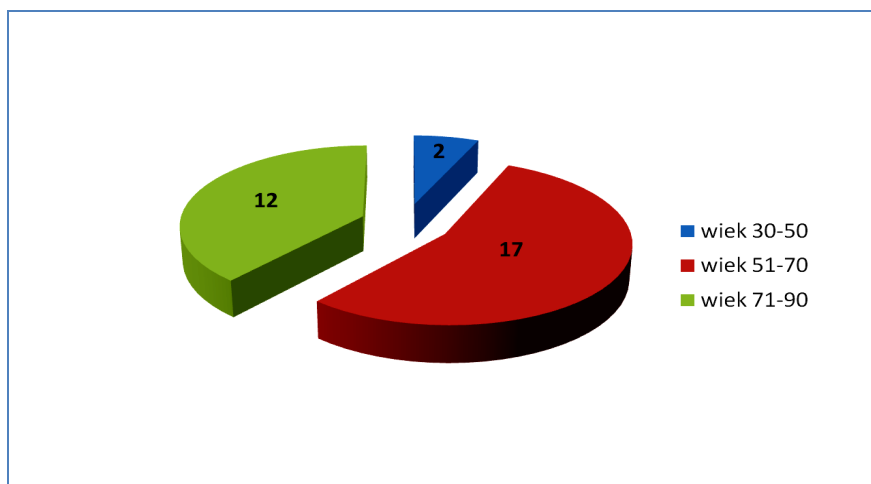
3.3.6. Zagadnienia etyczne

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (nr uchwały 1166/12) z dnia 6 grudnia 2012 roku.

4. WYNIKI

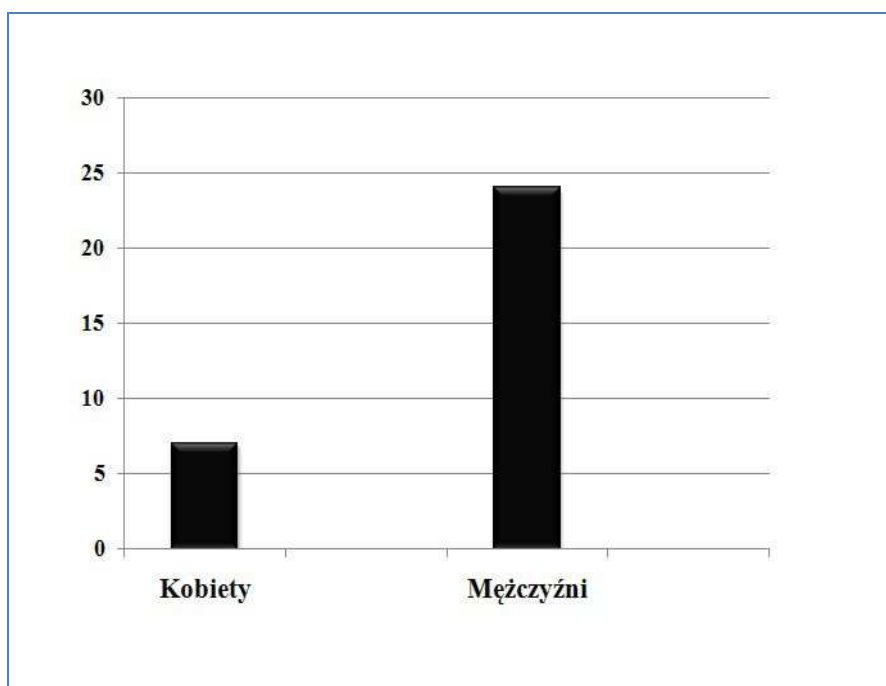
4.1. Dane kliniczne grupy badanej

Grupę badaną stanowiło 31 chorych z rakiem jelita grubego i odbytnicy (CRC). Wiek pacjentów wahał się od 32 do 89 lat (średnia wieku 65 ± 12 lat) (Rycina 3).



Rycina 3. Liczba pacjentów z rakiem jelita grubego (grupa badana) w zależności od wieku.

Wśród chorych z CRC było 7 kobiet (23%) i 24 mężczyzn (77%) (Rycina 4). Średnia wieku kobiet (62 ± 8 lat) i mężczyzn (66 ± 13 lat) nie różniła się istotnie ($p > 0,05$).



Rycina 4. Liczba chorych z CRC w zależności od płci w grupie badanej.

U 4/31 (13%) pacjentów występowały wcześniej gruczolaki jelita grubego (ang. *adenoma coli*), u 6/31 (19%) rozpoznawano polipowatość jelita grubego, u jednego chorego występowały oba w/w schorzenia. Wszystkie zmiany zostały usunięte chirurgicznie w ramach profilaktyki zdrowotnej. U 20/31 (65%) pacjentów nie uzyskano danych co do wcześniejszego wykrywania jakichkolwiek zmian przednowotworowych jelita grubego przed rozpoznaniem CRC.

Podstawowe dane kliniczne wraz z wynikami badań laboratoryjnych tych pacjentów przedstawia Tabela 7.

Średnie wartości hemoglobiny, leukocytów i trombocytów nie różniły się w zależności od płci pacjenta i mieściły się w zakresie wartości referencyjnych. Średnie stężenie glukozy na czczo w całej grupie badanej nieco przekraczało wartości referencyjne, bez istotnych różnic pomiędzy kobietami i mężczyznami z tej grupy.

Tabela 7. Wybrane dane kliniczne i wyniki badań laboratoryjnych pacjentów z CRC.

Cecha statystyczna		n	zakres norm	średnia	mediana	min.	maks.	SD	p testu
Wiek (lata)	K	7	-	61,86	64,00	47,00	72,00	8,15	0,295
	M	24		66,00	68,50	32,00	89,00	12,73	
	Cała grupa	31		65,06	65,00	32,00	89,00	11,86	-
Hemoglobina (g/dl)	K		11,8-15,8	10,71	10,30	9,30	13,40	1,44	0,666
	M			11,05	10,80	8,20	14,00	1,82	
	Cała grupa	30		10,97	10,65	8,20	14,00	1,72	-
Leukocyty (WBC; $\times 10^3/\mu\text{l}$)	K	7	3,60-11,0	9,94	7,41	4,80	18,68	4,97	0,848
	M	23		9,31	8,80	3,54	16,10	3,53	
	Cała grupa	30		9,46	8,59	3,54	18,68	3,82	-
Glukoza (mg/dl)	K	5	60,0-99,0 na czczo	103,20	104,00	80,00	134,00	20,32	0,767
	M	20		107,80	102,50	82,00	150,00	19,54	
	Cała grupa	25		106,88	103,00	80,00	150,00	19,35	-
Płytki krwi ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	K	7	130-400	320,29	234,00	144,00	622,00	180,28	0,532
	M	23		262,35	222,00	143,00	693,00	121,53	
	Cała grupa	30		275,87	224,50	143,00	693,00	136,20	-

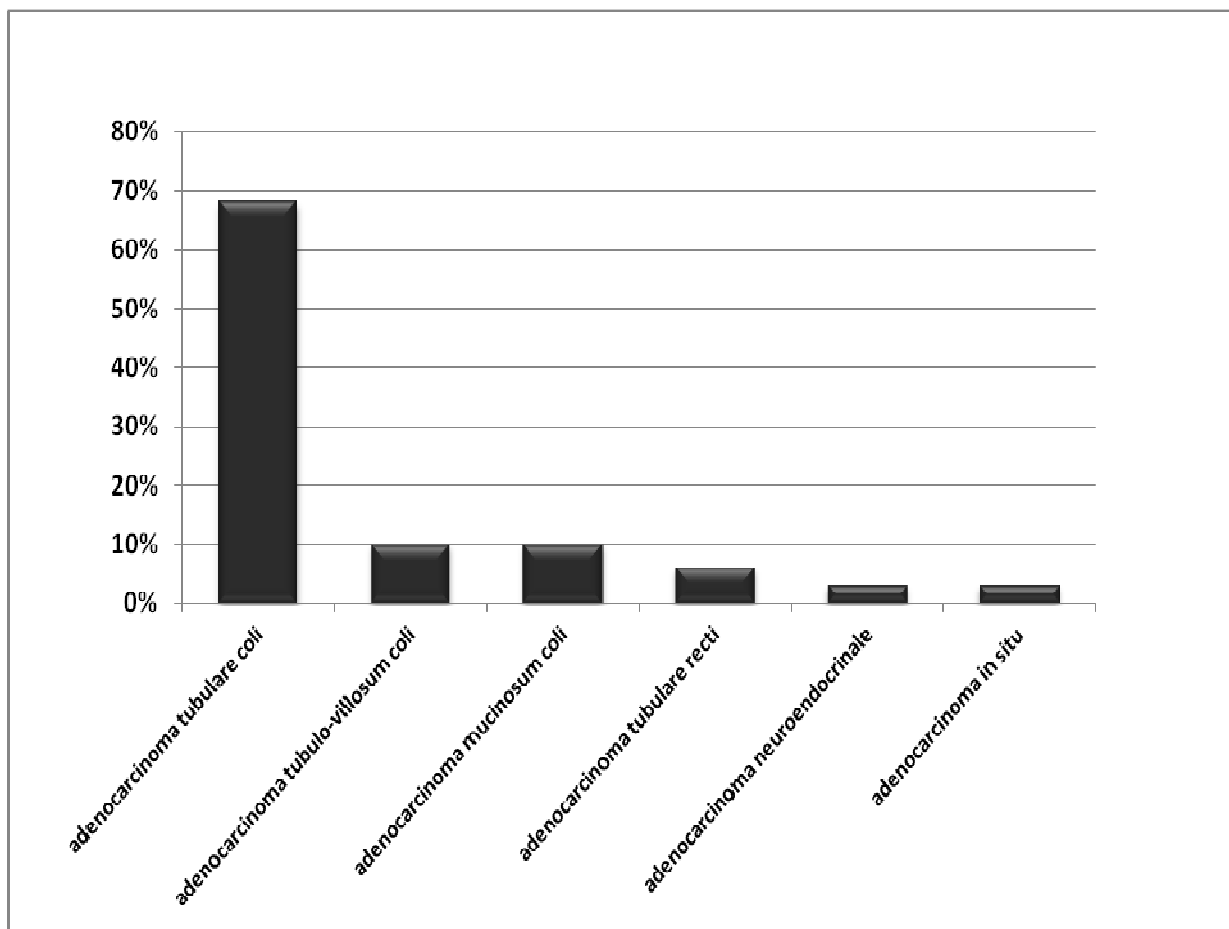
Objaśnienia: K - kobiety; M - mężczyźni; SD - odchylenie standardowe; porównania wykonano z zastosowaniem testu Manna-Whitney'a

4.2. Ocena złośliwości histologicznej (ang. *grade*) i stopnia zaawansowania zmian (ang. *stage*) u pacjentów z CRC

Cała grupa chorych z CRC miała morfologiczne cechy raka gruczołowego jelita grubego (ang. *adenocarcinoma coli*), niezależnie od lokalizacji. Dokładnie u 21 badanych pacjentów (68%) rozpoznano gruczolakoraka cewkowego jelita grubego (*adenocarcinoma tubulare coli*), u trzech pacjentów (10%) gruczolakorak miał cechy gruczolakoraka cewkowo-kosmkowego, u kolejnych trzech (10%) rozpoznano gruczolakoraka śluzotwórczego

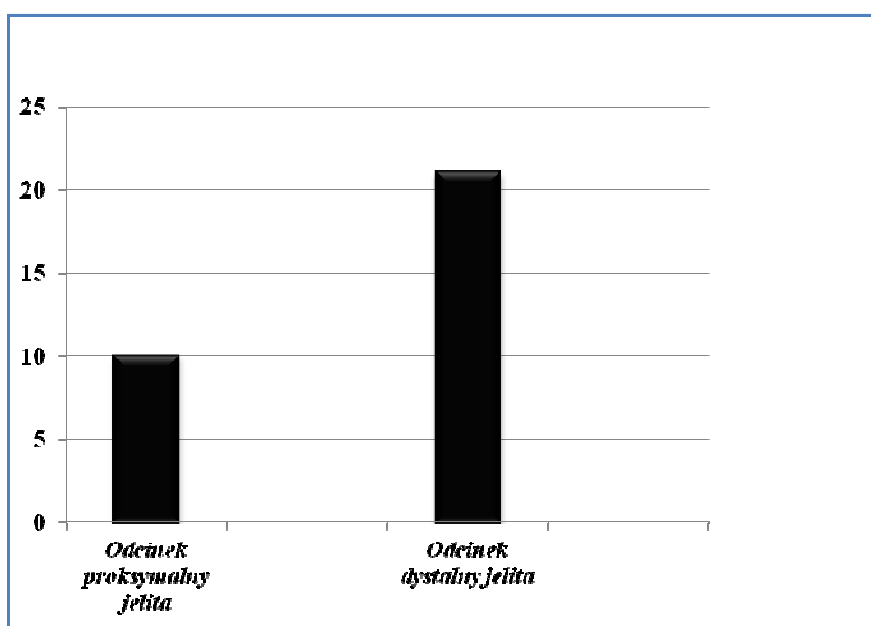
(*adenocarcinoma mucinosum*), a w jednym przypadku rozpoznano guz mieszany z komponentą neuroendokrynową (3%). U dwóch pacjentów (6%) rozpoznanie gruczolakoraka dotyczyło odbytnicy (*adenocarcinoma recti*). W jednym przypadku (3%) postawiono rozpoznanie *adenocarcinoma in situ* (pacjent 5) (Rycina 5).

„Czysty” typ śluzotwórczy CRC (*adenocarcinoma mucinosum*) widoczny był, jak wspomniano, u trzech chorych (10%), a częściową komponentę śluzotwórczą obserwowano dodatkowo u 6 pacjentów (19%) z całej grupy badanej.



Rycina 5. Odsetkowy rozkład typów histologicznych CRC w grupie badanej.

U większej liczby pacjentów, tj. 21/31 (68%) rak obecny był w odcinku dystalnym jelita grubego, a u 10 chorych (32%) guz jelita grubego dotyczył odcinka proksymalnego, jednak nie były to różnice statystycznie istotne ($p=0,058$) (Rycina 6).



Rycina 6. Liczba chorych w zależności od anatomicznego umiejscowienia CRC.

Nowotwór jelita grubego do 3 cm średnicy (makroskopowo typ płaski, ang. *flat*) wykazano u 13 chorych (42%), a o średnicy ≥ 3 cm (makroskopowo typ wypukły, ang. *protruded*) – u 18 pacjentów (58%) i również nie były to różnice statystycznie istotne ($p > 0,05$).

U znamiennej liczby chorych (68%) zmiany tkankowe guzów oceniono na 2 stopień złośliwości histologicznej (*grade 2*) w porównaniu z pozostałymi *grade* ($p < 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8. Ocena złośliwości histologicznej (ang. *grade*) nowotworów u pacjentów z grupy badanej.

<i>Grade*</i>	Liczba pacjentów	% pacjentów
rak nieinwazyjny, <i>ca in situ</i>	1	3
1	1	3
2	21	68
3	8	26
Suma	31	100

Objaśnienia: *ca* – carcinoma; *in situ* – w miejscu; * - parametr oceniony w skali półilościowej (patrz Materiał i Metody)

Rozkład zaawansowania klinicznego CRC (ang *stage*) w chwili postawienia rozpoznania po resekcji guza u badanych pacjentów w połączonej skali Dukesa i Astler-Collera oraz wg UICC/AJCC przedstawia Tabela 9. Najwięcej nowotworów oceniono na *stage* C2

(45%) oraz B2 (23%) w skali Astler-Collera, co odpowiada kategorii B i C także w skali Dukes'a. Innymi słowy u blisko połowy pacjentów (45%) guz jelita grubego przekraczał ścianę jelita i dawał przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych (*stage C2*), u 23% pacjentów guz dosięgł błony mięśniowej jelita, lecz nie było stwierdzanych przerzutów do węzłów chłonnych (*stage B2*). W sumie u 15/31 (48%) pacjentów (litera C w skali Dukes'a i Aster-Collera oraz *stage IIIA-C* w skali wg UICC/AJCC) stwierdzano przerzuty wyłącznie do okolicznych węzłów chłonnych. U czterech pacjentów (13%) występowały przerzuty odległe (do wątroby). Należy dodać, iż wśród tych 4 pacjentów, u trzech z nich stwierdzano równocześnie przerzuty do węzłów chłonnych.

Tabela 9. Ocena stopnia zaawansowania klinicznego (ang. *stage*) raka jelita grubego w skali Dukes'a i Astlera-Collera oraz wg UICC/AJCC w grupie badanej.

Skala oceny <i>stage</i> w CRC			Liczba pacjentów	% pacjentów
Wg Dukes'a	Wg Aster-Collera	Wg UICC/AJCC		
A	A	I	1	3
A	B1	I	3	10
B	B2	IIA, IIB	7	23
B	B3	IIC	-	-
C	C1	IIIA	1	3
C	C1, C2	IIIB	14	45
C	C2, C3	IIIC	-	-
-	D	IV	4	13
<i>Ca in situ</i>	-	0	1	3
Suma			31	100%

Objaśnienia: *ca* – carcinoma; *in situ* – w miejscu

Rozkład liczbowy chorych z CRC grupy badanej w klasyfikacji TNM przedstawiono w Tabeli 10.

Ocena wg klasyfikacji TNM pozwoliła wykazać, iż 25/31 (81%) pacjentów posiadało stopień T3 guza, co oznacza, że nowotwór sięgał do błony surowiczej i/lub naciekał tkanki okołojelitowe. Jak wspomniano, u czterech chorych obserwowano odległe przerzuty nowotworu (wszystkie do wątroby).

Tabela 10. Rozkład liczbowy chorych z grupy badanej w klasyfikacji TNM.

	Klasyfikacja TNM		
	Tis/T2/T3/T4	N0/N1/N2	M0/M1
Liczba chorych	1/4/25/1	14/11/6	27/4

Objaśnienia: T – guz pierwotny (ang. primary tumor); Tis- carcinoma in situ; N – regionalne węzły chłonne (ang. regional lymph nodes); M – odległe przerzuty (ang. distant metastasis)

4.3. Ocena histologiczna CLR (ang. Crohn's disease-like reaction) w grupie badanej

Liczbowe i odsetkowe rozłożenie pacjentów z CRC dotyczące obecności lub braku skupisk tkanki „limfoidalnej” (przypominających grudki chłonne) w 3-stopniowej skali półilościowej przedstawia Tabela 11. U ponad połowy pacjentów wykazano intensywną reakcję zapalną w podścielisku łącznotkankowym guza (grading 2), z obecnością nacieków limfocytarnych przypominających grudki chłonne i zlokalizowanych poza tzw. frontem inwazji guza.

Tabela 11. Ocena parametru CLR (ang. Crohn's disease-like reaction) w nowotworach pacjentów z grupy badanej.

Punkty skali*	Liczba pacjentów	% pacjentów
0	2	6
1	13	42
2	16	52
suma	31	100

Objaśnienia: * - skala półilościowa oceny parametru CLR [Graham i Appelman, 1990] (patrz Materiał i Metody)

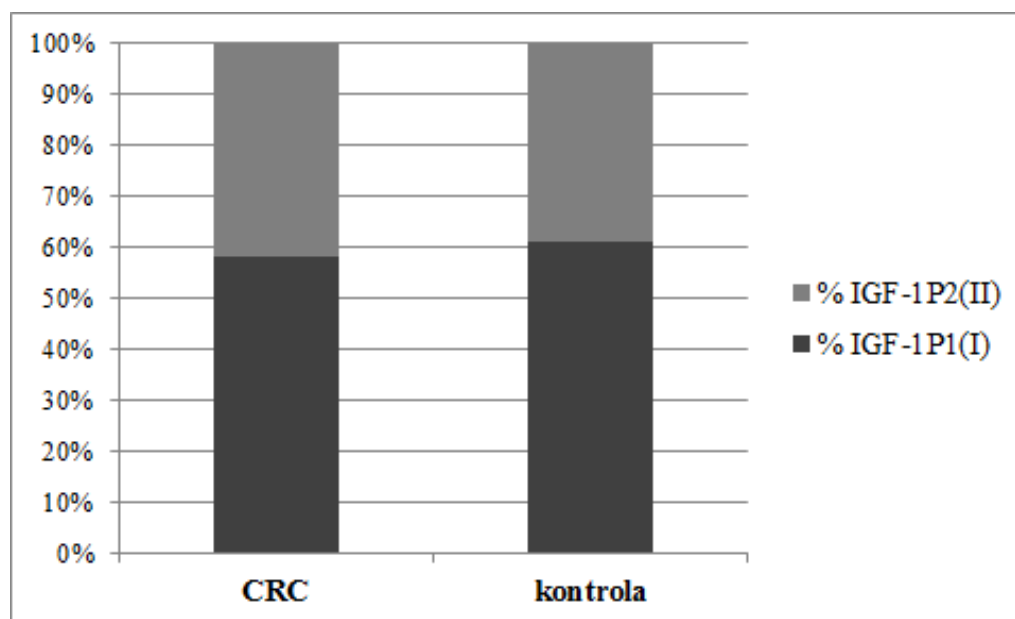
4.4. Ekspresja tkankowa całkowitego mRNA IGF-1 oraz izoform (wariantów) mRNA powstałych w alternatywnym splicingu w grupie badanej

Tkankową ekspresję całkowitego mRNA IGF-1 i wszystkich wariantów mRNA IGF-1 obserwowano u każdego pacjenta zarówno w guzie, jak i niezmięnionej nowotworowo tkance jelita grubego od tego samego pacjenta (kontrola), uwzględniając zarówno alternatywne egzony 1 i 2 (w zależności od użytego promotora P1 - klasa I lub P2 – klasa II transkryptów), jak i alternatywne izoformy splicingowe: IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C.

4.4.1. Procentowy udział transkryptów klasy I (P1) i II (P2) IGF-1 w całkowitej ekspresji genu IGF-1

W grupie CRC odsetkowy udział transkryptów klasy I (z promotora P1) i klasy II (z promotora P2) wyniósł 58% i 42%, zaś w kontroli odpowiednio 61% i 39% (Rycina 7).

W żadnej z tych grup (CRC/kontrola) nie wykazano różnic w odsetkowym rozkładzie ekspresji mRNA P1 w porównaniu z mRNA P2 ($p > 0,05$ dla obu grup).

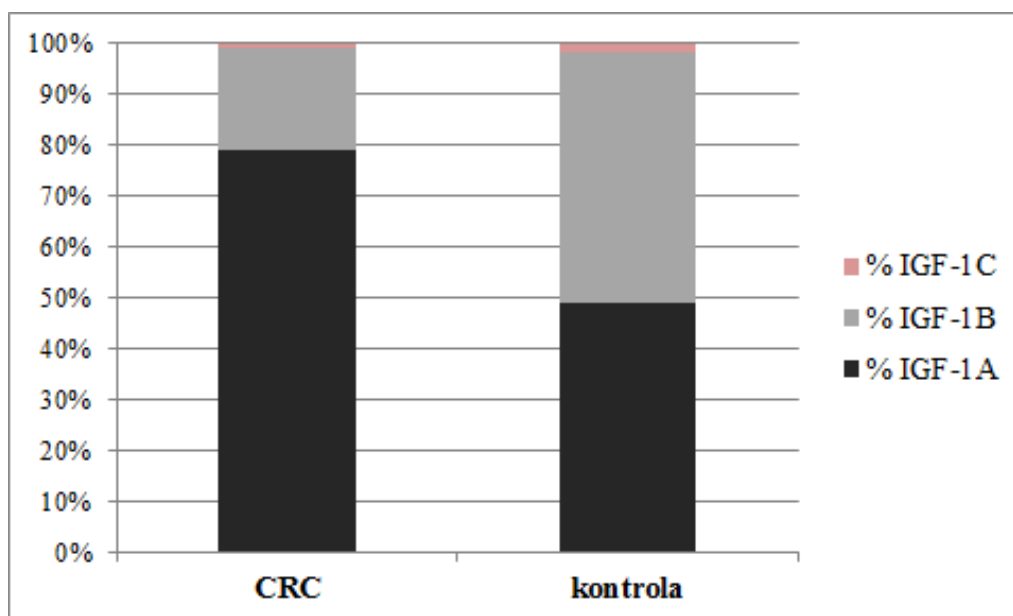


Rycina 7. Procentowy udział izoform mRNA klasy I i II IGF-1 (w zależności od użytego promotora P1 i P2) w całkowitej ekspresji IGF-1 w tkankach nowotworu jelita grubego (CRC) i kontrolnym jelicie grubym.

4.4.2. Procentowy udział izoform mRNA IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C w całkowitej ekspresji genu IGF-1

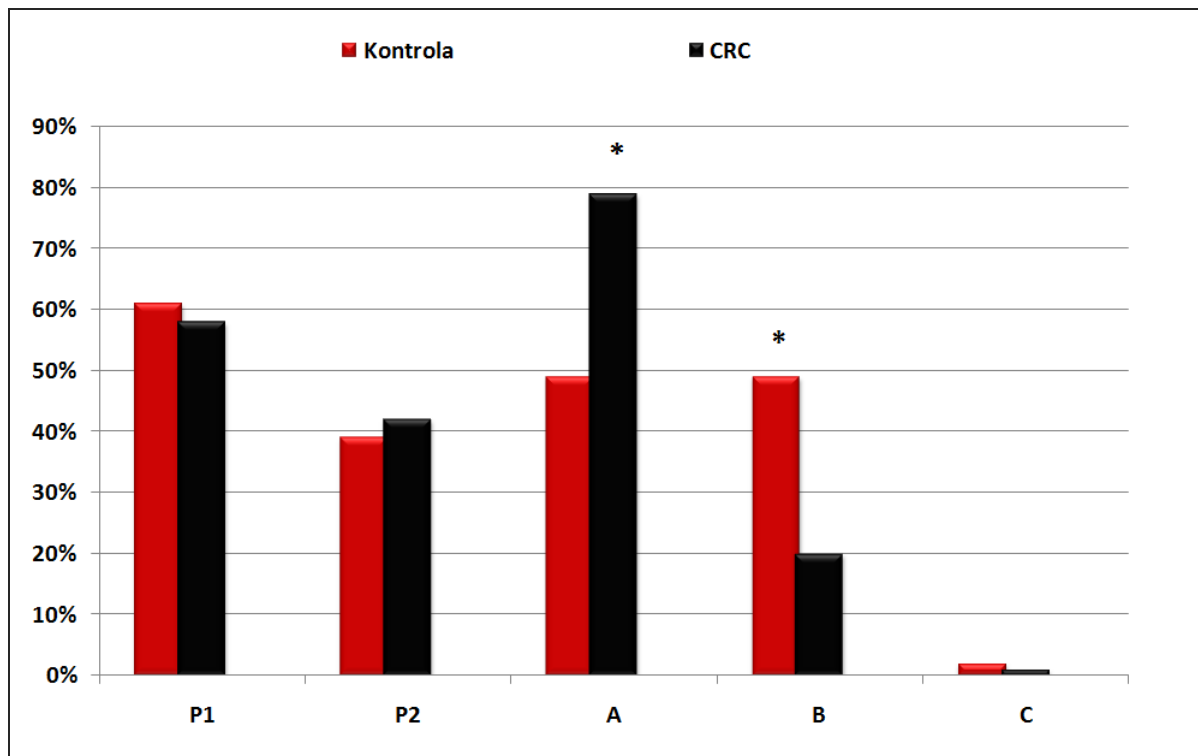
U pacjentów z CRC odsetkowy udział ekspresji izoformy splicingowej mRNA IGF-1A był największy i stanowił 79% wszystkich transkryptów. Ekspresje izoform mRNA IGF-1B i IGF-1C utrzymane były na niższym poziomie (20% i 1%, odpowiednio). Różnice statystycznie istotne wykazano pomiędzy procentem udziału izoformy mRNA A i B, A i C, oraz B i C ($p < 0,05$ we wszystkich przypadkach).

W grupie kontrolnej odsetkowy udział ekspresji mRNA IGF-1A (49%) i IGF-1B (49%) był identyczny, najmniejszy procentowy udział dotyczył ekspresji izoformy mRNA IGF-1C (2%) (Rycina 8). Istotne różnice obserwowano pomiędzy procentowym udziałem izoformy mRNA IGF-1A i C oraz B i C.



Rycina 8. Procentowy udział izoform mRNA IGF-1 (IGF-1A, IGF-1B, IGF-1C) w całkowitej ekspresji mRNA IGF-1 u chorych z rakiem jelita grubego (CRC) i w kontroli.

Porównując odsetkowy udział wszystkich badanych izoform mRNA IGF-1 dla grupy CRC i kontroli, procentowy udział ekspresji izoformy IGF-1A był istotnie wyższy u chorych z CRC w stosunku do kontroli (79% vs. 49%), zaś odsetek ekspresji izoformy mRNA IGF-1B niższy niż w kontroli (20% vs. 49%) ($p < 0,05$ w obu przypadkach). Nie wykazano istotnych różnic w odsetkowo wyrażonej ekspresji I i II klasy transkryptów (z promotora P1 i P2) w obu porównywanych grupach (Rycina 9).

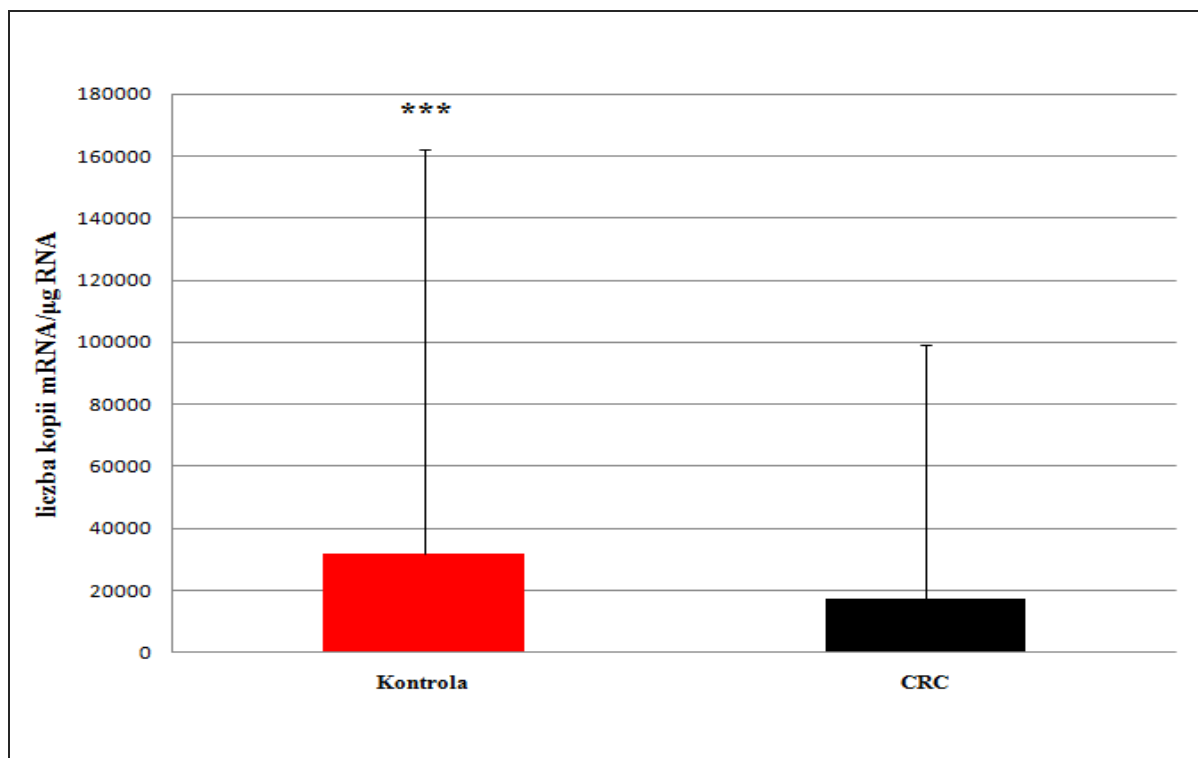


Rycina 9. Porównanie procentowego udziału wszystkich badanych izoform mRNA IGF-1 u chorych z CRC i w kontroli; * - $p < 0,05$ pomiędzy grupami.

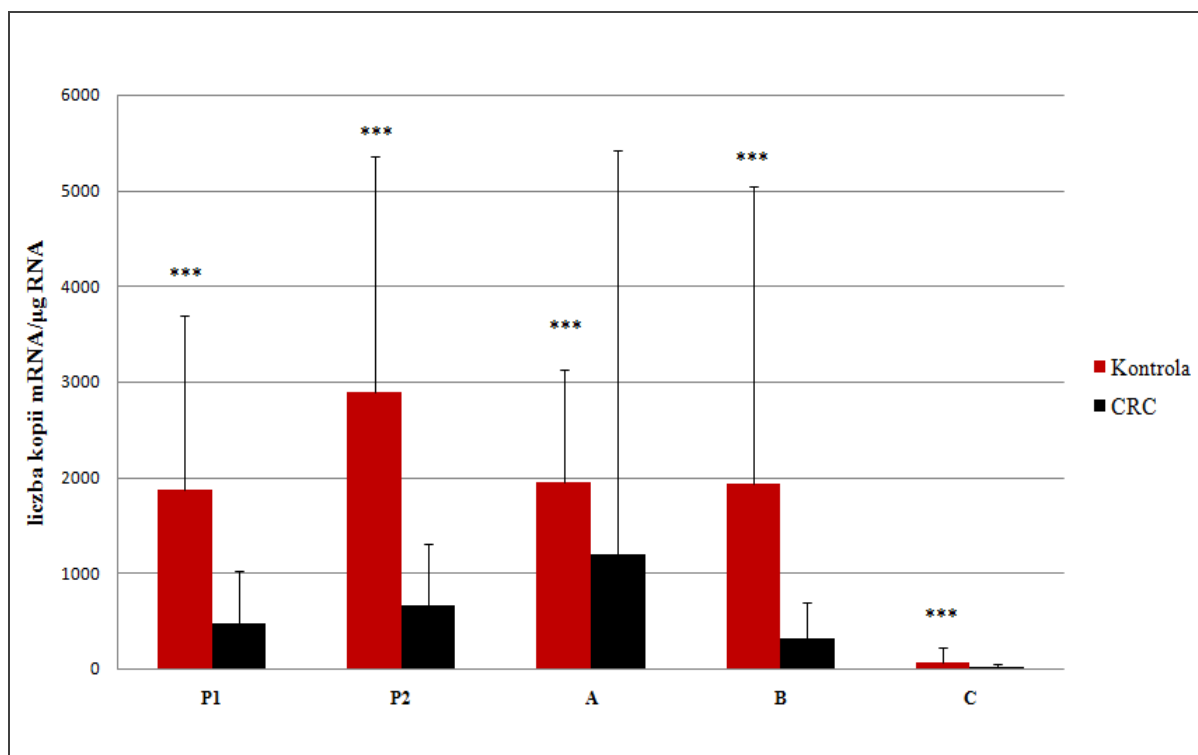
4.4.3. Ilościowa ekspresja mRNA IGF-1 i wariantów transkryptów w grupie badanej i w kontroli

Ilościową ekspresję całkowitego mRNA IGF-1 i jego izoform (P1, P2, A, B, C) podano w liczbie kopii odpowiedniego mRNA na mikrogram RNA.

Ekspresja całkowitego mRNA w tkankach nowotworowo zmienionych (grupa badana) była istotnie niższa (17115 ± 82183) w porównaniu z tkanką niezmienną morfologicznie (kontrola) (32029 ± 130217) ($p < 0,001$) (Rycina 10). Podobnie przedstawiały się wyniki porównawczej analizy ekspresji poszczególnych izoform mRNA w grupie badanej i kontroli. W każdym przypadku obserwowano niższą ekspresję izoform mRNA w nowotworze jelita grubego w porównaniu z kontrolą (Tabela 12 i Rycina 11).



Rycina 10. Porównanie ilościowej ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 (liczba kopii mRNA/μg RNA) w CRC i kontroli; *** - $p < 0,001$ pomiędzy grupami.



Rycina 11. Porównanie ilościowej ekspresji poszczególnych izoform mRNA IGF-1 (P1, P2, A, B i C) (liczba kopii mRNA/μg RNA) w CRC i kontroli; *** - $p < 0,001$ pomiędzy grupami.

Tabela 12. Porównanie ilościowej ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 oraz wszystkich izoform mRNA IGF-1 (liczba kopii mRNA/ μ g RNA) u chorych z CRC i w kontroli (test Wilcoxon).

	grupa (n=31)	średnia\pmSD	p testu
Całk. mRNA IGF-1	CRC	17115 \pm 82183	<0,001
	kontrola	32029 \pm 130217	
Wariant (izoforma) mRNA			
IGF-1 P1 (klasa I)	CRC	474 \pm 552	<0,001
	kontrola	1870 \pm 1826	
IGF-1 P2 (klasa II)	CRC	661 \pm 646	<0,001
	kontrola	2891 \pm 2465	
IGF-1A	CRC	1193 \pm 4235	<0,001
	kontrola	1951 \pm 1773	
IGF-1B	CRC	305 \pm 390	<0,001
	kontrola	1928 \pm 3111	
IGF-1C	CRC	14 \pm 31	<0,001
	kontrola	66 \pm 156	

Objaśnienia: p – poziom istotności; SD- odchylenie standardowe

Nie stwierdzono różnic w ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 czy izoform/klas mRNA IGF-1 w materiale tkankowym (CRC/kontrola) pomiędzy kobietami i mężczyznami (Tabela 13). Natomiast analizując oddzielnie każdą płć, np. kobiety - wykazano zmniejszoną ekspresję izoform mRNA P1, A i B w tkance raka jelita grubego w porównaniu z prawidłowym jelitem grubym u tej płci, a u mężczyzn te istotnie niższe wartości w porównaniu z kontrolą dotyczyły ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 oraz wszystkich jego izoform ($p < 0,05$) (Tabela 13).

Tabela 13. Różnice w ekspresji izoform i klas mRNA IGF-1 (średnia \pm SD) w zależności od płci chorych z CRC (test Manna-Whitney'a).

Transkrypt	grupa	kobiety (n=7)	mężczyźni (n=24)	p testu
całk. mRNA IGF-1	CRC	70768 \pm 171525	1467 \pm 1736	0,182
	kontrola	111494 \pm 273498	8851 \pm 11018*	0,764
<i>Izoforma mRNA</i>				
IGF-1 P1	CRC	485 \pm 480	471 \pm 581	0,835
	kontrola	1950 \pm 2040*	1846 \pm 1806**	0,982
IGF-1 P2	CRC	886 \pm 766	596 \pm 609	0,532
	kontrola	2092 \pm 1366	3124 \pm 2680***	0,661
IGF-1A	CRC	594 \pm 674	1367 \pm 4810	0,764
	kontrola	1707 \pm 1274*	2012 \pm 1912**	0,982
IGF-1B	CRC	552 \pm 646	233 \pm 257	0,274
	kontrola	1230 \pm 1391	2132 \pm 3453**	0,982
IGF-1C	CRC	12 \pm 14	15 \pm 34	0,216
	kontrola	161 \pm 319*	39 \pm 42**	0,341

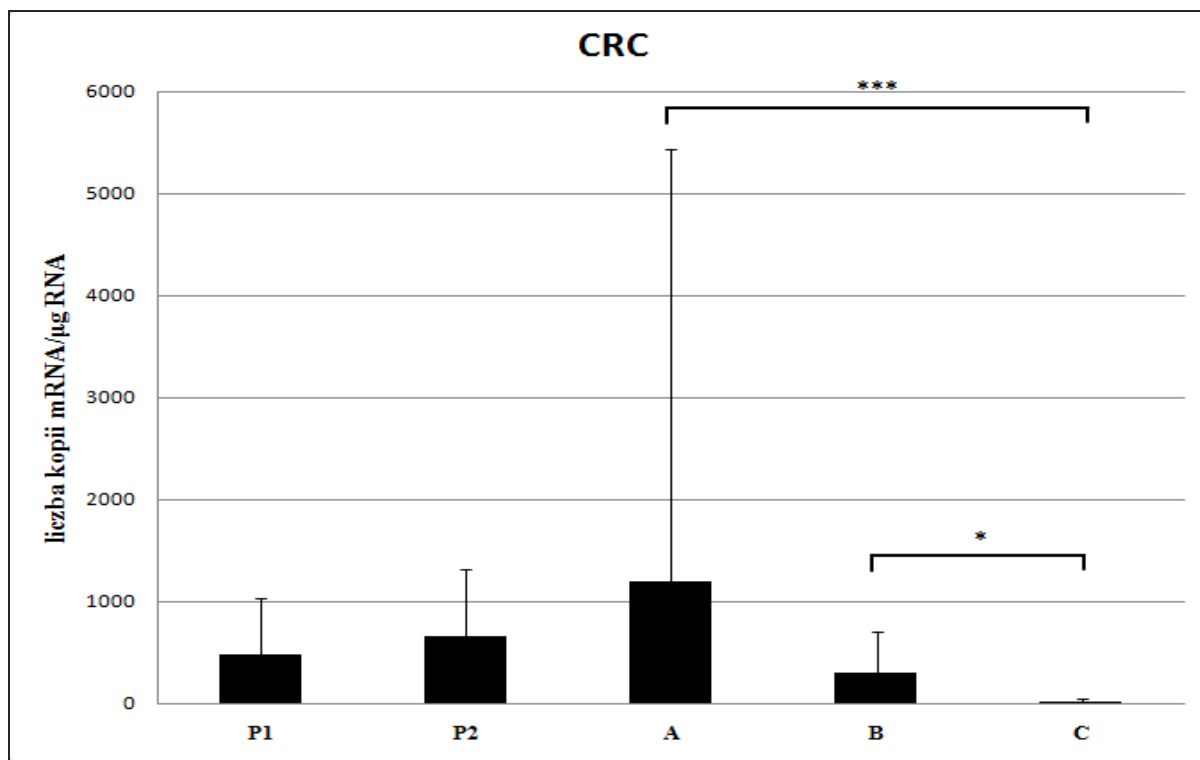
Objaśnienia: p – poziom istotności; *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,01$ - pomiędzy CRC i kontrolą w grupie kobiet i mężczyzn (test Wilcoxon)

4.4.4. Porównanie wzajemnej ilościowej ekspresji izoform mRNA IGF-1 w obrębie danej grupy

4.4.4.1. Grupa badana (CRC)

Ilościowa analiza z zastosowaniem RT-PCR ujawniła, iż wśród izoform mRNA określających klasę I (P1) i II (P2) tych wariantów mRNA, ekspresja mRNA P2 (661 \pm 646) w porównaniu z P1 (474 \pm 552) nie różniła się istotnie ($p > 0,05$).

Spośród wariantów A, B i C mRNA IGF-1, różnice znamienne testem Dunn'a wykazano pomiędzy ekspresją izoformy A (więcej) i C ($p < 0,001$) oraz między ekspresją izoformy B (więcej) i C ($p < 0,05$) (Rycina 12).

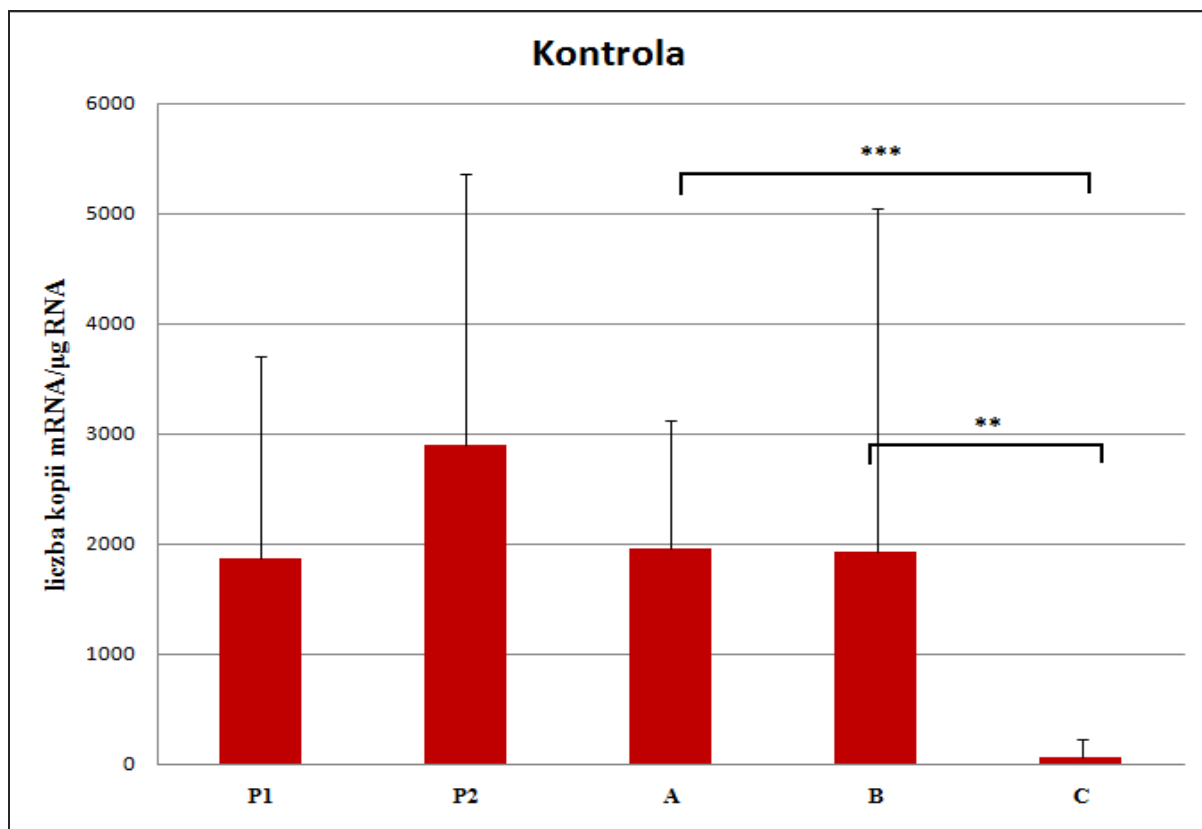


Rycina 12. Porównawcza analiza wzajemnej ilościowej ekspresji izoform mRNA IGF-1 (P1, P2, A, B, C) (liczba kopii mRNA/μg RNA) w CRC; *** - $p < 0,001$; * - $p < 0,05$.

4.4.4.2. Grupa kontrolna

Analiza ilościowa z zastosowaniem RT-PCR w materiale kontrolnym ujawniła, iż również wśród izoform mRNA określających klasę I i II tych wariantów (P1 i P2) w tej podgrupie, ekspresja mRNA P2 (2891 ± 2465) w porównaniu z P1 (1870 ± 1826), nie różniły się znacząco ($p > 0,05$).

Spośród wariantów A, B i C izoform mRNA IGF-1, podobnie jak w CRC, ilościowo podobna była ekspresja mRNA IGF-1A i B, a najmniejsza ekspresja dotyczyła wariantu C mRNA IGF-1. Różnice znaczące wykazano (podobnie jak w grupie z CRC) pomiędzy ekspresją izoform mRNA A (więcej) i C ($p < 0,001$) oraz B (więcej) i C ($p < 0,01$) (Rycina 13).



Rycina 13. Porównawcza analiza wzajemnej ilościowej ekspresji izoform mRNA IGF-1 (P1, P2, A, B, C) (liczba kopii mRNA/ μ g RNA) w kontroli; *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$.

4.5. Ekspresja mRNA antygeny proliferacyjnego Ki-67 w grupie CRC i w kontroli

Ekspresję mRNA Ki-67 (liczba kopii mRNA/ μ g RNA) wykazano we wszystkich badanych tkankach grupy badanej i kontroli, jednak nie obserwowano różnic istotnych pomiędzy grupami, a także w zależności od płci pacjenta w każdej z grup (Tabela 14).

Tabela 14. Różnice w ekspresji mRNA Ki-67 (średnia \pm SD) w grupie badanej (CRC) i w kontroli (test Wilcoxon) oraz w zależności od płci pacjenta w obu grupach (test Manna-Whitney'a).

mRNA Ki-67			
Grupa badana (CRC) (n=28)	Kontrola (n=29)	Grupa badana (CRC)	
		Kobiety (n=7)	Mężczyźni (n=21)
187346 \pm 122084	216964 \pm 190614	207197 \pm 169743	180729 \pm 106270
p=0,873		p=0,959	
		Kontrola	
		Kobiety (n=7)	Mężczyźni (n=22)
		118702 \pm 91357	248230 \pm 204494
		p=0,098	

Objaśnienia: n – liczba pacjentów; p – poziom istotności

4.6. Korelacje pomiędzy wzajemną ekspresją izoform mRNA IGF-1 w grupie CRC i w kontroli

Zarówno w CRC, jak i w kontroli obserwowano wysokie pozytywne korelacje pomiędzy ekspresją mRNA IGF-1 i wszystkich izoform transkryptów (Tabele 15 i 16).

Tabela 15. Wartości współczynników korelacji Spearmana dla ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 oraz różnych izoform (A, B, C, P1 i P2) transkryptu genu w raku jelita grubego (CRC).

Transkrypt	całk. IGF-1	IGF-1 P1	IGF-1 P2	IGF-1A	IGF-1B	IGF-1C
całk. IGF-1	-	0,688	0,576	0,628	0,459	0,821
IGF-1 P1	0,688	-	0,751	0,948	0,397	0,765
IGF-1 P2	0,576	0,751	-	0,794	0,829	0,616
IGF-1A	0,628	0,948	0,794	-	0,475	0,748
IGF-1B	0,459	0,397	0,829	0,475	-	0,375
IGF-1C	0,821	0,765	0,616	0,748	0,375	-

Objaśnienia: wytłuszczoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których $p < 0,05$

Tabela 16. Wartości współczynników korelacji Spearmana dla wzajemnej ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 oraz różnych izoform (A, B, C, P1 i P2) transkryptu genu w kontroli.

Transkrypt	całk. IGF-1	IGF-1 P1	IGF-1 P2	IGF-1A	IGF-1B	IGF-1C
całk. IGF-1	-	0,799	0,284	0,598	0,161	0,754
IGF-1 P1	0,799	-	0,492	0,871	0,305	0,714
IGF-1 P2	0,284	0,492	-	0,774	0,913	0,512
IGF-1A	0,598	0,871	0,774	-	0,609	0,670
IGF-1B	0,161	0,305	0,913	0,609	-	0,477
IGF-1C	0,754	0,714	0,512	0,670	0,477	-

Objaśnienia: wytłuszczoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których $p < 0,05$

4.7. Immunohistochemiczna (IHC) analiza lokalizacji i nasilenia ekspresji IGF-1 oraz wybranych białek proliferacyjnych i wskaźników apoptozy w CRC i w kontroli

4.7.1. Białko IGF-1

Badanie IHC dotyczące wykrywania białka IGF-1 wykonano na skrawkach parafinowych materiału tkankowego utrwalonego rutynowo w zbuforowanej formalinie, uzyskanych od pacjentów z CRC. Kontrolę stanowiły morfologicznie prawidłowe fragmenty ściany jelita grubego od tych samych pacjentów. Kontrolę pozytywną dla oceny reakcji IHC na IGF-1 stanowiły skrawki parafinowe z fragmentami zdrowej wątroby ludzkiej.

Pozytywną reakcję IHC na białko IGF-1 udało się wykazać w 14/31 przypadkach CRC (45%) i w 11/31 (35%) fragmentach kontrolnego jelita grubego i nie były to różnice statystycznie istotne ($p > 0,05$).

Ekspresja IGF-1 była bardzo zróżnicowana indywidualnie, od silnego homogenego (lub ziarnistego) typu zabarwienia większości komórek raka (Tablica 1A), poprzez słabszą intensywność reakcji IHC (Tablica 1B), do nielicznych neoplastycznie zmienionych komórek CRC z wyraźnie przypadkową lokalizacją produktu barwnego na to białko (Tablica 1C). Niekiedy występowała słaba rozsiana w całej komórce, reakcja barwna (Tablica 1D). Białko zlokalizowane było w cytoplazmie transformowanych komórek CRC (Tablica 1A-E) lub prawidłowych komórek nabłonka gruczołowego (Tablica 1F). Pozytywnym odczynem na IGF-1 cechowały się także pojedyncze komórki limfoidalne obecne w podścielisku łącznotkankowym guza (Tablica 1E). We fragmentach prawidłowego jelita grubego, IGF-1 zlokalizowano zarówno w komórkach błony śluzowej nabłonka oraz krypt jelitowych (Tablica 1F), jak również w komórkach tkanki łącznej (*lamina propria*), oraz komórkach mięśniowych gładkich błony mięśniowej (Tablica 1G).

W kontroli pozytywnej (wątroba) uzyskano intensywny i wyraźny odczyn barwny, zlokalizowany w cytoplazmie większości widocznych w polu widzenia hepatocytów (Tablica 1H).

Nie obserwowano uprzywilejowanych miejsc wykrywania IGF-1 w obrębie badanego fragmentu guza jelita grubego (centrum, obrzeże guza) czy ściany prawidłowego jelita grubego.

W obu badanych fragmentach jelita grubego (CRC/kontrola) wykonano także ocenę półilościową ekspresji białka IGF-1 w skali wg Remmele i Stegner i wyniki te porównano z zastosowaniem odpowiednich testów statystycznych. Nasilenie reakcji IHC na to białko nie różniło się istotnie pomiędzy grupą badaną (CRC) a kontrolą (Tabela 17).

4.7.2. Antygen proliferacyjny Ki-67

Obserwowano wyłącznie jądrową lokalizację białka Ki-67 z różnym odsetkiem immunopozytywnych komórek i zróżnicowanym stopniem nasilenia reakcji barwnej. W CRC wykrywano często szczególnie nasiloną reakcję na Ki-67, obecną w niekiedy bardzo licznych polimorficznych jądrach transformowanych komórek raka (Tablica 2A). Pozytywny odczyn IHC w skrawkach kontrolnych widoczny był głównie w jądrach przypodstawnie zlokalizowanych komórek nabłonka gruczołowego (Tablica 2B). Pozytywną reakcję na to białko (wykrywalność) obserwowano u 25/31 (81%) pacjentów z CRC i w 20/27 skrawkach kontrolnych (74%) i nie były to różnice znamienne ($p > 0,05$).

Obliczenia ilościowe (wyłącznie jądrowa lokalizacja białka), wykazały istotnie wyższą ekspresję Ki-67 w rakach jelita grubego w porównaniu z kontrolą (Tabela 17).

Tabela 17. Ocena ekspresji IGF-1 i wybranych białek cyklu komórkowego oraz apoptozy w CRC (grupa badana) i kontroli z zastosowaniem skal półilościowych (test Wilcoxon).

Wykrywany antygen*	grupa	n	mediana	min.	maks.	p testu
IGF-1	CRC	31	0,00	0,00	12,00	0,642
	kontrola	31	0,00	0,00	12,00	
Ki-67	CRC	31	3,00	0,00	4,00	<0,001
	kontrola	27	1,00	0,00	3,00	
PCNA	CRC	31	4,00	3,00	4,00	0,002
	kontrola	27	3,00	1,00	4,00	
Cyklina D1	CRC	28	0,00	0,00	3,00	0,005
	kontrola	25	0,00	0,00	0,00	
p53	CRC	31	2,00	0,00	4,00	<0,001
	kontrola	31	0,00	0,00	0,00	
Kaspaza-3	CRC	30	3,00	0,00	6,00	0,020
	kontrola	28	3,00	0,00	6,00	
Bcl-2	CRC	28	0,00	0,00	3,00	_**
	kontrola	24	0,00	0,00	3,00	
Białko AKT	CRC	31	0,00	0,00	8,00	0,173
	kontrola	27	0,00	0,00	8,00	

*Objaśnienia: n – liczba pacjentów; * - skala półilościowa oceny reakcji IHC (patrz Materiał i Metody); ** - ze względu na identyczne wyniki, nie dało się ich porównać statystycznie*

4.7.3. Pozostałe białka proliferacyjne: PCNA i cyklina D1

Białko PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) również lokalizowało się w jądrach komórkowych (Tablica 2C-D). W przypadku tkanek zmienionych nowotworowo, pozytywna reakcja IHC na PCNA obejmowała bardzo liczne jądra morfologicznie zmienionego nabłonka gruczołowego, ale także komórek podścieliska łącznotkankowego (Tablica 2C). W skrawkach kontrolnej błony śluzowej, obejmowała głównie dzielące się komórki u podstawy krypt jelitowych (Tablica 2D). Badanie IHC cykliny D1 wykazało obecność tego białka również na terenie jąder komórkowych i to zarówno w CRC (Tablica 2E), jak i kontroli (Tablica 2F).

Należy zaznaczyć, iż wykrywalność PCNA w obu badanych fragmentach tkanek (rak/kontrola) była 100%, natomiast w przypadku cykliny D1 – w CRC wykrywano jej obecność jedynie w 11/28 (39%) przebadanych tkanek, a nie wykryto w żadnym preparacie kontrolnym. Zarówno w CRC, jak i w kontroli, nasilenie reakcji IHC na oba białka było wyższe w CRC w porównaniu z kontrolą (Tabela 17).

4.7.4. Białka proapoptotyczne: p53 i kaspaza-3

Białko p53 wykrywano w jądrach komórek nowotworowych u 19/31 (61%) pacjentów, a nie wykryto w żadnym fragmencie prawidłowego jelita grubego. Reakcja IHC na to białko w CRC była z reguły bardzo intensywna i obejmowała często niemalże wszystkie transformowane komórki guza (Tablica 2G), choć obserwowano i fragmenty tkanek CRC gdzie wykrywalność białka dotyczyła tylko niektórych, zwłaszcza polimorficznych jąder komórkowych (Tablica 2H).

Aktywną formę kaspazy-3 jako przedstawiciela efektorowej fazy apoptozy obserwowano natomiast w cytoplazmie komórek leżących w obrębie zmienionych nowotworowo krypt jelitowych (Tablica 3A). W kontroli obserwowano pozytywną reakcję IHC w cytoplazmie komórek gruczołowych krypt oraz komórek nacieków zapalnych (Tablica 3B). Częstość występowania ekspresji tego białka (wykrywalność) była znamienne wyższa w CRC (90%) w porównaniu z kontrolą (59% tkanek) ($p < 0,05$). Pod względem ilościowym wykazano również istotnie większą ekspresję tego białka w CRC niż w kontroli ($p < 0,05$) (Tabela 17).

4.7.5. Białko antyapoptotyczne Bcl-2

Zarówno w CRC, jak i tkankach kontrolnych jelita grubego, pozytywną reakcję na białko antyapoptotyczne Bcl-2 wykrywano w pojedynczych komórkach zmienionych morfologicznie oraz licznych naciekowych komórkach limfoidalnych w podścielisku łącznotkankowym (Tablica 3C) i to u pojedynczych chorych (u dwóch pacjentów z całej grupy badanej i

kontrolnej, 7%). Dominowała lokalizacja dookoła jądra komórkowego (Tablica 3C). W kontroli również wykrywano bardzo słaby odczyn barwny na to białko (Tablica 3D). W związku z tak małym odsetkiem immunopozytywnych komórek i identycznym w obu grupach nie dało się tych wyników porównać statystycznie (Tabela 17).

4.7.6. Białko AKT

Białko to należy ufosforylowanych postaci kinaz białkowych z rodziny AKT (Akt-1, -2, -3). Antygen ten zlokalizowano głównie w cytoplazmie komórek raka jelita grubego (Tablica 3E-G) czy komórek gruczolowych prawidłowej błony śluzowej jelita (Tablica 3H). W przypadku komórek CRC fragmenty guza różniły się intensywnością reakcji IHC, od intensywnej, głównie przy szczycie komórki (Tablica 3E), do słabszej rozsianej po cytoplazmie całej komórki (Tablica 3F-G).

Ekspresję białka AKT w CRC wykazano u 13/31 (42%) pacjentów, w porównaniu z 6/27 (22%) fragmentami odpowiedniej kontroli, jednak nie były to różnice statystycznie znamienne ($p > 0,05$). Nie uchwycono również różnic statystycznie istotnych w nasileniu reakcji immunohistochemicznej pomiędzy grupami ($p < 0,05$) (Tabela 17).

4.8. Korelacje pomiędzy ekspresją IGF-1 (mRNA i białko) a ekspresją wybranych białek proliferacji komórkowej i apoptozy w grupie CRC

Badania obecne nie wykazały istotnej statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją całkowitego mRNA IGF-1 i samego peptydu IGF-1 w grupie badanej ($p > 0,05$) (Tabela 18). Ekspresja całkowitego mRNA IGF-1 nie była również skorelowana z ekspresją żadnego z białek proliferacyjnych, apoptozy czy białka AKT. Na uwagę zasługuje jednak wykazanie dość silnych pozytywnych korelacji pomiędzy ekspresją izoformy mRNA P2 i IGF-1B a ekspresją mRNA Ki-67. Innymi słowy wraz ze wzrostem wskaźnika proliferacji Ki-67 na poziomie mRNA, wzrastała ekspresja dwóch wariantów mRNA IGF-1, tj. mRNA promotora 2 IGF-1 i wariantu mRNA IGF-1B. Nie było takich korelacji pomiędzy ekspresją Ki-67 na poziomie białka z ekspresją powyższych wariantów mRNA IGF-1.

Słabe i zaskakująco negatywne korelacje wykazano natomiast pomiędzy ekspresją izoformy mRNA P1 i IGF-1A a ekspresją białka proliferacyjnego PCNA.

Negatywna korelacja (również dosyć słaba) dotyczyła również ekspresji izoform mRNA IGF-1P2 i IGF-1A i ekspresji białka antyapoptotycznego Bcl-2.

Natomiast ekspresja izoformy mRNA IGF-1B pozytywnie korelowała w badanym materiale tkankowym z ekspresją markera aktywnej apoptozy, tj. kaspazy-3 (dosyć słaba korelacja).

Z ekspresją przedstawiciela białek apoptozy (aktywna kaspaza-3) korelowała pozytywnie także ekspresja mRNA Ki-67 w badanych rakach jelita grubego.

Ekspresja białka Ki-67 korelowała pozytywnie z ekspresją białka p53 ($r=0,654$, wysoki współczynnik korelacji) (Tabela 18).

Tabela 18. Wartości współczynników korelacji Spearmana pomiędzy ekspresją IGF-1 (białko, mRNA), izoform mRNA IGF-1 oraz ekspresją markerów proliferacji komórkowej i apoptozy w raku jelita grubego (CRC).

	białko IGF-1	mRNA Ki-67	białko Ki-67	PCNA	cyklina D1	p53	kaspaza-3	Bcl-2	AKT
całk. mRNA IGF-1	-0,232	0,238	-0,142	-0,206	0,012	0,066	0,289	-0,292	0,216
białko IGF-1	-	0,300	0,104	0,158	-0,245	-0,084	0,314	0,111	-0,199
mRNA P1	-0,188	0,278	0,063	-0,396	-0,107	0,047	0,122	-0,343	0,137
mRNA P2	0,054	0,442	0,168	-0,124	-0,093	0,130	0,294	-0,395	0,103
mRNA IGF-1A	-0,065	0,372	0,109	-0,387	-0,192	0,031	0,160	-0,412	0,054
mRNA IGF-1B	0,117	0,477	0,038	0,074	-0,061	0,060	0,379	-0,326	0,049
mRNA IGF-1C	-0,114	0,210	0,023	-0,321	-0,064	0,130	0,222	-0,343	0,022
mRNA Ki-67	0,300	-	0,025	-0,230	-0,035	-0,070	0,459	-0,164	-0,200
białko Ki-67	0,104	0,025	-	-0,176	0,162	0,654	0,089	-0,009	-0,083

Objaśnienia: wytłuszczoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r , dla których $p < 0,05$

4.9. Korelacje pomiędzy ekspresją IGF-1 (mRNA i białko) a ekspresją wybranych białek proliferacji komórkowej i apoptozy w grupie kontrolnej

Badania obecne nie wykazały również istotnej statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją całkowitego mRNA IGF-1 i samego peptydu IGF-1 w kontrolnym jelicie grubym ($p>0,05$) (Tabela 19). Badanie korelacji pomiędzy ekspresją IGF-1 na poziomie mRNA i białek proliferacyjnych we fragmentach kontrolnego jelita grubego wykazało zaskakująco negatywne korelacje pomiędzy ekspresją niektórych izoform mRNA IGF-1 (P2, B i C) a ekspresją samego białka IGF-1. Zarówno ekspresja całkowitego mRNA IGF-1, jak i samego białka IGF-1 były negatywnie skorelowane z ekspresją PCNA, czyli wraz ze wzrostem proliferacji, malała ekspresja IGF-1 (mRNA, dojrzałe białko). Dla ekspresji całkowitego transkryptu IGF-1 dodatkowo wykazano negatywną korelację z ekspresją białka antyapoptotycznego Bcl-2. Ekspresja izoformy P1 także wykazywała negatywną korelację z ekspresją białka Bcl-2 oraz Ki-67. Ekspresja izoformy IGF-1B była natomiast pozytywnie skorelowana zarówno z ekspresją białka Bcl-2, jak i białka AKT (Tabela 19).

Tabela 19. Wartości współczynników korelacji Spearmana pomiędzy ekspresją IGF-1 (białko, mRNA), izoformami mRNA oraz ekspresją markerów proliferacji komórkowej i apoptozy w kontroli.

	białko IGF-1	mRNA Ki-67	białko Ki-67	PCNA	kaspaza-3	Bcl-2	AKT
całk. mRNA IGF-1	-0,112	0,068	-0,184	-0,420	-0,346	-0,479	-0,285
białko IGF-1	-	0,021	-0,114	-0,454	-0,156	-0,226	-0,365
mRNA P1	-0,128	0,206	-0,414	-0,199	-0,262	-0,414	-0,130
mRNA P2	-0,486	0,232	0,392	0,269	0,012	0,392	0,303
mRNA IGF-1A	-0,296	0,286	0,076	0,066	-0,163	-0,044	0,022
mRNA IGF-1B	-0,554	0,063	0,154	0,274	-0,025	0,457	0,427
mRNA IGF-1C	-0,493	0,037	0,175	0,167	-0,219	0,022	0,156
mRNA Ki-67	0,021	-	0,150	0,052	-0,119	0,150	-0,164
białko Ki-67	-0,114	0,128	-	0,507	0,201	0,148	0,379

Objaśnienia: wytłuszczoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r , dla których $p<0,05$. Niemożliwa była ocena korelacji pomiędzy ekspresją badanych wariantów transkryptów i białka IGF-1 a ekspresją p53 i cykliny D1, gdyż te ostatnie białka nie ulegały ekspresji w kontroli.

4.10. Ekspresja IGF-1 (mRNA, białko) oraz Ki-67 (mRNA, białko) a wybrane dane kliniczne pacjentów z rakiem jelita grubego (CRC)

4.10.1. Ekspresja IGF-1 i Ki-67 a stopień złośliwości histologicznej (ang. *grade*)

Wyniki te przedstawiono w Tabeli 20. Nie udało się wykazać różnic statystycznie istotnych w ekspresji składników systemu IGF-1 (mRNA, białko), różnych izoform mRNA IGF-1 oraz ekspresji antygenu Ki-67 (mRNA i białko) w zależności od stopnia histologicznej złośliwości CRC (ang. *grade*, *G*). Należy dodać, iż ze względu na liczebność porównywanych grup, analizę tę można było przeprowadzić jedynie dla parametru G2 (n=21) i G3 (n=8). *Grade* 1 dotyczył jednego guza (pacjent 29, Tabela 1, p. Materiał i Metody).

Tabela 20. Porównanie ilościowej ekspresji całkowitego IGF-1 (mRNA, białko) i wszystkich izoform mRNA IGF-1 oraz Ki-67 (mRNA i białko) w zależności od stopnia złośliwości histologicznej (G2 i G3) raka jelita grubego (CRC) (test Manna-Whitney'a).

Transkrypt/białko	n	grupa	średnia	mediana	min.	maks.	SD	P testu
całk. mRNA IGF-1	21	G2	23047,04	867,50	61,34	458963,00	99893,22	0,301
	8	G3	5378,61	1608,62	162,46	30369,41	10262,04	
IGF-1 białko*	21	G2	-	0,00	0,00	12,00	-	0,520
	8	G3	-	0,00	0,00	6,00	-	
mRNA IGF-1P1	21	G2	444,76	167,25	15,01	1969,20	589,26	0,218
	8	G3	578,84	418,74	74,99	1586,59	541,73	
mRNA IGF-1P2	21	G2	571,95	530,50	1,00	2117,19	603,31	0,139
	8	G3	930,04	752,09	114,48	2324,08	771,23	
mRNA IGF-1A	21	G2	1482,00	128,80	8,00	23855,21	5146,73	0,114
	8	G3	638,10	334,99	196,09	1934,00	627,44	
mRNA IGF-1B	21	G2	209,26	127,78	0,20	640,58	232,91	0,168
	8	G3	524,84	368,51	3,00	1875,00	612,93	
mRNA IGF-1C	21	G2	16,73	2,89	0,31	158,11	36,37	0,582
	8	G3	10,63	7,51	0,00	40,19	13,14	
mRNA Ki-67	18	G2	194126,43	182380,32	20329,34	456320,95	120770,06	0,644
	8	G3	179703,27	114491,33	15779,50	428517,47	138189,34	
białko Ki-67*	21	G2	-	3,00	0,00	4,00	-	0,140
	8	G3	-	2,00	0,00	4,00	-	

Objaśnienia: n – liczba osób; * - ekspresja oszacowana w skali półilościowej (p. Materiał i Metody); G (ang. grade) 2,3 odpowiednio; p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe

4.10.2. Ekspresja markerów proliferacji komórkowej i apoptozy a stopień złośliwości histologicznej (ang. *grade*)

Ze względu na zbyt małą liczebność grupy z *grade* 1 (G1) porównanie wykonano jedynie pomiędzy tkankami raka ze stopniem złośliwości histologicznej G2 i G3.

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w ekspresji białek proliferacji komórkowej (PCNA, cyklina D1), białek apoptozy (p53, kaspaza 3), białka anty-apoptotycznego Bcl-2 oraz białka AKT pomiędzy tkankami z *grade* 2 i 3 raka jelita grubego. Istotnie większą ekspresję białka p53 wykazano natomiast u chorych z niższym stopniem zróżnicowania/złośliwości histologicznej (G2) w porównaniu z G3 (Tabela 21).

Tabela 21. Porównanie ilościowej ekspresji markerów proliferacji komórkowej i apoptozy w zależności od stopnia złośliwości histologicznej (G2 i G3) CRC (test Manna-Whitney'a).

Marker*	n	grupa	mediana	min.	maks.	p testu
PCNA	21	G2	4,00	3,00	4,00	0,980
	8	G3	4,00	3,00	4,00	
Cyklina D1	20	G2	0,00	0,00	3,00	0,500
	8	G3	0,00	0,00	1,00	
p53	21	G2	2,00	0,00	4,00	0,050
	8	G3	0,00	0,00	3,00	
Kaspaza-3	21	G2	3,00	0,00	6,00	0,800
	7	G3	3,00	0,00	6,00	
Bcl-2	20	G2	0,00	0,00	3,00	0,730
	7	G3	0,00	0,00	0,00	
Białko AKT	21	G2	0,00	0,00	6,00	0,580
	8	G3	1,50	0,00	8,00	

Objaśnienia: n – liczba pacjentów; * - skala półilościowa oceny reakcji IHC (patrz *Materiał i Metody*)

4.10.3. Ekspresja IGF-1, Ki-67, białek proliferacji komórkowej oraz apoptozy a nasilenie zmian zapalnych (parametr CLR) w grupie badanej

Udało się porównać nasilenie ekspresji IGF-1 i Ki-67 jedynie dla wartości 1 (n=13) oraz 2 (n=16) dla parametru CLR (ang. *Crohn's disease-like reaction*). Nie wykazano istotnych

statystycznie różnic w ekspresji IGF-1 (mRNA, warianty mRNA, białko) oraz Ki-67 (mRNA i białko) pomiędzy różnymi wartościami CLR, tj. obecnością mniejszych lub większych skupisk komórek limfoidalnych w ścianie jelita grubego z CRC ($p > 0,05$ we wszystkich przypadkach) (Tabela 22).

Nie wykazano również istotnych statystycznie różnic w ekspresji białek proliferacji i apoptozy komórek w CRC, u których porównano parametr CLR 1 i 2 ($p > 0,05$ we wszystkich przypadkach) (Tabela 22).

Tabela 22. Porównanie ilościowej ekspresji całkowitego IGF-1 (mRNA, białko) i wszystkich izoform mRNA IGF-1, Ki-67 (mRNA i białko) oraz białek proliferacyjnych i apoptozy w zależności od parametru CLR (1 i 2) w grupie badanej (test Manna-Whitney'a).

Transkrypt/białko	n	CLR*	średnia	mediana	min.	maks.	SD	p testu
całk. mRNA IGF-1	13	1	1464,85	867,50	102,00	6393,91	1891,20	0,184
	16	2	31956,90	1474,85	104,56	458963,00	114102,85	
IGF-1 białko*	13	1	-	3,00	0,00	12,00	-	0,232
	16	2	-	0,00	0,00	12,00	-	
mRNA IGF-1P1	13	1	577,14	342,50	26,03	1969,20	677,25	0,914
	16	2	444,46	318,30	23,90	1586,59	456,42	
mRNA IGF-1P2	13	1	684,25	618,80	22,00	2117,19	579,07	0,779
	16	2	713,25	495,76	1,00	2324,08	720,43	
mRNA IGF-1A	13	1	2257,38	258,50	65,29	23855,21	6509,58	0,846
	16	2	457,53	262,79	8,00	1934,00	520,41	
mRNA IGF-1B	13	1	303,16	127,78	0,20	779,63	315,21	0,812
	16	2	337,19	149,78	9,45	1875,00	464,70	
mRNA IGF-1C	13	1	22,31	2,89	0,00	158,11	44,82	0,619
	16	2	9,38	5,20	0,31	41,00	12,87	
mRNA Ki-67	11	1	207724,92	237523,68	15779,50	456320,95	118935,44	0,474
	15	2	185773,45	172621,58	20329,34	428517,47	129533,37	
białko Ki-67*	13	1	-	3,00	0,00	4,00	-	0,746
	16	2	-	3,00	0,00	4,00	-	
PCNA*	13	1	-	4,00	3,00	4,00	-	0,374
	16	2	-	4,00	3,00	4,00	-	
cyklina D1*	13	1	-	0,00	0,00	3,00	-	0,418
	13	2	-	1,00	0,00	1,00	-	
p53*	13	1	-	0,00	0,00	4,00	-	0,199
	16	2	-	2,50	0,00	4,00	-	
kaspaza-3*	13	1	-	3,00	0,00	6,00	-	0,525
	15	2	-	3,00	0,00	6,00	-	
Bcl-2*	13	1	-	0,00	0,00	0,00	-	0,511
	13	2	-	0,00	0,00	3,00	-	
białko AKT*	13	1	-	0,00	0,00	8,00	-	0,948
	16	2	-	1,50	0,00	6,00	-	

Objaśnienia: n – liczba osób; * - ekspresja oszacowana w skali półilościowej (p. Materiał i Metody); CLR (ang. Crohn's disease-like reaction) 1, 2 odpowiednio; p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe

4.10.4. Porównanie ekspresji wybranych składników osi IGF (mRNA i białko), Ki-67 (mRNA i białko) oraz markerów proliferacyjnych i apoptozy w rakach o typie śluzotwórczym i pozostałych nowotworach jelita grubego

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w ekspresji składników osi IGF-1 na poziomie mRNA i białka, porównując typ śluzotwórczy gruczolakoraka (*adenocarcinoma mucinosum/partim mucinosum*) z pozostałymi typami CRC. Nie było także istotnych różnic w ekspresji antygenu Ki-67 (mRNA i białko) między tymi grupami (Tabela 23).

Tabela 23. Ilościowa ekspresja całkowitego IGF-1 (mRNA, białko) i wszystkich izoform mRNA IGF-1 oraz Ki-67 (mRNA i białko) u pacjentów z *adenocarcinoma mucinosum* vs. pozostałe typy raków jelita grubego (test Manna-Whitney'a).

Transkrypt/białko	n	grupa	średnia	mediana	min.	maks.	SD	p testu
całk. mRNA IGF-1	9	<i>mucinosum</i>	4148,73	486,24	162,46	30369,41	9873,83	0,623
	22	pozostałe	22419,95	1204,60	61,34	458963,00	97519,09	
białko IGF-1*	9	<i>mucinosum</i>	-	3,00	0,00	12,00	-	0,403
	22	pozostałe	-	0,00	0,00	12,00	-	
mRNA IGF-1P1	9	<i>mucinosum</i>	483,11	342,50	32,16	1535,50	545,26	0,848
	22	pozostałe	470,74	287,64	15,01	1969,20	567,85	
mRNA IGF-1P2	9	<i>mucinosum</i>	673,16	618,80	114,48	1514,00	517,32	0,507
	22	pozostałe	656,12	495,76	1,00	2324,08	702,49	
mRNA IGF-1A	9	<i>mucinosum</i>	571,70	296,61	65,29	1934,00	638,83	0,428
	22	pozostałe	1447,11	231,42	8,00	23855,21	5023,58	
mRNA IGF-1B	9	<i>mucinosum</i>	423,81	127,78	3,00	1875,00	612,15	0,814
	22	pozostałe	256,29	142,96	0,20	779,63	257,52	
mRNA IGF-1C	9	<i>mucinosum</i>	8,50	1,27	0,00	37,00	12,12	0,781
	22	pozostałe	16,60	3,78	0,31	158,11	35,58	
mRNA Ki-67	9	<i>mucinosum</i>	207581,83	220851,94	15779,50	428517,47	130792,88	0,468
	19	pozostałe	177760,31	172621,58	20329,34	456320,95	120215,97	
białko Ki-67*	9	<i>mucinosum</i>	-	2,00	0,00	4,00	-	0,104
	22	pozostałe	-	3,00	0,00	4,00	-	

Objaśnienia: n – liczba osób; p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe; * - ekspresja oszacowana w skali półilościowej (p. Materiał i Metody)

Nie wykazano różnic statystycznie istotnych w ekspresji markerów proliferacyjnych, białek apoptozy i białka AKT pomiędzy *adenocarcinoma mucinosum/partim mucinosum* a pozostałymi typami nowotworów jelita grubego ($p > 0,05$ w każdym przypadku) (Tabela 24).

Tabela 24. Ilościowa ekspresja markerów proliferacyjnych, białek apoptozy i białka AKT u chorych z *adenocarcinoma mucinosum* vs. pozostałe typy raka jelita grubego (test Manna-Whitney'a).

Marker*	n	grupa	mediana	min.	maks.	p testu
PCNA	9	<i>mucinosum</i>	4,00	3,00	4,00	0,848
	22	pozostałe	4,00	3,00	4,00	
Cyklina D1	8	<i>mucinosum</i>	0,00	0,00	3,00	0,566
	20	pozostałe	0,00	0,00	1,00	
p53	9	<i>mucinosum</i>	0,00	0,00	3,00	0,064
	22	pozostałe	2,00	0,00	4,00	
Kaspaza-3	8	<i>mucinosum</i>	3,00	0,00	6,00	0,730
	22	pozostałe	3,00	0,00	6,00	
Bcl-2	8	<i>mucinosum</i>	0,00	0,00	0,00	0,709
	20	pozostałe	0,00	0,00	3,00	
Białko AKT	9	<i>mucinosum</i>	0,00	0,00	8,00	0,781
	22	pozostałe	0,00	0,00	6,00	

Objaśnienia: n – liczba pacjentów; * - skala półilościowa oceny reakcji IHC (patrz *Materiał i Metody*)

4.10.5. Ekspresja IGF-1 i Ki-67 a makroskopowy typ raka jelita grubego

Nie udało się wykazać różnic w ekspresji IGF-1 i jego izoform mRNA oraz antygenu Ki-67 (mRNA i białko) pomiędzy makroskopowo płaskim i wypukłym typem raka jelita grubego (Tabela 25).

Tabela 25. Porównanie ilościowej ekspresji całkowitego IGF-1 (mRNA, białko) i wszystkich izoform mRNA IGF-1 oraz Ki-67 (mRNA i białko) w zależności od makroskopowego typu CRC (test Manna-Whitney'a).

Transkrypt/białko	n	grupa	średnia	mediana	min.	maks.	SD	P testu
całk. mRNA IGF-1	13	F	1563,92	867,50	112,97	6393,91	2059,94	0,708
	18	P	28347,02	1398,74	61,34	458963,00	107691,28	
białko IGF-1*	13	F	-	0,00	0,00	6,00	-	0,650
	18	P	-	1,50	0,00	12,00	-	
mRNA IGF-1P1	13	F	596,48	342,50	26,03	1969,20	671,78	0,352
	18	P	386,11	213,13	15,01	1582,13	447,31	
mRNA IGF-1P2	13	F	791,99	597,66	94,20	2324,08	715,23	0,352
	18	P	566,52	352,56	1,00	2013,12	593,28	
mRNA IGF-1A	13	F	509,47	258,50	69,12	1665,87	549,56	0,650
	18	P	1686,59	263,31	8,00	23855,21	5552,11	
mRNA IGF-1B	13	F	298,79	255,99	3,00	743,48	269,89	0,767
	18	P	309,36	103,89	0,20	1875,00	466,20	
mRNA IGF-1C	13	F	13,05	3,26	0,00	62,63	20,16	0,922
	18	P	15,11	3,10	0,31	158,11	36,99	
mRNA Ki-67	11	F	142414,86	115136,14	15779,50	273451,53	86082,58	0,147
	17	P	216418,76	237523,68	20329,34	456320,95	135032,74	
białko Ki-67*	13	F	-	3,00	0,00	4,00	-	0,418
	18	P	-	1,50	0,00	4,00		

Objaśnienia: n – liczba osób; * - ekspresja oszacowana w skali półilościowej (p. *Materiał i Metody*); F – płaski (ang. *flat*) typ; P (ang. *protruded*) – wypukły typ CRC; p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe

4.10.6. Ekspresja markerów proliferacji komórkowej i apoptozy a makroskopowy typ raka jelita grubego

Biorąc pod uwagę makroskopowy typ raka, tj. płaski (ang. *flat*, F) vs. wypukły (ang. *protruded*, P), jedynie w przypadku aktywnej kaspazy-3, wykazano znamienne większą ekspresję tego markera apoptozy w wypukłym w porównaniu z płaskim typem CRC (Tabela 26).

Tabela 26. Porównanie ilościowej ekspresji markerów proliferacji komórkowej i apoptozy w zależności od makroskopowego typu (płaski, wypukły) CRC (test Manna-Whitney'a).

Marker*	n	grupa	mediana	min.	maks.	p testu
PCNA	13	F	4,00	3,00	4,00	0,828
	18	P	4,00	3,00	4,00	
Cyklina D1	13	F	1,00	0,00	1,00	0,294
	15	P	0,00	0,00	3,00	
p53	13	F	0,00	0,00	4,00	0,294
	18	P	2,00	0,00	4,00	
Kaspaza-3	13	F	3,00	0,00	6,00	0,015
	17	P	3,00	3,00	6,00	
Bcl-2	13	F	0,00	0,00	3,00	0,964
	15	P	0,00	0,00	3,00	
Białko AKT	13	F	3,00	0,00	8,00	0,294
	18	P	0,00	0,00	6,00	

Objaśnienia: n – liczba pacjentów; * - skala półilościowa oceny reakcji IHC (patrz *Materiał i Metody*); F – płaski (ang. flat); P – wypukły (ang. protruded)

4.10.7. Ekspresja IGF-1 i Ki-67 a lokalizacja raka jelita grubego

Nie udało się wykazać różnic w ekspresji IGF-1 i różnych izoform mRNA genu IGF-1 oraz Ki-67 (mRNA, białko) w zależności od proksymalnego czy dystalnego umiejscowienia raka jelita grubego (Tabela 27).

Podobnie w kontrolnej tkance jelita grubego nie uzyskano istotnych różnic w ekspresji IGF-1 (mRNA i różne warianty mRNA, białko) oraz Ki-67 (mRNA, białko) w zależności od odcinka jelita grubego (proksymalny, dystalny) ($p > 0,05$ we wszystkich przypadkach) (Aneks, załącznik nr 2).

Tabela 27. Porównanie ilościowej ekspresji całkowitego IGF-1 (mRNA, białko) i wszystkich izoform mRNA IGF-1 oraz Ki-67 (mRNA i białko) w zależności od lokalizacji CRC (odcinek proksymalny vs. dystalny) (test Manna-Whitney'a).

Transkrypt/białko	n	odcinek jelita grubego	średnia	mediana	min.	maks.	SD	P testu
całk. mRNA IGF-1	10	P	1427,19	1013,62	102,00	5764,52	1747,15	0,492
	21	D	24585,97	1015,78	61,34	458963,00	99739,90	
białko IGF-1*	10	P	-	0,00	0,00	12,00	-	0,819
	21	D	-	0,00	0,00	12,00	-	
mRNA IGF-1P1	10	P	474,15	287,64	23,90	1586,59	592,22	0,852
	21	D	474,42	342,50	15,01	1969,20	547,47	
mRNA IGF-1P2	10	P	496,01	306,91	22,00	2324,08	682,75	0,184
	21	D	739,67	621,32	1,00	2117,19	628,83	
mRNA IGF-1A	10	P	443,77	264,73	18,46	1342,50	478,18	0,917
	21	D	1549,72	258,50	8,00	23855,21	5137,02	
mRNA IGF-1B	10	P	127,79	96,41	0,20	476,95	146,22	0,087
	21	D	389,28	255,99	3,00	1875,00	442,39	
mRNA IGF-1C	10	P	10,16	3,64	0,31	40,19	15,30	0,574
	21	D	16,20	3,26	0,00	158,11	35,93	
mRNA Ki-67	9	P	187345,92	185788,49	62966,51	333215,33	95121,66	0,772
	19	D	187345,74	172621,58	15779,50	456320,95	135407,66	
białko Ki-67*	10	P	-	3,00	0,00	4,00	-	0,416
	21	D	-	3,00	0,00	4,00	-	

Objaśnienia: n – liczba osób; * - ekspresja oszacowana w skali półilościowej (p. Materiał i Metody); P – proksymalny odcinek j. grubego; D – dystalny odcinek j. grubego; p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe

4.10.8. Ekspresja markerów proliferacji komórkowej i apoptozy a umiejscowienie raka jelita grubego

Ekspresja markerów proliferacji komórkowej i apoptozy nie różniła się istotnie, porównując proksymalny i dystalny odcinek jelita grubego z umiejscowieniem CRC (Tabela 28).

Tabela 28. Porównanie ilościowej ekspresji markerów proliferacji komórkowej i apoptozy w zależności od lokalizacji CRC (test Manna-Whitney'a).

Marker*	n	grupa	mediana	min.	maks.	p testu
PCNA	13	P	4,00	3,00	4,00	0,106
	18	D	4,00	3,00	4,00	
Cyklina D1	11	P	0,00	0,00	3,00	0,578
	17	D	0,00	0,00	1,00	
p53	13	P	1,00	0,00	4,00	0,373
	18	D	2,00	0,00	4,00	
Kaspaza-3	12	P	3,00	2,00	6,00	0,950
	18	D	3,00	0,00	6,00	
Bcl-2	11	P	0,00	0,00	3,00	0,890
	17	D	0,00	0,00	3,00	
Białko AKT	13	P	3,00	0,00	6,00	0,352
	18	D	0,00	0,00	8,00	

Objaśnienia: n – liczba pacjentów; * - skala półilościowa oceny reakcji IHC (patrz Materiał i Metody)

4.10.9. Ekspresja IGF-1 i Ki-67 a klasyfikacja TNM raka jelita grubego

Nie udało się wykonać porównań ekspresji IGF-1 i Ki-67 (mRNA, białko) w różnych wartościach klasyfikacji klinicznej T i M (zbyt mała liczebność grup do porównania statystycznego). Natomiast wykonano porównanie tejże ekspresji dla parametru N, tj. dla pacjentów bez przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (N0) z pozostałymi wartościami N (N1 – przerzuty do trzech węzłów i N2 – cztery i więcej węzłów z obecnością przerzutów raka).

Analiza ta nie wykazała istotnych różnic w ekspresji ani składników osi IGF-1, ani antygenu proliferacyjnego Ki-67, biorąc pod uwagę obecność przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (Tabela 29).

Tabela 29. Porównanie ilościowej ekspresji całkowitego IGF-1 (mRNA, białko) i wszystkich izoform mRNA IGF-1 oraz Ki-67 (mRNA i białko) w zależności od obecności lub braku przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (N1, N2 vs. N0) u pacjentów z CRC (test Manna-Whitney'a).

Transkrypt	n	grupa	średnia	mediana	min.	maks.	SD	p testu
całk. mRNA IGF-1	14	N0	3223,69	1087,76	102,00	30369,41	7886,29	0,769
	17	N1, N2	28555,6	867,5	61,34	458963,0	110929,7	
białko IGF-1 *	14	N0	-	1,50	0,00	12,00	-	0,518
	17	N1, N2	-	0,00	0,00	12,00	-	
mRNA IGF-1P1	14	N0	390,23	214,59	26,03	1582,13	469,45	0,740
	17	N1, N2	543,6	342,5	15,01	1969,2	617,7	
mRNA IGF-1P2	14	N0	586,74	620,06	22,00	1514,00	388,18	0,544
	17	N1, N2	722,3	438,1	1,00	2324,1	806,5	
mRNA IGF-1A	14	N0	2050,85	213,04	72,50	23855,21	6294,55	1,000
	17	N1, N2	486,5	296,6	8,00	1665,9	515,9	
mRNA IGF-1B	14	N0	407,30	196,55	0,20	1875,00	509,05	0,246
	17	N1, N2	220,6	127,8	3,00	674,1	241,5	
mRNA IGF-1C	14	N0	14,74	2,36	0,35	158,11	41,48	0,625
	17	N1, N2	13,8	6,1	0,00	62,6	19,0	
mRNA Ki-67	13	N0	220107,44	220851,94	62966,51	456320,95	119026,37	0,217
	15	N1, N2	158952,4	116086,6	15779,50	412129,1	121410,1	
białko Ki-67*	14	N0	-	3,00	0,00	4,00	-	0,799
	17	N1, N2	-	3,00	0,00	4,00	-	

Objaśnienia: n – liczba osób; * - ekspresja oszacowana w skali półilościowej (p. Materiał i Metody); p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe

4.10.10. Ekspresja markerów proliferacji komórkowej i apoptozy a klasyfikacja TNM raka jelita grubego

Także w odniesieniu do ekspresji markerów proliferacji komórkowej i/lub apoptozy udało się porównać ekspresję tychże białek pomiędzy pacjentami bez przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (N0) z ekspresją u pacjentów, którzy demonstrowali takie przerzuty do węzłów chłonnych (N1, N2). Nie obserwowano znamienych różnic w ekspresji tychże białek w zależności od obecności lub braku przerzutów do węzłów chłonnych (Tabela 30).

Tabela 30. Porównanie ilościowej ekspresji markerów proliferacji komórkowej i apoptozy w zależności od braku (N0) i obecności przerzutów (N1-N2) do regionalnych węzłów chłonnych u pacjentów z CRC (test Manna-Whitney'a).

Marker*	n	grupa	mediana	min.	maks.	p testu
PCNA	14	N0	4,00	3,00	4,00	0,399
	17	N1, N2	4,00	3,00	4,00	
Cyklina D1	12	N0	0,00	0,00	1,00	0,599
	16	N1, N2	0,00	0,00	3,00	
p53	14	N0	0,50	0,00	4,00	0,262
	17	N1, N2	2,00	0,00	4,00	
Kaspaza-3	14	N0	3,00	0,00	6,00	0,525
	16	N1, N2	3,00	0,00	6,00	
Bcl-2	12	N0	0,00	0,00	0,00	0,599
	16	N1, N2	0,00	0,00	3,00	
Białko AKT	14	N0	0,00	0,00	6,00	0,860
	17	N1, N2	0,00	0,00	8,00	

*Objaśnienia: n – liczba pacjentów; * - skala półilościowa oceny reakcji IHC (patrz Materiał i Metody)*

4.11. Ekspresja IGF-1 (mRNA, białko), różne izoformy mRNA IGF-1 oraz ekspresja Ki-67 (mRNA, białko) a podstawowe wyniki badań pracownianych

W grupie chorych z CRC nie obserwowano statystycznie istotnych korelacji pomiędzy ekspresją IGF-1 (całkowite mRNA, izoformy mRNA, białko), oraz Ki-67 (mRNA, białko) a wynikami badań morfologii krwi oraz stężenia glukozy u pacjentów z CRC (Tabela 31).

Tabela 31. Wartości współczynników korelacji Spearmana pomiędzy ekspresją IGF-1 (mRNA, białko), izoformami mRNA IGF-1 oraz antygenu Ki-67 (mRNA, białko) a danymi kliniczno-laboratoryjnymi pacjentów z CRC.

Transkrypt/białko	wiek (lata)	hemoglobina (g/dl)	leukocyty (WBC) x10 ⁹ /l	płytki krwi (G/l)	glukoza mg/dl
całk. mRNA IGF-1	-0,013	0,119	0,268	-0,024	-0,192
IGF-1 P1	0,077	-0,081	0,283	-0,184	-0,043
IGF-1 P2	0,163	0,134	0,208	-0,148	-0,056
IGF-1A	0,192	-0,121	0,199	-0,194	-0,039
IGF-1B	0,255	0,208	0,079	-0,033	-0,224
IGF-1C	0,009	0,040	0,341	-0,208	-0,022
białko IGF-1*	0,133	0,213	-0,027	-0,250	-0,109
mRNA Ki-67	-0,050	-0,084	-0,043	0,117	-0,073
białko Ki-67*	0,162	-0,085	0,118	-0,240	0,156

Objaśnienia: * - ekspresja oszacowana w skali półilościowej (p. Materiał i Metody)

4.12. Ekspresja IGF-1 oraz Ki-67 na poziomie mRNA u pacjentów żyjących i zmarłych w ciągu 5 lat od rozpoznania choroby

Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w tkankowej ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 oraz różnych izoform mRNA tego czynnika wzrostu, ani w ekspresji mRNA antygenu Ki-67 u pacjentów, którzy przeżyli 5 lat (25 chorych) od chwili operacji i rozpoznania CRC w porównaniu do zmarłych w tym okresie (sześciu pacjentów). Nie było również znamienych różnic w ekspresji białek proliferacji i apoptozy komórek w obu badanych podgrupach CRC (Tabela 32).

Tabela 32. Porównanie ilościowej ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 oraz wszystkich izoform mRNA IGF-1, Ki-67 (liczba kopii/ μ g RNA) oraz białek proliferacji i apoptozy komórek (analiza półilościowa reakcji immunohistochemicznej) u pacjentów, którzy zmarli w ciągu 5 lat od operacji nowotworu jelita grubego (n=6) z tymi, którzy żyją po 5 latach (rok 2015) od czasu zabiegu operacyjnego (n=25) (test Manna-Whitney'a).

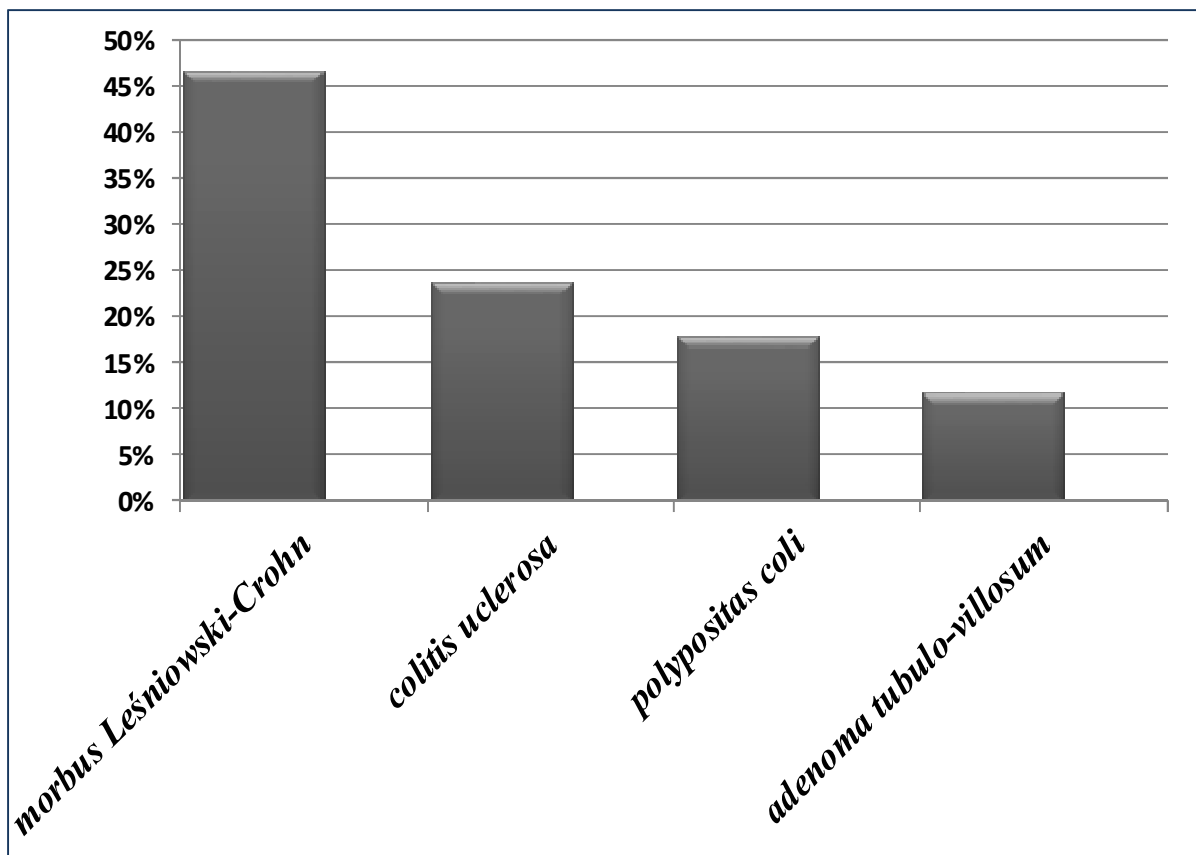
Transkrypt/białko	grupa	średnia\pmSD	p testu
całk. mRNA IGF-1	zmarli	2271 \pm 2108	0,575
	żyjący	20678 \pm 91506	
mRNA Ki-67	zmarli	212288 \pm 141838	0,806
	żyjący	180543 \pm 118939	
Wariant (izoforma) mRNA			
IGF-1 P1 (klasa I)	zmarli	581 \pm 578	0,575
	żyjący	449 \pm 555	
IGF-1 P2 (klasa II)	zmarli	1025 \pm 99	0,314
	żyjący	574 \pm 541	
IGF-1A	zmarli	592 \pm 437	0,283
	żyjący	1337 \pm 4719	
IGF-1B	zmarli	361 \pm 287	0,314
	żyjący	292 \pm 415	
IGF-1C	zmarli	11 \pm 15	0,072
	żyjący	15 \pm 34	
Białka*	Mediana/min./maks.		
IGF-1	zmarli	0,00/0/00/4,00	0,391
	żyjący	0,00/0,00/12,00	
Ki-67	zmarli	3,50/3,00/4,00	0,364
	żyjący	3,00/0,00/4,00	
PCNA	zmarli	4,00/3,00/4,00	0,752
	żyjący	4,00/3,00/4,00	
Cyklina D1	zmarli	0,00/0,00/1,00	0,283
	żyjący	0,00/0,00/3,00	
p53	zmarli	3,00/0,00/4,00	0,247
	żyjący	1,00/0,00/4,00	
kaspaza-3	zmarli	3,00/3,00/6,00	0,481
	żyjący	3,00/0,00/6,00	
Bcl-2	zmarli	0,00/0,00/0,00	0,764
	żyjący	0,00/0,00/3,00	
AKT	zmarli	0,00/0,00/3,00	0,190
	żyjący	0,00/0,00/8,00	

Objaśnienia: p – poziom istotności; * - wartości oszacowane w skali półilościowej (p. Materiał i Metody)

4.13. Dane kliniczne grupy porównawczej (zmiany nienowotworowe jelita grubego, „pseudoguzy”)

Grupę porównawczą stanowiło 17 pacjentów ze zmianami nienowotworowymi jelita grubego, wśród których dominowali pacjenci z przewlekłymi aktywnymi zmianami zapalnymi jelita grubego: chorobą Leśniowskiego-Crohna (n=8, 47%) i *colitis ulcerosa* (n=4, 24%). Polipowatość jelita grubego z- lub bez uchyłków rozpoznawano u kolejnych trzech chorych (18%). U dwóch pacjentów (12%) rozpoznano gruczolaka cewkowo-kosmkowego (*adenoma tubulo-villosum*) (Rycina 14). Dla celów tej pracy, całościowo grupę tę nazwano „pseudoguzami” jelita grubego. Cechy dysplazji komórkowej w grupie porównawczej wykazywano u sześciu pacjentów (pacjent nr 1, 2, 10, 11, 14, 15).

Kontrolę w tej grupie stanowiły fragmenty niezmiennego morfologicznie jelita grubego od tych samych pacjentów (kontrola grupy porównawczej), którą poddano analizie wyłącznie w oparciu o technikę RT-PCR.



Rycina 14. Rozkład odsetkowy pacjentów z histologicznym typem zmian nienowotworowych (grupa porównawcza, „pseudoguzy”).

Wiek pacjentów wahał się od 19 do 55 lat (średnia wieku 32 ± 10 lat). Wśród chorych z grupy porównawczej było 6 kobiet (35%) i 11 mężczyzn (65%). Średnia wieku kobiet (30 ± 8) i mężczyzn (34 ± 10) nie różniła się istotnie ($p > 0,05$) (Tabela 33). Choć wartości średniego stężenia glukozy we krwi w całej grupie pacjentów, oraz oddzielnie u kobiet i mężczyzn z grupy porównawczej, mieściły się w granicach normy, wykazano istotnie większe średnie stężenie glukozy we krwi u mężczyzn w porównaniu z grupą kobiet (Tabela 33).

Tabela 33. Wybrane dane kliniczne pacjentów ze zmianami nienowotworowymi jelita grubego (pseudoguzu).

Cecha statystyczna		n	zakres norm	średnia	mediana	min.	maks.	SD	p testu
<i>Wiek (lata)</i>	K	6	-	29,67	29,50	22,00	43,00	7,81	0,462
	M	11		33,55	35,00	19,00	55,00	10,58	
	Cała grupa	17		32,18	31,00	19,00	55,00	9,63	-
<i>Hemoglobina (g/dl)</i>	K	6	11,8-15,8	9,97	9,50	7,70	12,60	2,22	0,808
	M	11		9,71	10,20	7,50	11,50	1,61	
	Cała grupa	17		9,80	10,20	7,50	12,60	1,78	-
<i>Leukocyty (WBC; $\times 10^9/l$)</i>	K	6		11,88	13,67	4,23	17,41	4,68	0,350
	M	11		9,95	10,04	5,24	14,32	2,96	
	Cała grupa	17		10,63	10,30	4,23	17,41	3,64	-
<i>Glukoza (mg/dl)</i>	K	6	70,0-105,0	84,67	86,50	73,00	90,00	6,62	0,027
	M	11		93,45	97,00	75,00	103,00	8,34	
	Cała grupa	17		90,35	90,00	73,00	103,00	8,71	-
<i>Płytki krwi (G/l)</i>	K	6	130-440	282,33	257,00	200,00	470,00	95,24	0,660
	M	11		260,64	254,00	148,00	383,00	75,62	
	Cała grupa	17		268,29	257,00	148,00	470,00	80,77	-
<i>Grading*</i>	Cała grupa	17		-	5,00	2,00	5,00	-	-

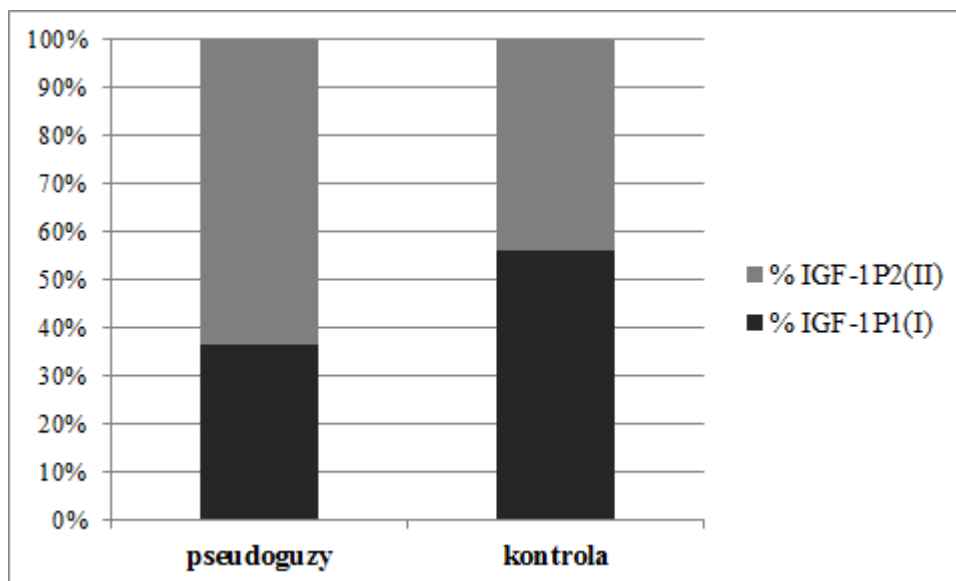
Objaśnienia: * - ocena nacieków zapalnych w skali półilościowej (p. Materiał i Metody); K - kobiety; M - mężczyźni; SD - odchylenie standardowe; dane porównano z zastosowaniem testu Manna-Whitney'a

4.13.1. Tkankowa ekspresja całkowitego mRNA IGF-1 oraz izoform splicingowych: P1, P2 oraz IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C

Tkankową ekspresję całkowitego mRNA IGF-1 i wszystkich badanych w pracy wariantów mRNA IGF-1 wykrywano u każdego pacjenta grupy porównawczej zarówno w pseudoguzie, jak i niezmienionej nowotworowo tkance jelita grubego od tego samego pacjenta (kontrola), uwzględniając zarówno alternatywne egzony 1 i 2 (w zależności od użytego promotora P1 lub P2), jak i alternatywne izoformy splicingowe: IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C.

4.13.1.1. Procentowy udział transkryptów klasy I (P1) i II (P2) IGF-1 w całkowitej ekspresji genu IGF-1

W grupie pseudoguzów jelita grubego odsetkowy udział transkryptów klasy I (z promotora P1) i klasy II (z promotora P2) wynosił odpowiednio 36% i 64%, zaś w kontroli 56% i 44% (Rycina 15). W obrębie żadnej z badanych grup nie wykazano różnic w odsetkowo wyrażonej ekspresji izoformy mRNA P1 w porównaniu z izoformą mRNA P2 ($p > 0,05$).



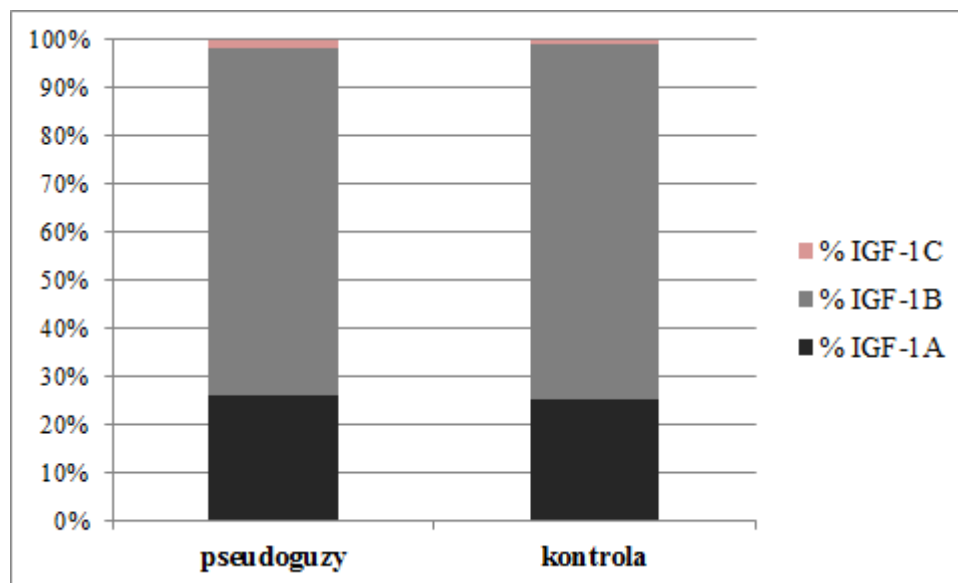
Rycina 15. Procentowy udział izoform mRNA klasy I i II IGF-1 (w zależności od użytego promotora P1 i P2) w całkowitej ekspresji IGF-1 w tkankach nienowotworowych (pseudoguzuzy) jelita grubego i kontroli.

4.13.1.2. Procentowy udział wariantów transkryptów A, B i C IGF-1 w całkowitej ekspresji genu IGF-1

U pacjentów z pseudoguzami jelita grubego procentowy udział ekspresji izoformy splicingowej mRNA IGF-1B stanowił 72% wszystkich transkryptów. Ekspresje izoform mRNA IGF-1A i IGF-1C utrzymane były na niższym poziomie procentowym (26% i 2%,

odpowiednio). W tej grupie różnice statystycznie istotne były wykryte pomiędzy procentowym udziałem izoformy mRNA A i B (więcej B), A i C (więcej A), oraz B i C (więcej B) ($p < 0,05$ we wszystkich przypadkach).

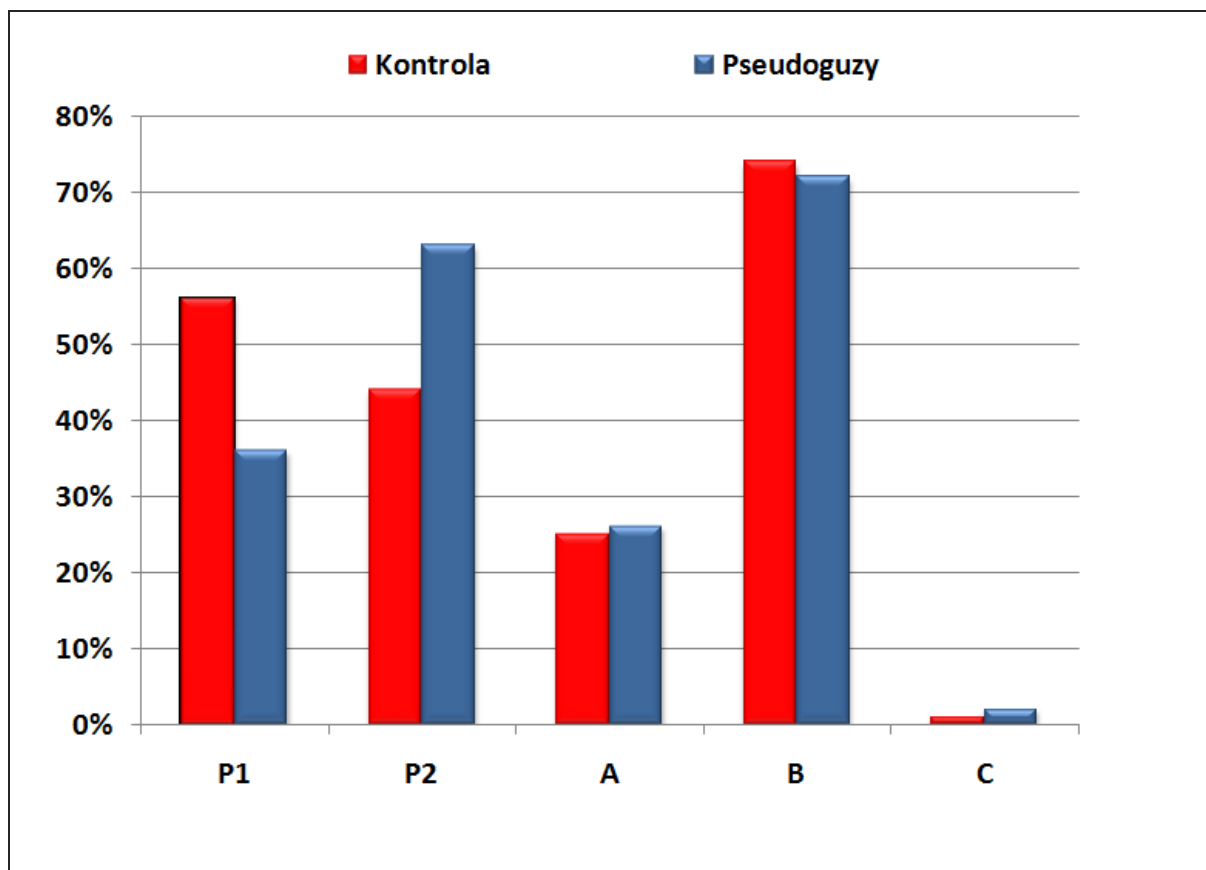
W grupie kontrolnej odsetkowy udział ekspresji izoform mRNA IGF-1A (25%) i IGF-1B (74%) był podobny jak w pseudoguzach, tj. najmniejszy procentowy udział miała ekspresja izoformy C (1%) (Rycina 16). Istotne różnice obserwowano pomiędzy procentowym udziałem izoformy A i B (więcej B), A i C (więcej A) oraz B i C (więcej B) ($p < 0,05$ we wszystkich przypadkach).



Rycina 16. Procentowy udział izoform mRNA IGF-1 (IGF-1A, IGF-1B, IGF-1C) w całkowitej ekspresji mRNA IGF-1 u chorych ze zmianami nienowotworowymi jelita grubego (pseudoguzy) i w kontroli.

Porównując odsetkowy udział wszystkich badanych izoform mRNA IGF-1 w pseudoguzach jelita grubego z odpowiednią kontrolą, udział odsetkowy ekspresji izoformy IGF-1A, B i C pomiędzy grupami był podobny ($p > 0,05$ we wszystkich przypadkach). Innymi słowy, nie obserwowano różnic w odsetkowo wyrażonej ekspresji izoform mRNA A, B i C pomiędzy pseudoguzami

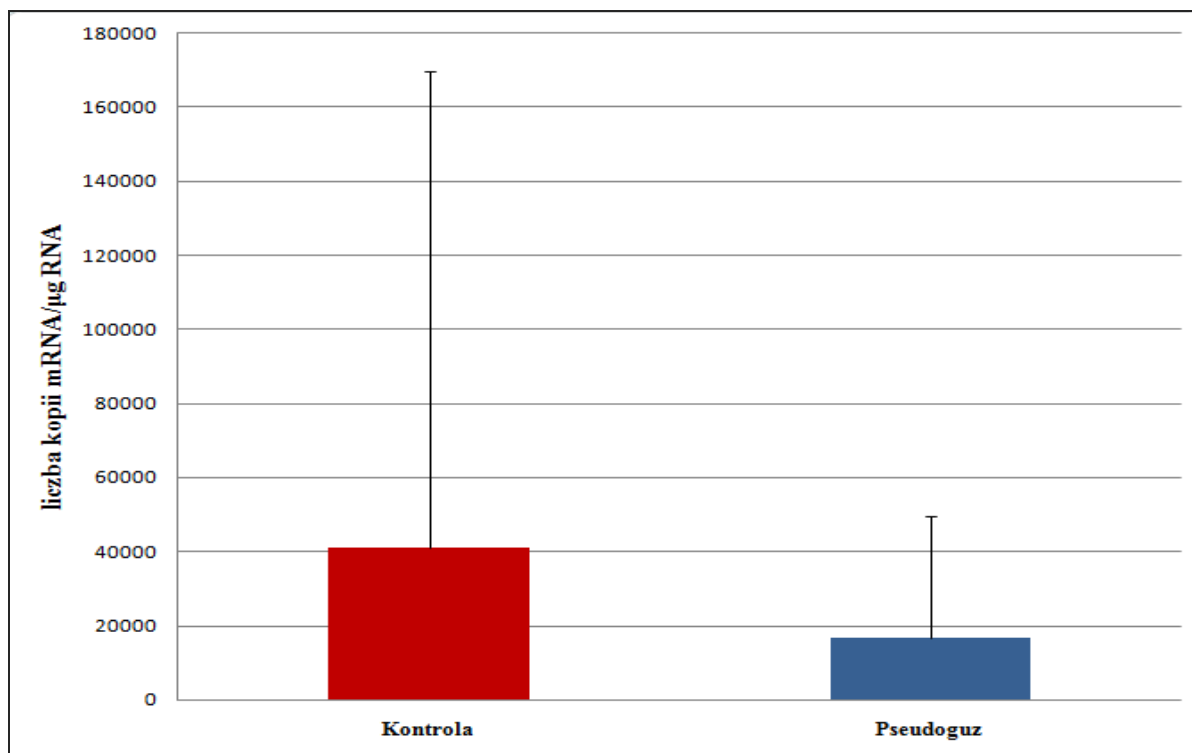
a kontrolą. Nie wykazano istotnych różnic także w odsetkowo wyrażonej ekspresji I i II klasy transkryptów (z promotora P1 i P2) pomiędzy grupą z pseudoguzami a odpowiednią kontrolą ($p > 0,05$) (Rycina 17).



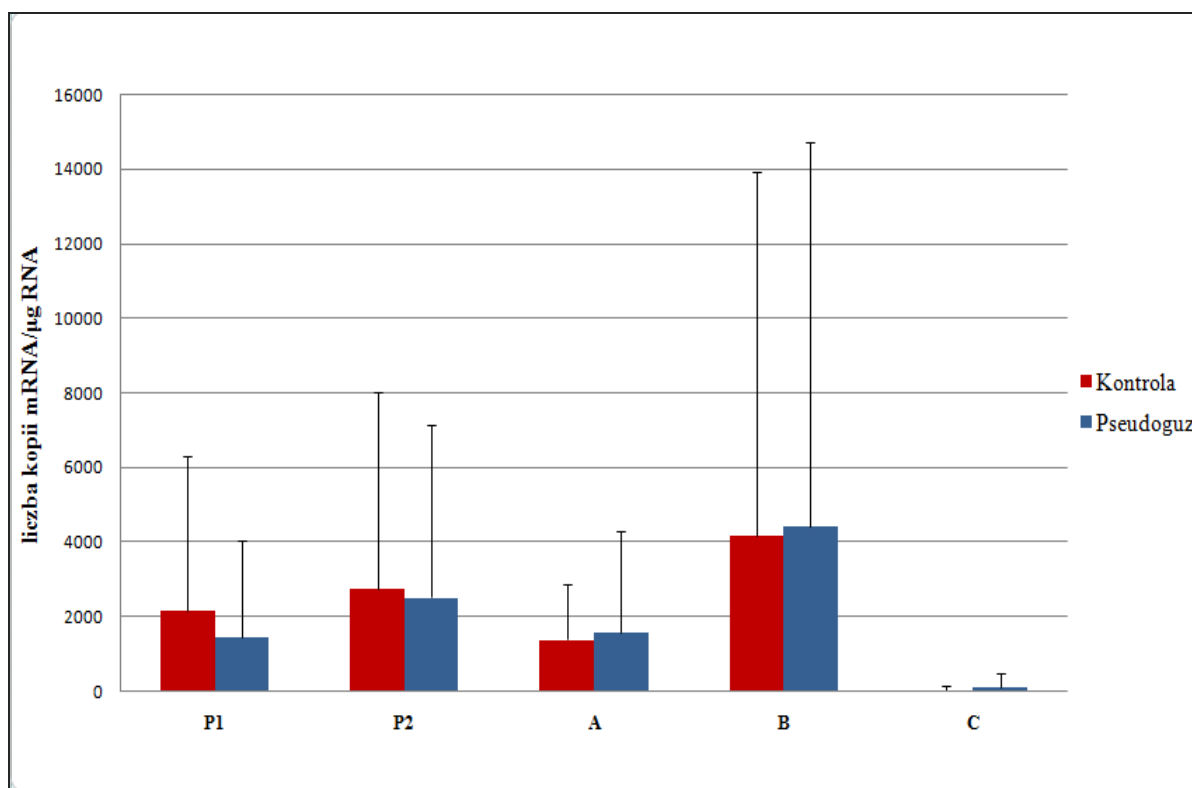
Rycina 17. Porównanie procentowego udziału wszystkich badanych izoform mRNA IGF-1 w całkowitej ekspresji mRNA u chorych z pseudoguzami jelita grubego i w odpowiedniej kontroli (zmiany nieistotnie statystycznie pomiędzy grupami).

4.14. Porównanie ilościowej ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 i wariantów splicingowych IGF-1 u chorych z grupy porównawczej (pseudoguzy) vs. kontrola

Ekspresja całkowitego mRNA w tkankach niezmiennych nowotworowo w grupie porównawczej (pseudoguzy) wynosiła 16855 ± 32792 , a w tkance niezmiętej morfologicznie od tych samych pacjentów (kontrola) - 41182 ± 128727 , i również tutaj (tzn. w wartościach liczbowych) nie udało się wykazać różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$) (Rycina 18). Podobnie bez różnic istotnych statystycznie przedstawiały się wyniki analizy ekspresji poszczególnych izoform mRNA w grupie porównawczej i kontroli ($p > 0,05$) (Rycina 19, Tabela 34).



Rycina 18. Porównanie ilościowej ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 (liczba kopii mRNA/μg RNA) w pseudoguzach i w kontroli. Zmiany nieistotne statystycznie pomiędzy grupami.



Rycina 19. Porównanie ilościowej ekspresji poszczególnych izoform mRNA IGF-1 (P1, P2, A, B i C) (liczba kopii mRNA/μg RNA) w pseudoguzach i w kontroli. Zmiany nieistotne statystycznie pomiędzy grupami.

Tabela 34. Porównanie ilościowej ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 oraz wszystkich izoform mRNA IGF-1 (liczba kopii/ μ g RNA) u pacjentów z grupy porównawczej (psueudoguz vs. kontrola).

Transkrypt	grupa (n=17)	średnia \pm SD	p testu
całk. mRNA IGF-1	pseudoguz	16855 \pm 32792	0,910
	kontrola	41182 \pm 128727	
mRNA IGF-1 P1 (klasa I)	pseudoguz	1452 \pm 2577	0,084
	kontrola	2154 \pm 4157	
mRNA IGF-1 P2 (klasa II)	pseudoguz	2516 \pm 4616	0,831
	kontrola	2748 \pm 5279	
mRNA IGF-1A	pseudoguz	1592 \pm 2719	0,868
	kontrola	1394 \pm 1475	
mRNA IGF-1B	pseudoguz	4409 \pm 10302	0,619
	kontrola	4189 \pm 9725	
mRNA IGF-1C	pseudoguz	127 \pm 368	0,463
	kontrola	45 \pm 94	

Objaśnienia: p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe

Natomiast wykazano znamienne wyższą ekspresję zarówno izoformy mRNA z promotora 2 (P2), jak i izoformy mRNA A i B u mężczyzn w porównaniu z kobietami grupy porównawczej (Tabela 35). Nie uchwycono takich różnic pomiędzy ekspresją mRNA IGF-ów w materiale kontrolnym kobiet i mężczyzn z grupy porównawczej.

Analizując oddzielnie każdą z płci, jedynie w grupie kobiet wykazano istotnie zmniejszoną ekspresję izoformy mRNA P2 (klasa II transkryptów) w tkance pseudoguz jelita grubego w porównaniu z prawidłowym jelitem grubym (kontrola) u tej płci. U mężczyzn nie wykazano żadnych istotnych różnic ani w ekspresji badanych transkryptów, ani całkowitego mRNA IGF-1 (Tabela 35).

Tabela 35. Różnice w ekspresji izoform i klas mRNA IGF-1 (średnia \pm SD) w zależności od płci pacjentów grupy porównawczej i kontroli.

Transkrypt	tkanka	kobiety (n=6)	mężczyźni (n=11)	P testu
całk. mRNA IGF-1	pseudoguz	21175 \pm 49179	14498 \pm 22225	0,525
	kontrola	127943 \pm 251439	9632 \pm 11248	0,753
mRNA IGF-1 P1	pseudoguz	298 \pm 338	2082 \pm 3055	0,404
	kontrola	319 \pm 320	3154 \pm 4947	0,062
mRNA IGF-1 P2	pseudoguz	121 \pm 100*	3823 \pm 5363	<0,001
	kontrola	5652 \pm 8373	1163 \pm 1310	0,591
mRNA IGF-1A	pseudoguz	156 \pm 167	2375 \pm 3148	0,007
	kontrola	1278 \pm 1542	1458 \pm 1510	0,660
mRNA IGF-1B	pseudoguz	182 \pm 130	6714 \pm 12379	<0,001
	kontrola	10202 \pm 15311	910 \pm 769	0,884
mRNA IGF-1C	pseudoguz	254 \pm 616	57 \pm 111	0,463
	kontrola	35 \pm 44	50 \pm 114	0,660

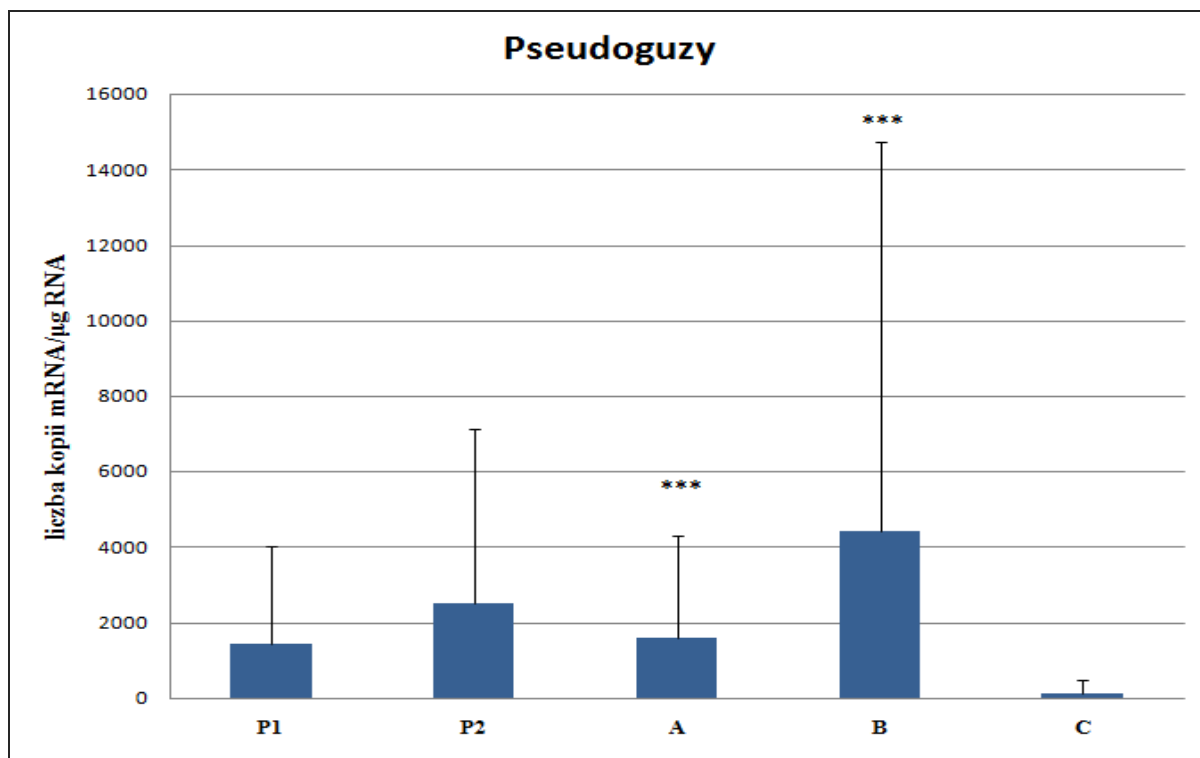
Objaśnienia: p – poziom istotności; * - $p < 0,01$ - pomiędzy pseudoguzem i kontrolą w grupie kobiet

4.15. Porównanie wzajemnej ilościowej ekspresji izoform mRNA IGF-1 w obrębie danej grupy

4.15.1. Grupa porównawcza - pseudoguz

Ilościowa analiza z zastosowaniem RT-PCR ujawniła, iż wśród izoform mRNA określających klasę I i II tych wariantów (P1 i P2), ekspresja mRNA P2 (2516 \pm 4616 kopii mRNA/ μ g RNA) nie różniła się istotnie w porównaniu z P1 (1452 \pm 2577) ($p > 0,05$) (Tabela 35).

Spośród wariantów A, B i C izoform mRNA IGF-1, największa ekspresja dotyczyła mRNA IGF-1B, potem IGF-1A i najmniejsza dotyczyła wariantu C. Różnice znamienne wykazano jednak tylko pomiędzy ekspresją izoformy A (więcej) i C ($p < 0,001$) oraz między ekspresją izoformy mRNA IGF-1B (więcej) i C ($p < 0,001$) (Rycina 20).



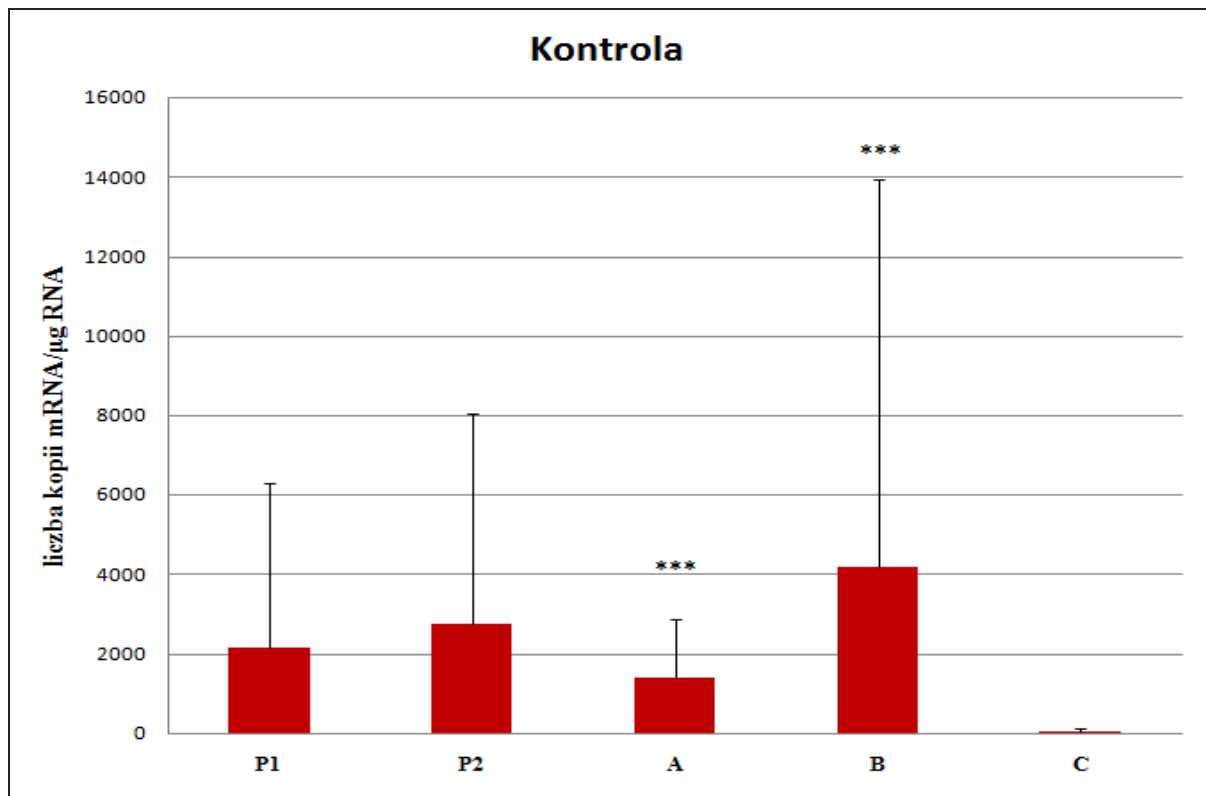
Rycina 20. Porównanie wzajemnej ilościowej ekspresji izoform mRNA IGF-1 (P1, P2, A, B, C) (liczba kopii mRNA/μg RNA) w pseudoguzach; *** - $p < 0,001$ pomiędzy ekspresją izoform mRNA A i C oraz B i C.

4.15.2. Grupa porównawcza - kontrola

Wśród izoform mRNA P1 i P2 w tkance kontrolnej ilościowo ekspresja mRNA P2 wynosiła 2748 ± 5279 , a P1 - 2154 ± 4157 kopii mRNA/μg RNA i również w tym wypadku różnice te nie osiągały istotności statystycznej ($p > 0,05$) (Tabela 34).

Spośród wariantów A, B i C izoform mRNA IGF-1, podobnie jak w pseudoguzach, największa ekspresja dotyczyła mRNA IGF-1B, potem IGF-1A i najmniejsza dotyczyła wariantu C. Różnice znamienne wykazano pomiędzy ekspresją izoformy A (więcej) i C ($p < 0,001$) oraz między ekspresją izoformy mRNA IGF-1B (więcej) i C ($p < 0,001$) (Rycina 21).

Zarówno w pseudoguzach, jak i kontroli, nie było różnic pomiędzy ekspresją wariantów mRNA A i B IGF-1.



Rycina 21. Porównanie wzajemnej ilościowej ekspresji izoform mRNA IGF-1 (P1, P2, A, B, C) w grupie kontrolnej; *** - $p < 0,001$ pomiędzy ekspresją izoform mRNA IGF-1A i C oraz B i C.

4.16. Korelacje pomiędzy wzajemną ekspresją różnych izoform mRNA IGF-1 w grupie porównawczej (pseudoguzy) i w kontroli

Zarówno w zmianach nienowotworowych (pseudoguzach) jelita grubego, jak i w odpowiedniej kontroli, obserwowano liczne pozytywne korelacje pomiędzy wzajemną ekspresją całkowitego transkryptu IGF-1 oraz badanych izoform mRNA (Tabele 36 i 37). Znamienność statystyczną uzyskano m.in. dla ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 i ekspresji mRNA promotora P1, ale nie P2, oraz dla ekspresji izoformy mRNA IGF-1C. Najlichniesze znamienne korelacje w grupie pseudoguzów prezentowała ekspresja izoformy mRNA P1 oraz IGF-1A (Tabela 36).

Zdecydowanie więcej pozytywnych korelacji obserwowano pomiędzy ekspresją poszczególnych izoform mRNA IGF-1 w grupie kontrolnej (Tabela 37).

Tabela 36. Wartości współczynników korelacji Spearmana dla wzajemnej ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 oraz różnych izoform mRNA (A, B, C, P1 i P2) w pseudoguzach jelita grubego.

Transkrypt	całk. IGF-1	IGF-1 P1	IGF-1 P2	IGF-1A	IGF-1B	IGF-1C
całk. IGF-1	-	0,958	0,280	0,459	0,300	0,863
IGF-1 P1	0,958	-	0,386	0,563	0,349	0,845
IGF-1 P2	0,280	0,386	-	0,885	0,939	0,404
IGF-1A	0,459	0,563	0,885	-	0,823	0,463
IGF-1B	0,300	0,349	0,939	0,823	-	0,456
IGF-1C	0,863	0,845	0,404	0,463	0,456	-

Objaśnienia: wytłuszczoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których $p < 0,05$

Tabela 37. Wartości współczynników korelacji Spearmana dla wzajemnej ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 oraz różnych izoform (A, B, C, P1 i P2) w kontroli grupy porównawczej.

Transkrypt	całk. IGF-1	IGF-1 P1	IGF-1 P2	IGF-1A	IGF-1B	IGF-1C
całk. IGF-1	-	0,721	0,538	0,610	0,002	0,974
IGF-1 P1	0,721	-	0,595	0,720	0,125	0,559
IGF-1 P2	0,538	0,595	-	0,926	0,735	0,575
IGF-1A	0,610	0,720	0,926	-	0,518	0,663
IGF-1B	0,002	0,125	0,735	0,518	-	0,235
IGF-1C	0,974	0,559	0,575	0,663	0,235	-

Objaśnienia: wytłuszczoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których $p < 0,05$

4.17. Ekspresja mRNA antygenu proliferacyjnego Ki-67 w grupie porównawczej (pseudoguzy)

Ekspresję mRNA Ki-67 wykazano we wszystkich badanych tkankach grupy porównawczej, jednak nie obserwowano istotnych różnic ilościowych pomiędzy pseudoguzem i kontrolą, a także w zależności od płci pacjenta w żadnej z tych podgrup (Tabela 38).

Tabela 38. Różnice w ekspresji mRNA Ki-67 (średnia \pm SD) w grupie porównawczej (pseudoguzy/kontrola) oraz w zależności od płci pacjenta (test Manna-Whitney'a).

mRNA Ki-67			
Pseudoguzy (n=17)	Kontrola (n=17)	Pseudoguzy	
		kobiety (n=6)	mężczyźni (n=11)
147523 \pm 195803	92744 \pm 93812	49738 \pm 34133	200860 \pm 227800
p=0,093		p=0,180	
		Kontrola	
		kobiety (n=7)	mężczyźni (n=22)
		49144 \pm 34110	116525 \pm 108336
		p=0,256	

Objaśnienia: n – liczba pacjentów; p – poziom istotności

4.18. Immunohistochemiczna ekspresja białka IGF-1 oraz markerów proliferacji komórkowej i białek apoptozy w grupie porównawczej

Przedstawione w tym podrozdziale wyniki badań immunohistochemicznych dotyczą wyłącznie grupy pseudoguzów, które wykonano w celu sprawdzenia potencjalnych korelacji z ekspresją izoform mRNA IGF-1 i całkowitego mRNA IGF-1 u tych pacjentów.

Analiza ekspresji IGF-1 na poziomie białka w zmianach nienowotworowych jelita grubego wykazała obecność tego białka u zaledwie 5/17 pacjentów (29%). Obserwowano z reguły słabo nasiloną reakcję IHC dotyczącą głównie komórek gruczołowych i komórek nacieków zapalnych (Tablica 4A). W pojedynczych przypadkach obserwowano bardzo słabą reakcję w nielicznych komórkach (Tablica 4B).

Antygen Ki-67 w pseudoguzach wykryto u 3/17 pacjentów i była to lokalizacja jądrowa dotycząca z reguły pojedynczych komórek krypt jelitowych (Tablica 4C). Natomiast antygen PCNA wykazano u wszystkich pacjentów z tej grupy i pozytywna reakcja IHC była intensywna, obecna w liczniejszych niż Ki-67 - jądrach komórkowych nabłonka krypt jelita grubego (Tablica 4D).

Białko p53 wykryto u zaledwie jednego pacjenta i to w pojedynczych jądrach komórkowych. Aktywną postać kaspazy-3 wykryto u 9/17 chorych (53%). Białko to zlokalizowano w cytoplazmie dość licznych komórek gruczołowych (Tablica 4E) oraz komórek nacieków zapalnych w podścielisku i/lub w świetle zmienionych morfologicznie krypt jelitowych (Tablica 4F).

Białko AKT zlokalizowano w cytoplazmie komórek u wszystkich pacjentów z tej grupy (100%). Komórkowa lokalizacja dotyczyła cytoplazmy komórek zarówno w przypadku gruczolaka (Tablica 4G), jak i polipowatości jelita grubego (Tablica 4H) i występowały duże indywidualne różnice w nasileniu reakcji IHC pomiędzy pacjentami.

Ilościowe oszacowanie ekspresji peptydu IGF-1 oraz pozostałych markerów proliferacji i apoptozy komórek w tej grupie pacjentów przedstawiono w Tabeli 39.

Tabela 39. Ocena immunohistochemicznej ekspresji IGF-1 i wybranych białek proliferacyjnych oraz markerów apoptozy w pseudoguzach (grupa porównawcza).

Wykrywany antygen*	n	mediana	min.	maks.
IGF-1	17	0,00	0,00	3,00
Ki-67	17	0,00	0,00	1,00
PCNA	12	3,00	3,00	4,00
p53	17	0,00	0,00	1,00
Kaspaza-3	17	2,00	0,00	3,00
Białko AKT	10	6,00	3,00	8,00

*Objaśnienia: n – liczba pacjentów; * - skala półilościowa oceny reakcji IHC (patrz Materiał i Metody)*

4.18.1. Korelacje pomiędzy ekspresją składników osi IGF-1 (mRNA i białko), Ki-67 (mRNA, białko) a markerami proliferacji komórkowej, apoptozy i białka AKT w grupie porównawczej

Badania obecne nie wykazały istotnej statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją całkowitego mRNA IGF-1 i samego peptydu w grupie pseudoguzów ($p > 0,05$) (Tabela 40).

Badanie korelacji pomiędzy ekspresją całkowitego mRNA IGF-1 oraz różnych izoform mRNA wykazało, iż ekspresja izoformy mRNA z promotora 1 (P1) pozytywnie koreluje ze wzrostem mRNA antygeny proliferacyjnego Ki-67 i jest to wysoki współczynnik korelacji

Spearmana ($r=0,526$; $p<0,05$). Nie obserwowano natomiast oczekiwanych korelacji pomiędzy ekspresją białka IGF-1 z ekspresją jego transkryptów pod postacią różnych wariantów mRNA w tej grupie pacjentów.

Biorąc pod uwagę ekspresję białek proliferacyjnych (Ki-67, PCNA) znamienne pozytywne korelacje wykazano pomiędzy ekspresją izoform mRNA P2 oraz mRNA IGF-1 A i B i ekspresją PCNA, a nie białka Ki-67. Nie obserwowano korelacji pomiędzy ekspresją wariantów mRNA IGF-1 i całkowitego mRNA tego czynnika wzrostu a ekspresją białka p53 i kaspazy-3. Silną ujemną korelację ($r=-0,699$; $p<0,05$) wykazano pomiędzy ekspresją izoformy mRNA IGF-1B a ekspresją białka AKT w tej grupie chorych (pseudoguzy).

Nie wykazano istotnych zależności pomiędzy ekspresją Ki-67 (mRNA, białko) a ekspresją pozostałych białek proliferacyjnych i białek apoptozy. Korelacji pomiędzy ekspresją białka Ki-67 a ekspresją białka AKT nie dało się wyznaczyć statystycznie (Tabela 40).

Tabela 40. Wartości współczynników korelacji Spearmana dla ekspresji IGF-1 (izoformy mRNA, białko), Ki-67 (mRNA, białko), oraz pozostałych immunohistochemicznych markerów proliferacji komórkowej i apoptozy oraz białka AKT w pseudoguzach.

Transkrypt/białko	białko IGF-1	mRNA Ki-67	białko Ki-67	PCNA	p53	Kaspaza-3	białko AKT
całk. IGF-1	0,158	0,455	0,126	0,360	-0,281	-0,102	-0,435
IGF-1 P1	0,026	0,526	0,189	0,308	-0,281	0,026	-0,435
IGF-1 P2	-0,317	0,233	0,347	0,822	-0,332	-0,322	-0,501
IGF-1A	-0,343	0,393	0,284	0,822	-0,332	-0,090	-0,567
IGF-1B	-0,317	0,064	0,378	0,822	-0,383	-0,400	-0,699
IGF-1C	0,093	0,206	0,316	0,517	-0,384	-0,172	-0,435
Białko IGF-1	-	0,264	-0,299	-0,408	-0,161	-0,232	-0,041
mRNA Ki-67	0,264	-	0,063	-0,206	-0,026	0,071	0,303
Białko Ki-67	-0,299	0,063	-	0,426	-0,116	-0,138	-*

Objaśnienia: wytłuszczoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r , dla których $p<0,05$;
* -niemożliwe wyznaczenie współczynnika korelacji pomiędzy ekspresją tych dwóch białek

4.19. Korelacje pomiędzy ekspresją różnych izoform mRNA IGF-1 i całkowitego mRNA IGF-1 a wynikami badań laboratoryjnych w grupie porównawczej

Jedyną, i to pozytywną, zależność w tej grupie chorych wykazano pomiędzy ekspresją izoformy mRNA IGF-1B a stężeniem glukozy we krwi pacjentów ($r=0,554$; $p<0,05$). Negatywne korelacje wykazano natomiast pomiędzy ekspresją całkowitego mRNA IGF-1 (na granicy istotności) oraz jego izoform P1, A i C a stężeniem hemoglobiny. Wartości współczynników korelacji Spearmana przedstawiono w Tabeli 41.

Tabela 41. Wartości współczynników korelacji Spearmana pomiędzy ekspresją IGF-1 (mRNA, izoformy mRNA, białko), Ki-67 (mRNA, białko) a wynikami badań laboratoryjnych u pacjentów z grupy porównawczej (pseudoguzy) ($n=17$).

Transkrypt/białko	wiek (lata)	hemoglobina (g/dl)	leukocyty (WBC) $\times 10^9/l$	płytki krwi (G/l)	glukoza mg/dl
Całk. mRNA IGF-1	-0,160	-0,474*	-0,097	0,474	-0,114
mRNA IGF-1 P1	-0,146	-0,491	-0,073	0,410	-0,135
mRNA IGF-1 P2	0,199	-0,426	-0,137	0,170	0,429
mRNA IGF-1A	0,261	-0,517	-0,272	0,174	0,226
mRNA IGF-1B	0,266	-0,425	-0,080	0,157	0,554
mRNA IGF-1C	-0,052	-0,616	0,000	0,459	-0,083
białko IGF-1	0,040	0,211	-0,238	-0,026	-0,330
mRNA Ki-67	-0,140	0,068	-0,430	-0,052	-0,116
Białko Ki-67	0,016	-0,142	0,063	-0,158	0,221

Objaśnienia: wytuszczoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r , dla których $p<0,05$; * $-p=0,055$ (na granicy istotności)

4.19.1. Ekspresja IGF-1 (białko, różne izoformy mRNA) a nasilenie zmian zapalnych (ang. *grading*) w grupie porównawczej

Nasilenie zmian zapalnych (*grading*) w przewlekłych zmianach zapalnych jelita grubego ($n=13$, z wyłączeniem *adenoma* i *polypositas coli*), oceniono w 5-pkt skali półilościowej [Geboes i wsp.]. U 9/13 chorych (69%) była to punktacja maksymalna (5 pkt), u trzech pacjentów (23%) – *grading* 4, u jednego – *grading* 2.

Współczynniki korelacji Spearmana pomiędzy nasileniem zmian zapalnych (*grading*) a ekspresją IGF-1 (białko, mRNA) i Ki-67 (białko, mRNA) oraz pozostałych badanych markerów proliferacji i apoptozy komórek przedstawia Tabela 42. Nie wykazano znamiennej zależności pomiędzy ekspresją badanych białek a aktywnością zapalną w pseudoguzach jelita grubego.

Tabela 42. Wartości współczynników korelacji Spearmana pomiędzy ekspresją IGF-1 (mRNA, białko), Ki-67 (mRNA, białko), pozostałych markerów proliferacji i apoptozy komórek, oraz białka AKT a *grading* u pacjentów z grupy porównawczej (pseudoguzy) ($p > 0,05$ we wszystkich przypadkach).

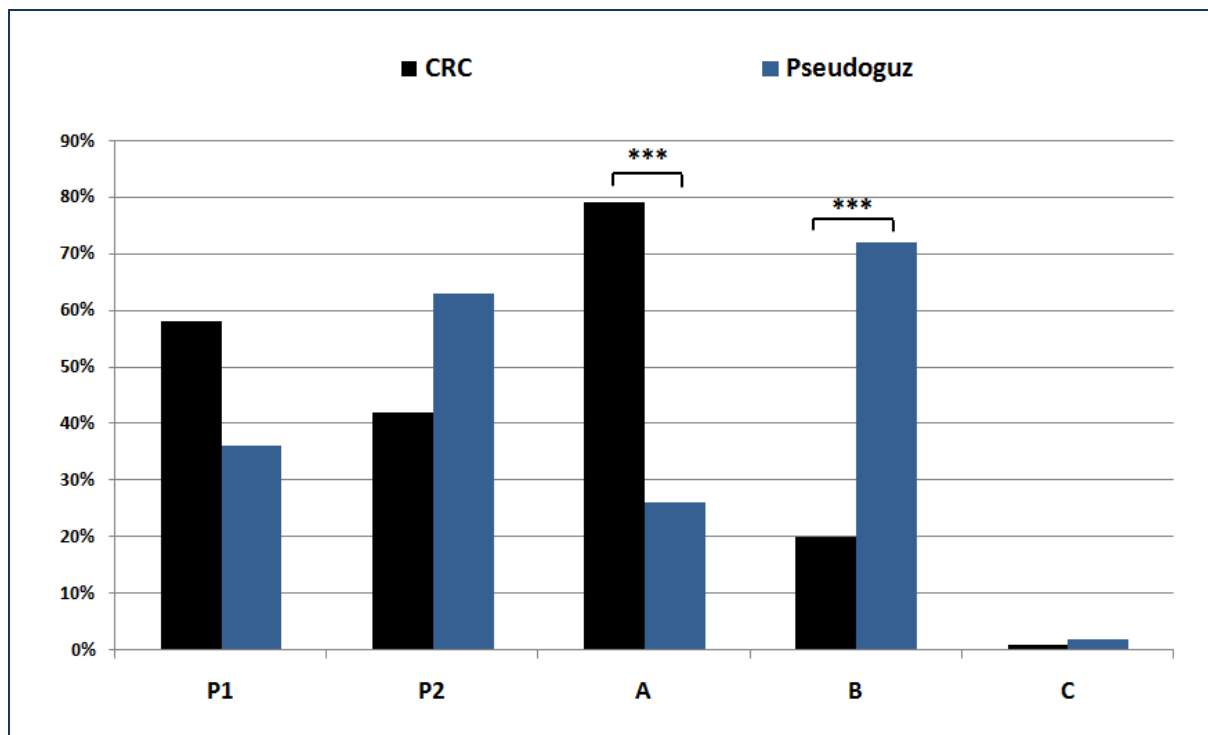
Transkrypt/ białko	Grading*
całk. mRNA IGF-1	0,176
mRNA IGF-1 P1	0,176
mRNA IGF-1 P2	-0,310
mRNA IGF-1A	-0,338
mRNA IGF-1B	-0,420
mRNA IGF-1C	0,366
białko IGF-1	0,361
mRNA Ki-67	0,041
białko Ki-67	0,000
PCNA	-0,299
cyklina D1	_**
p53	_**
kaspaza-3	0,264
białko AKT	0,657

Objaśnienia: * - parametr oceniony w skali półilościowej (p. Materiał i Metody); *_* - jednorodne wyniki

4.20. Porównanie ekspresji transkryptów IGF-1, mRNA Ki-67 pomiędzy grupą badaną (CRC) a porównawczą (pseudoguzy jelita grubego)

4.20.1. Porównanie odsetkowego udziału izoform mRNA IGF-1 w grupie CRC i pseudoguzach jelita grubego

Porównując odsetkowy udział wszystkich badanych izoform mRNA IGF-1 w całkowitej ekspresji genu IGF-1 pomiędzy grupą badaną i grupą porównawczą (CRC vs. pseudoguzy), różnice statystycznie istotne wykazano dla dwóch izoform mRNA IGF-1 a mianowicie izoformy mRNA A i B. Nie obserwowano więc istotnych różnic w odsetkowym rozkładzie mRNA obu promotorów P1 i P2 genu IGF-1 pomiędzy grupami. Procentowy udział izoformy IGF-1A (79%) był natomiast istotnie większy w CRC niż w pseudoguzach (26%), natomiast udział odsetkowy izoformy mRNA IGF-1B był wyższy w zmianach nienowotworowych (72%) w porównaniu ze zmianami złośliwymi (20%) (Rycina 22).



Rycina 22. Porównanie procentowego udziału wszystkich badanych izoform mRNA IGF-1 w całkowitej ekspresji mRNA u chorych z CRC i w pseudoguzach jelita grubego.

4.20.2. Porównanie ilościowej ekspresji w grupie CRC i pseudoguzach jelita grubego

Badanie porównawcze nad tkankową ekspresją różnych wariantów mRNA IGF-1 oraz mRNA Ki-67 wykonanych z zastosowaniem techniki RT-PCR w dwóch grupach pacjentów

przedstawia Tabela 43. Do analizy tej wzięto pod uwagę wyłącznie chorych ze zmianami patologicznymi jelita grubego tj. *adenocarcinoma coli* (CRC) i podgrupę zmian potencjalnie przednowotworowych („pseudoguzy” jelita grubego).

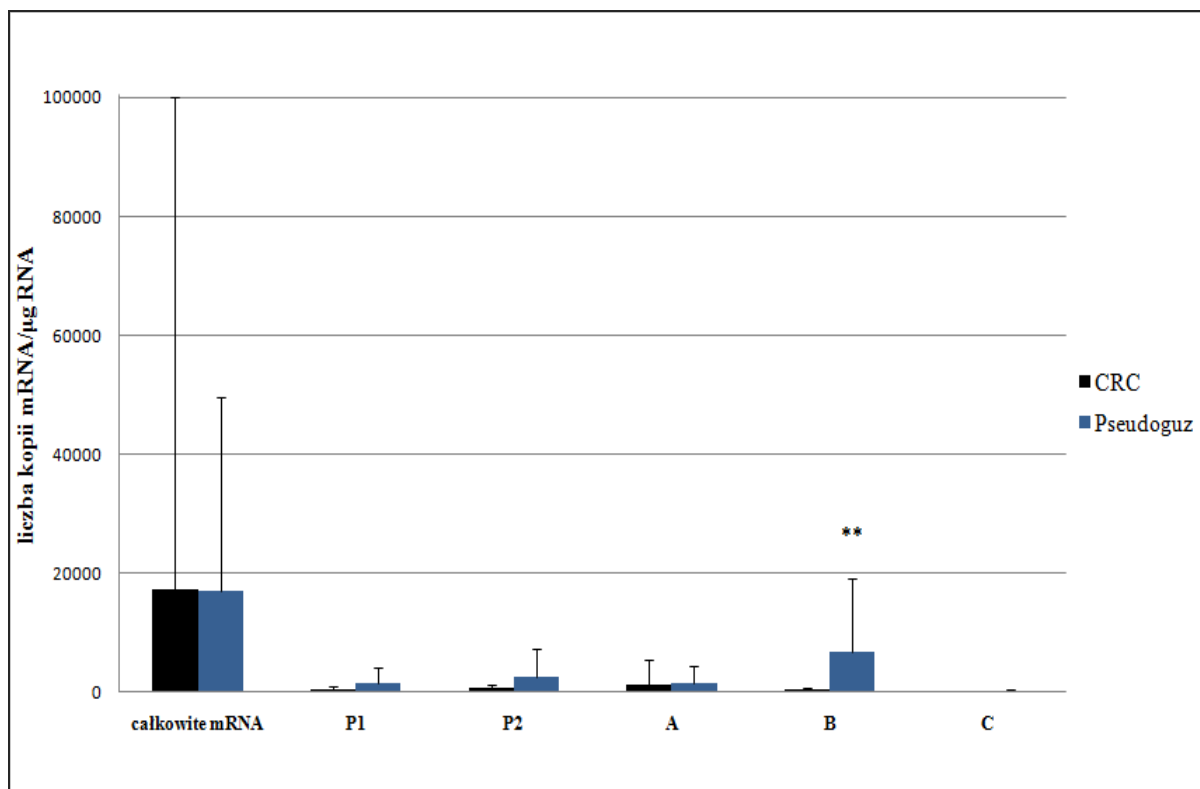
Choć ekspresja wszystkich wariantów mRNA IGF-1 była wyższa w „pseudoguzach” jelita grubego w porównaniu z rakiem jelita grubego (CRC), to istotność statystyczną osiągnięto jedynie dla ekspresji izoformy mRNA IGF-1B (Tabela 43, Rycina 23).

Ilościowa ekspresja mRNA antygenu proliferacyjnego Ki-67 w badanych grupach wydaje się być natomiast wyższa w CRC niż w „pseudoguzach” ($p=0,07$; na granicy istotności) (Tabela 43).

Tabela 43. Porównanie ilościowej ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 oraz wszystkich izoform mRNA IGF-1 oraz mRNA Ki-67 (liczba kopii/ μ g RNA) u pacjentów z CRC (guz, $n=31$) i w grupie porównawczej (pseudoguz, $n=17$).

	grupa	średnia\pmSD	p testu
Całk. mRNA IGF-1	guz (CRC)	17115 \pm 82183	0,138
	pseudoguz	16855 \pm 32792	
Wariant (izoforma) mRNA			
IGF-1 P1 (klasa I)	guz	474 \pm 552	0,454
	pseudoguz	1452 \pm 2577	
IGF-1 P2 (klasa II)	guz	661 \pm 646	0,814
	pseudoguz	2516 \pm 4616	
IGF-1A	guz	1193 \pm 4235	0,392
	pseudoguz	1592 \pm 2719	
IGF-1B	guz	305 \pm 390	0,009
	pseudoguz	6714 \pm 12379	
IGF-1C	guz	14 \pm 31	0,325
	pseudoguz	127 \pm 368	
mRNA Ki-67	guz	187346 \pm 456321	0,069
	pseudoguz	147523 \pm 195803	

Objaśnienia: *p* – poziom istotności; *SD* – odchylenie standardowe



Rycina 23. Porównawcza analiza ilościowej ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 oraz poszczególnych izoform mRNA IGF-1 (P1, P2, A, B i C) (liczba kopii mRNA/μg RNA) w grupie badanej (rak jelita grubego, CRC) i grupie porównawczej (pseudoguzy); ** - $p < 0,01$ pomiędzy ekspresją mRNA IGF-1B w obu grupach.

4.21. Porównanie immunohistochemicznej ekspresji białka IGF-1, białek proliferacji i apoptozy komórek oraz białka AKT pomiędzy grupą badaną a porównawczą

Wykrywalność białka IGF-1 w materiale tkankowym CRC była nieco wyższa (45%) w porównaniu z pseudoguzami (29%), jednak nie była to różnica istotna statystycznie ($p > 0,05$). Podobnie ilościowa ekspresja białka IGF-1 w raku jelita grubego oraz w zmianach nienowotworowych/pseudoguzach (grupa porównawcza) była podobna ($p > 0,05$). Ekspresja IHC markerów proliferacji komórkowej, takich jak antygen Ki-67 i PCNA była natomiast istotnie wyższa w raku w porównaniu ze zmianami nienowotworowymi jelita grubego. Ilościowo pod względem ekspresji różniły się także pozostałe analizowane immunohistochemicznie białka, tj. p53 oraz kaspaza-3 (oba wyższe w CRC niż w pseudoguzach) (Tabela 44). Ekspresja białka AKT była natomiast wyższa w grupie porównawczej (pseudoguzy) w porównaniu z CRC.

Tabela 44. Porównanie immunohistochemicznej ekspresji białka IGF-1, białek proliferacji komórkowej i markerów apoptozy oraz białka AKT u chorych z CRC (guz, n=31) i w grupie porównawczej (pseudoguz, n=17).

Marker*	Grupa	n	Mediana	Min.	Maks.	p testu
IGF-1	Guz (CRC)	31	0,00	0,00	12,00	0,138
	Pseudoguz	17	0,00	0,00	3,00	
Ki-67	Guz	31	3,00	0,00	4,00	<0,001
	Pseudoguz	17	0,00	0,00	1,00	
PCNA	Guz	31	4,00	3,00	4,00	0,040
	Pseudoguz	12	3,00	3,00	4,00	
p53	Guz	31	2,00	0,00	4,00	<0,001
	Pseudoguz	17	0,00	0,00	1,00	
Kaspaza-3	Guz	30	3,00	0,00	6,00	0,002
	Pseudoguz	17	2,00	0,00	3,00	
AKT	Guz	31	0,00	0,00	8,00	0,002
	Pseudoguz	10	6,00	3,00	8,00	

Objaśnienia: * - skala półilościowa oceny reakcji IHC (patrz *Materiał i Metody*); n – liczba pacjentów, p – poziom istotności

5. Omówienie wyników i dyskusja

Rak jelita grubego i odbytnicy (CRC) należy do najczęstszych i najgroźniejszych nowotworów złośliwych człowieka. Rozpoznawany jest zazwyczaj późno, pomimo coraz powszechniej stosowanych systemów wczesnego wykrywania. Wśród „histologicznych” czynników ryzyka rozwoju CRC wymienia się m.in. obecność przewlekłych zapalnych schorzeń jelit i przednowotworowych rozrostów nabłonka gruczołowego (głównie gruczolaki) [Bosman 2014; Bosman i Yan, 2014].

U większości badanych w tej pracy pacjentów (65%), na podstawie danych z historii chorób nie udało się potwierdzić wykrycia obecności morfologicznych zmian przednowotworowych jelita grubego. Trudno jednak stwierdzić czy rozwój CRC wystąpił *de novo*, czy na podłożu niewykrytych zawczasu zmian tkankowych. Średnia wieku pacjentów z CRC wynosiła 65 ± 12 lat i dominowali mężczyźni, co jest zgodne z danymi epidemiologicznymi [Nowacki i wsp., 2007; Hady i wsp., 2010; Klimczak i wsp., 2014; Mogoanta i wsp., 2014]. Wśród całej grupy pacjentów, blisko 60% chorych demonstrowało przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych, a cztery osoby (13%) przerzuty odległe (wszystkie do wątroby). Stadium klinicznego zaawansowania nowotworu w momencie rozpoznania CRC ma znaczenie prognostyczne co do 5-letniego przeżycia. W stadium I i po resekcji guza może osiągać 100%, a w stadium III (48% chorych w obecnej pracy) znacznie się zmniejsza (ok. 35%), malejąc do ok. 5% u pacjentów z odległymi przerzutami (13% moich pacjentów) [Kanthan i wsp., 2012; Brenner i wsp., 2014]. W okresie badań (2010-2015), z całej grupy CRC zmarło sześć osób (19%).

Od wielu dekad opisuje się związek pomiędzy składnikami systemu insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF) a rozwojem nowotworów złośliwych, w tym raka jelita grubego [Donovan i Kummar, 2008]. Większość prac wskazuje na zaburzenia (wzrost/spadek) i to głównie surowiczych stężeń składników osi IGF na różnych etapach kancerogenezy [Baricević i wsp., 2006; Maki 2010].

Insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1) produkowany jest głównie w wątrobie, chociaż synteza tego białka może odbywać się praktycznie w każdym narządzie i wielu typach komórek organizmu człowieka [Obrępańska-Stęplowska i wsp., 2005; Khandwala i wsp., 2000; Maki 2010]. IGF-1 produkowany w wątrobie spełnia funkcje hormonu endokrynowego, a produkowany w innych narządach działa głównie na drodze autokrynowej i parakrynowej w promocji fizjologicznego lub patologicznego wzrostu tkanek i narządów [Daughday i Rotweien, 1989; Alexia i wsp., 2004]. Znana i szeroko opisywana jest mitogenna i antyapoptotyczna funkcja IGF-1, stąd zmiany w nasileniu tkankowej ekspresji IGF-1 mogą

odpowiadać za transformację nowotworową [Le Roith i wsp., 2001; Józefiak i wsp., 2008; Szewczuk i wsp., 2009].

Na eksperymentalnych modelach raka jelita grubego dowiedziono autokrynowego wydzielania wszystkich składników systemu IGF (w tym IGF-1), sugerując rolę szlaku sygnałowego IGF w kancerogenezie tego nowotworu [Jehle i wsp., 1999; Donovan i Kummar, 2008]. Ilość produkowanych IGF-ów zależała od typu komórek nabłonka jelitowego oraz indeksu proliferacyjnego komórek guza [Jehle i wsp., 1999]. Różne transkrypty i zróżnicowane białka prekursorowe IGF-1 działają przede wszystkim jako czynniki pro-proliferacyjne, ale wykazano również efekt hamujący wzrost komórek nowotworowych [Tian i wsp., 1999; Chen i wsp., 2007; Matheny i wsp., 2010; Temmerman i wsp., 2010].

Nieliczne jak dotąd doniesienia dotyczą badania roli tkankowej ekspresji różnych izoform splicingowych mRNA *IGF-1* w nowotworach u człowieka [Armakolas i wsp., 2010; Koczorowska i wsp., 2011; Kasprzak i wsp., 2012; 2013].

5.1. Analiza ekspresji różnych izoform mRNA IGF-1 (IGF-1P1, IGF-1P2, IGF-1A, IGF-1B, IGF-1C)

Rola zróżnicowanej transkrypcji *IGF-1*, w tym produkcja wielu izoform (wariantów) mRNA IGF-1, a zwłaszcza tworzenia potranslacyjnych E-peptydów, jest ostatnio podnoszona w licznych badaniach *in vivo* oraz *in vitro* [Dluzniewska i wsp., 2005; Mills i wsp., 2007; Quesada i wsp., 2009; Armakolas i wsp., 2010; Barton i wsp., 2010; Philippou i wsp., 2009; Durzyńska i wsp., 2013].

Alternatywny splicing *IGF-1* najdokładniej scharakteryzowano w tkance mięśniowej szkieletowej [Yang i wsp., 1996; Mills i wsp., 2007; Barton i wsp., 2010; Matheny i wsp., 2010] i nerwowej [Dluzniewska i wsp., 2005; Quesada i wsp., 2009] oraz wybranych nowotworach i liniach komórek nowotworowych [Brokaw i wsp., 2007; Armakolas i wsp., 2010; Koczorowska i wsp., 2011; Philippou i wsp., 2013].

Badania dotyczące roli izoform mRNA IGF-1 w raku jelita grubego przyniosły interesujące wyniki własne [Kasprzak i wsp., 2012; 2013]. Badania te kontynuowano w ramach obecnej pracy przede wszystkim w oparciu o większą liczbę pacjentów z CRC oraz grupę porównawczą z przewlekłymi zmianami zapalnymi, gruczolakami i/lub polipowatością jelita grubego. Po raz pierwszy w dwóch grupach chorych, tj. w raku jelita grubego oraz w przewlekłych zmianach zapalnych jelita grubego (pseudoguzi), podjęto próbę ilościowej i jakościowej oceny profilu splicingowego genu IGF-1 mając do dyspozycji

sekwencje odpowiednio zaprojektowanych starterów do różnych wariantów mRNA IGF-1 [Koczorowska i wsp., 2011; Koczorowska 2012]. Dane z piśmiennictwa sugerują, iż izoformy mRNA IGF-1, jak również propeptydy oraz peptydy z końca karboksylowego cząsteczki białka (Ea, Eb, Ec), spełniają bliżej nieznaną funkcję w nowotworowej komórce, prawdopodobnie różniące się od działania dojrzałego białka [Phillipou i wsp., 2009]. Wykazanie jądrowej (i jąderkowej) lokalizacji izoformy mRNA IGF-1B czy pro-peptydu IGF-1B miałyby wskazywać na rolę zwłaszcza tej izoformy w kancerogenezie [Tan i wsp., 2002; Koczorowska 2012]. Nie jest jednak dokładnie poznany molekularny mechanizm działania tej izoformy mRNA IGF-1 czy powstających z niej pro-peptydów na funkcje jądra komórkowego. Nie wyklucza się udziału tych białek i/lub izoform IGF-1 w regulacji cyklu komórkowego, niezależnie od sygnalizacyjnej roli IGF-1.

U pacjentów zebranych w ramach obecnej pracy (grupa badana – CRC oraz grupa porównawcza – zmiany potencjalnie przednowotworowe jelita grubego, tzw. pseudoguzi) zbadano tkankową ekspresję całkowitego mRNA IGF-1 oraz następujących izoform mRNA IGF-1: obu promotorów genu (P1 i P2) oraz izoform mRNA określanych skrótowo: A, B i C. Ekspresję całkowitego mRNA IGF-1 oraz izoform mRNA promotora pierwszego i drugiego oraz pozostałych wariantów mRNA IGF-1 (A, B, C), wykazano u wszystkich pacjentów z CRC i w kontrolnym jelicie grubym. U innych autorów samo wykazywanie obecności (wykrywalność) mRNA IGF-1 przedstawiało się bardzo różnie, od braku wykrywania transkryptu w tkankach CRC [Freier i wsp., 1999] oraz na liniach komórek CRC HT-29 i CaCo-2 [Jenkins i wsp., 2005], wykrywania ich tylko w części przypadków (41-54% CRC; 60-67% kontrolnych) [Bustin i wsp., 2002; Jenkins i wsp., 2005; Nosho i wsp., 2004], do wykazywania, podobnie jak w obecnej pracy – obecności transkryptu we wszystkich przypadkach raka i w tkankach prawidłowej ściany jelita grubego [Michell i wsp., 1997]. W obrębie prawidłowej śluzówki okrężnicy transkrypty IGF-1 we wszystkich badanych skrawkach i niezależnie od anatomicznej lokalizacji w okrężnicy (wstępująca, poprzecznicą, esicą) i odbytnicy wykazała również grupa Vrielinga. Z zastosowaniem podobnej jak w obecnej pracy metody RT-PCR, autorzy ci wykazali ilościowo większą ekspresję IGF-1 mRNA w odbytnicy w porównaniu z okrężnicą wstępującą [Vrieling i wsp., 2009]. Obecne badania własne nie mogą potwierdzić takiej obserwacji, choć porównano również te dwa odcinki jelita grubego (dystalny vs. proksymalny). Należy dodać, iż w zebranej w tej pracy grupie pacjentów było jedynie dwóch chorych z lokalizacją CRC w samej odbytnicy. U pięciu dalszych pacjentów wykazywano obecność nowotworu w okolicy zagięcia esiczo-odbytniczego. Ani w raku, ani w kontrolnej tkance tej okolicy nie uchwycono jednak różnic

w ekspresji całkowitego mRNA IGF-1 biorąc pod uwagę odcinek proksymalny i dystalny jelita grubego (Załącznik nr 2, Aneks).

Celem konfrontacji z wynikami badań innych badaczy, w obecnej pracy przedstawiono procentowy udział ekspresji mRNA obu promotorów *IGF-1* (P1, P2) oraz izoform mRNA A, B i C w całkowitej ekspresji *IGF-1* w dwóch grupach chorych (raki, pseudoguzy) oraz w kontrolnym jelicie grubym. I chociaż odsetkowy udział mRNA promotora P1 wynosił w obecnych badaniach blisko 60% w CRC, 36% w pseudoguzach, a w odpowiednich dwóch kontrolach ok. 60%, nie różnił się znamienne od procentowego udziału mRNA P2 w żadnej z tych grup. Nie obserwowano różnic w procentowym udziale obu promotorów P1 i P2 genu *IGF-1* pomiędzy grupą z CRC i pseudoguzami jelita grubego. W odniesieniu do danych z piśmiennictwa zdecydowanie częściej wskazuje się na przewagę ekspresji mRNA pierwszego promotora (P1) w formowaniu klas transkryptów genu *IGF-1* (klasa I) i to zarówno w zdrowej wątrobie szczura (60-65%) [Mittanck i wsp., 1997], jak i w innym typie, niż badany w tej pracy, nowotworze ludzkim (rak szyjki macicy) (69-86%) [Koczorowska 2012; 2013]. Kompensacyjny wzrost aktywności promotora P1 opisano również w badaniach na modelu mysim z *knockout* P2 genu *IGF-1*. Zwierzęta te cechowały się normalnym rozwojem i wzrostem postnatalnym i miały prawidłowe stężenie krążącego IGF-1 [Temmerman i wsp., 2010]. U człowieka mechanizm preferencyjnego wyboru promotora P1 w procesie transkrypcji genu jest słabo poznany. Warto przypomnieć, iż budowa promotorów P1 i P2 genu *IGF-1* jest zbliżona u człowieka i innych ssaków, a także gryzoni i są one usytuowane w obrębie 1 i 2 egzonu [Adamo 1995; Mittanck i wsp., 1997].

Procentowy udział mRNA drugiego promotora genu *IGF-1* (P2) w całkowitej ekspresji *IGF-1* zbadany w obecnej pracy (42% u osób z CRC, a 64% w pseudoguzach) i ok. 40% w obu grupach kontrolnych, był wyższy niż w badaniach innych autorów. W tkankach z różnie zaawansowanymi zmianami nabłonka szyjki macicy, wynosił on maksymalnie 31% całkowitej ekspresji *IGF-1* w raku w porównaniu z mniej zaawansowanymi zmianami i kontrolą [Koczorowska 2012]. W wątrobie szczura, promotor P2 zaangażowany był w wytwarzanie 25% całkowitej puli transkryptów *IGF-1* [Adamo i wsp., 1991].

Badania obecne wskazują na równoważną rolę obu promotorów genu *IGF-1* w formowaniu transkryptów *IGF-1* w prawidłowym i zmienionym morfologicznie (pseudoguzy, rak) jelicie grubym u człowieka.

Odsetkowy wzór pozostałych izoform mRNA *IGF-1* (A, B i C) w tkankach pacjentów z CRC ujawnił przewagę ekspresji mRNA izoformy A (79%) nad B (20%) i C (1%) oraz większą ekspresję izoformy mRNA B niż C. Porównanie materiału tkankowego CRC i kontrolnego

jelita grubego, wykazało istotnie wyższy procentowy udział izoformy mRNA IGF-1A u pacjentów z CRC (79%) w porównaniu z kontrolą (49%), a istotnie mniejszy udział mRNA izoformy B (20%) w tkance zmienionej nowotworowo w porównaniu z prawidłową tkanką jelita grubego (49%).

W CRC udział ekspresji izoformy mRNA IGF-1A (79%) był istotnie większy także w porównaniu z grupą porównawczą (pseudoguzy) (26%), natomiast udział odsetkowy izoformy mRNA B był wyższy w zmianach potencjalnie przednowotworowych (72%) w porównaniu ze zmianami złośliwymi jelita grubego (CRC) (20%).

Wyniki te trudno skomentować na podstawie wyników badań innych autorów. Podobną analizę ekspresji tych izoform mRNA IGF-1 (A, B i C) z zastosowaniem identycznych starterów, wykonano na HPV-pozytywnych i negatywnych tkankach raka szyjki macicy [Koczorowska i wsp., 2011; Koczorowska 2012]. Inaczej niż obecne wyniki badań, w komórkach rozwiniętego raka szyjki macicy w porównaniu z innymi stadiami nowotworzenia, wykazano istotną przewagę procentowego udziału izoformy IGF-1B nad pozostałymi izoformami mRNA IGF-1. Autorzy sugerują, że z tej postaci transkryptu może powstawać peptyd (Eb) o silnie mitogennych właściwościach, które opisano w piśmiennictwie [Pfeffer i wsp., 2009].

Badania obecne sugerują także istotną biologiczną aktywność izoformy mRNA IGF-1B, zwłaszcza we wczesnych stadiach nowotworzenia w jelicie grubym. Na pro-proliferacyjną rolę lokalnej ekspresji izoformy IGF-1B we wczesnych fazach kancerogenezy jelita grubego (pseudoguzy) wskazuje dodatkowo wysoka pozytywna korelacja z ekspresją antygenu proliferacyjnego PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) właśnie w tej grupie chorych. W samym raku (CRC) wykazano nieco słabszą, ale również pozytywną zależność pomiędzy ekspresją tej izoformy mRNA a ekspresją mRNA antygenu Ki-67.

Dokładna analiza ilościowa genowej ekspresji IGF-1 (znormalizowana przez mRNA genów referencyjnych) u pacjentów z CRC i w sąsiadującej prawidłowej tkance jelita grubego (kontrola), wykazała znamienne niższą ekspresję całkowitego mRNA IGF-1 oraz wszystkich izoform mRNA w tkance nowotworu w porównaniu z kontrolą (Ryciny 10-11). Porównując ekspresję tych izoform mRNA między sobą – podobnie jak we wzorze odsetkowym, nie udało się wykazać różnic w ilościowej ekspresji mRNA transkryptów klasy I (P1) i klasy II (P2). Natomiast, przeciwnie do odsetkowego wzoru ekspresji izoform A, B i C, nie potwierdzono znamiennej ilościowej przewagi izoformy mRNA IGF-1A nad B w grupie CRC. Krótko mówiąc, analiza ilościowa wykazała zbliżoną ekspresję izoform

mRNA A i B, a niższą ekspresją od obu tych wariantów mRNA, cechowała się ekspresja izoformy mRNA IGF-1C.

W grupie zmian nienowotworowych (pseudoguzy) badanych w ramach obecnej pracy okazało się, że ekspresja całkowitego IGF-1 oraz wariantów mRNA IGF-1 nie różni się ilościowo od ekspresji genu IGF-1 w kontrolnym jelicie grubym. Spośród różnych izoform mRNA dominującą okazała się ekspresja izoformy mRNA IGF-1B, jednak znamienność statystyczną wykazano jedynie pomiędzy ekspresją izoform mRNA B i C. Ekspresja izoformy mRNA IGF-1A była oczywiście także wyższa w porównaniu z ekspresją IGF-1C.

Porównując ilościową ekspresję IGF-1 (liczba kopii/ μ g RNA) w obu grupach (CRC vs. pseudoguzy) znamienne wyższa w grupie zmian przednowotworowych w porównaniu z CRC, okazała się ekspresja izoformy mRNA IGF-1B. Jak wspomniano wcześniej, nie można wykluczyć roli tej izoformy mRNA IGF-1 we wczesnych etapach transformacji nowotworowej kolonocytów (czyli w grupie pseudoguzów).

Dane z piśmiennictwa dotyczące ilościowej oceny ekspresji mRNA IGF-1 (z zastosowaniem różnych technik molekularnych) w CRC przynoszą (podobnie jak ocena samej wykrywalności/obecności transkryptów) – dość zróżnicowane wyniki [Tricoli i wsp., 1986; Mitchell i wsp., 1997; Freier i wsp., 1999; Nosho i wsp., 2004]. I tak, brak istotnych różnic w nasileniu ekspresji IGF-1 mRNA u pacjentów (n=10) ze sporadycznymi formami CRC (stadium B lub C w skali Dukes'a) i w nabłonku prawidłowej błony śluzowej jelita grubego wykazał Mitchell i wsp., stosując *Northern* i *Western blotting* [Mitchell i wsp., 1997]. Natomiast Tricoli i wsp. dzięki użyciu podobnej techniki molekularnej (*Northern blotting*) w ok. 20% pierwotnych CRC wykazali słabo zaznaczony, 3-5-razy podwyższony poziom ekspresji mRNA IGF-1, a w prawidłowej śluzówce jelita grubego obserwowano niski poziom ekspresji IGF-1, nazwany „*background level*” [Tricoli i wsp., 1986]. Zastosowanie podobnej do stosowanej w obecnej pracy techniki molekularnej (RT PCR) przez Nosho i wsp., na tkankach ludzkiego CRC (n=90), pozwoliło wykazać nadekspresję mRNA IGF-1 w ok. 54% tkanek. Transkrypt był słabo widoczny w sąsiadującej nieguzowej tkance. Ekspresja mRNA IGF-1 była pozytywnie skorelowana ze zmianami histologicznymi, ale nie z wiekiem, wymiarem guza, płcią, lokalizacją czy makroskopowym typem nowotworu. W odróżnieniu od badanych w tej pracy tkanek z CRC, autorzy ci analizowali wyłącznie wczesne stadia raka (gruczolaki i CRC w stadium klinicznym pT1) [Nosho i wsp., 2004]. Ponadto badali oni poziom całkowitego mRNA IGF-1, a nie ekspresję wariantów mRNA czy prekursorów białka. Ponadto większą uwagę autorzy tego studium poświęcili roli ekspresji mRNA IGF-2, która korelowała z ekspresją transkryptów IGF-1 oraz IGF-1R, a także

z ekspresją transaktywatorów ścieżki PI3K/Akt - Cox-2 (ang. *cyclooxygenase 2*) i MMP-7 (ang. *matrix metalloproteinase 7*) [Nosho i wsp., 2004]. Ta sama grupa badaczy kilka lat później opisała niższą ekspresję IGF-1 na poziomie mRNA w tkance nowotworowej w porównaniu z sąsiadującą prawidłową błoną śluzową, a podwyższone wartości mRNA receptora IGF-1 (IGF-1R) [Oshima i wsp., 2008]. Podobnie ekspresja IGF-1 mRNA oceniona przez Jenkins i wsp. była niższa w CRC niż w kontroli (2.6×10^5 vs. 4.7×10^5 kopii/ μ g całkowitego RNA, odpowiednio) [Jenkins i wsp., 2005]. Podobne wyniki (tzn. obniżenie ekspresji IGF-1 na poziomie mRNA w CRC vs. kontrola) uzyskano w ramach wcześniej prowadzonych badań własnych [Kasprzak i wsp., 2012; 2013].

Interpretując niższą ekspresję mRNA IGF-1 w CRC w porównaniu z kontrolą, nie można wykluczyć wpływu środowiska wewnątrz światła przewodu pokarmowego (ang. *intraluminal environment*) (np. diety), a także oddziaływania systemowych czynników wzrostu na lokalną regulację (hamowanie?) produkcji IGF-1 w przebiegu postępującego nowotworu. Jak dotąd skąpe są dokładniejsze prace na temat jelitowej regulacji osi IGF-ów [Renehan i wsp., 1999; Bortvedt i Lund, 2012]. Na zwierzęcym modelu otyłości (szczury) po traktowaniu dietą wysokotłuszczową (ang. *high-fat diet*) wykazano wzrost liczby jelitowych gruczolaków, wyższy indeks proliferacji komórek nabłonka jelitowego (wyrażonej ekspresją Ki-67), wzrost masy ciała, masy wątroby i tkanki tłuszczowej dookoła przewodu najądrza tych zwierząt. Zmiany te były skorelowane z wyższymi stężeniami wielu składników osi IGF, w tym IGF-1 w surowicy krwi [Zhu i wsp., 2014].

W obecnej pracy nie badano surowicznych stężeń IGF-1 u pacjentów z CRC, ani nie dysponowano danymi odnośnie sposobu odżywiania, wartości BMI pacjentów, stąd też trudno ustosunkować się do tych danych. Można jedynie przyjąć za innymi wynikami badań, iż czynnik dietetyczny w jelicie ma niewątpliwy wpływ na ryzyko tworzenia zmian przednowotworowych jelita grubego także u człowieka. Jednym z mechanizmów może być parakrynowe wydzielanie IGF-1, którego źródłem niekoniecznie są zmienione nowotworowo kolonocyty, a raczej jelitowe komórki pochodzenia mezenchymatycznego [Bortvedt i Lund, 2012]. Związek otyłości z kancerogenezą jelita grubego znany jest od lat, ale bardziej kontrowersyjna wydaje się być rola estrogenów w rozwoju CRC u otyłych pacjentów. Dane epidemiologiczne pokazują, iż poziom endogennego estradiolu jest niezależnym czynnikiem ryzyka dla CRC, a jego wzrost w otyłości może mieć nawet rolę protekcyjną. Hormon ten działa głównie poprzez receptor typu B (ang. *estrogen receptor β* , ER- β) obecny na normalnych kolonocytach. W miarę postępu transformacji nowotworowej spada jednak liczba

ER- β , a wzrasta liczba ER- α i wówczas estrogeny (których stężenie wzrasta w otyłości) promują rozwój guza [Chen i Iverson, 2012].

W całej zebranej w latach 2010-2015 grupie chorych na CRC dominowali mężczyźni. Spośród sześciu zmarłych w tych latach pacjentów, pięciu należało do tej płci. Nie było istotnych różnic w ekspresji genowej IGF-1 porównując całą grupę pacjentów, którzy zmarli w omawianym okresie czasu z tymi, którzy przeżyli 5 lat od zabiegu operacyjnego. Nie stwierdzono również istotnych różnic w ekspresji IGF-1 i jego izoform mRNA pomiędzy kobietami i mężczyznami z CRC.

W grupie porównawczej (pseudoguzy) wykazano natomiast pewne różnice w ekspresji izoform mRNA IGF-1 pomiędzy kobietami i mężczyznami. I tak, znamienne wyższą ekspresję mRNA klasy II transkryptów (P2) oraz izoform mRNA A i B obserwowano u mężczyzn w porównaniu z kobietami.

Nie ma podobnych prac w piśmiennictwie dotyczących omawianej kwestii. Znalezione wyniki badań pokazujące przewagę ekspresji izoformy mRNA IGF-1A nad IGF-1B w takich narządach jak macica, jajniki, wątroba i nerki, ale u myszy, podkreślając narządowo-specyficzną regulację produkcji wariantów mRNA IGF-1 w czasie rozwoju [Ohtsuki i wsp., 2005].

Podsumowując, badania obecne wykazały różnice ilościowe w ekspresji zarówno całkowitego mRNA IGF-1, jak i poszczególnych izoform transkryptów IGF-1 a te znamienne statystycznie w porównaniu z kontrolą, dotyczyły przede wszystkim grupy CRC. Innymi słowy, obserwowano istotnie niższą ekspresję całkowitego mRNA IGF-1 oraz wszystkich jego izoform w rakach jelita grubego w porównaniu z kontrolą. Nie uchwycono natomiast różnic w lokalnej ekspresji genowej IGF-1 w pseudoguzach w porównaniu z tkanką kontrolną tej grupy. Porównanie dwóch zasadniczych grup pacjentów (CRC i pseudoguzy) pozwoliło na uchwycenie znamienne większej ekspresji izoformy mRNA IGF-1B w zmianach przednowotworowych w porównaniu z tkankami raka jelita grubego (CRC). Sugeruje to rolę biologiczną izoformy mRNA IGF-1B w początkowych etapach kancerogenezy jelita grubego.

5.2. Analiza ekspresji IGF-1 na poziomie białka

Dojrzałe białko IGF-1 powstaje z 3 i 4 egzonu *IGF-1*, które to egzony są niezmiennie. Egzony 1 i 2 zawierają alternatywne promotory P1 i P2 i kodują peptydy sygnałowe klasy I i II, a egzony 5 i 6 podlegają alternatywnemu splicingowi i kodują różne peptydy E [Zarilli i wsp., 1994; Barton 2006a]. Zastosowane w obecnej pracy monoklonalne przeciwciała swoiste anty-

IGF-1 z firmy R&D Systems wykrywały najbardziej konserwatywny fragment dojrzałego peptydu w komórkach ludzkich. Nie dysponowano przeciwciałami na wykrywanie izoform pro-peptydów w badaniach immunocytochemicznych (IHC).

Wykrywalność samego białka IGF-1 z zastosowaniem metody IHC w obecnej pracy dotyczyła zbliżonego odsetka przypadków w CRC i kontroli (45% vs. 35%, odpowiednio; $p > 0,05$). Pod względem ilościowym ekspresja białka także nie różniła się, jak się spodziewano, pomiędzy guzem i kontrolą. Badania innych autorów z zastosowaniem techniki IHC na tkankowym panelu CRC (ponad 700 fragmentów raka) przeprowadzone przez niemieckich autorów wykazały ekspresję IGF-1 u zaledwie 7,5% pacjentów [Peters i wsp., 2003]. Natomiast obserwacje autorów japońskich opisały ją aż u 80% chorych [Shiratsuchi i wsp., 2011]. Oba badania przeprowadzono z zastosowaniem innych przeciwciał pierwszorzędowych niż w obecnej pracy. Lokalizacja białka w cytoplazmie komórek nowotworowych z niekiedy ziarnistym wzorem reakcji IHC, obserwowana w obecnej pracy, jest zgodna z cytowanymi pracami z piśmiennictwa [Peters i wsp., 2003; Shiratsuchi i wsp., 2011; Li i wsp., 2013]. Ekspresja białka IGF-1 zarówno w CRC, jak i odpowiedniej kontroli w obecnych badaniach, oceniona półilościowo w 12-punktowej skali Remmele i Stegner była niska (mediana 0,00) i nie różniła się istotnie w CRC i kontroli. Nie można potwierdzić wyników badań Li i wsp., którzy wykazali zwiększoną ekspresję białka IGF-1 oraz IGF-1R, z intensywniejszym sygnałem IHC w słabiej zróżnicowanych rakach jelita grubego w porównaniu z otaczającą normalną tkanką jelita grubego. Nie udało się również potwierdzić istotnych korelacji lub różnic ilościowych dla ekspresji białka IGF-1 i danych klinicznych (wiek, płeć, wyniki badań pracownianych, *grade*, *stage* guza, przerzutowanie do węzłów chłonnych, żyjący/zmarli pacjenci), jak to wykazano w innych pracach [Peters i wsp., 2003; Li i wsp., 2013]. Inni autorzy wykazywali pozytywną korelację pomiędzy zwiększoną ekspresją tych składników osi IGF a przerzutowaniem guza do węzłów chłonnych oraz z parametrami klasyfikacji TNM [Li i wsp., 2013]. Badacze ci stosowali jednak inne niż w obecnej pracy, przeciwciała swoiste (z firmy Abcam), choć system oceny półilościowej był podobny. Brak istotnych zależności z przerzutowaniem i klasyfikacją TNM w obecnej pracy, można uzasadnić faktem, iż pacjenci z CRC stanowili bardziej jednorodną grupę, tj. 81% pacjentów posiadało stopień T3 guza, a u ponad połowy pacjentów (55%) guz jelita grubego przekraczał ścianę jelita i dawał przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych (*stage C2*) (Tabele 8-10). Nie występowały jednak różnice ilościowe w ekspresji białka IGF-1 w zależności od obecności czy braku przerzutów do węzłów chłonnych (Tabela 29).

W obecnej pracy nie udało się wykazać istotnych zależności między ekspresją białka IGF-1 a produkcją całkowitego mRNA i poszczególnych izoform transkryptu. Inni autorzy, jednak z wykorzystaniem innych metod badawczych (rzeczywiste ilościowe analizy biochemiczne), wykazywali również niewielkie ilości białka IGF-1, i to podobne w zdrowych i tkankach ze zmianami złośliwymi [Freier i wsp., 1999]. Nie można natomiast potwierdzić wyników badań Bustin i wsp., którzy wykrywali peptyd IGF-1 wyłącznie w tkankach, które dawały jednocześnie ekspresję mRNA IGF-1, sugerując tym samym korelację produkcji dojrzałego IGF-1 na matrycy wcześniej wytwarzanego transkryptu [Bustin i wsp., 2002].

Analiza ekspresji IGF-1 na poziomie białka w zmianach nienowotworowych jelita grubego (pseudoguzy) w obecnej pracy, wykazała obecność tego białka jedynie u 5/17 chorych. Także w tej grupie chorych wykrywany immunocytochemicznie produkt reakcji na IGF-1 nie był istotnie zależny od produkowanych przez tkanki transkryptów IGF-1. Wbrew oczekiwaniom nie wykazano ilościowych różnic w ekspresji IGF-1 na poziomie białka pomiędzy tkankami z rakiem jelita grubego (CRC) i zmianami potencjalnie przednowotworowymi (pseudoguzy). Należy dodać jednak, że sama wykrywalność IGF-1 w materiale tkankowym była nieco wyższa w CRC (45%) w porównaniu z tkankami pseudoguzów (ok. 30%), jednak nie była to różnica istotna statystycznie ($p > 0,05$).

Badania obecne u pacjentów z CRC nie wykazały korelacji pomiędzy ekspresją białka IGF-1 a nasileniem proliferacji komórkowej, jak demonstrują to badania innych autorów na przykładzie ekspresji markera proliferacyjnego Ki-67 [Peters i wsp., 2003]. Nie uchwycono więc istotnych korelacji pomiędzy ekspresją całkowitego (dojrzałego) białka IGF-1 a ekspresją Ki-67 ani na poziomie mRNA, ani białka. W pseudoguzach ekspresja białka IGF-1 również nie była istotnie zależna od ekspresji markerów proliferacji komórkowej czy apoptozy. Ponadto nie udało się wykazać znamiennych zależności ekspresji tkankowej białka IGF-1 z nasileniem zmian zapalnych (ang. *grading*) w tej grupie pacjentów.

Badania obecne nie potwierdziły korelacji pomiędzy ekspresją peptydu IGF-1 a złośliwością histologiczną guza (ang. *grade*), ani z nasileniem zmian zapalnych (parametr CLR) w badanych tkankach grupy pacjentów z CRC. Nie było również znamiennych zależności pomiędzy nasileniem zmian zapalnych a ekspresją IGF-1 w grupie pseudoguzów. Ekspresja tego białka nie różniła się także w zależności od histologicznego typu CRC (śluzotwórczy/inne), od wielkości guza, anatomicznej lokalizacji guza, obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych czy wyników podstawowych badań pracownianych. Zbliżoną ekspresję peptydu IGF-1 mieli pacjenci z CRC, którzy zmarli w ocenianym okresie czasu, w porównaniu z nadal żyjącymi. Nie dysponowano dokładnymi datami śmierci

pacjentów z CRC zebranych w obecnej pracy, stąd nie udało się przeprowadzić badania krzywych przeżycia w zależności od tkankowej ekspresji białka IGF-1. Inni autorzy wskazują na trend krótszego czasu przeżycia u IGF-1-pozytywnych pacjentów w porównaniu z IGF-1-negatywnymi, jednak wynik ten również nie osiągnął istotności statystycznej i powinien być zweryfikowany w dalszych badaniach [Peters i wsp., 2003].

Porównując nieliczne wyniki badań innych autorów dotyczące badania ekspresji IGF-1 z zastosowaniem technik immunohistochemicznych, wykazywano znaczące korelacje między ekspresją IGF-1 a średnicą guza oraz skalą klinicznego zaawansowania raka (parametr Tis-T1 a T2-T4) czy inwazją naczyń żylnych i/lub limfatycznych [Shiratsuchi i wsp., 2011]. Nie obserwowano, podobnie jak w obecnej pracy, korelacji między ekspresją IGF-1 a histologicznym zróżnicowaniem raka, jak również pomiędzy wiekiem, płcią czy lokalizacją guza (okrężnica, odbytnica) [Shiratsuchi i wsp., 2011].

Dyskusja na temat prognostycznej wartości ekspresji tkankowej IGF-1 w rakach jelita grubego pozostaje otwarta. Czy identyfikacja IGF-1-dodatnich CRC okaże się być pomocą w przewidywaniu efektów nowych strategii leczenia, obejmujących system IGF-ów jak sugerują niektórzy badacze [Peters i wsp., 2003], być może pokażą kolejne prace badawcze. Słabo poznanym tematem pozostaje rola pre-peptydów IGF-1 w kancerogenezie jelita grubego. Badania takie byłyby możliwe poprzez np. pojawienie się na rynku nowych przeciwciał na ich wykrywanie metodami immunohistochemicznymi czy *Western blot*.

5.3. Analiza immunohistochemicznej ekspresji białek proliferacyjnych i apoptozy w rakach jelita grubego i w zmianach nienowotworowych

W CRC wykazano znamienne wyższą ekspresję typowych białek proliferacji komórkowej (Ki-67 i PCNA) oraz apoptozy (białko p53, aktywna kaspaza-3) i to w porównaniu zarówno z kontrolą, jak i grupą porównawczą (zmiany potencjalnie przednowotworowe).

Cyklina D1 kodowana przez protoonkogen PRAD-1/CCND-1/BCL-1 należy do dużej rodziny cyklin, które regulują fazy wzrostu komórkowego poprzez aktywację kinaz cyklinozależnych. Białko to promuje wejście w fazę S cyklu komórkowego. Ekspresja tej cykliny waha się i osiąga maksimum w fazie G1. Rozregulowanie genu PRAD-1/CCND-1/BCL-1 (częste w nowotworach) powoduje wzmocnienie ekspresji cykliny D1 [Bartkova i wsp., 1994]. Cyklina D1 i antygen PCNA zostały zidentyfikowane w CRC jako tzw. *hub genes* w sieci PPI (ang. *a protein-protein interaction*) i bada się ich użyteczność jako biomarkerów wczesnej diagnostyki i monitorowania przebiegu CRC [Liu i wsp., 2015].

Ekspresję cykliny D1 w obecnej pracy można było porównać ilościowo jedynie w grupie CRC i kontroli. Choć była ona istotnie wyższa w zmianach nowotworowych niż w kontrolnym jelicie grubym, zbadanie ekspresji tej cyklinozależnej kinazy serynowo-treoninowej, nie przyniosło oczekiwanych korelacji w kontekście badanej ekspresji genowej *IGF-1*. Niektóre dane literaturowe wskazują jednak na potencjalny wpływ IGF-ów (w tym IGF-1) na regulację ekspresji cykliny D1 [cyt. za Brudnik i wsp., 2007]. W obecnym badaniu sama wykrywalność cykliny D1 dotyczyła ok. 40% pacjentów z CRC, w porównaniu z 50% w innych doniesieniach [Tsai i wsp., 2013]. Nie można jednak potwierdzić wyników nieco wcześniejszych badań, które wykryły bardzo niewielką grupę cyklino-pozytywnych raków jelita grubego, tj. 6% [Ioachim 2008]. Ten ostatni badacz wykazał ponadto zwiększoną ekspresję cykliny D1 w bardziej zaawansowanych klinicznych stadiach CRC (*stage C vs. stage B* w skali Dukes'a), w rakach z przerzutami do węzłów chłonnych oraz w typie śluzotwórczym w porównaniu z niesłuzotwórczym CRC, czego również nie udało się pokazać w badaniach obecnych. Może to wynikać z faktu, iż autor ten analizował liczniejszą grupę chorych (n=97) niż w obecnej pracy (n=31), bardziej zróżnicowaną pod względem zaawansowania klinicznego i typów histologicznych CRC [Ioachim 2008]. Wspomniany autor nie potwierdził jednak dużego znaczenia prognostycznego badanych w swej pracy białek cyklu komórkowego, w tym cykliny D1 w kontekście ryzyka nawrotu choroby czy przeżywalności chorych z CRC [Ioachim 2008]. Inni autorzy wykazują ścisłą zależność pomiędzy ekspresją cykliny D1 i VEGF, sugerując udział tej cykliny (protoonkogenu) w nasilaniu angiogenezy. Podają również, iż koegzystencja ekspresji cykliny D1 z nadekspresją VEGF znacznie skracała czas wolny od nawrotu choroby i obniżała całkowite przeżycie w badanej grupie (n=100). Ocena tych dwóch markerów może (obok klasyfikacji TNM) mieć znaczenie prognostyczne w CRC [Tsai i wsp., 2013].

Obecnym we wszystkich fazach aktywnego cyklu komórkowego (z wyjątkiem fazy G0 i wczesnej fazy G1) jest antygen proliferacyjny Ki-67, zlokalizowany w jądrach komórkowych. Najsilniejszy odczyn barwny na to białko uzyskuje się w czasie mitozy [Gerdes i wsp., 1984]. Rola diagnostyczno-prognostyczna Ki-67 w CRC jest niejednoznaczna [Brown i Gatter, 2002], choć również w tym typie nowotworu u człowieka, sugeruje się dużą kliniczną przydatność badania tego markera za pomocą metod immunohistochemicznych [Melling i wsp., 2015].

W obecnej pracy, zgodnie z danymi z piśmiennictwa [Brown i Gatter, 2002; Melling i wsp., 2015] - obserwowano wyłącznie jądrową lokalizację białka Ki-67 z indywidualnie zróżnicowanym odsetkiem immunopozytywnych komórek. Pozytywną reakcją na to białko

obserwowano u ponad 80% pacjentów z CRC i choć odsetek samej częstości wykrywania nie różnił się od kontroli (75%), analiza ilościowa wykazała istotnie wyższą ekspresję antygenu Ki-67 w rakach jelita grubego w porównaniu z kontrolą. Inni badacze wykazują ekspresję tego markera u 95% chorych z CRC oraz istotny spadek ekspresji po zastosowaniu chemio- i radioterapii przedoperacyjnej [Debucquoy i wsp., 2009]. Podobnie jak w innych badaniach dotyczących CRC, nie wykazano w obecnej pracy korelacji pomiędzy ekspresją białka Ki-67 a stopniem złośliwości guza (*grade*), histologicznym typem guza czy usytuowaniem raka. Nie można potwierdzić danych, iż wyższa ekspresja tego markera jest skorelowana z niższym zaawansowaniem klinicznym raka czy brakiem przerzutowania do węzłów chłonnych i z klinicznie dobrym przebiegiem CRC [Melling i wsp., 2015]. Na podstawie przeprowadzonych w obecnej pracy analiz, nie można poprzeć wniosków wspomnianych autorów, iż wysoki indeks jądrowej ekspresji Ki-67 jest niezależnym czynnikiem prognostycznym dłuższego czasu przeżycia dla pacjentów z CRC [Melling i wsp., 2015]. Nie obserwowano również korelacji między ekspresją antygenu Ki-67 a ekspresją cykliny D1, jak wykazują to niektóre badania [Ioachim 2008].

Dla dokładniejszego sprawdzenia zależności pomiędzy ekspresją całkowitego mRNA oraz różnych wariantów mRNA IGF-1, w obecnej pracy zbadano również ekspresję transkryptu Ki-67. Ze względu na duże różnice indywidualne (w zależności od badanych tkanek z CRC) nie udało się potwierdzić ani różnic w ekspresji mRNA tego markera pomiędzy CRC a odpowiednią kontrolą tej grupy, pseudoguzami i ich kontrolą, ani pomiędzy CRC a pseudoguzami. Porównując te ostatnie grupy (CRC vs. pseudoguzy) wydaje się jednak, że istnieje tendencja do nadekspresji mRNA właśnie w CRC w porównaniu ze zmianami nienowotworowymi ($p=0,069$; na granicy istotności), lecz wymagałoby to potwierdzenia na większej liczbie chorych. Pośrednio o takim trendzie świadczy fakt występowania znamiennej większej ekspresji samego antygenu Ki-67 (na poziomie białka) w CRC w porównaniu z pseudoguzami czy kontrolą ($p<0,001$ w obu przypadkach).

Biorąc pod uwagę ekspresję badanych w pracy przedstawicieli systemu IGF-1 w zależności od nasilenia ekspresji antygenu Ki-67 (na poziomie mRNA), w CRC wykazano pozytywne, dość wysokie korelacje pomiędzy ekspresją mRNA Ki-67 a izoformy mRNA IGF-1P2 oraz IGF-1B, a w przypadku pseudoguzów z ekspresją izoformy mRNA IGF-1P1. Oba warianty mRNA IGF-1 mogą, jak wspomniano wcześniej, odgrywać ważną rolę w nasilaniu wzrostu komórek raka jelita grubego. Być może uda się potwierdzić w przyszłości wartość prognostyczną nie tyle samego peptydu IGF-1, co konkretnych izoform mRNA w CRC [Debucquoy i wsp., 2009].

W przypadku pseudoguzów obserwowano bardzo silne pozytywne korelacje także pomiędzy ekspresją pozostałych izoform mRNA IGF-1 (z wyjątkiem izoformy C) a lokalną ekspresją innego niż Ki-67 (białko, mRNA) antygeny proliferacyjnego, mianowicie PCNA (badanego immunohistochemicznie). Antygen ten jest kwaśnym białkiem jądrowym o m. cząst. 36 kD, pełniącym rolę kofaktora polimerazy delta, ściśle związanym z cyklem komórkowym (koniec fazy G1 i faza S) [Mathews i wsp., 1984; Bravo i wsp., 1987]. Białko to bierze udział w syntezie, metabolizmie oraz naprawie uszkodzonego DNA [Liu i wsp., 2015]. Marker ten był wykorzystywany jako czynnik prognostyczny w nowotworach jelita grubego. Wykazano ściśle korelacje zarówno z lokalną progresją CRC, jak i przerzutowaniem [Nakae i wsp., 1998]. Szczególne znaczenie w przewidywaniu złej prognozy i zdolności do przerzutowania (zwłaszcza do wątroby) przypisywano obecności PCNA w tzw. froncie inwazyjnym CRC [cyt. za Liu i wsp., 2015]. Sugeruje się, że wykazanie zarówno nadekspresji PCNA, jak i genu CCND1 (gen dla cykliny D1) może być cenne w rozwoju nowych form leczenia w CRC [Liu i wsp., 2015].

TP53 to gen supresorowy dla guza (ang. *the tumor suppressor gene*), a produkowane na matrycy mRNA *TP53*, białko zwane „strażnikiem genomu”, o masie cząsteczkowej 53 kDa, odpowiada również za naprawę DNA, a w razie niemożności naprawienia szkód - może indukować programowaną śmierć komórki (apoptozę). Metodami IHC można wykrywać jedynie białko p53 o dłuższym okresie półtrwania (zmutowane lub o zwiększonym współczynniku syntezy) [Jacks i Weinberg, 1996]. *TP53* jest jednym z najczęściej zmutowanych genów w różnych typach nowotworów, w tym CRC. W raku tym zauważono, iż mutacje *TP53* odgrywają zasadniczą rolę w transformacji *adenoma* w *adenocarcionoma*. Opiswane są różne formy mutacji w genie *TP53* w CRC, co implikuje utratę lub utrzymanie prawidłowej funkcji samego białka p53 [López i wsp., 2012; Zeestraten i wsp., 2013].

W obecnej pracy lokalną ekspresję białka p53 (wyłącznie w jądrach komórkowych) wykryto u 61% pacjentów z rakiem jelita grubego, a nie wykryto w żadnej kontroli. W pseudoguzach obecność zmutowanej formy p53 w nielicznych komórkach wykazano u jednego pacjenta (0,06%). W wielu badaniach sugerowano rolę białka p53 jako czynnika prognostycznego w CRC [Liu i wsp., 2014; Huh i wsp., 2015; McGregor i wsp., 2015]. Częstość występowania tkankowej ekspresji p53, wykazana przez niektórych autorów jest identyczna jak w obecnych badaniach, tj. 65% raków [McGregor i wsp., 2015], a u innych niższa (ok. 40%-55%) [López i wsp., 2012; Zeestraten i wsp., 2013; Liu i wsp., 2014]. Ostatni z autorów wykazali krótszy czas przeżycia dla pacjentów z p53-pozytywnym rakiem jelita grubego [Liu i wsp., 2014].

McGregor i wsp. potwierdzili natomiast korelację ekspresji p53 z miejscem usytuowania CRC (odcinek dystalny jelita grubego) oraz III stopniem klinicznego zaawansowania CRC. Jednak jako samodzielny biomarker, białko p53 nie było dobrym czynnikiem prognostycznym w przewidywaniu efektów terapii i czasu przeżycia pacjenta [McGregor i wsp., 2015]. Według innych autorów, analiza IHC białka p53 może okazać się pomocna w prognozowaniu przeżycia jedynie podgrupy pacjentów w stadium III raka odbytnicy, poddanej przedoperacyjnej chemioterapii i radioterapii, jednak zgodnie z opinią poprzedników, białka tego nie uznano za niezależny czynnik prognostyczny w CRC [Huh i wsp., 2015]. Wykazano przy tym, iż obniżenie ekspresji dwóch białek, tj. p53 wspólnie z białkiem Ku70 (ang. *double-strand break repair proteins*) w raku jelita grubego jest powiązane z gorszą prognozą [Lu i wsp., 2015].

W badaniach obecnej pracy u pacjentów z CRC wykazano wysoką pozytywną korelację ekspresji białka p53 i antygenu Ki-67 na poziomie białka, co wiąże funkcję obu białek z zaburzeniami regulacji cyklu komórkowego w raku jelita grubego. Wzrost ekspresji białka p53 u badanych w obecnej pracy pacjentów, obserwowano wraz z nasileniem proliferacji guza. Znalezione potwierdzenie tego wyniku badań w pracy Melling i wsp., którzy również wykazali silną pozytywną korelację między wysokim stopniem ekspresji Ki-67 a ekspresją p53 oraz β -kateniny [Melling i wsp., 2015].

W obecnej pracy nie znaleziono jednak żadnych istotnych zależności pomiędzy ekspresją zmutowanej formy p53 a ekspresją IGF-1 (mRNA, białko). Nie można również potwierdzić różnic ilościowych w ekspresji białka p53 pomiędzy pacjentami zmarłymi i tymi, którzy nadal żyją w obserwowanych 5 latach od operacji.

Liu i wsp. porównując wyniki badań komórkowej ekspresji różnych markerów cyklu komórkowego (cyklina D1, PCNA, białko p53) stawiają hipotezę, iż nadekspresja genu CCND1 (dla cykliny D1) może nasilać wzrost i proliferację komórek w CRC poprzez regulację cyklu komórkowego *via* ścieżka sygnałowa p53, a nadekspresja PCNA promuje progresję CRC, wywierając bezpośrednie efekty na cykl komórkowy [Liu i wsp., 2015]. Trudnością oceny porównawczej wyników badań nad immunohistochemiczną ekspresją markerów proliferacji i białka p53 uzyskanych w obecnej pracy oraz w innych doniesieniach jest przede wszystkim niejednorodność stosowanych przeciwciał pierwszorzędowych, skal pólilościowej oceny nasilenia reakcji IHC oraz samych grup badanych (liczba pacjentów, histologiczne typy CRC, *stage* i *grade* CRC).

Próby wyłonienia „idealnego” markera (wśród 26 zbadanych białek apoptozy) dla zastosowania w codziennej praktyce klinicznej u pacjentów z CRC, jak dotąd, nie powiodły się [Zeestraten i wsp., 2013].

Ekspresję aktywnej kaspazy-3 wykryto w 90% przypadków CRC zebranych w obecnej pracy, co było znamienne wyższe w porównaniu z kontrolą (ok. 60% tkanek) i pseudoguzami (ok. 50% tkanek). Również pod względem ilościowym, istotnie większą ekspresję tego białka wykazano w CRC w porównaniu zarówno z kontrolą, jak i grupą pseudoguzów. Ponadto badania dowiodły, iż ekspresja kaspazy-3 jest istotnie wyższa w tzw. wypukłym w porównaniu z płaskim typem makroskopowym CRC. Porównując ten wynik z danymi z piśmiennictwa, pozytywny sygnał na kaspazę-3 (oraz wysoki poziom ekspresji tego białka) demonstrowano w CRC, które lepiej prognozowały co do przebiegu i długości przeżycia w porównaniu do pacjentów negatywnych [Koelink i wsp., 2009; Dawson i wsp., 2014]. Wskazywano, iż apoptoza dotycząca komórek podścieliska guza (ang. *stromal apoptosis*) w odróżnieniu od apoptozy komórek nabłonkowych, jest czynnikiem istotnym w przewidywaniu przeżywalności pacjentów czy nawrotu choroby [Koelink i wsp., 2009; Noble i wsp., 2013]. Wysoki poziom ekspresji aktywnej kaspazy-3 w podścielisku guza uznano nawet za dobry i niezależny czynnik prognostyczny w raku jelita grubego. Badacze ci twierdzą, iż komórki podścieliska guza promują kancerogenezę jelita grubego, a zwiększona ich apoptoza jest zjawiskiem hamującym ten proces [Noble i wsp., 2013]. Badania *in vitro* (2015) na różnych liniach komórkowych CRC wskazują, iż naświetlane komórki rakowe (podlegające apoptozie), mogą promować proliferację „żyjących” komórek guza. Natomiast wyniki badań *in vivo* u pacjentów z CRC, pokazują (podobnie jak w obecnej pracy), wyższą ekspresję kaspazy-3 oraz antygenu Ki-67 w komórkach guza w porównaniu z kontrolą. Wysoki poziom ekspresji aktywnej kaspazy-3 oraz Ki-67 w komórkach nowotworowych u tych autorów korelował jednak ze złą prognozą raków, a mianowicie z wyższym stopniem zaawansowania w klasyfikacji TNM, odległymi przerzutami i krótszym czasem przeżycia chorych, czego nie udało się wykazać w ramach obecnej pracy. Wspomniani autorzy nie mogli uznać jednak ani poziomu ekspresji kaspazy-3, ani antygenu Ki-67 za niezależne czynniki prognostyczne w CRC [Zhang i wsp., 2015].

W kontekście badanej w pracy ekspresji białka IGF-1 oraz różnych wariantów mRNA IGF-1, właśnie u pacjentów z CRC wykazano dość słabą, pozytywną korelację pomiędzy ekspresją kaspazy-3 i ekspresją izoformy mRNA IGF-1B. Dalszych badań wymagałoby jednak dokładne zbadanie roli tej izoformy mRNA IGF-1 w procesie apoptozy (hamowanie?, nasilanie?) komórek raka jelita grubego. Badania Yang i wsp. na hodowanych komórkach

CRC, które potwierdzają znamienne zwiększanie aktywności kaspazy-3/7, -8 i -9 pod wpływem podania egzogennej IGF-1, zwracają uwagę na inny aspekt zagadnienia. Obserwowali oni, iż pomimo aktywacji tych białek apoptozy, nie wywoływały one programowanej śmierci komórek rakowych [Yang i wsp., 2009]. Autorzy konkludują, iż aktywacja kaspaz (w tym kaspazy-3) nie musi być synonimem apoptozy. Opisywano bowiem udział aktywnej kaspazy-3 w ostatecznym różnicowaniu pewnych linii komórek rakowych jelita grubego (HT-29). Kaspazy odgrywać mogą rolę także w ruchu komórek, ich migracji czy enukleacji [cyt. za Yang i wsp., 2009]. Co interesujące, zwiększenie aktywności kaspazy-3 i nasilenie procesu apoptozy w CRC opisano również wraz z postępującym wiekiem pacjenta z tym typem nowotworu [Perraud i wsp., 2012].

Białko AKT, jako przedstawiciel serynowo-treoninowych kinaz białkowych z rodziny AKT (Akt-1, -2, -3), należy do innej grupy regulatorów komórkowej proliferacji i apoptozy. Białko to odgrywa ważną rolę w utrzymaniu równowagi pomiędzy przeżyciem komórki i apoptozą [Dihlmann i wsp., 2005]. Jest efektem i przekaźnikiem sygnału w szlaku kinazy 3 fosfatydyloinozytolu (PI3-K), który odpowiada za aktywację ważnych transkrypcyjnie regulatorów kancerogenezy jelita grubego, tj. czynnika jądrowego NF kappa B i β -kateniny [Krześlak 2010]. Aktywacja szlaku PI3K, wraz z mutacją białka p53 oraz mutacjami KRAS (ang. *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) należą do wspólnych cech CRC. W aktywacji ścieżki PI3K/AKT w CRC dowiedziono roli białek szoku termicznego (HSPs, ang. *heat shock proteins*), zwłaszcza HSP27 [Ghosh i wsp., 2013]. W ludzkich CRC wykazano nadekspresję ufosforylowanych postaci kinaz AKT, co korelowało z hamowaniem apoptozy komórek CRC [Dihlmann i wsp., 2005; Johnson i wsp., 2010].

Przeciwciała wykorzystane w obecnej pracy, pochodzące z firmy Dako, wykrywały właśnie ufosforylowaną postać białka AKT (kinaza proteinowa, Rac- α). Lokalizacja białka AKT głównie w cytoplazmie komórek nowotworowych obserwowana w obecnych badaniach, jest opisywana przez innych badaczy [Dihlmann i wsp., 2005; Johnson i wsp., 2010]. Natomiast pod względem ilościowym ekspresja białka AKT w CRC była porównywalna z obserwowaną w zdrowym jelicie grubym. Nie znaleziono różnic ilościowych pomiędzy ekspresją tej kinazy u pacjentów zmarłych i żyjących. W tkankach pseudoguzów wykazano natomiast wyższą w porównaniu z CRC, ekspresję białka AKT. Porównując zależności AKT a składniki systemu IGF-1 (mRNA, warianty mRNA, białko), tylko w kontrolnym jelicie grubym wykazano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją i to jednej z izoform mRNA (IGF-1B) a białkiem AKT. Co zaskakujące - w grupie pseudoguzów (gdzie obserwowano największą

ekspresję tego białka wśród badanych grup) obserwowano wysoką, ale negatywną, zależność pomiędzy ekspresją izoformy mRNA IGF-1B i ekspresją kinazy proteinowej AKT. Innymi słowy, wraz ze wzrostem ekspresji białka AKT w grupie zmian potencjalnie przednowotworowych malała ekspresja izoformy mRNA IGF-1B.

Badania immunocytochemiczne innych autorów w różnych stadiach rozwoju raka jelita grubego wykazywały intensywniejszą pozytywną reakcję w bardziej zaawansowanych zmianach niż w gruczolakach [Saglam i wsp., 2007]. Kolejne doniesienia wskazują na podwyższoną tkankową ekspresję białka AKT, która korelowała pozytywnie z ekspresją cytoplazmatycznie i jądrowo zlokalizowanej β -kateniny w CRC [Dihlmann i wsp., 2005]. Są również prace, które demonstrują nadekspresję kinazy Akt-1 w CRC, i to większą ekspresję tego białka w guzach zlokalizowanych po stronie lewej jelita grubego (odcinek dystalny) w porównaniu z częścią prawego jelita grubego (odcinek proksymalny) [Johnson i wsp., 2010]. Nie potwierdzają takich różnic w ekspresji białka AKT obecne badania. Określenie roli białka AKT w zmianach przednowotworowych jelita grubego wymaga dalszych badań. W kontekście badanej ekspresji genu IGF-1, na podstawie obecnych badań wydaje się, że wzrost ekspresji tkankowej białka AKT w grupie pseudoguzów nie jest zależny od osi IGF-1 lub jest hamowany przez ekspresję niektórych izoform mRNA tego genu (IGF-1B).

6. PODSUMOWANIE

1. Tkankowa ekspresja całkowitego mRNA oraz wariantów (izoform) mRNA *IGF-1* jest istotnie niższa w raku jelita grubego i odbytnicy (CRC), a niezmieniona w zmianach nienowotworowych (pseudoguzu) w porównaniu z kontrolą, zachowując aktywność obu promotorów (IGF-1P1 i IGF-1P2) oraz produkcję pozostałych form splicingowych (IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C) genu IGF-1 we wszystkich grupach (CRC, pseudoguzu, kontrola).
2. Rola obu promotorów (P1 i P2) genu IGF-1 jest równoważna w formowaniu transkryptów IGF-1 w tkankach jelita grubego we wszystkich badanych grupach (CRC, pseudoguzu, kontrola).
3. Tkankowa ekspresja dwóch izoform mRNA IGF-1 (IGF-1P2 i IGF-1B) w raku jelita grubego i odbytnicy (CRC) pozytywnie koreluje z tkankową ekspresją mRNA Ki-67.
4. Immunocytochemiczna ekspresja typowych białek proliferacji komórkowej (Ki-67 i PCNA) oraz apoptozy (białko p53, aktywna kaspaza-3) w CRC jest znamienne wyższa w porównaniu z tkankami pseudoguzów i kontroli, ale nie zależy istotnie od ekspresji genowej IGF-1.
5. Pseudoguzu (potencjalne zmiany przednowotworowe) cechują się wyższą tkankową ekspresją izoformy mRNA IGF-1B w porównaniu z CRC oraz pozytywną korelacją tego wariantu mRNA IGF-1 z ekspresją jądrowego antygenu proliferacyjnego (PCNA).
6. Lokalna ekspresja trzech izoform mRNA IGF-1, tj. IGF-1P2, IGF-1A i IGF-1B w zmianach zapalnych jelita grubego (pseudoguzu) jest wyższa u mężczyzn w porównaniu z kobietami.
7. Wyłącznie w grupie zmian nienowotworowych (pseudoguzu) obserwuje się pozytywną korelację pomiędzy ekspresją mRNA IGF-1B a stężeniem glukozy we krwi pacjenta.

7. WNIOSKI KOŃCOWE

1. Kancerogenezie jelita grubego u człowieka towarzyszą zmiany tkankowej ekspresji genu IGF-1.
2. Ze wszystkich badanych izoform mRNA IGF-1 w raku jelita grubego i odbytnicy, najlepiej z nasiloną proliferacją komórkową koreluje tkankowa ekspresja dwóch transkryptów: IGF-1P2 oraz IGF-1B.
3. Na wczesnych etapach kancerogenezy jelita grubego u człowieka najważniejszą rolę biologiczną wydaje się spełniać izoforma mRNA IGF-1B.
4. Zróżnicowana lokalna ekspresja izoform mRNA IGF-1 może stanowić dodatkowy marker prognostyczny w raku jelita grubego i odbytnicy u człowieka.

8. STRESZCZENIE

Tkankowa ekspresja insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1) w nowotworach jelita grubego

Wstęp: Rak jelita grubego i odbytnicy (CRC) należy do najczęstszych i najgroźniejszych nowotworów złośliwych człowieka. Wśród czynników ryzyka rozwoju CRC wymienia się m.in. obecność przewlekłych zapalnych schorzeń jelit oraz przednowotworowych rozrostów nabłonka gruczołowego (głównie gruczolaki).

Od wielu dekad opisuje się związek pomiędzy składnikami systemu IGF a kancerogenezą jelita grubego. Dominują prace podnoszące rolę wzrostu surowiczego stężenia insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1) i obniżania stężeń białek wiążących IGF (IGF BPs) jako czynników ryzyka CRC.

IGF-1 produkowany jest głównie w wątrobie, gdzie spełnia funkcje hormonu endokrynowego, a produkowany w innych narządach działa głównie na drodze autokrynowej i parakrynowej w promocji wzrostu tkanek i narządów. Znana i szeroko opisywana jest mitogenna i antyapoptotyczna funkcja IGF-1, stąd zmiany w poziomie tkankowej ekspresji IGF-1 mogą odpowiadać za transformację nowotworową, w tym CRC.

Celem pracy była: (1) Analiza ekspresji IGF-1 (izoformy mRNA, białko) w nowotworach jelita grubego, zmianach nienowotworowych i w kontrolnym jelicie grubym; (2) Badanie korelacji pomiędzy tkankową ekspresją IGF-1 (izoformy mRNA, białko) a aktywnością proliferacyjną oraz wykładnikami apoptozy w badanych grupach; (3) Odniesienie ekspresji tkankowej IGF-1 do wybranych danych klinicznych pacjentów z badanych grup.

Materiał i Metody: Badania przeprowadzono łącznie u 31 chorych z CRC (grupa badana) oraz u 17 pacjentów z nienowotworowymi zmianami morfologicznymi jelita grubego (głównie aktywne przewlekłe zmiany zapalne) (grupa porównawcza, pseudoguzu). Badano pary materiału tkankowego z patologicznymi zmianami morfologicznymi i kontrolą od tych samych pacjentów. Do zasadniczej części badań zastosowano ilościową metodę RT-PCR. Technikę immunohistochemiczną opartą o tzw. *new polimer-based IHC* z zastosowaniem systemu EnVision++, wykorzystano do badań lokalizacji i nasilenia ekspresji IGF-1 oraz pozostałych białek proliferacyjnych (Ki-67, PCNA, cyklina D1), białek apoptozy (p53, kaspaza-3, Bcl-2) oraz białka AKT. Ekspresję mRNA IGF-1 i wszystkich izoform mRNA (P1, P2, A, B, C) oraz transkryptu Ki-67 mierzono w liczbie kopii mRNA na μg RNA. Wyniki badań IHC oceniono w skalach półilościowych.

Wyniki: Badania wykazały znamienne niższą tkankową ekspresję całkowitego mRNA oraz wariantów (izoform) mRNA *IGF-1* w raku jelita grubego i odbytnicy, a niezmienną w zmianach nienowotworowych (pseudoguzy) w porównaniu z kontrolą, zachowując aktywność obu promotorów (IGF-1P1 i IGF-1P2) oraz produkcję pozostałych form splicingowych (IGF-1A, IGF-1B i IGF-1C) genu IGF-1 we wszystkich grupach (CRC, pseudoguzy, kontrola). Rola obu promotorów (P1 i P2) genu IGF-1 wydaje się być równoważna w formowaniu transkryptów IGF-1 na poziomie tkanki we wszystkich badanych grupach (CRC, pseudoguzy, kontrola). Wykazano, iż tkankowa ekspresja dwóch izoform mRNA IGF-1, tj. IGF-1P2 oraz IGF-1B w CRC jest pozytywnie skorelowana z produkcją mRNA Ki-67.

Analiza immunocytochemiczna wykazała, iż ekspresja typowych białek proliferacji komórkowej (Ki-67 i PCNA) oraz apoptozy (białko p53, aktywna kaspaza-3) w CRC jest znamienne wyższa w porównaniu z ekspresją w tkankach pseudoguzów i kontroli, ale nie zależy istotnie od ekspresji genowej IGF-1.

W zmianach nienowotworowych (pseudoguzy) obserwowano zwiększoną tkankową ekspresję izoformy mRNA IGF-1B w porównaniu z CRC oraz jej pozytywną korelację z ekspresją jądrowego antygenu proliferacyjnego (PCNA).

Badanie korelacji z danymi klinicznymi jedynie w grupie porównawczej (pseudoguzy) wykazało, iż lokalna ekspresja trzech izoform mRNA IGF-1, tj. IGF-1P2, IGF-1A i IGF-1B jest wyższa u płci męskiej w porównaniu z kobietami. Wyłącznie w grupie zmian nienowotworowych (pseudoguzy) obserwuje się pozytywną korelację pomiędzy ekspresją mRNA IGF-1B a stężeniem glukozy we krwi pacjenta.

Wnioski: Badania podsumowano następującymi wnioskami: (1) Kancerogenezie jelita grubego u człowieka towarzyszą zmiany tkankowej ekspresji genu IGF-1; (2) Ze wszystkich badanych izoform mRNA IGF-1, tkankowa ekspresja dwóch transkryptów (IGF-1P2 oraz IGF-1B) najlepiej koreluje z nasiloną proliferacją komórkową w raku jelita grubego i odbytnicy; (3) Na wczesnych etapach kancerogenezy jelita grubego u człowieka najważniejszą rolę biologiczną wydaje się spełniać izoforma mRNA IGF-1B; (4) Zróżnicowana lokalna ekspresja izoform mRNA IGF-1 może stanowić dodatkowy marker prognostyczny w raku jelita grubego i odbytnicy u człowieka.

9. SUMMARY

Tissue expression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in colorectal carcinoma

Introduction: Colorectal carcinoma (CRC) belongs to the most frequent and most deadly human malignant tumours. Risk factors of CRC development include, i.a., chronic inflammatory lesions in intestines and pre-neoplastic hypertrophy of glandular epithelium (mainly adenomas). A relationship between components of IGF system and colorectal neoplasia has been noted for many decades. The prevailing studies point to the role of an increased serum level of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and lowered level of IGF binding proteins (IGF BPs) as risk factors of CRC.

IGF-1 is produced mainly in the liver, in which it fulfills role of an endocrine hormone while produced in other organs of the body it acts mainly in an autocrine and paracrine manner in promotion of growth in tissues and organs. The mitogenic and anti-apoptotic role of IGF-1 is well known and, therefore, alterations in the level of tissue expression manifested by IGF-1 may be responsible for neoplastic transformation, which may result in CRC.

The study aimed at: (1) Analysis of IGF-1 expression (isoforms of mRNA, protein) in colorectal tumours, non-neoplastic lesions and control large intestine; (2) Examination of correlation between tissue expression of IGF-1 (isoforms of mRNA, protein) and proliferative activity, exponents of apoptosis in the examined groups; (3) Comparison between tissue expression of IGF-1 and selected clinical data in patients of studied groups.

Material and Methods: The studies were conducted on the total number of 31 patients with CRC (the study group) and on 17 patients with non-neoplastic morphological lesions in large intestine (mainly active chronic inflammatory lesions) (comparative group, pseudotumours). Pairs of tissue material with pathological morphological lesions and of control obtained from the same patients were examined. In the principal part of the studies the quantitative RT-PCR method was applied. The immunohistochemical technique based on the so called new polymer-based IHC with use of EnVision++ system was used in studies on localization and intensity of expression manifested by IGF-1 and the remaining proliferation-associated proteins (Ki-67, PCNA, cyclin D1), apoptotic proteins (p53, caspase-3, Bcl-2) and by AKT protein. Expression of mRNA for IGF-1 and for all isoforms of mRNA (P1, P2, A, B, C) and

of Ki-67 transcript was measured in numbers of mRNA copies per μg RNA. Results of IHC tests were evaluated in semi-quantitative scales.

Results: The studies demonstrated a significantly lower tissue expression of total mRNAs and of mRNA variants (isoforms) coding for *IGF-1* in colorectal carcinoma and the unchanged expression in non-neoplastic lesions (pseudotumours) as compared to the control, with persistent activity of both promoters (IGF-1P1 and IGF-1P2) and persistent production of the remaining splicing forms (IGF-1A, IGF-1B and IGF-1C) of IGF-1 gene in all the groups (CRC, pseudotumours, control). Role of both promoters (P1 and P2) of IGF-1 gene seemed to be equilibrated in formation of IGF-1 transcripts at the tissue level in all the examined groups (CRC, pseudotumours, control). Tissue expression of the two isoforms of IGF-1 mRNA IGF-1, *i.e.* of IGF-1P2 and IGF-1B in CRC was found to be positively correlated with production of mRNA for Ki-67.

Immunocytochemical analysis demonstrated that expression of typical cell proliferation-associated proteins (Ki-67 i PCNA) and of apoptosis exponents (p53 protein, active caspase-3) in CRC was significantly higher than expression in the tissue of pseudotumours and controls but it was not significantly dependent on expression of IGF-1 gene.

In non-neoplastic lesions (pseudotumours) an elevated tissue expression of IGF-1B mRNA isoform was observed, as compared to CRC and its positive correlation with expression of the nuclear proliferative antigen (PCNA).

Studies on correlation with clinical variables only in the comparative group (pseudotumours) demonstrated that local expression of three mRNA isoforms for IGF-1, *i.e.* IGF-1P2, IGF-1A and IGF-1B was higher in men than in women Exclusively within non-neoplastic lesions (pseudotumours) a positive correlation was detected between expression of mRNA for IGF-1B and blood glucose concentration in a patient.

Conclusions: (1) Carcinogenesis in human large intestine is accompanied by changes in tissue expression of IGF-1 gene; (2) Among all examined isoforms of mRNA for IGF-1 in colorectal cancer, the best with the high cellular proliferation correlate tissue expression of two transcripts: IGF-1P2 and IGF-1B; (3) At early stages of colorectal carcinogenesis in humans the most significant biological role seems to be played by IGF-1B isoform of mRNA;

(4) The differentiated local expression of mRNA isoform for IGF-1 may provide an additional prognostic marker in human colorectal carcinoma.

10. PIŚMIENICTWO

1. Adamo ML. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression. Implications for normal and pathological growth. *Diabetes Rev* 1995; 3: 2-27.
2. Adamo ML, Ben-Hur H, LeRoith D, Roberts CT Jr. Transcription initiation in the two leader exons of the rat IGF-1 gene occurs from disperse versus localized sites. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 887-893.
3. Adamo ML, Neuenschwander S, LeRoith D, Roberts CT Jr. Structure, expression, and regulation of the IGF-I gene. *Adv Exp Med Biol* 1993; 343: 1-11.
4. Akagi Y, Liu W, Zebrowski B, Xie K, Ellis LM. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I. *Cancer Res* 1998; 58: 4008-4014.
5. Akkoca AN, Yanik S, Özdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG, Çam A, Özer C. TNM and modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7(9): 2828-2835.
6. Alexia C, Fallot G, Lasfer M, Schweizer-Groyer G, Groyer A. An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocellular cells against drug-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2004; 86: 1003-1015.
7. Armakolas A, Philippou A, Panteleakou Z, Nezos A, Sourla A, Petraki C, Koutsilieris M. Preferential expression of IGF-IEc (MGF) transcript in cancerous tissues of human prostate: evidence for a novel and autonomous growth factor activity of MGF E peptide in human prostate cancer cells. *Prostate* 2010; 70: 1233-1242.
8. Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139: 846-852.
9. Aust DE. WHO classification 2010 for the lower gastrointestinal tract: what in new? *Pathologie* 2011; 32, Suppl 2: 326-331.
10. Bach MA, Roberts CT Jr, Smith EP, LeRoith D. Alternative splicing produces messenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I prohormones that are differentially glycosylated in vitro. *Mol Endocrinol* 1990; 4(6): 899-904.
11. Banner BF, Savas L, Baker S, Woda BA. Characterization of the inflammatory cell populations in normal and colonic carcinomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1993; 64(4): 213-220.
12. Baricević I, Jones DR, Nikolić JA, Nedić O. Gastrointestinal inflammation and the circulating IGF system in humans. *Horm Metabol Res* 2006; 38(1): 22-27.

13. Barresi V, Bonetti LR, Ieni A, Branca G, Baron L, Tuccari G. Histologic grading based on counting poorly differentiated clusters in preoperative biopsy predicts nodal involvement and pTNM stage in colorectal cancer patients. *Hum Pathol* 2014; 45: 268-275.
14. Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Cell cycle-related variation and tissue-restricted expression of human cyclin D1 protein. *J Pathol* 1994; 172(3): 237-245.
15. Barton ER. The ABCs of IGF-I isoforms: impact on muscle hypertrophy and implications for repair. *Appl Physiol Nutr Metab* 2006a; 31:791-797.
16. Barton ER. Viral expression of insulin-like growth factor-I promotes different responses in skeletal muscle. *J App Physiol* 2006b; 100: 1778-1784.
17. Barton ER, DeMeo J, Lei H. The insulin-like growth factor (IGF)-I E-peptides are required for isoform-specific gene expression and muscle hypertrophy after local IGF-I production. *J Appl Physiol* (1985) 2010; 108(5): 1069-1076.
18. Baserga R. The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth? *Cancer Res* 1995; 55: 249-255.
19. Baserga R. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer* 2003; 107: 873-877.
20. Bauer TW, Fan F, Liu W, Johnson M, Parikh NU, Parry GC, Callahan J, Mazar AP, Gallick GE, Ellis LM. Insulinlike growth factor-I-mediated migration and invasion of human colon carcinoma cells requires activation of c-Met and urokinase plasminogen activator receptor. *Ann Surg* 2005; 241: 748-758.
21. Bell GI, Stempien MM, Fong NM, Rall LB. Sequences of liver cDNAs encoding two different mouse insulin-like growth factor 1 precursors. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 7873-7882.
22. Bentov I, Narla G, Schayek H, Akita K, Plymate SR, LeRoith D, Friedman SL, Werner H. Insulin-like growth factor-1 regulates Kruppel-like factor-6 gene expression in a p53-dependent manner. *Endocrinology* 2008; 149(4): 1890-1897.
23. Bortvedt SF, Lund PK. Insulin-like growth factor 1: common mediator of multiple enterotrophic hormones and growth factors. *Curr Opin Gastroenterol* 2012; 28(2): 89-98.
24. Bosman FT. Colorectal cancer. In: *World Cancer Report 2014* (Ed. Stewart BW and Wild CP) IARC Press, Lyon 2014; 32-402.
25. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (eds). *WHO classification of tumours of the digestive system*. IARCPress 2010; 4th ed.
26. Bosman FT, Yan P. Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol J Pathol* 2014; 65(4): 257-266.
27. Bravo R, Frank R, Blundell PA, MacDonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987; 326(6112): 515-517.
28. Brenner H, Kloor M, Pox P. Colorectal cancer. *Lancet* 2014; 383: 1490-1502.

29. Brisson BK, Barton ER. Insulin-like growth factor-I E-peptide activity is dependent on the IGF-I receptor. *PLoS One* 2012; 7(9): e45588.
30. Brokaw J, Katsaros D, Wiley A, Lu L, Su D, Sochirca O, de la Longrais IA, Mayne S, Risch H, Yu H. IGF-I in epithelial ovarian cancer and its role in disease progression. *Growth Factors* 2007; 25(5): 346-354.
31. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002; 40: 2-11.
32. Bruckner HW, Pitrelli J, Merrick M. Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (eds). *WHO classification of tumors of the digestive system*. Lyon: IARC Press, 2010: 138-139.
33. Brudnik U, Wojas-Pelc A, Alekseenko A. Przydatność kliniczna badania cykliny D1 w guzach nowotworowych – przegląd piśmiennictwa. *Post Dermatol Alergol* 2007; XXIV: 48-51.
34. Burroughs KD, Donn SE, Barrett JC, Taylor JA. Insulin-like growth factor-I: a key regulator of human cancer risk. *J Natl Cancer Res* 1999; 91: 579-581.
35. Bustin SA, Dorudi S, Phillips SM, Feakins RM, Jenkins PJ. Local expression of insulin-like growth factor-I affects angiogenesis in colorectal cancer. *Tumour Biol* 2002; 23(3):130-138.
36. Cats A, Dullaart R, Kleibeuker J, Kuijpers F, Sluiter W, Hardonk M, de Vries E. Increased epithelial cell proliferation in the colon of patients with acromegaly. *Cancer res* 1996; 56: 523-526.
37. Chen J, Iverson D. Estrogen in obesity-associated colon cancer: friend or foe? Protecting postmenopausal women but promoting late-stage colon cancer. *Cancer Causes Control* 2012; 23(11); 1767-1773.
38. Chen MJ, Chiou PP, Lin P, Lin CM, Siri S, Peck K, Chen TT. Suppression of growth and cancer-induced angiogenesis of aggressive human breast cancer cells (MDA-MB-231) on the chorioallantoic membrane of developing chicken embryos by E-peptide of pro-IGF-I. *J Cell Biochem* 2007; 101: 1316-1327.
39. Chew SL, Lavender P, Clark AJ, Ross RJ. An alternatively spliced human insulin-like growth factor-1 transcript with hepatic tissue expression that diverts away from mitogenic IGF1 peptide. *Endocrinology* 1995; 136: 1939-1944.
40. Chi F, Wu R, Zeng YC, Xing R, Liu Y. Circulation insulin-like growth factor peptides and colorectal cancer risk: an updated systematic review and meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2013; 40(5): 3583-3590.
41. Chin E, Zhou J, Dai J, Baxter RC, Bondy CA. Cellular localization and regulation of gene expression for components of the insulin-like growth factor ternary binding protein complex. *Endocrinology* 1994; 134: 2498-2504.
42. Clark R. The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr rev* 1997; 18: 157-179.

43. Cohen P. Overview of the IGF-I system. *Horm Res* 65 (Supp 1): 3-8, 2006.
44. Collett-Solberg PF, Cohen P. The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996; 25(3): 591-614.
45. Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, Bodmer WF. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 1992; 340: 626-630.
46. Daughday WH, Rotweien P. Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989; 10:68-91.
47. Dawson H, Koelzer VH, Karamitopoulou E, Economou M, Hammer C, Muller D-E, Lugli A, Zlobec I. The apoptotic and proliferation rate of tumor budding cells in colorectal cancer outlines a heterogenous population of cells with various impacts on clinical outcome. *Histopathology* 2014; 64: 577-584.
48. Debucquoy A, Goethals L, Libbrecht L, Perneel C, Geboes K, Ectors N, McBride WH, Haustermans K. Molecular and clinico-pathological markers in rectal cancer: a tissue microarray study. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24(2): 129-138.
49. Delafontaine P, Song YH, Li Y. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:435-444.
50. D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentration of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 935-939.
51. Deschoolmeester V, Baay M, Van Marc E, Weyler J, Vermuelen P, Lardon F, Vermorken JB. Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal patients. *BMC Immunology* 2010; 11:19.
52. Dihlmann S, Kloor M, Fallsehr Ch, von Knebel Doeberitz M. Regulation of *AKT1* expression by beta-catenin/Tcf/Lef signaling in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 2005; 26(9): 1503-1512.
53. Dluzniewska J, Sarnowska A, Beresewicz M, Johnson I, Srail SK, Ramesh B, Goldspink G, Górecki DC, Zabłocka B. A strong neuroprotective effect of the autonomous C-terminal peptide of IGF-1 Ec (MGF) in brain ischemia. *FASEB J* 2005; 19(13): 1896-1898.
54. Donovan EA, Kummar S: Role of insulin-like growth factor-1R system in colorectal carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 66: 91-98.
55. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Path Bact* 1932; 35: 323-327.
56. Durzyńska J, Philippou A, Brisson BK, Nguyen-McCarty M, Barton ER. The pro-forms of insulin-like growth factor I (IGF-I) are predominant in skeletal muscle and alter IGF-I receptor activation. *Endocrinology* 2013; 154(3): 1215-1224.

57. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti AE (eds). *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York; Springer, 2010, p. 143-164.
58. Ellis BC, Graham LD, Molloy PL. CRNDE, a long non-coding RNA responsive to insulin/IGF signaling, regulates genes involved in central metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843(2): 372-386.
59. Ewing GP, Goff LW. The insulin-like growth factor signaling pathway as a target for treatment of colorectal carcinoma. *Clinical Colorectal Cancer* 2010; 9(4): 219-223.
60. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Rev Pathol Mech Dis* 2011; 6: 479-507.
61. Feik E, Baiertl A, Hieger B, Führlinger G, Pentz A, Stättner S, Weiss W, Pulgram T, Leeb G, Mach K, Micksche M, Gsur A. Association of IGF-1 and IGFBP3 polymorphisms with colorectal polyps and colorectal cancer risk. *Cancer Causes Control* 2010; 21(1): 91-97.
62. Fenton JI, Birmingham JM. Adipokine regulation of colon cancer: adiponectin attenuates interleukin-6-induced colon carcinoma cell proliferation via STAT-3. *Mol Carcinog* 2010; 49(7): 700-709.
63. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127 (12): 2893-2917.
64. Fernández-Aceñero MJ, Galindo-Gallego M, Sanz J, Aljama A. Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma. *Cancer* 2000; 88(7): 1544-1548.
65. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: pathological aspects. *J Gastrointest Oncol* 2012; 3 (3): 152-173.
66. Flood A, Mai V, Pfeiffer R, Kahle L, Rosen CJ, Lanza E, Schatzkin A. Serum concentration of IGF-I and IGFBP-3 and recurrent colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(6): 1493-1498.
67. Freier S, Weiss O, Eran M, Flyvbjerg A, Dahan R, Nephesh I, Safra T, Shiloni E, Raz I. Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in adenocarcinoma of the colon. *Gut* 1999; 44: 704-708.
68. Fritz JM, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM. Stimulation of neoplastic mouse lung cell proliferation by alveolar macrophage-derived, insulin-like growth factor-1 can be blocked by inhibiting MEK and PK3K activation. *Mol Cancer* 2011; 10: 76.
69. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277(41): 38205-38211.

70. Gauguin L, Delaine C, Alvino CL, McNeil KA, Wallace JC, Forbes BE, De Meyts P. Alanine scanning of a putative receptor binding surface of insulin-like growth factor-1. *J Biol Chem* 2008; 283(30): 20821-20829.
71. Gao Y, Katki K, Graubard B, Pollak M, Martin M, Tao Y, Schoen RE, Church T, Hayes RB, Greene MH, Berndt SI. Serum IGF-1, IGF-2 and IGFBP3 and risk of advanced colorectal adenoma. *Int J Cancer* 2012; 131(2): E105-113.
72. Gatter KC, Dunnill MS, Gerdes J, Stein H, Mason DY. New approach to assessing lung tumours in man. *J Clin Pathol* 1986; 39(6): 590-593.
73. Geboes K, Riddell R, Öst A, Jensfelt B, Persson T, Löfberg R. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut* 2000; 47: 404-409.
74. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cellproliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-1715.
75. Ghosh A, Lai C, McDonald S, Suraweera N, Sengupta N, Propper D, Dorudi S, Silver A. HSP27 expression in primary colorectal cancers is dependent on mutation of KRAS and PI3K/AKT activation status and is dependent of TP53. *Exp Mol Pathol* 2013; 94(1): 103-108.
76. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653: 1-24.
77. Giovannucci E. Insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and risk of cancer. *Horm Res* 1999; 51(suppl 3): 32-41.
78. Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer. A review of the evidence. *J Nutr* 2001; 131: 3109S-3120S.
79. Giovannucci E, Pollak M, Liu Y, Platz EA, Majeed N, Rimm EB, Willett WC. Nutritional predictors of insulin-like growth factor I and their relationships to cancer in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12(2): 84-89.
80. Goldspink G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anatom* 1999; 194: 323-334.
81. Goldman H, Ming S, Hickock DF. Nature and significance of hyperplastic polyps of the human colon. *Arch Pathol* 1970; 89: 349-354.
82. Górecki DC, Beręsewicz M, Zabłocka B. Neuroprotective effects of short peptides from the Insulin-like growth factor 1. *Neurochemistry Int* 2007; 51: 451-458.
83. Graham DM, Appelman HD. Crohn's-like lymphoid reaction and colorectal carcinoma: a potential histologic prognosticator. *Mod Pathol* 1990; 3(3): 332-335.
84. Grimberg A. Mechanisms by which IGF-I may promote cancer. *Cancer Biol Ther* 2003; 2:630-635.

85. Guo YS, Jin GF, Houston CW, Thompson JC, Townsend CM Jr. Insulin-like growth factor-1 promotes multidrug resistance in MCLM colon cancer cells. *J Cell Physiol* 1998; 175(2): 141-148.
86. Guo YS, Narayan S, Yallampalli C, Singh P. Characterization of insulin-like growth factor I receptors in human colon cancer. *Gastroenterology* 1992; 102: 1101-1108.
87. Hady HR, Kamiński FA, Sołdatow M, Łuba ME, Snarska J, Ładny JR, Dadan JW. Risk factors for large intestine cancer in clinical material. *Adv Clin Exp Med* 2010; 19(6): 723-730.
88. Hameed M, Orrell RW, Cobbold M, Goldspink G, Harridge SD. Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. *J Physiol* 2003; 547: 247-254.
89. Hamilton SR, Aaltonen LA, (eds). Pathology and genetics of tumours of the digestive system. World Health Organization. IARC Press, Lyon, 2000.
90. Harrison JC, Dean PJ, el-Zeky F, Vander Zwaag R. Impact of the Crohn's-like lymphoid reaction on staging of right-sided colon cancer: results of multivariate analysis. *Hum Pathol* 1995; 26(1): 31-38.
91. Horváth HC, Lakatos P, Kósa JP, Bácsi K, Borka K, Bises G, Nittke T, Hershberger PA, Speer G, Kállay E. The candidate oncogene CYP24A1: a potential biomarker for colorectal tumorigenesis. *J Histochem Cytochem* 2010; 58(3): 227-285.
92. Höppener JWM, de Pagter-Holthuizen P, Geurts van Kessel AHM, Jansen M, Kittur SD, Antonarakis SE, Lips CJM, Sussenbach JS. The human gene encoding insulin-like growth factor I is located on chromosome 12. *Hum genet* 1985; 69: 157-160.
93. Huang XF, Chen JZ. Obesity, the PI3K/Akt signal pathway and colon cancer. *Obes Rev* 2009; 10(6): 610-616.
94. Huh JW, Lee WY, Kim SH, Park YA, Cho YB, Yun SH, Kim HC, Park HC, Choi DH, Park JO, Park YS, Chun HK. Immunohistochemical detection of p53 expression in patients with preoperative chemoradiation for rectal cancer: association with prognosis. *Yonsei Med J* 2015; 56(1): 82-88.
95. Humbrel RE. The insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 1990; 150: 445-462.
96. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 1999; 20: 761-787.
97. Ioachim E. Expression patterns of cyclins D1, E and cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1, p27kip1 in colorectal carcinoma: correlation with other cell cycle regulators (pRb, p53 and Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. *Int J Clin Pract* 2008; 62(11): 1736-1743.

98. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363: 558-561.
99. Jacks T, Weinberg RA. Cell cycle control and its watchman. *Nature* 1996, 381: 643-644.
100. Janiak A, Oset P, Talar-Wojnarowska R, Kumor A, Małeczka-Panas E. Insulin, insulin-like growth factor binding protein 3 serum concentrations in patients with adenomatous colon polyps. *Prz Gastroenterol* 2013; 8(5): 308-314.
101. Jansen M, van Schaik FM, Ricker AT, Bullock B, Woods DE, Gabbay KH, Nussbaum AL, Sussenbach JS, Van den Brande JL. Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature* 1983; 306: 609-611.
102. Jass JR. Molecular heterogeneity of colorectal cancer: implications for cancer control. *Surg Oncol* 2007; 16: S7-S9.
103. Jehle PM, Fussgaenger RD, Blum WF, Angelus NK, Hoeflich A, Wolf E, Jungwirth RJ. Differential autocrine regulation of intestine epithelial cell proliferation and differentiation by insulin-like growth factor (IGF) system components. *Horm Metab Res* 1999; 31: 97-102.
104. Jenkins PJ, Khalaf S, Ogunkolade W, McCarthy K, David T, Hands RE, Davies D, Bustin SA. Differential expression of IGF-binding protein-3 in normal and malignant colon and its influence on apoptosis. *Endocrine-Related Cancer* 2005; 12: 891-901.
105. Jiang B, Zhang X, Du LL, Wang Y, Liu DB, Han CZ, Jing JX, Zhao XW, Xu XQ. Possible roles of insulin, IGF-1 and IGFbps in initiation and progression of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(6): 1608-1613.
106. Johannesson B, Sattler S, Semenova E, Pastore S, Kennedy-Lydon TM, Sampson RD, Schneider MD, Rosenthal N., Bilbao D. Insulin-like growth factor-1 induces regulatory T cell-mediated suppression of allergic contact dermatitis in mice. *Dis Mod Mech* 2014; 7: 977-985.
107. Johnson SM, Gulhati P, Rampy BA, Han Y, Rychahou PR, Doan HQ, Weiss HL, Evers MB. Novel expression patterns of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. *J Am Coll Surg* 2010; 210(5): 767-778.
108. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16(1): 3-34.
109. Josse C, Bouznad N, Geurts P, Irrthum A, Huynh-Thu VA, Servais L, Hego A, Delvenne P, Bours V, Oury C. Identification of microRNA landscape targeting the PI3K/Akt signaling pathway in inflammation-induced colorectal carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014; 306(3): G229-243.
110. Józefiak A, Pacholska J, Kędzia W. Rola IGF-1 i IGFBP w procesie neogenezy. *Perinat Neonat Gin* 2008; 1(3): 175-183.
111. Juul A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Horm IGF Res* 2003; 13(4): 113-170.

112. Kaaks R, Toniolo P, Akhmedkhanov A, Lukanova A, Biessy C, Dechaud H, Rinaldi S, Zeleniuch-Jacquotte A, Shore RE, Riboli E. Serum C-peptide, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding proteins, and colorectal cancer risk in women. *J Nat Cancer Inst* 2000; 92(19): 1592-1600.
113. Kaczka A, Kumor A, Pietruczuk M, Małecka-Panas E. Serum concentration of insulin, C-peptide and insulin-like growth factor I in patients with colon adenomas and colorectal cancer. *Pol Merkur Lekarski* 2007; 22(131): 373-375.
114. Kandalla PK, Goldspink G, Butler-Browne G, Mouly V. Mechano growth factor E peptide (MGF-E), derived from an isoform of IGF-1, activates human muscle progenitor cells and induces an increase in their fusion potential at different ages. *Mech Ageing Dev* 2011; 132(4): 154-162.
115. Kanthan R, Senger JL, Kanthan SC. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Pathol Res Int* 2012; 2012, No ID:597497, 14 pages.
116. Kasprzak A, Szaflarski W, Szmeja J, Andrzejewska M, Przybyszewska W, Koczorowska M, Drews M, Kaczmarek E. Expression of various insulin-like growth factor-1 mRNA isoforms in colorectal cancer. *Współ Onkol* 2012; 16: 147-153.
117. Kasprzak A, Szaflarski W, Szmeja J, Andrzejewska M, Przybyszewska W, Kaczmarek E, Koczorowska M, Kościński T, Zabel M, Drews M. Differential expression of IGF-1 mRNA isoforms in colorectal carcinoma and normal colon tissue. *Int J Oncol* 2013; 42: 305-316.
118. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effect of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocrine Rev* 2000; 21: 215-244.
119. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170.
120. Kiziltaş Ş, Ramadan SS, Topuloğlu A, Küllü S. Does the severity of tissue eosinophilia of colonic neoplasms reflects their malignancy potential? *Turk Gastroenterol* 2008; 19(4): 239-244.
121. Klimczak A, Kempieńska-Mirośławska B, Mik M, Dziki L, Dziki A. Colorectal cancer mortality in Poland – analysis of region variation. *Arch Med Sci* 2014; 10(1): 63-67.
122. Klintrup K, Mäkinen J, Kauppila S, Väre PO, Melkko J, Tuominen H, Tuppurainen K, Mäkela J, Karttunen TJ, Mäkinen MJ. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2645-2654.
123. Koczorowska MM. Alternatywne składowanie pre-mRNA genu *IGF-1* w komórkach nabłonka szyjki macicy, prawidłowych i nowotworowych, zakażonych ludzkim wirusem brodawczaka. Praca doktorska, UAM, Poznań, 2012.
124. Koczorowska MM, Kwasniewska A and Gozdzicka-Jozefiak A. IGF1 mRNA isoform expression in the cervix of HPV-positive woman with pre-cancerous and cancer lesions. *Exp Ther Med* 2: 149-156, 2011.

125. Koelink PJ, Sier CFM, Hommes DW, Lamers CBHW, Verspaget HW. Clinical significance of stromal apoptosis in colorectal cancer. *Brit J Cancer* 2009; 101: 765-773.
126. Kooijman R, Willems M, De Haas CJ, Rijkers GT, Schuurmans AL, Van Buul-Offers SC, Heijnen CJ, Zegers BJ. Expression of type I insulin-like growth factor receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Endocrinology* 1992; 131(5): 2244-2250.
127. Kostecka Z, Blahovec J: Insulin-like growth factor binding proteins and their functions (minireview). *Endocr Regul* 1999; 33: 90-94.
128. Krześlak A. Kinaza Akt: kluczowy regulator metabolizmu i progresji nowotworów. *Postepy Hig Med. Dosw (online)*, 2010; 64: 490-503.
129. Kubiak A, Kycler W, Trojanowski M. Epidemiologia i profilaktyka raka jelita grubego w Polsce. *Probl Hig Epidemiol* 2014; 95(3): 636-642.
130. Kushlinskii NE, Gershtein ES, Nikolaev AA, Delektorskaya VV, Korotkova EA, Dvorova EK, Kostyleva OI. Insulin-like growth factors (IGF), IGF-binding proteins (IGFBP), and vascular growth factor (VEGF) in blood serum of patients with colorectal cancer. *Bull Exp Biol Med.* 2014; 156(5): 684-688.
131. Kyriakos M. The President's cancer, the Dukes classification, and confusion. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109(12): 1063-1066.
132. Lee E, Schiller LR, Fordtran JS. Quantitative of colonic lamina propria cells by means of a morphometric point-counting method. *Gastroenterology* 1988; 94(2): 409-418.
133. Lee EK, Gorospe M. Minireview: posttranscriptional regulation of the insulin and insulin-like growth factor systems. *Endocrinology* 2010; 151(4): 1403-1408.
134. Leiphakpam PD, Agarwal E, Mathiesen M, Haferbier KL, Brattain MG, Chowdhury S. In vivo analysis of insulin-like growth factor type 1 receptor humanized monoclonal antibody MK-0646 and small molecule kinase inhibitor OSI-906 in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2014; 31(1): 89-94.
135. LeRoith D. Insulin-like growth factors. *Seminars in Medicine of Beth Israel Deaconess Medical Center. N Engl J Med* 1997; 336: 633-640.
136. LeRoith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 2001;22:53-74.
137. LeRoith D, Roberts CT Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Letters* 2003; 195: 127-137.
138. Li ZJ, Ying ZJ, Chen HL, Ye PJ, Chen ZL, Li G, Jiang HF, Liu J, Zhou SZ. Insulin-like growth factor-1 induces lymphangiogenesis and facilitates lymphatic metastasis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19(43): 7788-7794.
139. Lin EH, Lenz HJ, Saleh MN, Mackenzie MJ, Knost JA, Pathiraja K, Langdon RB, Yao SL, Lu BD. A randomized, phase II study of the anti-insulin-like growth factor receptor

- type 1 (IGF-1R) monoclonal antibody robatumumab (SCH717454) in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Med* 2014; 3(4): 988-997.
140. Liu BW, Liu Y, Liu JR, Feng ZX, Liu T. Prognostic effect of p53 expression in patients with completely resected colorectal cancer. *Tumour Biol* 2014; 35(10): 9893-9896.
 141. Liu F, Ji F, Ji Y, Jiang Y, Sun X, Lu Y, Zhang L, Han Y, Liu X. In-depth analysis of the critical genes and pathways in colorectal cancer. *Int J Mol Med* 2015; 36: 923-930.
 142. López I, P Oliveira L, Tucci P, Alvarez-Valin F, A Coudry R, Marin M. Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer. *Gene* 2012; 499(1): 81-87.
 143. Lu Y, Gao J, Lu Y. Down-expression pattern of Ku70 and p53 coexisted in colorectal cancer. *Med Oncol* 2015; 32(4): 98; doi: 10.1007/s12032-015-0519-9.
 144. Luebbers EL, Pretlow TP, Emancipator SN, Boohaker EA, Pitts AM, Macfadyen AJ, Bradley E, Jr, Pretlow TG II. *Cancer Res* 1985; 45: 5196-5200.
 145. Lund PK, Hepler JE, Hoyt EC, Simmons JG. Physiological relevance of IGF-I mRNA heterogeneity. In: *Modern concepts of insulin-like growth factors*. Spencer EM (ed.). New York: Elsevier Science Publishing Co 1991; pp. 111-120.
 146. Luo HY, Xu RH. Predictive and prognostic biomarkers with therapeutic targets in advanced colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(14): 3858-3874.
 147. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 919-932.
 148. Lynch HT, Lanspa SJ, Boman BM, Smyrk T, Watson P, Lynch JF, Lynch PM, Cristofaro G, Bufo P, Tauro AV, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer – Lynch syndromes I and II. *Gastroenterol Clin North Am* 1988; 17: 679-712.
 149. Ma J, Polak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, Stampfer MJ. Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 620-625.
 150. Magee BA, Shooter GK, Wallace JC, Francis GL. Insulin-like growth factor I and its binding proteins: a study of the binding interface using B-domain analogues. *Biochemistry* 1999; 38(48): 15863-15870.
 151. Maguire A, Sheahan K. Controversies in the pathological assessment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(29): 9850-9861.
 152. Maki RG. Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(33): 4985-4995.
 153. Matheny RW Jr, Nindl BC, Adamo ML. Minireview: Mechano-Growth Factor: a putative product of IGF-I gene expression involved in tissue repair and regeneration. *Endocrinology* 2010; 151: 865-875.

- 154.** Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Garrels JI. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 1984; 309(5966): 374-376.
- 155.** McGregor MJ, Fadhil W, Wharton R, Yanagisawa Y, Presz M, Pritchard A, Womack C, Dutton S, Kerr RS, Kerr DJ, Johnstone EC, Ilyas M. Abberant P53 expression lacks prognostic or predictive significance in colorectal cancer: results from the VICTOR trial. *Anticancer Res* 2015; 35(3): 1641-1645.
- 156.** Melling N, Kowitz CM, Simon R, Bokemeyer C, Terraciano L, Sauter G, Izbicki JR, Marx AH. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2015; Aug 17.pii: jclinpath-2015-202985, doi: 10.1136/jclinpath-2015-202985.
- 157.** Michell NP, Langman MJS, Eggo MC. Insulin-like growth factors and their binding proteins in human colonocytes: preferential degradation of insulin-like growth factor binding protein 2 in colonic cancers. *Br J Cancer* 1997; 76(1): 60-66.
- 158.** Mills P, Dominique JC, Lafrenière JF, Bouchentouf M, Tremblay JP. A synthetic mechano growth factor E peptide enhances myogenic precursor cell transplantation success. *Am J Transplant* 2007; 7(10): 2247-2259.
- 159.** Mittanck DW, Kim SW, Rotwein P. Essential promoter elements are located within the 5' untranslated region of human insulin-like growth factor-I exon I. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 126: 153-163.
- 160.** Moezzi J, Gopalswamy N, Haas RJ Jr, Markert RJ, Suryaprasad S, Bhutani MS. Stromal eosinophilia in colonic epithelial neoplasms. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(2): 520-523.
- 161.** Mogoanta SS, Vasile I, Totolici B, Neamtu C, Streba L, Busuioc CJ, Mateescu GO. Colorectal cancer – clinical and morphological aspects. *Rom J Morphol Embryol* 2014; 55(1): 103-110.
- 162.** Murphy LJ. Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? *J Mol Endocrinol* 1998; 21:97-107.
- 163.** Nakae S, Nakamura T, Ikegawa R, Yoshioka H, Shirono J, Tabuchi Y. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer region and proliferating cell nuclear antigen in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 1998; 69: 28-35.
- 164.** Nakamura M, Miyamoto S, Maeda H, Zhang S, Sangai T, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, Saito N, Asaka M, Ochiai A. Low levels of insulin-like growth factor type 1 receptor expression at cancer cell membrane predict liver metastasis in Duykes' C human colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8434-8441.
- 165.** Noble P, Vyas M, Al-Attar A, Durrant S, Scholefield J, Durrant L. High levels of cleaved caspase-3 in colorectal tumour stroma predict good survival. *Br J Cancer* 2013; 108(10): 2097-2105.

- 166.** Nosho K, Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Yoshida Y, Arimura Y, Endo T, Hinoda Y, Imai K. Interplay of insulin-like growth factor-II, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor –I receptor, COX-2, and matrix metalloproteinase-7, play key roles in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7950-7957.
- 167.** Nowacki M, Bujko K, Krzakowski M, Nowakowska D, Rutkowski A. Colon cancer. In: Diagnostic and therapeutic recommendations in malignant cancers treatment. *Oncology in Clinical Practise, J Pol Clin Oncol Assoc tom 3, supl C*, Krzakowski M, Herman K, Jassem J, Jędrzejczak W, Kowalczyk JR, Podolak-Dawidziak M, Reinfuss M, *Via Medica Gdańsk* 2007, 153-178.
- 168.** Oberbauer AM. The regulation of IGF-1 gene transcription and splicing during development and aging. *Front Endocrinol* 2013; 4(39): 1-9.
- 169.** Obrępańska-Stęplowska A, Durzyński Ł, Goździcka-Józefiak A. Insulin-like growth factor and interacting proteins. *Post Biochem* 2005; 51:69-79.
- 170.** Ohtsuki T, Otsuki M, Murakami Y, Maekawa T, Yamamoto T, Akasaka K, Takeuchi S, Takahashi S. Organ-specific and age-dependent expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA variants: IGF-IA and IB mRNAs in the mouse. *Zoolog Sci* 2005; 22(9): 1011-1021.
- 171.** Orłowska J, Pachlewski J. Zmiany ząbkowane i polipowatość ząbkowana (hiperplastyczna) a rak jelita grubego. *Med Prakt Chirurgia* 2014/06: 57.
- 172.** Oshima T, Akaike M, Yoshihara K, Shiozawa M, Yamamoto N, Sato T, Yamada R, Fujii S, Rino Y, Kunisaki C, Tanaka K, Masuda M, Imada T. Clinicopathological significance of the gene expression of matrix metalloproteinase-7, insulin-like growth factor-1, insulin-like growth factor-2 and insulin-like growth factor-1 receptor in patients with colorectal cancer: insulin-like growth factor-1 receptor gene expression is a useful predictor of liver metastasis from colorectal cancer. *Oncol rep* 2008; 20(2): 359-364.
- 173.** Pankaj J, Kumari JR, Kim W, Lee SA. Insulin-like growth factor-1, IGF-binding protein-3, C-peptide and colorectal cancer: a case control study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(0): 3735-3740.
- 174.** Park S, Brisson BK, Liu M, Spinazzola JM, Barton ER. Mature IGF-I excels in promoting functional muscle recovery from disuse atrophy compared with pro-IGF-IA. *J App Physiol (1985)* 2014; 116(7): 797-806.
- 175.** Patai V, Molnár B, Tulassay Z, Sipos F. Serrated pathway: alternative route to colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19(5): 607-615.
- 176.** Pechlivanis S, Wagner K, Chang-Claude J, Hoffmeister M, Brenner H, Försti A. Polymorphisms in the insulin like growth factor 1 and IGF binding protein 3 genes and risk of colorectal cancer. *Cancer Detect Prev* 2007; 31(5): 408-416.

177. Perea J, Rueda D, Canal A, Rodríguez Y, Álvaro E, Ososrio I, Alegre C, Rivera B, Martínez J, Banítez J, Urioste M. Age at onset should be a major criterion for subclassification of colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2014; 16(1): 116-126.
178. Perraud A, Akil H, Nouaille M, Petit D, Labrousse F, Jauberteau M-O, Mathonnet M. Implications of cleaved-caspase 3 and AIF expression in colorectal cancer based on patient age. *Oncol Rep* 2012; 27: 1787-1793.
179. Peters G, Gongoll S, Langner C, Mengel M, Piso P, Klempnauer J, Rüschoff J, Kreipe H, von Wasielewski R. IGF-1R, IGF-1 and IGF-2 expression as potential prognostic and predictive markers in colorectal-cancer. *Virchows Arch* 2003; 443: 139-145.
180. Pfeffer LA, Brisson BK, Lei H, Barton ER. The insulin-like growth factor (IGF)-I E-peptides modulate cell entry of the mature IGF-I protein. *Mol Biol* 2009; 20: 3810-3817.
181. Philippou A, Armakolas A, Koutsilieris M. Evidence for the possible biological significance of the *igf-1* gene alternative splicing in prostate cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 31.
182. Philippou A, Papageorgiou E, Bogdanis G, Halapas A, Sourla A, Maridaki M, Pissimissis N, Koutsilieris M. Expression of IGF-1 isoforms after exercise-induced muscle damage in humans: characterization of the MGF E peptide actions in vitro. *In Vivo* 2009; 23(4): 567-575.
183. Pollak MN, Perdue JF, Margolese RG, Baer K, Richard M. of somatomedin receptors on primary human breast and colon carcinomas. *Cancer let* 1987; 38: 223-230.
184. Potemski P. Epidemiologia, badania przesiewowe i klasyfikacja zaawansowania klinicznego raka jelita grubego. *Onkologia w Praktyce Klinicznej* 2010; 6(6): 283-289.
185. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359: 235-237.
186. Pretlow TP, Boohaker EA, Pitts AM, Macfadyen AJ, Bradley E, Jr, Pretlow TG II. Heterogeneity and subcompartmentalization in the distribution of eosinophils in human colonic carcinomas. *Am J Pathol* 1984; 116: 207-213.
187. Probst-Hensch NM, Yuan JM, Stanczyk FZ, Gao YT, Ross RK, Yu MC. IGF-1, IGF-2 and IGFBP-3 in prediagnostic serum: association with colorectal cancer in a cohort of Chinese men in Shanghai. *Br J Cancer* 2001; 85(11): 1695-1699.
188. Quan H, Tang H, Fang L, Bi J, Liu Y, Li H. IGF-1(CA)19 and IGFBP-3-202A/C gene polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *Cell Biochem Biophys* 2014; 69(1): 169-178.
189. Quesada A, Micevych P, Handforth A. C-terminal mechano growth factor protects dopamine neurons: a novel peptide that induces heme oxygenase-1. *Exp Neurol* 2009; 220(2): 255-266.

190. Reeves SG, Rich D, Meldrum CJ, Colyvas K, Kurzawski G, Suchy J, Lubinski J, Scott RJ. IGF1 is a modifier of disease risk in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 2008; 123(6): 1339-1343.
191. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 1987; 8: 138-140.
192. Renehan AG, O'Dwyer ST, Ahalet SM. Re: Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-Binding protein-3. *J Natl Cancer Res* 1999; 91: 2051-2052.
193. Richards CH, Flegg KM, Roxburgh CS, Going JJ, Mohammed Z, Horgan PG, McMillan DC. The relationships between cellular components of the peritumoural inflammatory response, clinicopathological characteristics and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Br J Cancer* 2012; 106(12): 2010-2015.
194. Rinaldi S, Cleveland R, Norat T, Biessy C, Rohmann S, Linseisen J, et al. Serum levels of IGF-I, IGFBP-3 and colorectal cancer-risk: results from the EPIC cohort, plus a meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer* 2010; 126(7): 1702-1715.
195. Rinderknecht W, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 1978; 253: 2769-2776.
196. Roberts CT Jr, Lasky SR, Lowe WL Jr, Seaman WT, LeRoith D. Molecular cloning of rat insulin-like growth factor I complementary deoxyribonucleic acids: differential messenger ribonucleic acid processing and regulation by growth hormone in extrahepatic tissues. *Mol Endocrinol* 1987; 1(3): 243-248.
197. Rosenfeld RG, Pham H, Cohen P, Fielder P, Gargosky SE, Muller H, Nonoshita L, Oh Y. Insulin-like growth factor binding proteins and their regulation. *Acta Paediatr Suppl.* 1994; 399: 154-158.
198. Rotwein P. Two insulin-like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 77-81.
199. Rotwein P, Pollock KM, Didier DK, Krivi GG. Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides. *J Biol Chem* 1986; 261: 4828-4832.
200. Roxburgh CS, McMillan DC. The role of the in situ local inflammatory response in predicting recurrence and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2012; 38(5): 451-466.
201. Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, Pieri F, Fraternali-Orcioni G, Pileri SA. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol.* 1998; 51(7): 506-511.

- 202.** Saglam O, Garrett CR, Boulware D, Sayegh Z, Shibata D, Malafa M, Yeatman T, Cheng JQ, Sebti S, Coppola D. Activation of the serine/threonine protein kinase AKT during the progression of colorectal neoplasia. *Clin Colorectal Cancer* 2007; 6(9): 652-656.
- 203.** Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* 2007; 28:20-47.
- 204.** Sandel MH, Dadabayev AR, Menon AG, Morreau H, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH, Janssen-van Rhijn CM, Ensink NG, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Kuppen PJ. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res* 2005; 11(7): 2576-2582.
- 205.** Sax AT, Jenkins DG, Devin JL, Hughes GI, Bolam KA, Skinner TL. The insulin-like growth factor axis: a biological mechanism linking physical activity to colorectal cancer survival. *Cancer Epidemiol* 2014; 38: 455-459.
- 206.** Scharf JG, Dombrowski F, Ramadori G. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. *Mol Pathol* 2001; 54:138-144.
- 207.** Sekharam M, Nasir A, Kaiser HE, Coppola D. Insulin-like growth factor 1 receptor activates c-SRC and modifies transformation and motility of colon cancer in vitro. *Anticancer res* 2003; 23(2B): 1517-1524.
- 208.** Shiratsuchi I, Akagi Y, Kawahara A, Kinugasa T, Romeo K, Yoshida T, Ryu Y, Gotanda Y, Kage M, Shirouzu K. Expression of IGF-1 and IGF-1R and their relation to clinicopathological factors in colorectal cancer. *Anticancer res* 2011; 31: 2541-2546.
- 209.** Shavlakadze T, Winn N, Rosenthal N, Grounds MD. Reconciling data from transgenic mice that overexpress IGF-I specifically in skeletal muscle. *Growth Horm IGF Res* 2005; 15: 4-18.
- 210.** Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol* 2011; 47: R1-R10.
- 211.** Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer death. *CA Cancer J Clin* 2011; 61 (4): 212-236.
- 212.** Siegfried JM, Kasprzyk PG, Treston AM, Mulshine JL, Quinn KA, Cuttitta F. A mitogenic peptide amine encoded within the E peptide domain of the insulin-like growth factor IB prohormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:8107-8111.
- 213.** Simmons JG, Van Wyk JJ, Hoyt EC, Lund PK. Multiple transcription start sites in the rat insulin-like growth factor-I gene give rise to IGF-I mRNAs that encode different IGF-I precursors and are processed differently in vitro. *Growth Factors* 1993; 9: 205-221.
- 214.** Singh P, Alex JM, Bast F. Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signalling system: novel treatment strategies for cancer. *Med Oncol* 2014; 31(1): 805.

- 215.** Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2011; 42: 1-10.
- 216.** Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch (red.). *TNM Klasyfikacja nowotworów złośliwych*. Piekarski J. (red. wyd. pol.). Via Medica, Gdańsk, 2010; 79-83.
- 217.** Soos MA, Whittaker J, Lammers R, Ullrich A, Siddle K. Receptors for insulin-like growth factor-I can form hybrid dimmers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochem J* 1990; 270: 383-390.
- 218.** Soubry A, Il'yasova D, Sedjo R, Wang F, Byers T, Rosen C, Yashin A, Ukrainitseva S, Haffner S, D'Agostino R Jr. Increase in circulating levels of IGF-1 and IGF-1/IGFBP-3 molar ratio over a decade is associated with colorectal adenomatous polyps. *Int J Cancer* 2012; 131(2): 512-517.
- 219.** Stanilov NS, Karakolev IA, Deliysky TS, Jovchev JP, Stanilova SA. Association of insulin-like growth factor-I receptor polymorphism with colorectal cancer development. *Mol Biol Rep* 2014; 42(12): 8099-8106.
- 220.** Stewart CEH, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 1996; 76:1005-1026.
- 221.** Suwała A, Ziora K, Landowska D. Budowa i funkcja insulinopodobnych czynników wzrostu oraz objawy kliniczne niedoboru IGF-1. *Endokrynol Ped* 2010; 3(32): 47-61.
- 222.** Szewczuk M, Zych S, Piątkowska-Czerniakowsak E. Ewolucja poglądów na temat insulinopodobnych czynników wzrostu. *Post Biochem* 2009; 55(3): 329-336.
- 223.** Tan DSW, Cook A, Chew SL. Nucleolar localization of an isoform of the IGF-I precursor. *BMC Cell Biol* 2002;3:17.
- 224.** Temmerman, L, Slonimsky E, Rosenthal N. Class 2 IGF-1 isoforms are dispensable for viability, growth and maintenance of IGF-1 serum levels. *Growth Horm IGF Res* 2010; 20: 255-263.
- 225.** Tennant MK, Thrasher JB, Twomey PA, Drivdahl RH, Birbaum RS, Plymate SR. Protein and messenger ribonucleic acid (mRNA) for the type 1 insulin-like growth factor (IGF) receptor is decreased and IGF-II mRNA is increased in human prostate carcinoma to benign prostate epithelium. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3774-3782.
- 226.** Teodoridis JM, Hardie C, Brown R. CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications. *Cancer Lett* 2008; 268: 177-186.
- 227.** Tian S, Simon I, Moreno V, Roepman P, Tabernero J, Snel M, van't Veer L, Salazar R, Bernards R, Capella G. A combined oncogenic pathway signature of BRAF, KRAS and PI3KCA mutation improves colorectal cancer classification and cetuximab treatment prediction. *Gut* 2013; 62: 540-549.
- 228.** Tian XC, Chen MJ, Pantschenko AG, Yang TJ, Chen TT. Recombinant E-peptides of pro-IGF-I have mitogenic activity. *Endocrinology* 1999; 140: 3387-3390.

- 229.** Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 1994; 15: 80-101.
- 230.** Toden S, Belobrajdic DP, Bird AR, Topping DL, Conlon MA. Effects of dietary beef and chicken with and without high amylose maize starch on blood malondialdehyde, Interleukins, IGF-I, insulin, leptin, MMP-2, and MMP-2 concentrations in rats. *Nutr Cancer* 2010; 62(4): 454-465.
- 231.** Tricoli JV, Rall LB, Karakousis CP, Herrera L, Petrelli NJ, Bell GI, Shows TB. Enhanced levels of insulin-like growth factor messenger RNA in human colon carcinomas and liposarcomas. *Cancer Res* 1986; 46: 6169-6173.
- 232.** Tsai H-L, Yeh Y-S, Chang Y-T, Yang I-P, Lin C-H, Kuo C-H, Juo S-H, Wang J-Y. Co-existence of cyclin D1 and Vascular Endothelial Growth Factor protein expression is a poor prognostic factor for UICC stage I-III colorectal cancer patients after curative resection. *J Surg Oncol* 2013; 107: 148-154.
- 233.** Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, Maekawa K, Katsurada Y, Nakamura T, Mochizuki H, Yamamoto J, Hase K. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2012; 36: 193-201.
- 234.** Vassilakos G, Philippou A, Tsakiroglou P, Koutsilieris M. Biological activity of the e domain of the IGF-1Ec as addressed by synthetic peptides. *Hormones* 2014; 13(2):182-196.
- 235.** Vinciguerra M, Santini MP, Claycomb WC, Ladurner AG, Rosenthal N. Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity. *Aging (Albany NY)* 2009; 2(1): 43-62.
- 236.** Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Boss JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532.
- 237.** Vrieling A, Voskuil DW, Bosma A, Majoor DM, van Doorn J, Cats A, Depla ACTM, Timmer R, Witteman BJM, Wesseling J, Kampman E, Van't Veer LJ. Expression of insulin-like growth factor system components in colorectal tissue and its regulation with serum IGF levels. *Growth Hormone & IGF Research* 2009; 19: 126-135.
- 238.** Wallis M. New insulin-like growth factor (IGF)-precursor sequences from mammalian genomes: the molecular evolution of IGFs and associated peptides in primates. *Growth Horm IGF Res* 2009; 19(1): 12-23.
- 239.** Warren R, Yuan H, Matli M, Ferrara N, Donner D. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem* 1996; 271: 29483-29488.
- 240.** Weber M, Fottner C, Liu SB, Jung MC, Engelhardt D, Baretton GB. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor in human colon carcinomas. *Cancer* 2002; 95: 2086-2095.

241. Weigent DA. Lymphocyte GH-axis hormones in immunity. *Cell Immunol* 2013; 285: 118-132.
242. Wilky BA, Rudek MA, Ahmed S, Laheru DA, Cosgrove D, Donehower RC, Nelkin B, Ball D, Doyle LA, Chen H, Ye X, Bigley G, Womack C, Azad NS. A phase I trial of vertical inhibition of IGF signaling using cixutumumab, an anti-IGF-1R antibody, and selumetinib, an MEK ½ inhibitor, in advanced solid tumours. *Br J Cancer* 2015; 112: 24-31.
243. Wong HL, Koh WP, Probst-Hensch NM, Van den Berg D, Yu MC, Ingles SA. Insulin-like growth factor-1 promoter polymorphism and colorectal cancer: a functional genomics approach. *Gut* 2008; 57(8): 1090-1096.
244. Wu Y, Yakar S, Zhao L, Henninghausen L, LeRoith D. Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res* 2002; 62: 1030-1035.
245. www.onkologia.org
246. Yang S, Alnageeb M, Simpson H, Goldspink G. Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *J Muscle res Cell Motil* 1996; 17(4): 487-495.
247. Yang SY, Bolvin C, Sales KM, Fuller B, Seifalian AM, Winslet MC. IGF-I activates caspases 3/7, 8 and 9 but does not induce cell death in colorectal cancer cells. *BMC Cancer* 2009; 9: 158; doi: 10.1186/1471-2407-9-158.
248. Zarilli R, Bruni CB, Riccio A. Multiple levels of control of insulin-like growth factor gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 101:R1-R14.
249. Zeestraten ECM, Benard A, Reimers MS, Schouten PC, Liefers GJ, van de Velde CJH, Kuppen PJK. The prognostic value of the apoptosis pathway in colorectal cancer: a review of the literature on biomarkers identified by immunohistochemistry. *Biomarkers in Cancer* 2013;5: 13-29.
250. Zhang R, Xu GL, Li Y, He LJ, Chen LM, Wang GB, Lin SY, Luo GY, Gao XY, Shan HB. The role of insulin-like growth factor 1 and its receptor in the formation and development of colorectal carcinoma. *J Int Med Res* 2013; 41(4): 1228-1235.
251. Zhang Z, Wang M, Zhou L, Feng X, Cheng J, Yu Y, Gong Y, Zhu Y, Li C, Tian L, Huang Q. Increased HMGB1 and cleaved caspase-3 stimulate the proliferation of tumor cells and are correlated with the poor prognosis in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2015; 34:51; DOI 10.1186/s13046-015-0166-1.
252. Zhu JL, Pao CI, Hunter E Jr, Lin KW, Wu GJ, Phillips LS. Identification of core sequences involved in metabolism-dependent nuclear protein binding to the rat insulin-like growth factor I gene. *Endocrinology* 1999; 140:4761-4771.
253. Zhu QC, Gao RY, Wu W, Guo BM, Peng JY, Qin HL. Effect of a high-fat diet in development of colonic adenoma in an animal model. *World J Gastroenterol* 2014; 20(25): 8119-8129.

11. ANEKS

Załącznik nr 1.

Izolacja RNA z tkanek guzów metodą *TRI REAGENT* +Kolumna

- 1) Odważenie 100-120 mg tkanki
- 2) Pokrojenie sterylnymi nożyczkami tkanki na drobne kawałki
- 3) Umieszczenie tkanki w szklanym homogenizatorze i zalanie 0,5 ml *TRI REAGENT*
- 4) Homogenizowanie w schłodzonym statywie do uzyskania maksymalnie homogennej zawiesiny
- 5) Dodanie 0,5 ml *TRI REAGENT*
- 6) Przeniesienie zawiesiny za pomocą 1ml pipety do 2ml *Eppendorf* (Epp)
- 7) Wirowanie 12 000 G przez 10 min. w temp. 4°C
- 8) Przeniesienie supernatantu do nowej 2 ml Epp
- 9) Dodanie 200 µl chloroformu
- 10) Wytrząsanie na wortexie ok. 20 sek.
- 11) Inkubowanie w temp. pokojowej ok. 10 min.
- 12) Wirowanie 12 000 G przez 15 min. w temp. 4°C
- 13) Zebranie górnej wodnej frakcji
- 14) Przeniesienie do świeżej probówki (ok. 400µl i dodanie takiej samej ilości 70% alchohol etylowy)
- 15) Nałożenie mieszaniny na kolumnę wiążącą RNA (zestaw do izolacji RNA firmy EURx) i wirowanie przez 1min przy prędkości 11 000 rpm w temp. pokojowej
- 16) Wylanie przesączu i dodanie do kolumny 600µl buforu RBW
- 17) Wirowanie 1 min. z prędkością 11 000 rpm w temp. pokojowej
- 18) Wylanie przesączu i dodanie do kolumny 300µl buforu RBW
- 19) Wirowanie 1 min. z prędkością 11 000 rpm w temp. pokojowej
- 20) Umieszczenie kolumny w czystej Epp
- 21) Wirowanie 1 min.; 11 000rpm; temp. pokojowa
- 22) Przełożenie kolumny do nowej Epp
- 23) Dodanie 40µl sterylnej wody na kolumnienkę
- 24) Inkubowanie ok. 1-2 min. w temp. pokojowej
- 25) Wirowanie 2 min.; 11 000rpm; temp. pokojowa
- 26) Pomiar stężenia (*Nano Drop*)

Załącznik nr 2.

Porównanie ilościowej ekspresji całkowitego IGF-1 (mRNA, białko) i wszystkich izoform mRNA IGF-1 oraz Ki-67 (mRNA i białko) w zależności od lokalizacji jelita grubego w grupie kontrolnej (odcinek proksymalny vs. dystalny) (test Manna-Whitney'a).

Transkrypt/białko	n	Odcinek jelita grubego	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	SD	P testu
całk. mRNA IGF-1	10	P	7918,25	4263,54	115,29	36775,50	10528,45	0,693
	21	D	43509,79	6542,28	809,71	731389,00	43509,79	
białko IGF-1*	10	P	-	0,00	0,00	8,00	-	0,393
	21	D	-	0,00	0,00	12,00	-	
mRNA IGF-1P1	10	P	1853,22	1249,52	238,54	6393,00	1770,00	0,662
	21	D	1877,58	1309,09	174,96	6318,50	1895,55	
mRNA IGF-1P2	10	P	3782,31	3005,18	367,50	8402,21	2785,24	0,217
	21	D	2466,46	2042,81	53,00	8624,19	2243,73	
mRNA IGF-1A	10	P	2221,85	1377,65	1029,84	6530,00	1799,40	0,416
	21	D	1821,47	1585,80	53,00	7633,00	1790,67	
mRNA IGF-1B	10	P	3533,19	1094,89	6,00	13519,00	4775,81	0,172
	21	D	1164,28	692,57	108,13	6549,21	1533,36	
mRNA IGF-1C	10	P	46,15	30,61	2,50	144,63	43,82	0,633
	21	D	75,65	23,43	2,41	881,00	188,27	
mRNA Ki-67	9	P	206600,75	200662,53	27927,71	414230,50	129681,67	0,532
	20	D	221627,95	162774,61	18876,31	870833,50	215382,19	
białko Ki-67*	7	P	-	2,00	0,00	3,00	-	0,498
	20	D	-	1,00	0,00	3,00	-	

Objaśnienia: n – liczba osób; * - ekspresja oszacowana w skali półilościowej (p. Materiał i Metody); P – proksymalny odcinek j. grubego; D – dystalny odcinek j. grubego; p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe