

lek. Krzysztof Szmyt

**Ocena ekspresji genów *OCT-4*, *SOX-2*, *KLF-4* i *NANOG*  
w komórkach nowotworowych u chorych leczonych  
chirurgicznie z powodu raka jelita grubego**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych  
w dyscyplinie medycyna**

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Jacek Szmeja

Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Onkologii  
Gastroenterologicznej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik Katedry i Kliniki: Prof. dr hab. med. Tomasz Banasiewicz



Wydział Lekarski

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2020

## WYKAZ SKRÓTÓW:

- AJCC – Amerykański Wspólny Komitet Raka (*ang. American Joint Committee on Cancer*)
- Akt – kinaza serynowo/treoninowa (*ang. Serine/Threonine Protein Kinase*)
- APC – gen polipowatości jelita grubego (*ang. Adenomatous Polyposis Coli*)
- BMI – wskaźnik masy ciała (*ang. Body Mass Index*)
- BRAF – protoonkogen BRAF (*ang. Type B Rapid Accelerated Fibrosarcoma*)
- BTE - podstawowy element transkrypcyjny (*ang. Basic Transcription Element*)
- CCND1 - gen kodujący Cyklinę D1 (*ang. Gene Coding Protein Cyclin D1*)
- CDX2 – białko CDX2 (*ang. Caudal-Type Homeobox Protein 2*)
- c-MYC – protoonkogen c-MYC (*ang. MYCL Proto-Oncogene*)
- CRC – rak jelita grubego (*ang. Colorectal Cancer*)
- CSCs – pluripotencjalne komórki nowotworowe (*ang. Cancers Stem Cells*)
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (*ang. Deoxyribonucleic Acid*)
- ECs - embrionalne komórki nowotworowe (*ang. Embryonal Carcinoma Cells*)
- EG - embrionalne komórki zarodkowe (*ang. Embryonal Germ Cells*)
- ELF - gen ELF (*ang. E74-like Factor 1*)
- ESC - embrionalne komórki macierzyste (*ang. Embryonic Stem Cells*)
- EMT – przejście epitelialno-mezenchymalne (*ang. Epithelial-Mesenchymal Transition*)
- EPCAM – nabłonkowa komórkowa molekula adhezyjna (*ang. Epithelial Cell Adhesion Molecule*)
- FAP – zespół polipowatości rodzinnej (*ang. Familial Adenomatous Polyposis*)
- FCC - rodzinny rak jelita grubego (*ang. Familial Colorectal Cancer*)
- FOLFIRI - (*ang. FOLinic acid, Fluorouracil, IRInotecan*)
- FOLFOX – (*ang. FOLinic acid, Fluorouracil, OXaliplatin*)
- GAPDH - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*ang. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*)
- GIST - nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego (*ang. Gastrointestinal Stromal Tumor*)
- GSK3β – kinaza 3 syntetyzująca glikogen (*ang. Glycogen Synthase Kinase-3*)
- hESCs - ludzkie embrionalne komórki macierzyste (*ang. human Embryonic Stem Cells*)
- HIST-PAT – rozpoznanie histopatologiczne
- HMD - domena o wysokiej mobilności wiążącej DNA (*ang. High-Mobility-Domein*)

hMLH - (*ang. human MutL Homolog*)

HNPCC - dziedziczny rak jelita grubego bez polipowatości (*ang. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*)

hPMS2 - (*ang. Postmeiotic Segregation Increased 2*)

hPSCs - ludzkie pluripotencjalne komórki macierzyste (*ang. Human Pluripotent Stem Cells*)

IBD – nieswoista choroba zapalna jelit (*ang. Inflammatory Bowel Disease*)

ICM – węzeł zarodkowy (*ang. Inner Mass Cell*)

IGF - insulinopodobny czynnik wzrostu (*ang. Insulin-like Growth Factor*)

IGF1R - receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (*ang. Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*)

iPSC - indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (*ang. induced Pluripotent Stem Cells*)

ITF2 – immunoglobulina czynnika transkrypcyjnego 2 (*ang. Immunoglobulin Transcription Factor 2*)

KLF4 – gen/czynnik transkrypcyjny KLF 4 (*ang. Krüppel-like factor 4*)

K-Ras - protoonkogen/białko K-Ras (*ang. Kirsten Rat Sarcoma Oncogene/Protein*)

MAPK - szlak sygnałowy kinaz aktywowanych mitogenami (K-Ras/BRAF/MEK/ERK, *ang. Mitogen Activated Protein Kinase*)

miRNA - mikroRNA (*ang. microRNA*)

MMP/TIMP - system inhibicji metaloproteinaz (*ang. Matrix Metaloproteinases/Tissue Inhibitors of MMPs*)

mTOR - tzw. ssaczy cel rapamycyny (*ang. Mammalian Target Of Rapamycin Kinase*)

mTORC – kompleks kinazy mTOR (*ang. Mammalian Target Of Rapamycin Kinase Complex*)

NANOG – czynnik transkrypcyjny/gen NANOG

NCF2 – czynnik rozkładu neutrofilii 2 (*ang. Neutrophil Cytosolic Factor 2*),

LAR - przednia resekcja odbytnicy (*ang. Lower Anterior Resection*)

LCC – rak lewej połowy okrężnicy (*ang. Left Colon Cancer*)

OCT4 - (*ang. Octamer-binding Transcription Factor 4*)

“One-step” RT-PCR – jednoetapowa odwrotna reakcja łańcuchowej polimerazy (*ang. „One-step” Reverse Transcription PCR*)

OS – całkowite przeżycie (*ang. Overall Survival*)

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (*ang. Polymerase Chain Reaction*)

PI3K – 3-kinaza fosfatidyloinozytolu (*ang. PhosphoInositide 3-Kinases*)

PFS - czasu przeżycia wolnego od progresji choroby nowotworowej (*ang. Progression-Free Survival*)

POU – domena POU (*ang. POU domain*)

PTEN - (*ang. Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten*)

p38 $\alpha$  – białko kinazy 14 aktywującej mitogen (albo MAPK14, *ang. Mitogen-Activated Protein Kinase 14*)

p53 - czynnik transkrypcyjny p53 (*ang. Transcription Factor Protein 53*)

RCC – rak prawej połowy okrężnicy (*ang. Right Colon Cancer*)

REX1 – czynnik transkrypcyjny REX1 (*ang. ZFP42 - Zinc Finger Protein*)

RNA – kwas rybonukleinowy (*ang. Ribonucleic Acid*)

RT-qPCR – odwrotna ilościowa reakcja łańcuchowej polimerazy (*ang. Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR*)

SD – odchylenie standardowe (*ang. Standard Deviation*)

SOX – gen/czynnik transkrypcyjny SOX (*ang. Sex Determining Region Y Box Containing Gene*)

STK11 – gen kinazy treoninowo-serynowej (lub LBK1, *ang. Serine/threonine Kinase 11*)

TAZ – gen TAZ/białko Tafazzin (*ang. TAZ gene/Tafazzin Protein*)

TCF4 - czynnik transkrypcyjny 4 (*ang. Transcription Factor 4*)

TE - trofektoderma (*ang. Trophectoderm*)

TEAD - czynnik transkrypcyjny TEAD (*ang. Transcriptional Enhancer factor TEF-1/TEA Domain Family Member 1*)

TEM – przezodbytowa endoskopowa chirurgia (*ang. Transanal Endoscopic Microsurgery*)

TGF- $\beta$  - transformujący czynnik wzrostu beta (*ang. Transforming Growth Factor Beta*)

Tcl1 – gen/białko Tc11 (*ang. T-Cell Leukemia/Lymphoma 1 gen/protein*)

TME – całkowite wycięcie mezorektum (*ang. Total Mesorectal Excision*)

TNM – międzynarodowa klasyfikacja nowotworów złośliwych, T – guz, N – węzły chłonne, M- przerzuty odległe (*ang. Tumor, lymph Nodes, Metastasis*)

TRUS - ultrasonografia przezodbytnicza (*ang. Transrectal Ultrasound*)

WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (*ang. World Health Organization*)

WNT – szlak sygnalizacyjny WNT (*ang. Wg- Wingless, Int – MMTV integration site*)

YAP1 – białko YAP1 (*ang. Yes-Associated Protein 1*)

*Serdecznie dziękuję*

***Panu prof. dr hab. n. med. Jackowi Szmeji**  
za życzliwość, poświęcony czas oraz merytoryczne wsparcie,  
bez których praca ta nie mogłaby powstać.*

*Dziękuję także  
**Panu dr hab. n. med. Mariuszowi Kaczmarkowi**  
za inspirację i opiekę merytoryczną,  
w trakcie przygotowywania tej pracy.*

*Pracę tę dedykuję mojej wspaniałej **Żonie**,  
oraz wspierającej **Mamie**.*

**Słowa kluczowe:** rak jelita grubego, nowotworowe komórki pluripotencjalne, OCT4, SOX2, KLF4, NANOG

**Key words:** colorectal cancer, cancer stem cells, OCT4, SOX2, KLF4, NANOG

## **SPIS TREŚCI:**

1. WSTĘP.....	12
1.1. Epidemiologia i etiologia raka jelita grubego.....	12
1.2 Klasyfikacja i patomorfologia raka jelita grubego.....	16
1.3 Standardy diagnostyki i leczenia raka jelita grubego.....	20
1.4 Teorie karcynogenezy.....	22
1.5 Komórki macierzyste i ich markery.....	24
1.6 Wpływ genów pluripotencji na embriogenezę.....	25
1.7 Molekularne szlaki sygnałowe regulujące ekspresję transkrypcyjnych czynników pluripotencji.....	26
1.8. Opis badanych czynników transkrypcyjnych, mechanizmów działania i ich poznanej roli u człowieka i zwierząt.....	28
1.8.1. Czynniki transkrypcyjne SOX2 (rodzina genów SOX).....	28
1.8.2. Homeotyczny czynnik transkrypcyjny NANOG.....	29
1.8.3. Czynniki transkrypcyjne KLF4.....	30
1.8.4. Domena genów transkrypcyjnych POU - czynnik transkrypcyjny OCT-4.....	32
2. CELE PRACY.....	33
3. MATERIAŁY I METODY.....	34
3.1 Grupa badana.....	34
3.2 Materiał do badań molekularnych.....	35
3.3 Ocena ekspresji genów w badanych próbkach tkankowych.....	37
3.4. „One-step” RT-PCR.....	40

3.5. Elektroforeza białek na żelu agarozowym.....	41
3.6. Analiza statystyczna.....	44
4. WYNIKI.....	45
4.1 Charakterystyka demograficzna i kliniczna badanej grupy.....	45
4.2 Charakterystyka histopatologiczna badanej grupy.....	52
4.3. Charakterystyka cech klinicznych w grupie badanej.....	57
4.4. Analiza izolacji RNA oraz badań genu referencyjnego (GAPDH).....	59
4.5. Analiza ekspresji jakościowej genów pluripotencji.....	61
4.6. Porównanie ekspresji genów pluripotencji z cechami klinicznymi i patomorfologicznymi.....	64
4.7. Analiza subpopulacji ze względu na koekspresję genów pluripotencji oraz współzależności do parametrów klinicznych i patomorfologicznych.....	69
5. DYSKUSJA.....	72
5.1 Omówienie danych demograficznych, klinicznych i histopatologicznych.....	72
5.2. Analiza ekspresji genów pluripotencji i ich implikacja kliniczna.....	74
5.2.1 SOX2.....	74
5.2.2 OCT4.....	77
5.2.3 KLF4.....	80
5.2.4 NANOG.....	82
5.2.5. Wzajemne powiązania pomiędzy pluripotencjalnymi czynnikami transkrypcyjnymi...	84
5.3. Ograniczenia badania.....	86



5.4. Perspektywy i dalsze plany.....	87
5.5. Wnioski.....	89
6. BIBLIOGRAFIA.....	90
7. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM.....	102
8. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM.....	103
9. OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ.....	104

## **SPIS RYCIN:**

Rycina 3.2.1. Schematyczny sposób pobrania tkanek z guza oraz tkanki zdrowej.....	36
Rycina 3.3.1. Thermomixer comfort (Eppendorf).....	38
Rycina 3.3.2. Wirówka MiniSpin (Eppendorf).....	38
Rycina 3.3.3. Spektrofotometr ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).....	39
Rycina 3.3.4. Histogram przykładowego pomiaru stężenia wyizolowanego RNA (spektrometr ND-1000).....	39
Rycina 3.4.1. Analizator PCR (Eppendorf).....	41
Rycina 3.5.1. Produkty PCR w żelu agarozowym podczas elektroforezy.....	42
Rycina 3.5.2. Zasilacz do elektroforezy.....	42
Rycina 3.5.3. System MiniBis Pro do analizy migracji produktów elektroforezy pod lampą UV (DNR).....	43
Rycina 4.1.1. Podział pacjentów według stadium zaawansowania w klasyfikacji TNM .....	46
Rycina 4.1.2. Podział pacjentów według klasyfikacji Duke'a oraz względem płci .....	47
Rycina 4.1.3. Podział badanej grupy według zaawansowania względem klasyfikacji Duke'a w modyfikacji Astlera-Collera oraz względem płci.....	48
Rycina 4.1.4. Porównanie wzrostu pomiędzy płciami w całej grupie badanej.....	51
Rycina 4.1.5. Porównanie wagi pomiędzy płciami w całej grupie badanej.....	51
Rycina 4.2.1. Lokalizacja guza pierwotnego w całej grupie badanej.....	53
Rycina 4.4.1. Fotografia przedstawiająca rozdział elektroforetyczny DNA genu referencyjnego GAPDH.....	60

Rycina 4.5.1. Fotografie przedstawiające rozdział elektroforetyczny DNA genów pluripotencji.....	61
Rycina 4.7.1. Porównanie liczby ekspresji genów w zależności od rodzaju miejsca pobranej tkanki w całej grupie badanej.....	71

## **SPIS TABEL:**

Tabela 2.1 Klasyfikacja TNM (wg AJCC - Edycja 8) raka jelita grubego.....	18
Tabela 2.2 Klasyfikacja zaawansowania klinicznego TNM wg AJCC (Edycja 8).....	19
Tabela 2.3 Klasyfikacja Dukesa.....	20
Tabela 2.4 Klasyfikacja Dukesa wg modyfikacji Astlera-Collera.....	20
Tabela 3.1.1. Kryteria włączenia i wyłączenia pacjenta do badania klinicznego.....	35
Tabela 3.4.1. Użyte sekwencje starterów genów pluripotencji i ich produkt.....	40
Tabela 4.1.1 Podział pacjentów według stadium zaawansowania w klasyfikacji TNM.....	45
Tabela 4.1.2. Podział pacjentów według klasyfikacji Dukesa oraz względem płci.....	47
Tabela 4.1.3. Podział badanej grupy według zaawansowania względem klasyfikacji Dukesa w modyfikacji Astlera-Collera oraz względem płci.....	48
Tabela 4.1.4. Wyniki poszczególnych składowych klasyfikacji TNM w całej grupie badanej oraz porównanie pomiędzy płciami.....	49
Tabela 4.1.5. Podstawowe dane demograficzne całej badanej grupy.....	50
Tabela 4.1.6. Porównanie względem płci w całej grupie badanej.....	50
Tabela 4.2.1. Charakterystyka lokalizacji guza na podstawie oceny operacyjnej i potwierdzeniu histopatologicznym w całej badanej grupie oraz porównanie względem płci.....	52
Tabela 4.2.2. Podstawowe wymiary guzów pierwotnych wg przeanalizowanych badań histopatologicznych w całej grupie badanej.....	53
Tabela 4.2.3. Różnice w zakresie rozmiarów guza pomiędzy płciami.....	54
Tabela 4.2.4. Ostateczne rozpoznanie histopatologiczne i podział ze względu na płeć.....	55
Tabela 4.2.5. Wyniki statystyczne dla całej grupy badanej w zakresie następujących cech: angioinwazji, neuroinwazji oraz stopnia zróżnicowania guza (G).....	55
Tabela 4.2.6. Ilość zajętych nowotworowo lokalnych węzłów chłonnych oraz lokalizacja przerzutów odległych w całej grupie badanej i względem płci.....	56
Tabela 4.3.1. Analiza danych związanych z chorobami przewlekłymi oraz spożywania używek w całej grupie badanej.....	57

Tabela 4.3.2. Charakterystyka leczenia onkologicznego przed- i pooperacyjnego w całej grupie badanej.....	58
Tabela 4.4.1. Wyniki ilości wyizolowanego RNA za pomocą zestawu Total RNA w całej grupie badanej .....	59
Tabela 4.4.2. Porównanie ilościowe otrzymanego RNA między wszystkimi podgrupami w całej populacji badanej.....	60
Tabela 4.5.1. Ocena ekspresji jakościowej genu OCT4 względem płci.....	62
Tabela 4.5.2. Ocena ekspresji jakościowej genu SOX2 względem płci.....	62
Tabela 4.5.3. Ocena ekspresji jakościowej genu KLF4 względem płci.....	63
Tabela 4.5.3. Ocena ekspresji jakościowej genu NANOG względem płci.....	63
Tabela 4.6.1. Porównanie ekspresji jakościowej genów pomiędzy miejscami pobrania tkanki w całej grupie badanej.....	64
Tabela 4.6.2. Szczegółowe wyniki porównań ekspresji genów pluripotencji i wybranych cech klinicznych oraz histopatologicznych w całej grupie badanej (istotnych statystycznie).....	65
Tabela 4.6.3. Różnice w ekspresji genów pluripotencji w zależności od wielkości guza w całej grupie badanej.....	66
Tabela 4.6.4. Podział guzów ze względu na lokalizację i kategorią wiekową.....	67
Tabela 4.6.5. Ekspresja genów pluripotencji w poszczególnych genach oraz w zależności od miejsca wyizolowania materiału genetycznego w całej grupie badanej.....	68
Tabela 4.7.1. Różnice liczby ekspresji genów pluripotencji w poszczególnych tkankach w całej grupie badanej.....	71

# 1. WSTĘP

## 1.1. Epidemiologia i etiologia raka jelita grubego

Rak jelita grubego (*ang. Colorectal Cancer, CRC*) jest trzecim najczęstszym nowotworem złośliwym w Polsce w populacji ogólnej (po raku płuca i piersi wśród kobiet oraz raku płuca oraz gruczołu krokowego u mężczyzn). Z kolei, według danych Światowej Organizacji Zdrowia (*ang. World Health Organization, WHO*) z 2018 roku, CRC jest trzecim najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym wśród mężczyzn i drugim wśród kobiet. CRC jest także najczęstszym nowotworem złośliwym przewodu pokarmowego na świecie oraz w Polsce.

Szacuje się, że według najnowszych danych zapadalność na CRC w Polsce wynosi około 24 przypadki na 100 000 ludzi (1). W samym regionie województwa wielkopolskiego każdego roku odnotowuje się średnio 1,5-2 tysięcy nowych przypadków zachorowań na CRC, a mniej więcej 60% pacjentów umiera w ciągu 5 lat od postawienia diagnozy (1). Najnowsze dane odnoszące się do okresu ostatnich pięciu lat wskazują na 1 849 518 nowych przypadków oraz 880 792 przypadków śmiertelnych CRC, łącznie wśród kobiet i mężczyzn. W Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej około 8% wszystkich zgonów z powodu nowotworów złośliwych jest spowodowanych CRC (2).

W ostatnich latach obserwuje się również zwiększoną dynamikę zachorowalności na CRC. Nadal nieznanym jest szczegółowy mechanizm karcynogenezy CRC oraz udział poszczególnych czynników w procesie nowotworzenia. Wyróżnia się kilka kategorii czynników wpływających na rozwój CRC, w tym:

- epidemiologiczne;
- środowiskowe (w tym geograficzne) oraz dietetyczne;
- współwystępowanie niektórych chorób przewodu pokarmowego (np. występowanie polipów gruczolakowych, nieswoiste choroby zapalne jelit);
- genetyczne i epigenetyczne.

Najważniejszą przyczyną epidemiologiczną stanowi podeszły wiek (według definicji WHO osoby powyżej 60 roku życia). Dowiedziono, że wyższe ryzyko zachorowania na CRC występuje u osób powyżej 65 roku życia – który powoduje wzrost ryzyka u mężczyzn o około 59%, natomiast u kobiet o ponad 63%. Obserwuje się również, że u mężczyzn powyżej 50-tego roku życia, CRC występują od 4 do 8 lat wcześniej u mężczyzn niż u kobiet (3).

Do poznanych czynników ryzyka rozwoju CRC należą: nadwaga/otyłość oraz zmniejszona aktywność fizyczna. Wyraźne jest zróżnicowanie geograficzne zachorowalności na CRC (4). W Europie największa zapadalność na CRC występuje w rejonach północnych. Badania wykazały, że liczne czynniki środowiskowe, w tym nawyki żywieniowe, odrywają bardzo ważną rolę w etiologii raka jelita grubego. Dieta oparta na żywności wysokoprzetworzonej, bogata w czerwone mięso, a uboga w wapń czy kwas foliowy sprzyjają zwiększonej zapadalności na opisywany typ nowotworu. Taki sposób odżywiania niekorzystnie wpływa na florę bakteryjną, wydłuża czas pasażu pokarmu przez jelito grube i sprzyja powstawaniu związków będących prekursorami karcynogenów. Z drugiej strony, zaobserwowano, bezsprzecznie pozytywny wpływ błonnika pokarmowego na zapobieganiu powstawania gruczolaków i gruczolakoraków jelita grubego. Kolejnym istotnym czynnikiem ryzyka są palenie tytoniu oraz nadmierne spożywanie alkoholu (5, 6, 7).

Koegzystencja raka jelita grubego z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit (*ang. Inflammatory Bowel Diseases, IBD*) została po raz pierwszy opisana w 1925 roku. Według danych, CRC nadal statystycznie odpowiada za 10-15% zgonów wśród osób ze zdiagnozowanym IBD. Pomimo, ewidentnego powiązania chorób zapalnych jelit z zachorowalnością na CRC, podstawy molekularne tego procesu oraz jego patofizjologia wciąż pozostają nie w pełni wyjaśnione, stanowiąc obszar aktualnych i rozwijanych badań klinicznych i naukowych. Uważa się, że u osób z długoletnią (ponad 10 lat) historią choroby wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, ryzyko zachorowania na CRC może być nawet ponad 20-krotnie wyższe. Jeszcze większe ryzyko występuje u osób u których zaostrzenia występują często i przebiegają w sposób ciężki (8).

Około 85% przypadków CRC (w tym 90% sporadycznych CRC) wynika ze zmian o charakterze gruczolaków mających makroskopowo postać polipa. Mają one określony potencjał do przemiany nowotworowej. Polipy są endofitycznymi rozrostami błony śluzowej jelita grubego. Ryzyko rozwoju CRC w obrębie polipa zależy oczywiście od wielu czynników takich jak: wielkości, liczby oraz charakterystyki histopatologicznej polipów (9). Ze względu na budowę histologiczną wyróżnia się następujące typy polipów:

- hiperplastyczne (metaplastyczne) - nie posiadają cech atypii komórkowej;
- zapalne;
- powstające z zaburzeń rozwojowych (hamartomatyczne);
- gruczolakowe:
  - gruczolaki cewkowe;

- gruczolaki kosmkowe;
- gruczolaki cewkowo-kosmkowe;
- gruczolaki ząbkowane - łączą cechy polipów hiperplastycznych i gruczolaków.

Największe ryzyko rozwoju CRC ma miejsce w przypadku polipów o budowie kosmkowej (29-70%), a w dalszej kolejności cewkowo-kosmkowej (19%) i cewkowej (5-10%) (9). Udowodniono także istnienie zależności pomiędzy wielkością polipa, a występowaniem CRC. U osoby, u której wykryto polipa o średnicy poniżej 1 cm ryzyko przejścia nowotworu w formę złośliwą wynosi poniżej 1%, jednak przy średnicy powyżej 2 cm wzrasta do niemal 50% (10).

Genetycznie uwarunkowany zespół gruczolakowatości rodzinnej (*ang. Familial Adenomatous Polyposis, FAP*) prowadzi do nagromadzenia dużej liczby polipów w jelicie grubym. Istnieje niemal 100% ryzyko przemiany nieleczzonego zespołu FAP w CRC. Szacunkowo FAP odpowiada za 0,5% wszystkich zachorowań na CRC. Jest to choroba dziedziczona autosomalnie, dominująco, związana z mutacjami w genie APC (*ang. Adenomatous Polyposis Coli*). Do tej pory wykryto ponad 300 mutacji genu APC. U nosicieli mutacji genu APC stwierdza się często również wyższe ryzyko rozwoju nowotworu żołądka i jelita cienkiego. Zmianami pozajelitowymi FAP są guzy desmoidalne, raki tarczycy, charakterystyczne wyrośla kostne i zmiany w siatkówce oka (zespół Gardnera) (11, 12).

Kolejnym stanem, zwiększającym ryzyko rozwoju CRC jest zespół Peutza-Jeghersa, cechujący się przede wszystkim występowaniem plam soczewicowatych na skórze warg i palców oraz polipów typu hamartomatycznego, w 40% może zwiększać ryzyko wystąpienia CRC oraz innych nowotworów. Częstość występowania szacuje się na 1:8300 i 1:200 000. Zespół ten jest dziedziczony autosomalnie dominująco. Mutacje germinálną można znaleźć w obrębie genu kinazy treoninowo-serynowej 11 (STK11, lub LKB1, *ang. Gene Coding Serine/threonine Kinase 11*) i może obejmować zarówno punktowe mutacje, jak i duże delecje. Polipy typu hamartomatycznego mogą występować również w przypadku polipowatości mnogiej młodzieńczej oraz innych zespołów takich, jak: zespół Cowdena, zespół Bannayan-Riley-Ruvalcaba oraz zespół Proteusza. Wystąpienie jednego z wymienionych zespołów może zwiększać zachorowalność na CRC nawet o 60-70% (13, 14).

Z kolei dziedziczny rak jelita grubego bez polipowatości (*ang. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC*) inaczej zespół Lyncha stanowi do 5% wszystkich przypadków CRC. HNPCC jest dziedziczony w sposób autosomalny dominujący w powiązaniu z mutacjami genów zaangażowanych w naprawę DNA: hMLH1 (*ang. human MutL Homolog 1*), hMSH2 (*ang. human MutL Homolog 2*), hMSH6 (*ang. human MutL Homolog 6*), hPMS2 (*ang. human*

*Postmeiotic Segregation Increased 2*) oraz genu EPCAM (ang. *Epithelial Cell Adhesion Molecule*) (15). Największe ryzyko CRC mają pacjenci z mutacją hMSH2 oraz EPCAM. Zasadniczo wyróżnia się dwa typy HNPCC:

- zespół Lyncha I - występowanie tylko w CRC;
- zespół Lyncha II - współwystępowanie CRC oraz innych typów nowotworów złośliwych (m.in. raka trzonu macicy, jajnika, piersi, żołądka, jelita cienkiego, wątroby, dróg żółciowych, dróg moczowych, a także chłoniaków).

Ze względu na brak swoistych cech fenotypowych HNPCC jest rozpoznawany na podstawie przeprowadzonych wywiadów rodzinnych wg kryteriów amsterdamskich, w których:

- rak jelita grubego występuje u co najmniej trzech krewnych, z których jeden jest w pierwszym stopniu pokrewieństwa, gdy wszystkie przypadki raka zostały zweryfikowane histopatologicznie;
- co najmniej dwie spośród tych osób to krewni pierwszego stopnia w dwóch różnych pokoleniach;
- przynajmniej u jednej z tych osób rozpoznano raka jelita grubego przed pięćdziesiątym rokiem życia;
- u badanej osoby wykluczono FAP. Obecnie zaleca się również badanie występowania niestabilności mikrosatelitarnego DNA oraz zmian ekspresji genów podlegających mutacji w HNPCC (16).

Rodzinny rak jelita grubego (ang. *Familial Colorectal Cancer, FCC*) stanowi od około kilku do kilkunastu procent wszystkich przypadków CRC. Zespół FCC rozpoznaje się, gdy pomimo zdiagnozowania wśród krewnych CRC układ zachorowań rodzinnych nie odpowiada dziedzicznemu zespołom predyspozycji (np. HNPCC czy FAP). Główną rolę w zachorowalności na FCC odgrywają czynniki środowiskowe (np. podobne nawyki żywieniowe) oraz nieokreślone dotąd dokładnie uwarunkowania genetyczne, które są wspólne dla całej rodziny (17).

## 1.2 Klasyfikacja i patomorfologia raka jelita grubego

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) wyróżnia się następujące typy histopatologiczne nowotworu jelita grubego (18):

A. Nowotwory pochodzenia nabłonkowego (*ang. epithelial tumors*):

- gruczolak (*łac. adenoma*);
- cewkowy (*łac. tubulare*);
- kosmkowy (*łac. villosum*);
- kosmkowo-cewkowy (*łac. tubulo-villosum*);
- ząbkowany (*łac. serrated*);
  
- śródnabłonkowa dysplazja związana z przewlekłymi chorobami zapalnymi:
  - niskiego stopnia (*ang. low-grade glandular intraepithelial dysplasia*);
  - wysokiego stopnia (*ang. high-grade glandular intraepithelial dysplasia*);
  
- rak (*łac. carcinoma*):
  - rak gruczołowy (*łac. adenocarcinoma*);
  - rak gruczołowy śluzotworczy (*łac. adenocarcinoma mucinosum*);
  - rak sygnetowokomórkowy (*ang. signet-ring cell carcinoma*);
  - rak drobnokomórkowy (*łac. carcinoma microcellulare*);
  - rak płaskonabłonkowy (*łac. squamous cell carcinoma*);
  - rak gruczołowo-łuskowy (*łac. adenosquamous carcinoma*);
  - rak rdzeniasty (*łac. medullary carcinoma*);
  - rak niezróżnicowany (*łac. carcinoma nondifferentiatum*);
  
- rakowiak (*ang. carcinoid*):
  - dobrze zróżnicowany nowotwór endokryny;
  - EC-cell – nowotwór produkujący serotoninę;
  - L-cell – nowotwór produkujący peptyd;
  - inne.

B. Nowotwory pochodzenia nienabłonkowego:

- tłuszczak (*łac. lipoma*);
  
- mięśniak gładkokomórkowy (*łac. leiomyoma*);
  
- nowotwór podścieliskowy (*ang. gastrointestinal stromal tumor – GIST*);
  
- mięśniakomięsak gładkokomórkowy (*łac. leiomyosarcoma*);



- naczyńniakomięsak (*łac. angiosarcoma*);
- mięsak Kaposiego (*łac. Kaposi sarcoma*);
- czerniak złośliwy (*łac. melanoma malignum*);
- inne;

C. Chłoniaki (*ang. lymphoma*);

D. Polipy nienowotworowe.

Niemal, 90% spotykanych sporadycznych raków jelita grubego ma postać raka gruczołowego (gruczolakoraków). Makroskopowo wyróżnia się cztery typy zaawansowanego CRC: polipowaty; owrzodziały i grzybiasty; owrzodziały i zwężający; rozlegle naciekający (19).

W celu ujednoczenia stopnia zaawansowania nowotworów jelita grubego wprowadzono kilka systemów klasyfikujących. Obecnie najpowszechniej stosowany jest system TNM (*ang. Tumor, lymph Node, Metastases*) według AJCC (*ang. American Joint Committee on Cancer*), opierająca się na ocenie nacieku tkanek, stanu zajęcia regionalnych węzłów chłonnych oraz obecności przerzutów odległych (20):

T (*ang. tumor*) - określającej głębokość naciekania guza pierwotnego,

N (*ang. lymph node*) - określającej stan regionalnych węzłów chłonnych,

M (*ang. metastases*) - potwierdzającej lub wykluczającej występowanie przerzutów w narządach odległych [Tabela 2.1, 2.2].

W szerszym użytku są nadal klasyfikacje Dukesa (najczęściej w modyfikacji Astlera-Collera) [Tabela 2.3, 2.4].

**Tabela 2.1 Klasyfikacja TNM (wg AJCC - Edycja 8) raka jelita grubego.**

Guz pierwotny – cecha T	
Tx	Nie można ocenić guza pierwotnego
T0	Nie stwierdza się guza pierwotnego
Tis	Rak in situ
T1	Guz nacieka warstwę podśluzową
T2	Guz nacieka błonę mięśniową właściwą
T3	Guz nacieka przez błonę mięśniową właściwą tkanki okołokręnicze lub okołodbytnicze
T4	–
T4a	Guz powoduje perforację otrzewnej
T4b	Guz bezpośrednio nacieka lub przylega do innych narządów lub struktur
Zajęcie okolicznych węzłów chłonnych – cecha N	
Nx	Nie można ocenić okolicznych węzłów chłonnych
N0	Nie stwierdza się przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych
N1	Obecne są przerzuty w 1–3 regionalnych węzłach chłonnych
N1a	Przerzut w 1 regionalnym węzle chłonnym
N1b	Przerzuty w 2–3 regionalnych węzłach chłonnych
N1c	Obecny depozyt lub depozyty komórek nowotworowych w warstwie podsukowiczej, krezce lub niepokrytych otrzewną tkankach okołokręniczych lub okołodbytniczych bez przerzutu lub przerzutów w węzłach chłonnych
N2	Obecne są przerzuty w 4 lub więcej regionalnych węzłach chłonnych
N2a	Przerzuty w 4–6 regionalnych węzłach chłonnych
N2b	Przerzuty w 7 lub więcej regionalnych węzłach chłonnych
Przerzuty odległe – cecha M	
Mx	Nie można określić obecności przerzutów odległych
M0	Nie stwierdza się przerzutów odległych
M1	Obecne przerzuty odległe
M1a	Przerzuty ograniczone do jednego narządu lub miejsca (np. wątroba, płuco, jajnik, pozaregionalny węzeł chłonny)
M1b	Przerzuty w więcej niż jednym narządzie lub miejscu lub w otrzewnej

T – guz; N- przerzuty do węzłów chłonnych; M- obecność przerzutów odległych

**Tabela 2.2 Klasyfikacja zaawansowania klinicznego TNM wg AJCC (Edycja 8).**

Stopień zaawansowania	Cecha T	Cecha N	Cecha M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3	N1	M0
	T4a	N1	M0
	T2	N2a	M0
	T3	N2a	M0
	T1	N2b	M0
	T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3	N2b	M0
	T4a	N2b	M0
	T4b	N1	M0
	T4b	N2	M0
IVa	dowolne T	dowolne N	M1a
IVb	dowolne T	dowolne N	M1b

T – guz; N- przerzuty do węzłów chłonnych; M- obecność przerzutów odległych

**Tabela 2.3 Klasyfikacja Dukesa.**

Stopień	Cechy
A	Nowotwór nie przekracza ściany jelita
B	Nowotwór przekracza ścianę jelita do surowicówki lub tkanki tłuszczowej okołodbytniczej
C	Przerzuty w okolicznych węzłach chłonnych
D	Przerzuty odległe

**Tabela 2.4 Klasyfikacja Dukesa według modyfikacji Astler-Collera.**

Stopień	Cechy
A	Rak ograniczony do błony śluzowej
B1	Naciek nie przekracza ściany mięśniowej
B2	Naciek przekracza ścianę mięśniową, obejmuje tkanki okołookrężnicze lub otrzewną
C1	Stopień B1 i zajęcie regionalnych węzłów chłonnych
C2	Stopień B2 i zajęcie regionalnych węzłów chłonnych
D	Obecne przerzuty odległe

### 1.3 Standardy diagnostyki i leczenia raka jelita grubego

Oczywistym jest, że podstawowym celem leczenia jest całkowite wyeliminowanie choroby nowotworowej. Obecnie nadal standardem diagnostycznym w rozpoznawaniu nowotworów jelita grubego stanowią metody endoskopowe (kolonoskopia, sigmoidoskopia lub rektoskopia) w połączeniu z metodami obrazowymi: ultrasonografia i tomografia komputerowa jamy brzusznej wraz z miednicą mniejszą. W celu dokonania oceny obecności przerzutów odległych wykonuje się tomografię komputerową klatki piersiowej lub rzadziej zdjęcie rentgenowskie klatki piersiowej.

Dokładnej oceny miejscowego zaawansowania raka odbytnicy dokonuje się poprzez wykonanie rezonansu magnetycznego (najlepiej z cewką doodbytniczą) oraz/lub ultrasonografię przezodbytniczą (*ang. Transrectal Ultrasound, TRUS*). Wykazano jednak, że czułość oceny naciekania TRUS wynosi jedynie około 69% (21). Co więcej, uważa się, że

mimo wykorzystania TRUS dokładna ocena stopnia naciekania jest możliwa jedynie w ośrodkach z dużym doświadczeniem. TRUS ma ograniczone zastosowanie w przypadku: dalekiego położenia guza od kanału odbytu, guza zamykającego światło odbytnicy oraz oceny naciekania mesorectum. Niestety, w Polsce jest bardzo niska dostępność tej techniki (22). Z uwagi na wymienione ograniczenia TRUS, metodą z wyboru w ocenie stopnia zaawansowania raka odbytnicy pozostaje rezonans magnetyczny.

W ocenie możliwości leczenia operacyjnego należy wziąć pod uwagę kilka podstawowych zasad:

a) dokładną ocenę stopnia zaawansowania miejscowego oraz ogólnego, z uważnym badaniem wątroby, całego jelita grubego, jak również dróg moczowych i rodnych (u kobiet);

b) stosowanie zasad chirurgii onkologicznej:

- stosowanie techniki ‘non touch’, wykorzystanie technik nietraumatyzujących, wykorzystanie diatermii, usunięcie całego fragmentu jelita wraz z odpowiednim zakresem: krezki jelita, węzłów chłonnych i naczyń krwionośnych;

- w przypadku raka odbytnicy wycięcie tak zwanej krezki odbytnicy (*ang. Total Mesorectal Excision, TME*);

- pierwotne podwiązanie naczyń;

- wykonanie resekcji ‘*en bloc*’ w przypadku raka naciekającego sąsiadujące narządy;

c) anatomiczne odtworzenie ciągłości przewodu pokarmowego za pomocą szwu ręcznego lub mechanicznego.

W zależności od lokalizacji guza wyróżnia się kilka typów operacji raka okrężnicy: wycięcie prawej połowy okrężnicy, wycięcie poprzecznicy, wycięcie lewej połowy okrężnicy, wycięcie esicy, subtotalną kolektomię oraz wyłonienie kolostomii.

W przypadkach raka okrężnicy w stopniu IIIA, IIIB lub IV (wg TNM) swoje zastosowanie znajduje chemioterapia adjuwantowa. Stosuje się schematy FOLFIRI – Fluorouracyl, Folinian wapniowy i Irynatekan (I linia), FOLFOX-4 – Oksaliplatyna, Folinian wapniowy i Fluorouracyl (II linia) z dodatkiem lub bez nowych leków (do których zaliczamy cefuksymab, bewacyzumab lub panitumumab).

Natomiast, ze względu na naturalny rozwój i przebieg raka odbytnicy, schemat diagnostyczny oraz leczniczy jest odmienny. Zabieg chirurgiczny jest podstawowym sposobem leczenia – szczególnie w niższych stadiach zaawansowania choroby (guza T1 i T2). Jednakże, aktualne rekomendacje wskazują, że wszyscy chorzy w II i III stopniu zaawansowania wg TNM powinni być poddani leczeniu neoadiuwantowemu. W leczeniu skojarzonym stosuje się radioterapię neoadiuwantową (tzw. krótką, czyli 5-dniową) lub chemioradioterapię (tzw. długą,

czyli 6-tygodniową). Wykazano, że powyższa terapia zmniejsza ryzyko wznowy miedniczej. Natomiast, w przypadku stwierdzenia obecności czynników złego rokowania w badaniu pooperacyjnym (naciekanie całej grubości ściany, przerzuty w lokalnych węzłach chłonnych, stopień zróżnicowania G3, zatory z komórek nowotworowych w drobnych naczyniach żylnych lub chłonnych, jedynie częściowa regresja guza po leczeniu przedoperacyjnym) stosuje się adiuwantową chemioterapię (schematy FOLFIRI i FOLFOX-4).

Wyróżnia się trzy podstawowe sposoby leczenia operacyjnego raka odbytnicy w Polsce:

- a) leczenie miejscowe: z dostępu przezodbytniczego (metodą klasyczną [Parksa] lub z zastosowaniem proktoskopu operacyjnego [TME]), zaodbytniczego (metoda Kraskego) i przezzwieraczowego [sposobem Yorksa-Masona]. Do wycięcia miejscowego kwalifikują się małe guzy (3-4 cm), o zachowanej ruchomości, dobrze zróżnicowane (G1-2), zlokalizowane do 10 cm od brzegu odbytu, obejmujące nie więcej niż 2/3 obwodu jelita z zachowanymi wydolnymi zwieraczami.
- b) przednią resekcję odbytnicy (*ang. Lower Anterior Resection, LAR*), w której wymagane są adekwatne usunięcie mesorectum (przynajmniej 4-5 cm poniżej dolnego brzegu guza) i zachowanie marginesu okrężnego (2 mm) oraz obwodowego (2 cm).
- c) brzuszno-kroczone (sposobem Milesa), czy brzuszno-krzyżowe odjęcie odbytnicy lub międzyzwieraczowa resekcja odbytnicy.

## 1.4 Teorie karcynogenezy

Istnieje wiele hipotez dotyczących procesu karcynogenezy. Pierwsze doniesienia, które próbowały dowodzić, że nowotwory mogą się rozwijać z nisz komórkowych o właściwościach komórek macierzystych zwanych nowotworowymi komórkami macierzystymi (*ang. Cancer Stem Cells, CSCs*). Komórki te zidentyfikowano w nowotworach układu krwionośnego około 20 lat temu, a ich istnienie zostało potwierdzone w prawie wszystkich głównych typach raka w oparciu o fenotyp i testy czynnościowe.

Obecnie w źródłach naukowych wymienia się trzy podstawowe teorie opisujące przebieg procesu kancerogenezy.

1. **Teoria stochastyczna**, według której wszystkie komórki nowotworowe są zasadniczo homogeniczne, przez co mają taki sam potencjał rozwojowy i wszystkie są zdolne do indukowania progresji choroby. Jednakże, doniesień naukowych dowodzi, że komórki nowotworowe charakteryzuje duża zmienność (heterogenność) pod wieloma względami. Heterogenność ta objawia się między innymi w morfologii czy fenotypie

komórek, ale także ich zdolności do proliferacji oraz, co niesie istotne implikacje kliniczne - odporności na terapię. Obecnie teoria ta ma jedynie charakter historyczny (23).

2. Według **teorii hierarchicznej**, nieliczna populacja komórek nowotworowych posiada potencjał do tworzenia guza i tylko one mogą odpowiadać za rozwój i w dalszej konsekwencji progresję nowotworu. Dodatkowo populacja ta daje możliwości tworzenia fenokopii guza, zarówno w trakcie procesu przerzutowania, jak i w czasie ksenotransplantacji ludzkich komórek nowotworowych np. do organizmów zwierząt laboratoryjnych. CSC potrafią więc stworzyć wszystkie rodzaje komórek dojrzałych, jakie można napotkać w danym rodzaju nowotworu. Istnieje więc hierarchiczne zróżnicowanie komórkowe, podobne do schematu rozwoju prawidłowych komórek macierzystych w warunkach fizjologicznych. Następuje przejście komórki macierzystej do progenitorowej, a dalej zróżnicowanie do dojrzałej komórki. Wydaje się, że same CSC rzadko ulegają podziałom, co najprawdopodobniej chroni DNA przed mutacjami 'de novo'. Za niewątpliwie niezwykłą zdolność nowotworu do występowania dużej liczby komórek potomnych odpowiadać muszą komórki aktywnie proliferujące (23).
3. **Teoria klonalnej ekspansji** zakłada, że nowotwory rozwijają się dzięki aktywnej proliferacji, doprowadzając do dominacji tzw. pierwotnej/pierwszorzędowej CSC w danej niszy (*ang. primary CSC*). W dalszej kolejności, prawdopodobnie jedna z klonalnych komórek nabywa nową mutację i wówczas ona uzyskuje dominację (tzw. drugorzędowa lub wtórna CSC — *ang. secondary CSC*). Następne zmiany, mogą doprowadzić CSC do opuszczenia zajmowanej niszy i wytworzenia przerzutów (tzw. przerzutująca CSC — *ang. metastatic CSC*). W każdej niszy takie klonalne ekspansje prawdopodobnie zachodzą niezależnie od siebie, a dowodem na to mogą być zmiany fenotypu komórek CSC raka jelita grubego, które po inwazji i stworzeniu przerzutów zmieniały swój fenotyp. Innym przykładem może być obserwowana selektywność oporność na stosowaną radio-, chemo- czy radiochemioterapię. Ostatecznie przeżywają te komórki, które wytworzyły najlepsze mechanizmy ochronne (24).

Należy podkreślić, że najprawdopodobniej w czasie całego rozwoju choroby nowotworowej mamy do czynienia ze współistnieniem obu mechanizmów opisywanych w teorii hierarchicznej i klonalnej. Możliwe jest założenie, że w wyniku klonalnej ekspansji dochodzi do selekcji komórek, które następnie są podstawą do tworzenia hierarchicznych komórek nowotworowych (25).

## 1.5 Komórki macierzyste i ich markery

Ludzkie pluripotencjalne komórki macierzyste (*ang. human Pluripotent Stem Cells*, hPSCs), zawierające ludzkie embrionalne komórki macierzyste (*ang. human Embryonic Stem Cells*, hESCs), które indukują pluripotencjalne somatyczne komórki macierzyste (*ang. induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs), posiadają dwie istotne właściwości: nieokreśloną samoodnowę komórkową oraz zdolność do tworzenia każdego typu komórek organizmu ludzkiego poprzez różnicowanie w jedno z trzech embrionalnych warstw zarodkowych. Te unikatowe właściwości hPSCs czynią z nich nieocenione źródło komórek nie tylko dla medycyny regeneracyjnej, wyjaśnienia podstawowych procesów powstawania chorób, opracowywania leków, ale także do badań nad rozwojem człowieka, służąc jako wyjaśnienia mechanizmów molekularnych regulujących proliferację i różnicowanie komórek embrionalnych (26, 27).

Wyjaśnienie mechanizmów, które leżą u podstawy samoodnawiania i nieograniczonej proliferacji hPSCs jest fundamentalnie ważne dla wykorzystania tych komórek w badaniach klinicznych. W ostatnim 10-leciu, dowody naukowe dowodzą, że determinacja losu pluripotencjalnych komórek macierzystych, a także podtrzymywanie właściwości pluripotencji oraz różnicowanie w jedną z trzech warstw zarodkowych, jest kontrolowana zarówno przez wewnętrzne i zewnętrzne czynniki (26). Wewnętrzne czynniki odnoszą się głównie do czynników transkrypcyjnych, które odgrywają istotną rolę w bezpośredniej kontroli ekspresji genów w komórkach, podczas gdy czynniki zewnętrzne, włączając czynniki wzrostu takie jak macierze zewnątrzkomórkowe i cytokiny, mają znaczny wpływ na poziomy ekspresji wewnętrznych czynników transkrypcyjnych poprzez różne szlaki sygnałowe. Rdzeniowe czynniki wewnętrzne regulujące pluripotencję zostały zidentyfikowane jako OCT4 (*ang. Octamer-binding transcription factor 4*), NANOG (*ang. Nanog homeobox*) oraz SOX2 (*ang. Sex Determining Region Y Box Containing Gene 2*), podczas gdy OCT4 i SOX2 są również przedstawiane jako regulujące różnicowanie mezodermy i endodermy. Zatem SOX2 jest jednym z kluczowych czynników kontrolujących zarówno pluripotencję, jak i różnicowanie hPSCs.

Jedną z przyczyn niepowodzeń leczenia chorych na nowotwory złośliwe jest istnienie CSCs. Stanowią one tylko około 2% masy guza, ale mają unikatowe właściwości, w tym zdolność do przetrwania w stanie utajenia (*ang. Dormant Cells, DC*). CSC są w większości przypadków odporne na standardowe leczenie onkologiczne (chemio- i radioterapię), przez co prowadzą do progresji raka, przerzutowania (zarówno lokalnego jak i odległego) i nawrotów



choroby nowotworowej. Mają one często swoiste biomarkery, na których podstawie identyfikuje się je oraz izoluje.

Jednakże, jak dotychczas łatwo dostępny i uniwersalny marker komórek macierzystych nie został opisany. Niektórzy autorzy podają różnice w ekspresji poszczególnych markerów ekspresji komórek macierzystych w zależności od typu histologicznego nowotworu. Potencjalnymi i zidentyfikowanymi markerami raka jelita grubego są: APC, czynnik transkrypcyjny p53 (*ang. Transcription Factor Protein 53*) i protoonkogen/białko K-Ras (*ang. Kirsten Rat Sarcoma Oncogene/Protein*) (28).

## **1.6 Wpływ genów pluripotencji na embriogenezę**

Podczas embriogenezy, totipotencjalna zygota ulega rozszczepieniu, a powstająca wielokomórkowa morula rozwija się dalej, tworząc blastocystę, w której komórki po raz pierwszy wydają się nabywać celowanych właściwości związanych z ich ułożeniem przestrzennym. Gromadzą się więc albo w węźle zarodkowym blastocyty (*ang. Inner Mass Cell, ICM*), albo w trofektodermie (*ang. Trophectoderm, TE*) czyli ścianie pęcherzyka zarodkowego. Komórki ICM prowadzącą do powstania właściwego zarodka. W dalszej kolejności ICM różnicuje się we wszystkie typy komórek znajdujące się w ciele człowieka, a zatem komórki ICM są klasyfikowane jako pluripotencjalne. Z drugiej strony, komórki TE rozwijają się w tkanki łożyska, pomagając w implantacji i odżywianiu zarodka podczas jego rozwoju (29).

Czynnikami transkrypcyjnymi odpowiedzialnymi za utrzymanie pluripotencji komórek ICM są m.in. OCT4, NANOG oraz SOX2. W stadium moruli (8-komórkowe) białka te są syntetyzowane we wszystkich blastomerach, ale po uformowaniu blastocysty ich synteza zostaje stopniowo wyciszana w komórkach zewnętrznych i ostatecznie ograniczona tylko do komórek ICM, a następnie epiblastu. Zarodki, w których inaktywowano oba allele każdego z tych genów, obumierają w okresie okołoinplantacyjnym. W przypadku braku genu OCT4 zarodki rozwijają się do stadium blastocysty, jednak powstający węzeł zarodkowy nie jest pluripotencjalny i jego komórki różnicują w TE. Z kolei w zarodkach pozbawionych funkcjonalnej kopii genu SOX2 ekspresja czynnika transkrypcyjnego OCT4 jest zahamowana i w zarodkach takich nie dochodzi do wytworzenia epiblastu, a powstają w nich jedynie komórki pierwotnej endodermy (29).

## 1.7 Molekularne szlaki sygnałowe regulujące ekspresję transkrypcyjnych czynników pluripotencji

Mechanizmy, za pomocą których rdzeniowe czynniki transkrypcyjne wpływają na nowotworowe przeprogramowanie komórek zdrowych, nie są nadal w pełni wyjaśnione. Uważa się, że następujące mechanizmy molekularne biorą udział w pluripotencjalnej transformacji nowotworowej złośliwej. Szlak Kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K, *ang. Phosphatidylinositol 3-Kinase*)/ Kinazy białkowej Serynowo-treoninowa (Akt, *ang. Protein Kinase B*)/ tzw. Kinazy Ssaczego Celu Rapamycyny (mTOR, *ang. Mammalian Target of Rapamycin Kinase*) jest złożoną kaskadą wewnątrzkomórkową, która reguluje wzrost komórek, różnicowanie, proliferację, ruchliwość, przeżycie i apoptozę (30). Kinaza białkowa AKT (inaczej zwana kinazą białkową B, *ang. protein kinase B*), jest centralnym węzłem w tym złożonej sieci szlaków sygnałowych (31). Kinaza białkowa AKT aktywuje dwa kompleksy wielobiałkowe: tzw. ssaczy cel rapamycyny 1 i 2 (mTORC1 i mTORC2). Kompleks mTORC1 jest uważany za bezpośredni cel białka Akt, podczas gdy mTORC2 powoduje zwiększenie produkcji białka Akt (32, 33). Uważa się, że aktywacja szlaku PI3K/Akt jest jednym z najważniejszych sygnałów w przemianie epithelialno-mezenchymalnej (*ang. Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT*), która jest uważana za kluczowy etap w procesie powstawania przerzutów nowotworowych (34). PI3K/Akt/mTOR to drugi najczęściej wymieniany szlak sygnałowy w procesach onkogenezy ludzkich nowotworów. Rozregulowanie PI3K obserwuje się u prawie 30% przypadków nowotworów u ludzi, co czyni tę kaskadę sygnalizacyjną ważnym celem terapeutycznym (35). Nadekspresja p-Akt i obniżona ekspresja PTEN (*ang. Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten*) - negatywnego regulatora Akt, są obserwowane u 70% pacjentów z CRC (36). Zmiany składowych szlaków sygnałowych związanych z Akt są szeroko opisane w literaturze jako zaangażowane w ludzką kancerogenezę m.in. płuc, piersi, okrężnicy i innych nowotworów złośliwych (37, 38).

Niedawno wykazano m.in., że niektóre związki biologiczne (np. cryptotanshinone) znajdujące się np. w szałwii mogą hamować wzrost i inwazję CRC poprzez system inhibicji metaloproteinaz (*ang. Matrix Metaloproteinases/Tissue Inhibitors of MMPs - MMP/TIMP*) oraz szlak sygnałowy PI3K/Akt/mTOR (39). Wykazano również, że OCT4 zwiększa aktywność kinazy Akt1 poprzez kontrolę transkrypcyjną białka/genu Tc11 (*ang. T-Cell Leukemia/Lymphoma1 gen/protein*). Ostatnie badania udowodniły, że szlak EGFR/PI3K/Akt reguluje ekspresję czynnika transkrypcyjnego SOX2 w ludzkich nowotworach (40).

Szlak sygnałowy kinaz aktywowanych mitogenami (K-Ras/BRAF/MEK/ERK lub MAPK, *ang. Mitogen Activated Protein Kinase*) i PI3K/Akt, a także szlaki: transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- $\beta$ , *ang. Transforming growth factor beta*) i WNT (*ang. Wg-Wingless, Int – MMTV integration site*) / $\beta$ -kateniny odgrywają ważną rolę w rozwoju CRC. Wszystkie prowadzą do rozwoju mutacji zwiększających, w sposób nieuregulowany i promujących nowotworzenie. Ponadto, posiadają kilka ważnych połączeń z siecią pluripotencji (41).

Shan i wsp. wykazali zwiększoną ekspresję insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF, *ang. Insulin-like Growth Factor*) i receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF1R, *ang. Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*) w CSC, których ekspresja NANOG była pozytywna (42). Wykazano również, że szlak sygnałowy IGF1R przyczynia się do przeprogramowania komórkowego za pośrednictwem NANOG i utrzymania zdolności samoodnawiania CSC (42, 43).

Sygnalizacja Wnt odgrywa różne, często rozbieżne role biologiczne, takie jak regulacja homeostazy komórkowej i utrzymanie samoodnowy komórkowej przez cały okres embriogenezy jak i po ostatecznym ich zróżnicowaniu. Szlak ten szczególnie promuje proliferację nabłonka jelitowego oraz różnicowanie krypt jelitowych (44). Jak dotychczas, najlepiej odkryto rolę białek szlaku Wnt w powstawaniu i rozwoju chorób nowotworowych (45). Co ważne, w kontekście raka jelita grubego większość mutacji w genie APC uniemożliwia wiązanie białka APC z aksyną czy  $\beta$ -kateniną (46). Ponadto, w wielu przypadkach rodzinnej polipowatości jelita grubego oraz innych nowotworach (m.in. jelita, jajnika, endometrium, trzustki, prostaty, żołądka czy też głowy i szyi) wykazano również mutacje w genie kodującym  $\beta$ -kateninę (46, 47). Powyższe interakcje aktywują z kolei transkrypcję genów odpowiedzialnych za proliferację oraz hamują ekspresję genów proapoptotycznych w komórkach nowotworowych przyczyniając się do często progresji choroby (48). Polscy autorzy wykazali, że aktywność szlaku Wnt wywiera pozytywny wpływ na ekspresję genów pluripotencji w rozwijających się zarodkach bydłowych, objawiająca się wzrostem ekspresji OCT4, NANOG, SOX2, c-MYC, KLF4 i REX1 (*ang. Zinc Finger Protein 42, ZFP42*) w ICM i zmniejszeniem ekspresji CDX2 (*ang. Caudal-Type Homeobox Protein 2*) w TE (49). Aktywacja  $\beta$ -kateniny przez mutacje jej inhibitora APC jest jedną z najczęstszych zmian molekularnych w raku jelita grubego, powodując aktywację transkrypcji przez czynnik transkrypcyjny 4 (TCF4, *ang. Transcription Factor 4* lub inaczej ITF2, *ang. Immunoglobulin Transcription Factor 2*), która wiąże promotory we współpracy z  $\beta$ -kateniną (50). OCT4 jest

zaliczany do ostatecznych genów transkrypcji TCF4/ $\beta$ -kateniny, a następnie wraz z  $\beta$ -kateniną uczestniczy w transkrypcję dodatkowych promotorów (51). Kolejnym celem transkrypcji TCF4/ $\beta$ -kateniny jest protoonkogen c-MYC (ang. *MYCL proto-oncogene*), będący ważnym onkogenem, powodującym w dodatku wzrost aktywności OCT4 i SOX2 (52). Parenti i wsp., opisali w swej pracy, że KLF-4 wchodzi w interakcje z  $\beta$ -kateniną i działa hamująco poprzez szlak sygnałowy WNT (53).

## **1.8. Opis badanych czynników transkrypcyjnych, mechanizmów działania i roli u człowieka i zwierząt**

### **1.8.1. Czynniki transkrypcyjny SOX2 (rodzina genów SOX)**

SOX2 jest jednym z czynników transkrypcyjnych należącym do rodziny SOX (ang. *Sex-determining Region Y (SRY)-Box Protein*). Rodzina ta została po raz pierwszy zdefiniowana poprzez odkrycie czynnika determinującego rozwój jąder u ssaków. Wszystkie białka z rodziny SOX mają wspólną konserwatywną domenę o wysokiej mobilności wiążącą DNA (ang. *high-mobility-domain*, HMG). Do tej pory zostało zidentyfikowanych 20 różnych genów SOX u myszy i ludzi, które są dalej podzielone na podgrupy. Podgrupy te zostały stworzone ze względu na stopień homologii w obrębie domeny HMG (oraz inne dane strukturalne). SOX2 jest sklasyfikowany jako członek grupy SOXB1, która obejmuje również SOX1 i SOX3. Chociaż SOX1, SOX2 i SOX3 mają więcej niż 80% podobieństwa w sekwencji genów i wydają się być funkcjonalnie zbędne, SOX2 posiada różne funkcje w sposób zależny aktywowane od kontekstu biologicznego i jest niezbędny do rozwoju embrionalnego (54, 55).

Jak dotychczas wykazano, że wiele czynników wpływa na wiązanie białek SOX z ich genami docelowymi, co doprowadza do różnych efektów funkcjonalnych. Jednym z takich czynników jest interakcja między białkami SOX, a różnymi kofaktorami. Interakcja z różnymi kofaktorami nadaje SOX2 większą wszechstronność funkcjonalną podczas procesów rozwojowych (56).

Ekspresja SOX2 pierwotnie została wykryta w stadium moruli. Z czasem bardziej specyficjnie ustalono aktywność tego genu w komórkach ICM blastocysty oraz w dalszej kolejności tworzącego się epiblastu (ang. *epiblast*, EPI). Rzeczywiście, delecja genu SOX2 jest śmiertelna dla zarodka z powodu braku powstawania pluripotencjalnych komórek trofoblastu i epiblastu, podczas gdy brak SOX2 ma niewielki wpływ na tworzenie komórek TE. Dlatego

właśnie SOX2 jest tak krytycznym i istotnym czynnikiem w tworzeniu komórek pluripotencjalnych na wczesnych etapach rozwoju zarodka (55).

W licznych pracach naukowych wykazano, że SOX2 ma ważny wpływ na wiele procesów zachodzących w komórkach nowotworowych, takich jak: tumorogeneza, proliferacja oraz wzrost CSC, inwazyjność, apoptoza, odporność na chemioterapię, a także możliwość przerzutowania. Bierze udział także w podtrzymywaniu pluripotencji i migracji CSC (57, 58, 59, 60).

### **1.8.2. Homeotyczny czynnik transkrypcyjny NANOG**

Gen homeotyczny z grupy czynników transkrypcyjnych o nazwie NANOG (od celtyckiej, mitologicznej nazwy, wiecznie młodej krainy - "*Tir Na Nog*") jest jednym z 3 najważniejszych czynników transkrypcyjnych niezbędnych do utrzymania pluripotencji epiblastu i zapobiegania różnicowaniu (61). NANOG został odkryty w mysich zarodkowych komórkach macierzystych (62, 63). Ostatecznie, udało się odkryć umiejscowienie genów NANOG w ludzkim genomie. Ludzkie białko będące produktem NANOG zawiera 305 aminokwasów i jest zasadniczo podzielone na 3 domeny: koniec N, kasety homeo (*ang. Homeobox*) oraz koniec C (64). U ludzi jedynie koniec C wykazuje aktywność transkrypcyjną (u myszy z kolei koniec C i N jest aktywny transkrypcyjnie) (65). Koniec C z kolei podzielony jest przez operony tryptofanowe na dwa regiony – CD1 oraz CD2. Operony tryptofanowe są kluczowe do dimeryzacji NANOG co z kolei wydaje się kluczowe w utrzymaniu pluripotencji przez NANOG (66, 67). Grupa genów NANOG1 ma swoje *loci* na chromosomie 12. Z kolei pseudogen NANOGP8 można znaleźć w obrębie chromosomu 15 i jest on jedynym pseudogenem z otwartą ramką odczytu (68, 69, 70). Spośród 11 znanych pseudogenów NANOG, NANOGP8 odgrywa dominującą rolę w rozwoju CSC (71). Białko NANOG zostało pierwszy raz odkryte w embrionalnych komórkach macierzystych (*ang. Embryonic Stem Cells, ESCs*) i od razu przypisano mu niezwykle ważne funkcje związane z regulacją samoodnowy komórek i ich pluripotencją.

Wraz z SOX2 oraz OCT4, NANOG odgrywa zdecydowanie kluczową rolę w utrzymaniu odpowiednich właściwości ESC. Te trzy kluczowe czynniki działają razem poprzez tworzenie specyficznych sieci transkrypcyjnych i poprzez to kontrolują ekspresję całego zestawu genów związanych z pluripotencją. NANOG ulega silnej ekspresji w komórkach pluripotencjalnych, takich jak ESC, embrionalne komórki zarodkowe (*ang. Embryonal Germ*

*Cells* - EG) oraz embrionalne komórki nowotworowe (*ang. Embryonal Carcinoma Cells*, EC), a ekspresja ta ulega zmniejszeniu wraz z kolejnymi etapami różnicowania.

Liu i wsp. udowodnili, że ekspresja NANOG jest aktywowana poprzez szlak molekularny Smad1/Akt/GSK3 $\beta$  (*ang. Glycogen Synthase Kinase-3*) (72). Jednak inne prace sugerują, że sygnalizacja poprzez szlak IGF1R może być kluczowa w utrzymaniu samoodnowy CSC związanej z czynnikiem transkrypcyjnym NANOG (43). Z drugiej strony wcześniejsze badania pokazały, że NANOG pochodzi głównie z NANOGP8 w tkankach komórek nowotworowych (73).

Chociaż, ekspresja NANOG jest wyciszona w prawidłowych komórkach somatycznych, odnotowano ekspresję tego białka w wielu typach ludzkich nowotworów, w tym: w rakach mózgu, piersi, szyjki macicy, jelita grubego, żołądka, głowy i szyi, wątroby, płuc, nerek, jamy ustnej, jajnika, trzustki, prostaty i innych narządów (42, 71, 74, 75, 76, 77, 78, 79). Co ważniejsze, poziom ekspresji NANOG jest często skorelowany z opornością na leczenie i gorszym czasem życia pacjentów z rakiem. Różne badania wykazały, że silniejsza ekspresja NANOG zwiększa karcynogenezę zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, podczas gdy represja NANOG hamuje inicjację guza. Zatem ekspresja NANOG jest związana z progresją guza, opornością terapeutyczną, większą częstością nawrotów i przerzutowania (80, 81, 82).

### **1.8.3. Czynniki transkrypcyjne KLF4**

KLF4 (*ang. Krüppel-Like Factor-4* lub GKL4) to czynnik transkrypcyjny z trzema domenami cynkowo-karboksyłowymi (Zn-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), które wykazują homologię z genami segmentacyjnymi *Drosophila melanogaster* (83). Czynniki te zostały po raz pierwszy opisane w 1996 i od tego czasu powstało wiele raportów na temat jego funkcji oraz występowania w poszczególnych tkankach. W tej chwili, w rodzinie KLF (w obrębie ludzkiej populacji) zidentyfikowano co najmniej 25 jej członków. Czynniki KLF4 przez wiązanie do promotora bogatego w GC lub CACCC i koaktywatora p300/CBP, może regulować ekspresję genów, które mają kluczowe znaczenie w procesach komórkowych, w tym w proliferacji i różnicowaniu komórek oraz programowaniu komórek macierzystych. KLF4 posiada specjalne miejsce wiązania o wysokim powinowactwie, nazwane podstawowym transkrypcyjnym elementem (*ang. Basic Transcription Element*, BTE) (84). Ekspresja KLF4 wydaje się być głównie wzmożona w postreplikatywnych komórkach nabłonkowych jelita, skóry i grasicy (83). KLF-4 okazał się konieczny dla końcowego różnicowania keratynocytów w skórze i komórek kubkowych jelit (*ang. Goblet Cells*) (85, 86). W grasicy KLF-4 ulega ekspresji

podczas różnicowania korowych komórek nabłonkowych, co sugeruje rolę w tworzenia limfocytów T (87).

Wysoka ekspresja KLF-4 została wykazana również w jądrach, szczególnie w komórkach zarodkowych i komórkach somatycznych Sertoliego, co sugeruje ważną rolę w rozwoju jąder (88). Wreszcie, KLF4 ulega ekspresji w komórkach śródbłonka naczyń (89) i może hamować TGF $\beta$  zależne różnicowanie komórek mięśni gładkich w naczyniach krwionośnych (90). W zależności od typu komórki, ekspresja KLF4 jest związana z hamowaniem i indukcją proliferacji. Wymuszona ekspresja KLF4 poprzez transfekcję w tej samej linii komórkowej hamuje syntezę DNA. W mysich fibroblastach zarodkowych KLF4 oddziałuje z p53 (działającym supresyjnie na rozwój guzów) i indukuje inhibitor kinazy zależnej od cykliny p21 (91). Natomiast, ekspresja KLF4 jest zmniejszona w nisko zaawansowanych gruczolakach jelita cienkiego, gruczolakach okrężnicy oraz gruczolakorakach okrężnicy u myszy. Także takie zjawisko obserwuje się u pacjentów z dziedzicznymi i sporadycznie powstającymi nowotworami, co sugeruje, że zmniejszona ekspresja KLF4 może przyczyniać się do zwiększonego powstawania nowotworu (92, 93). Jednakże, inne badania wykazały, że u ludzi nadekspresja KLF4 może redukować nowotworzenie w jelicie grubym oraz żołądka (obniżona ekspresja z kolei może mieć wpływ na rozwój stanów przedrakowych w żołądka). Wielu autorów, jak dotychczas opisało złożone działanie KLF4 na szlak sygnałowy WNT/ $\beta$ -katenina, co ma bezpośredni wpływ na rozwój komórek nowotworowych (53). Badania te są jednak cały czas w fazie wstępnej i w wielu z nich wskazują się wciąż niejasne drogi działania i wpływów na karcynogenezę. Podsumowując, dokładne mechanizmy odpowiedzialne za rolę KLF4 w proliferacji i różnicowaniu komórek nie zostały jeszcze dokładnie określone.

#### 1.8.4. Domena genów transkrypcyjnych POU - czynnik transkrypcyjny OCT-4

Czynnik transkrypcyjny wiążący Oktamer 3/4 (ang. *Octamer Core Transcription 3/4*, OCT3/4) należy do rodziny czynników transkrypcyjnych POU (skrót od „*Pit-Oct-Unc*”). Jest niezbędny do utrzymania stanu pluripotencji w embrionalnych komórkach macierzystych. In vivo, OCT3/4 występuje w wewnętrznej warstwie komórek blastocysty. Wiadomo, że poziom ekspresji OCT3/4 spada wraz ze stopniem zaawansowania różnicowania komórek somatycznych i OCT3/4 nie występuje w dojrzałych komórkach somatycznych (94). Wykazano, że w nowotworach OCT4 hamuje proces apoptozy poprzez specyficzny szlak OCT4/Tcl1 (ang. *T-Cell Leukemia/Lymphoma1*) /Akt1. OCT4 zwiększa aktywność kinazy Akt1 poprzez kontrolę transkrypcyjną Tcl1. Wreszcie Akt1 wspomaga proliferację komórek i hamuje apoptozę komórek nowotworowych (95, 96).

Saigusa i wsp. wykazali, że OCT4 sprzyjał powstawaniu CSC u pacjentów z CRC zarówno w sposób autokryny, jak i parakryny (97).

Gazuoli i wsp. wykazali, że szczególnie izoforma OCT4 o nazwie OCT4B1 jest markerem CSC i możliwym predykatorem u pacjentów z CRC (98).

Wykazano, że SOX2 i OCT4 działają w kooperacji, aby wspólnie regulować ekspresję genów specyficznych dla utrzymania pluripotencji komórek macierzystych i niezbędnych w procesach samoodnowy (99).

Po analizie piśmiennictwa przyjęto następujące hipotezy badawcze:

- aktywacja ekspresji kluczowych czynników odpowiedzialnych za utrzymanie pluripotencji: OCT4, SOX2, KLF4 i NANOG może stać się nowym, czułym markerem w diagnostyce i leczeniu wczesnych, bezobjawowych stadiów raka jelita grubego;
- stopień ekspresji czynników odpowiedzialnych za pluripotencję: OCT4, SOX2, KLF4 i NANOG wykazuje istotny związek ze stadium zaawansowania raka jelita grubego;
- powtarzalne oznaczanie poziomu ekspresji czynników pluripotencji może stać się wskaźnikiem odpowiedzi na stosowane leczenie u chorych z rakiem jelita grubego.



## **2. CELE PRACY**

1. Próba wytypowania nowych, potencjalnych markerów powstawania i rozwoju raka jelita grubego.
2. Ocena ekspresji jakościowej OCT4, SOX2, KLF4 i NANOG w raku jelita grubego.
3. Wykazanie zależności między ekspresją oraz koekspresją genów pluripotencji, a parametrami klinicznymi, danymi demograficznymi, klasyfikacjami zaawansowania choroby nowotworowej oraz cechami histopatologicznymi.

### **3. MATERIAŁY I METODY**

#### **3.1 Grupa badana**

Grupę badaną stanowiło 150 kolejnych pacjentów (leczonych w Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Onkologii Gastroenterologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu) z rozpoznaniem pierwotnym gruczolakorakiem jelita grubego (lub innym nowotworem złośliwym pierwotnie wywodzącym się z jelita grubego), zdiagnozowanych i ocenianych na podstawie obrazu klinicznego, badań obrazowych, laboratoryjnych oraz histopatologicznych. Wszyscy pacjenci, włączeni do badania, zostali poddani zabiegowi leczniczemu – radykalnemu lub paliatywnemu, w czasie którego został pobrany materiał histopatologiczny z guzowatej zmiany nowotworowej, umiejscowionej w obrębie jelita grubego. Do badania włączono również pacjentów, którzy przeszli przed- lub pooperacyjną radioterapię, chemioterapię lub radiochemioterapię.

Podstawowym kryterium włączenia był wiek powyżej 18 roku życia, rozpoznanie przed-, śród- lub pooperacyjne gruczolakoraka jelita grubego oraz konieczność leczenia operacyjnego z możliwością pobrania próbek do badania klinicznego. Kryterium wyłączenia stanowił wiek poniżej 18 r. ż. oraz obecność innych chorób jelit, tj. nieswoistego zapalenia jelit (aktywnego bądź w fazie remisji), nowotworów łagodnych jelita grubego (potwierdzonych), innych pierwotnych nowotworów z poza jelita grubego (potwierdzonych), nowotworów o charakterze wtórnym jelita grubego, FAP i innych genetycznie uwarunkowanych zespołów zwiększających ryzyko zapadalności na raka jelita grubego [Tabela 3.1.1].

W czasie hospitalizacji oceniono podstawowe dane demograficzne i kliniczne, także inne wskaźniki, takie jak: obecność przewlekłych chorób współistniejących, palenie tytoniu (i innych wyrobów tytoniowych) oraz szkodliwe spożywanie alkoholu. Precyzyjnie wykonano badanie histopatologiczne ze wszystkimi jego elementami. Szczególnie przeanalizowano wielkość guza, stopień zaawansowania w skali Duke'a oraz skali Duke'a w modyfikacji Astlera-Collera, stopień zróżnicowania guza (G), obecność przerzutów do węzłów chłonnych czy do innych narządów i inne charakterystyczne cechy. Każdego pacjenta oceniono według klasyfikacji TNM wg AJCC (Edycja 8) i na jej podstawie podzielono uczestników badania na odpowiednie grupy kliniczne (ze względu na odpowiednie stadium zaawansowania choroby nowotworowej).

Do dalszych analiz statystycznych podzielono całą grupę badaną względem

prawostronnej bądź lewostronnej lokalizacji nowotworu. Do tzw. „prawostronnych” lokalizacji należały (Grupa P): guzy kątnicy, wstępnicy oraz poprzeczniczy a do tzw. „lewostronnych” (Grupa L): guzy zstępnicy, esicy, zagięcia esiczo-odbytniczego oraz odbytnicy.

Następnym etapem był czysto teoretyczny i arbitralny podział ze względu na wiek. Ustalono ogólnie trzy następujące kategorie wiekowe: do 59 lat, od 60 do 74 lat oraz powyżej 74 roku życia (średni wiek w całej grupie badanej wyniósł aż ponad 67 lat).

Pacjentów podzielono także, na 3 grupy względem BMI: I grupa BMI poniżej 25 kg/m<sup>2</sup>, II grupa BMI pomiędzy 25 a 30 kg/m<sup>2</sup> i III grupa z BMI powyżej 30 kg/m<sup>2</sup>.

**Tabela 3.1.1. Kryteria włączenia i wyłączenia pacjenta do badania klinicznego.**

Kryteria włączenia	Kryteria wyłączenia
Rozpoznany pierwotny rak jelita grubego	Inne łagodne nowotwory jelita grubego lub inne pierwotne nowotwory, przerzutowe guzy jelita grubego
Leczenie operacyjne (radykalne lub paliatywne)	Współistnienie nieswoistych zapalnych chorób jelit
Możliwość pobrania 2 próbek z guza oraz 1 próbki tkanki zdrowej pooperacyjnie	Zespół polipowatości rodzinnej (FAP) i inne genetycznie uwarunkowane zespoły zwiększające ryzyko raka jelita grubego
Świadoma zgoda włączenia do badania klinicznego	Brak zgody na włączenie do badania klinicznego
Wiek $\geq$ 18 r.ż.	Wiek $<$ 18 r.ż.

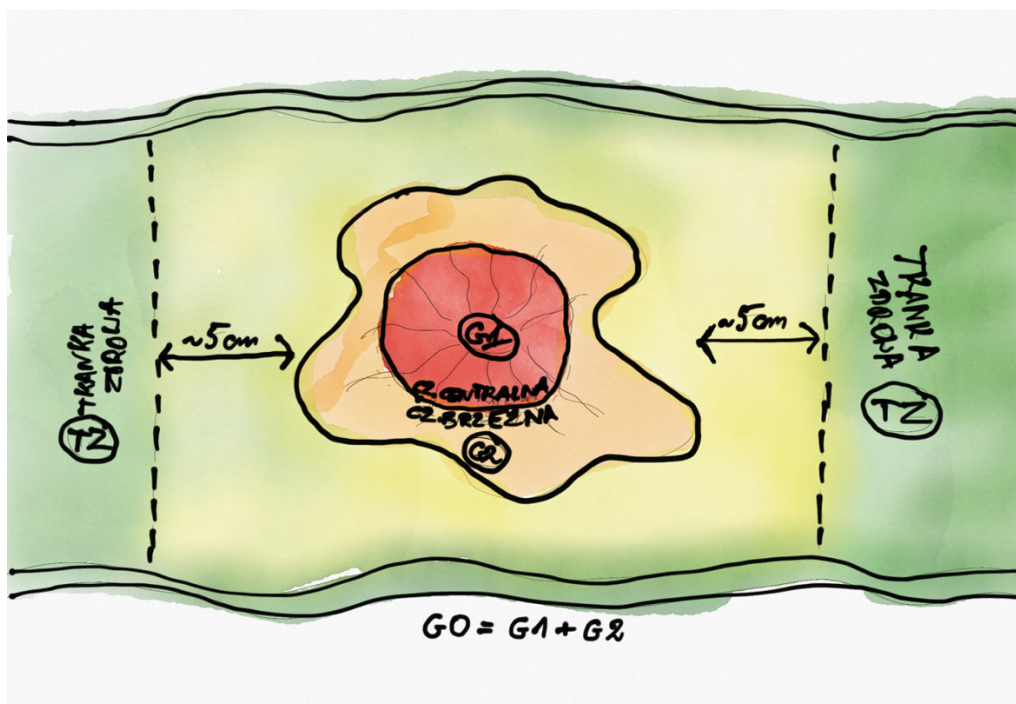
### 3.2 Materiał do badań molekularnych

Bezpośrednio po zabiegu od każdego pacjenta pobrano kilkakrotnie materiał biopsyjny tkanki nowotworowej – dwie próbki z samego guza (jedna próbka z obrzeża guza [Grupa G2], druga z części centralnej [Grupa G1]) oraz jedna próbka z teoretycznie zdrowej tkanki jelita grubego [Grupa TZ] – jako próbka kontrolna. Arbitralnie ustalono, że tkankę zdrową pobierano minimum 5 cm od makroskopowej granicy guza. Schematyczny sposób pobrania pokazuje rycina przedstawiona poniżej [Rycina 3.2.1]. Wszystkie próbki niezwłocznie po pobraniu zostały zabezpieczone w probówkach typu Eppendorf (jałowych, wolnych od RNAzy) poprzez

zalanie płynem RNALater (firma Alliance Bio, Bothell, USA) oraz zamrożone w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania analiz. Następnie tkanki były niezwłocznie przekazywane do dalszych badań w Katedrze i Zakładzie Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Pozostałą część materiału, zgodnie z procedurą obowiązującą w Szpitalu Klinicznym im. Heliodora Świąteczkiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, oddano do badania histopatologicznego w Zakładzie Patomorfologii Klinicznej Katedry Patomorfologii i Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Całość materiału była analizowana na podstawie wyników badań histopatologicznych.

Proces uzyskania materiału do badań nie niósł dodatkowego ryzyka zdrowotnego dla pacjentów, gdyż stanowił element niezbędnej diagnostyki i leczenia raka jelita grubego. Przed rozpoczęciem analiz uzyskano zgodę komisji bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o numerze 543/15. Przed zabiegiem operacyjnym każdy pacjent otrzymał formularz, w którym wyraził zgodę na uczestnictwo w badaniach molekularnych oraz zgodę na udział w badaniu klinicznym. We wszystkich badaniach i analizach wykorzystano aparaturę udostępnioną przez Zakład Immunologii Katedry Patomorfologii i Immunologii Klinicznej.



Rycina 3.2.1. Schematyczny sposób pobrania tkanek z guza oraz tkanki zdrowej (próby kontrolnej).

### 3.3 Ocena ekspresji genów w badanych próbkach tkankowych

Ekstrakcję RNA wykonano przy użyciu zestawów do izolacji całkowitego RNA – Total RNA Mini (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Każdy zestaw zawierał: roztwór płuczący A1, fenzol, izopropanolol, mikrokolumny do oczyszczania RNA, probówki 2 ml, probówki 1,5 ml typu Eppendorf (jałowe, wolne od RNAzy) oraz jałową wodę wolną od nukleaz, traktowaną pirowęglenem dietylu (DEPC). Przed rozpoczęciem pracy powierzchnię roboczą oczyszczano preparatem LabZAP (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Tkanki poddawane analizie rozmrażano, a następnie poddawano dezintegracji przy użyciu nożyczek chirurgicznych na szalce Petriego w środowisku roztworu soli fizjologicznej o stężeniu 0,9%. Rozdrobniony materiał przenoszono do probówek typu Eppendorf 1,5ml. Do próbek dodawano 800  $\mu$ l fenzolu i mieszano aż do całkowitej lizy komórek. W dalszej kolejności przeprowadzano inkubację w temperaturze 50°C przez 5 minut (inkubator Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Niemcy; Rycina 3.3.1). Po tym czasie do lizatów dodawano 200  $\mu$ l chloroformu i mieszano. Po 2 min inkubacji w temperaturze pokojowej próbki wirowano przez 10 min z prędkością 12000 obr./min (wirówka miniSpin, Eppendorf, Hamburg Niemcy; – Rycina 3.3.2). Następnie pobierano po 450  $\mu$ l supernatantów, które przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf (1,5ml) zawierających 450  $\mu$ l izopropanololu. Całość dokładnie mieszano i наносzono na minikolumny do oczyszczania RNA. Minikolumny z roztworem zawierającym RNA wirowano przez 1 min z prędkością 12000 obr./min, a następnie przenoszono do czystych 2 ml probówek. Do minikolumn dodawano 700  $\mu$ l roztworu płuczającego A1 i ponownie wirowano przez 1 min z prędkością 12000 obr./min. Przesącze usuwano i ponownie dodawano 700  $\mu$ l roztworu płuczającego A1. Całość wirowano 1 minutę przy 12000 obr./min. Przesącze usuwano i do minikolumn dodawano 200  $\mu$ l roztworu płuczającego A1. Próbkę wirowano 2 min przy 12000 obr./min, a następnie umieszczono w nowych jałowych, wolnych od RNAzy probówkach (1,5ml). Ostatecznie do minikolumn dodawano 100  $\mu$ l wody jałowej, całość inkubowano przez 3 min w temperaturze pokojowej i wirowano 1 min przy 12000 obr./min. Uzyskane przesącza zawierały oczyszczone RNA, gotowe do dalszych analiz. Czystość i stężenie uzyskanego RNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) przy długości fali  $\lambda=260$  i 280nm (Ryciny 3.3.3 i 3.3.4). Stosunek pomiędzy wartością absorbancji odczytaną przy długości fali 260 do wartości odczytanej przy długości fali 280 mieszczący się w zakresie 1,8-2,0 uznano, za wskaźnik braku domieszki białek w wyizolowanym RNA.



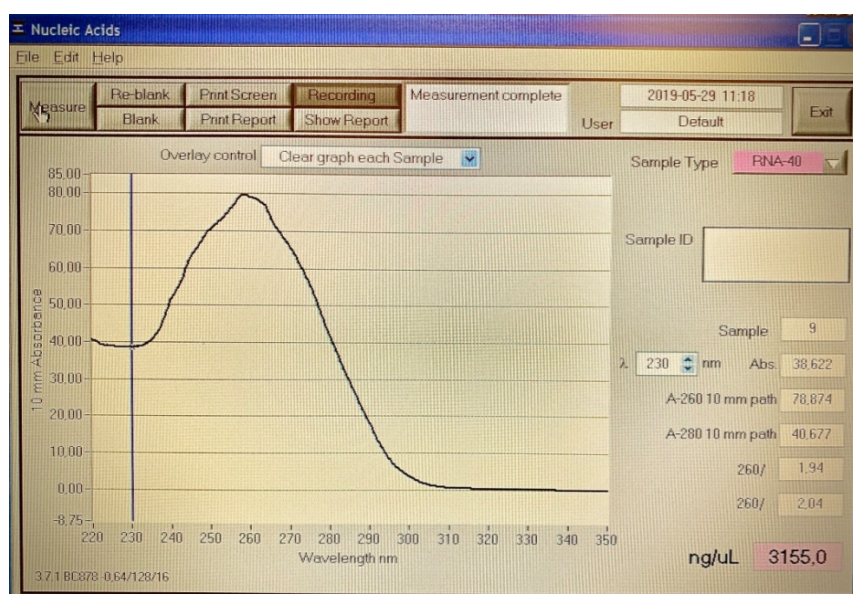
Rycina 3.3.1. Thermomixer comfort (Eppendorf)



Rycina 3.3.2. Wirówka MiniSpin (Eppendorf)



Rycina 3.3.3. Spektrofotometr ND-1000 (Thermo Fisher Scientific)



Rycina 3.3.4. Histogram przykładowego pomiaru stężenia wyizolowanego RNA (spektrofotometr ND-1000)

### 3.4. „One-step” RT-PCR

Reakcja typu „One-step” RT-PCR (*ang. „One-step” Reverse Transcription PCR*) jest jednoetapową reakcją odwrotnej transkrypcji (RT) z bezpośrednio następującą po niej łańcuchową reakcją polimerazy (PCR). Uzyskane próbki RNA zostały przepisane na komplementarne DNA (*ang. complementary DNA, cDNA*), a następnie amplifikowane z wykorzystaniem zestawu One Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy). Procedurę wykonano zgodnie z instrukcją producenta. Reakcje przeprowadzono przy użyciu aparatu Authorized Thermal Cycler AG 2331 (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)

Pierwszym krokiem było wykonanie powyższej reakcji dla wszystkich badanych próbek, z wykorzystaniem starterów dla genu referencyjnego typu „housekeeping”, gen dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH*). Geny „housekeeping”, czyli geny metabolizmu podstawowego, charakteryzują się stałym poziomem ekspresji w komórkach. Ich ekspresja świadczy o dobrej jakości prawidłowo wyizolowanego RNA. W następnych etapach próbkach oceniano pod względem ekspresji genów związanych z pluripotencją komórek macierzystych: SOX2, OCT4, KLF4 i NANOG. Startery dla genów związanych z macierzystością zaprojektowano za pomocą oprogramowania Primer3 (Biology Workbench wersja 3.2, San Diego Supercomputer Center, University of California, San Diego) [Tabela 3.4.1].

**Tabela 3.4.1. Użyte sekwencje starterów genów pluripotencji i ich produkt.**

Gen	Sekwencja startera (5'-3')	Sekwencja startera (3'-5')	Produkt (pary zasad - bp)
KLF4	5'-ACATTAATGAGGCAGCCACC-3'	5'-TTCTGGCAGTGTGGGTCATA-3'	143/88
OCT4	5'-CTGGAGAAGGAGAAGCTGGA-3'	5'-CAAATTGCTCGAGTTCTTTCTG-3'	114
SOX2	5'-CAAGATGCACAACCTCGGAGA-3'	5'-GCTTAGCCTCGTCGATGAAC-3'	75
NANOG	5'-AACATGAGTGTGGATCCAG-3'	5'-TCACTCATCTTCACACGTCTTCAGGTTG-3'	445/343

Reakcje RT-PCR przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej w końcowej objętości 25 µl składającej się z 1 µl RNA, 400 nM każdego startera dla odpowiednich genów, mieszaniny polimeraz i odwrotnej transkryptazy, dNTP i buforu reakcyjnego. Reakcje przeprowadzono w następujących warunkach temperatury i czasu: 50°C przez 2 min i 95°C przez 10 min, a następnie wstępna denaturacja w 95°C przez 5 min, po której następowało 40 cykli obejmujących denaturację w temperaturze 95°C przez 15 sekund, przyłączanie starterów



(annealing) w temperaturze 60°C przez 1 minutę i wydłużanie łańcucha nukleotydów przez polimerazę (elongacja) w temperaturze 72°C przez 1 minutę. Ostateczna elongacja następowała w temperaturze 72°C przez 10 minut. Reakcje przeprowadzono za pomocą analizatora PCR firmy Eppendorf (Hamburg, Niemcy) [Rycina 3.4.1].

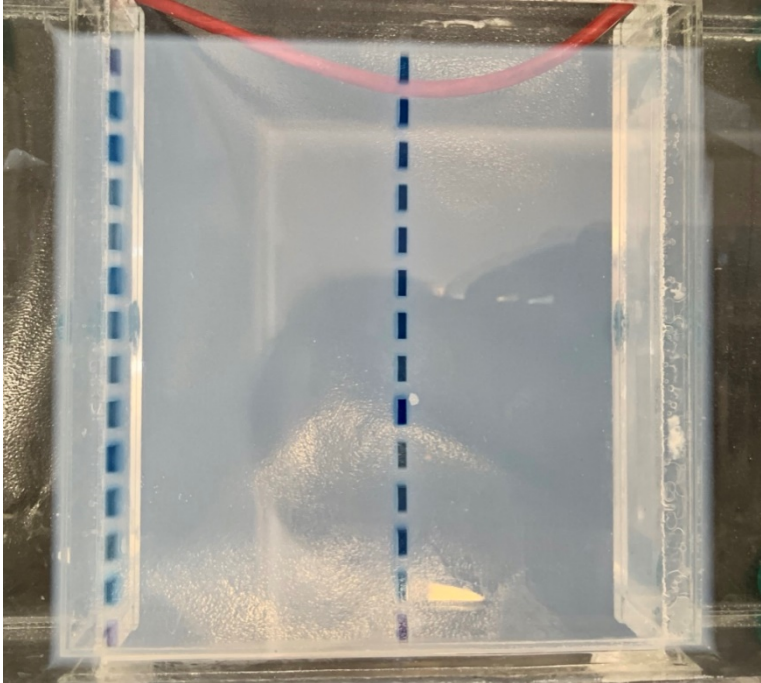


**Rycina 3.4.1. Analizator PCR (Eppendorf)**

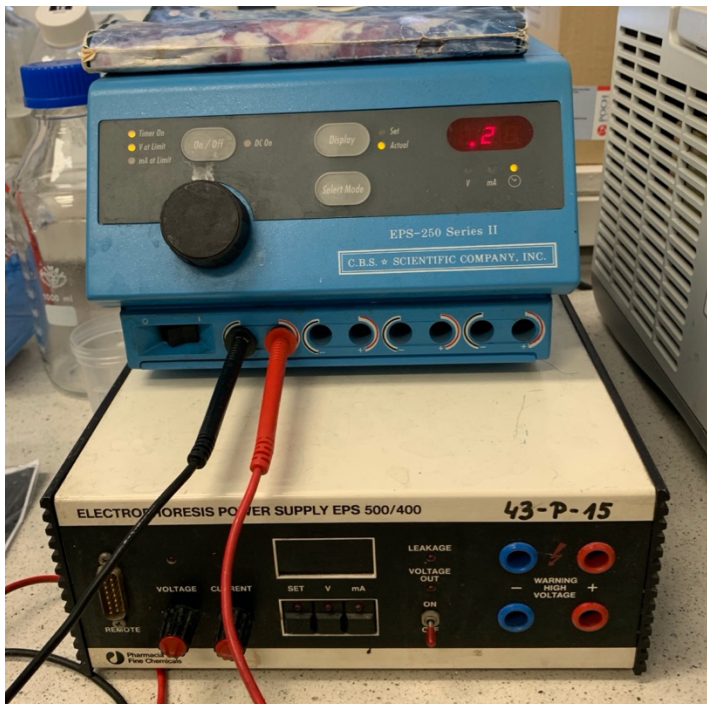
### **3.5. Elektroforeza białek na żelu agarozowym**

Elektroforezę produktów reakcji RT-PCR przeprowadzano w 1 % żelu agarozowym rozpuszczonym w buforze 1×TBE. Agarozę gotowano przez ok. 2 minuty w celu dokładnego rozpuszczenia. Następnie roztwór schładzano do temp. 60-70°C i dodawano 10 µl roztworu bromku etydydny o stężeniu 10mg/ml. Całość dokładnie mieszano, wylewano na płytkę i pozostawiano do zastygnięcia. Żele agarozowe umieszczano w aparacie do elektroforezy. Aparat napełniono buforem elektrodowym (1×TBE). Użyto markera masy DNA 1 (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Produkty reakcji RT-PCR łączono z buforem obciążającym do elektroforezy i nanoszono po 9 µl na żel (Ryciny 7 i 8). Rozdział elektroforetyczny

proawodno przy napięciu 100V przez 20 min. Po zakończonęj elektroforezie analizę migracji produktów proawodno pod lampą UV przy użyciu systemu MiniBis Pro (DNR, Neve Yamin, Israel) [Rycina 3.5.3].



Rycina 3.5.1. Produkty PCR w żelu agarozowym podczas elektroforezy



Rycina 3.5.2. Zasilacz do elektroforezy



**Rycina 3.5.3. System MiniBis Pro do analizy migracji produktów elektroforezy pod lampą UV (DNR)**

### 3.6. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Statistica 13.7 (TIBCO Software Inc, Palo Alto, Kalifornia, USA) oraz PQStat 1.6.8 (PQStat Software, Poznań, Polska).

Do opracowania danych liczbowych i jakościowych wykorzystano elementy statystyki opisowej. Zmienne ilościowe opisano za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego (SD) lub mediany, rozstępu ćwiartkowego (IQR) oraz zakresu. Zmienne jakościowe opisano przez liczbę przypadków w danej kategorii oraz procent (%), a różnice dotyczące cech opisanych w skali nominalnej zbadano, stosując testy Chi-kwadrat oraz test Fishera-Freemana-Haltona (w zależności od licznosci w tabeli wielodzzielczej). Zgodność z rozkładem normalnym oceniano przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Zmienne ilościowe porównywano za pomocą testu ANOVA dla grup niezależnych z poprawką Brown-Forsythe'a i wykorzystaniem testu post-hoc Duncana i Tukeya, a w przypadku braku zgodności z rozkładem normalnym z wykorzystaniem analizy wariancji testem ANOVA Kruskala-Wallisa.

Za istotną statystycznie uznano wartość współczynnika  $\alpha$  na poziomie  $\alpha = 0.005$  oraz współczynnika  $p \leq 0.05$ .

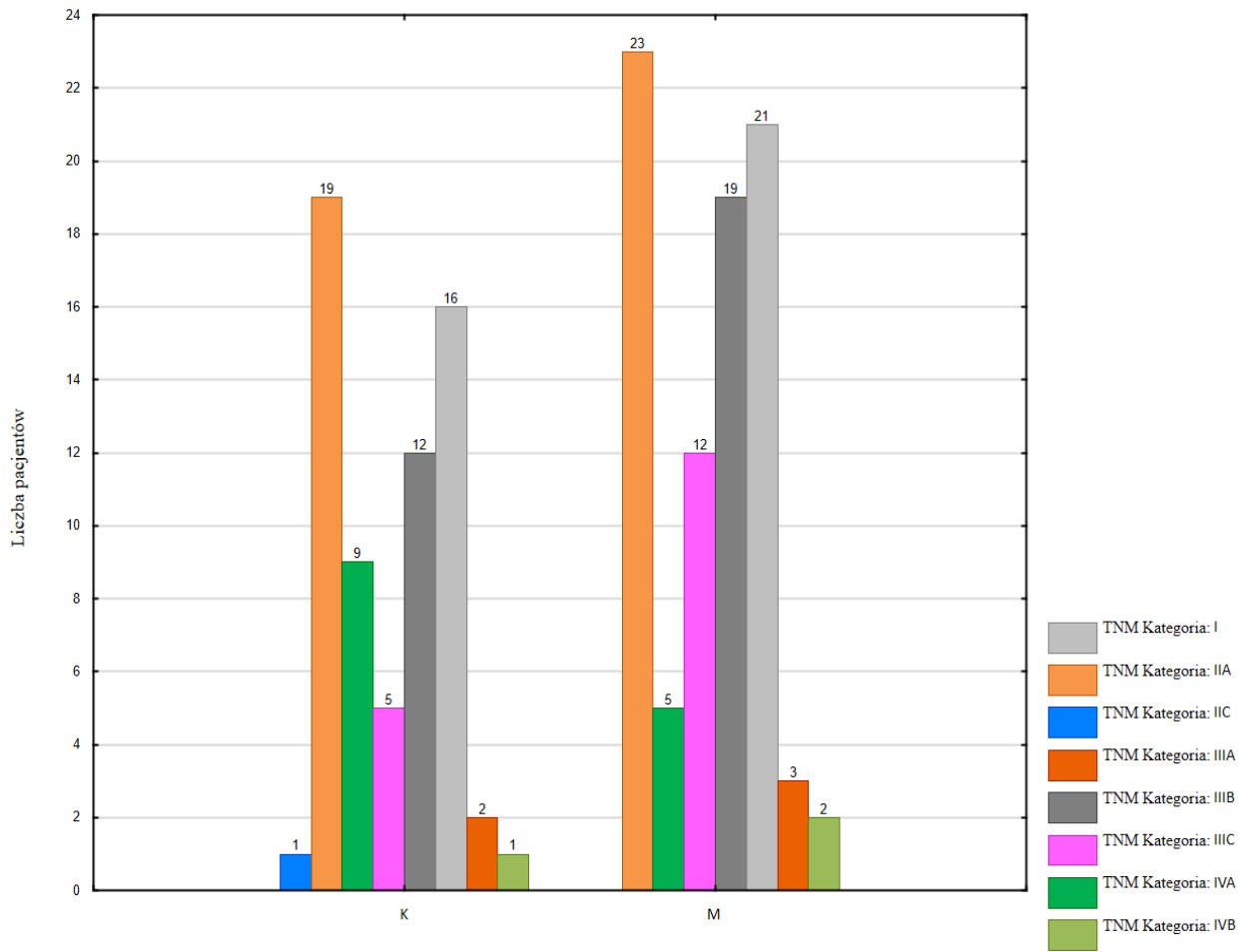
## 4. WYNIKI

### 4.1 Charakterystyka demograficzna i kliniczna badanej grupy

W przeprowadzonej analizie nie wykazano istotnych różnic statystycznych w poszczególnych skalach ani cechach w skali TNM pomiędzy płciami. Wyniki zaprezentowano w czterech tabelach [Tabela 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4] oraz trzech rycinach [Ryciny 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3].

**Tabela 4.1.1 Podział pacjentów według stadium zaawansowania w klasyfikacji TNM.**

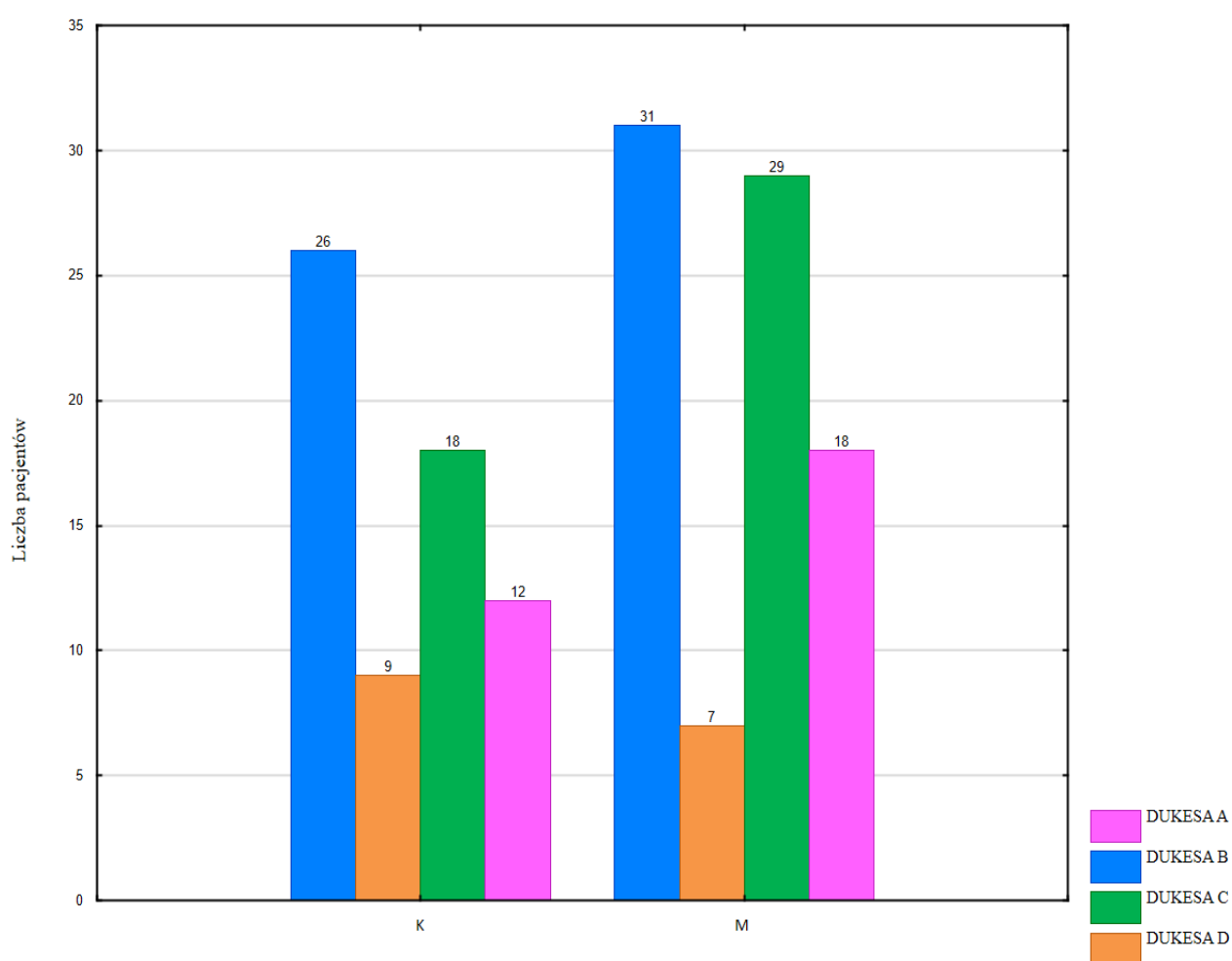
Stadium	Liczba pacjentów [n=150]	Procent [n=150]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
I	37	24,67%	16	21	=0,69
IIA	42	28,00%	19	23	
IIB	1	0,67%	0	1	
IIC	2	1,33%	1	1	
IIIA	5	3,33%	2	3	
IIIB	30	20,00%	12	18	
IIIC	16	10,67%	5	11	
IVA	2	1,33%	1	1	
IVB	15	10,00%	6	9	



**Rycina 4.1.1. Podział pacjentów według stadium zaawansowania w klasyfikacji TNM.**

**Tabela 4.1.2. Podział pacjentów według klasyfikacji Dukesa oraz względem płci.**

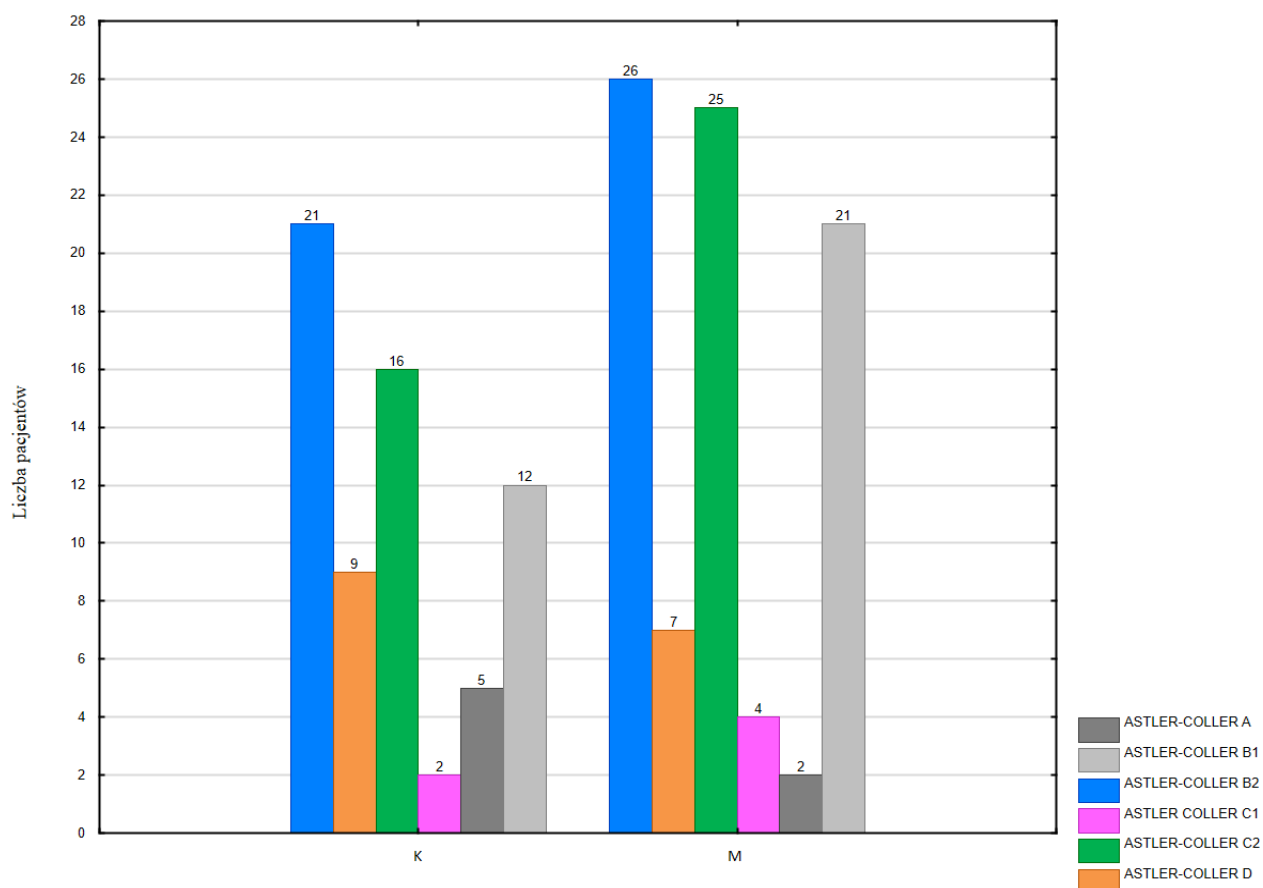
Zmienna	Liczba pacjentów [n=150]	Procent [n=150]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
A	30	20,00%	12	18	=0,66
B	57	38,00%	26	31	
C	46	30,67%	18	28	
D	17	11,33%	9	8	



**Rycina 4.1.2. Podział pacjentów według klasyfikacji Dukesa oraz względem płci.**

**Tabela 4.1.3. Podział badanej grupy według zaawansowania względem klasyfikacji Duke'a w modyfikacji Astlera-Collera oraz względem płci.**

Zmienna	Liczba pacjentów [n=150]	Procent [n=150]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
A	7	4,67%	5	2	=0,68
B1	33	22,00%	12	21	
B2	47	31,33%	21	26	
C1	6	4,00%	2	4	
C2	40	26,67%	15	25	
D	17	11,33%	9	8	



**Rycina 4.1.3. Podział badanej grupy według zaawansowania względem klasyfikacji Duke'a w modyfikacji Astlera-Collera oraz względem płci.**



**Tabela 4.1.4. Wyniki poszczególnych składowych klasyfikacji TNM w całej grupie badanej oraz porównanie pomiędzy płciami.**

Zmienna	Liczba pacjentów [n=150]	Procent [100%]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
<b>Guz pierwotny [T]</b>					
1	8	5,33	4	4	=0,80
2	37	24,67	16	21	
3	92	61,33	40	52	
4a	2	1,33	1	1	
4b	11	7,33	4	7	
<b>Zajęcie okolicznych węzłów chłonnych [N]</b>					
0	87	57,33	39	48	=0,79
1a	14	9,33	8	6	
1b	12	8,00	6	6	
1c	12	8,00	4	8	
2a	10	6,67	2	8	
2b	15	10,00	6	9	
<b>Przerzuty odległe [M]</b>					
0	130	86,67	55	75	=0,84
1a	17	11,33	9	8	
1b	3	2,00	1	2	

Cała grupa badana składała się z 85 mężczyzn (56,67%) i 65 kobiet (43,33%) – bez istotnej różnicy statystycznej ( $p=0,78$ ). Wszyscy pacjenci reprezentowali rasę kaukaską. Średni wiek w całej grupie wyniósł  $67,37 \pm 11,09$  lat, natomiast średnia wartość BMI wyniosła  $27,50 \pm 4,62$  kg/m<sup>2</sup>. Grupa kobiet różniła się istotnie statystycznie od mężczyzn pod względem masy ciała oraz wzrostu. Jednakże już nie zaobserwowano różnic statystycznych w zakresie BMI. Szczegółowe wyniki przedstawiono w odpowiednio w tabeli 4.1.5 oraz 4.1.6 [Tabela 4.1.5 oraz 4.1.6] oraz rycinach [Rycina 4.1.4 oraz 4.1.5].

**Tabela 4.1.5. Podstawowe dane demograficzne całej badanej grupy.**

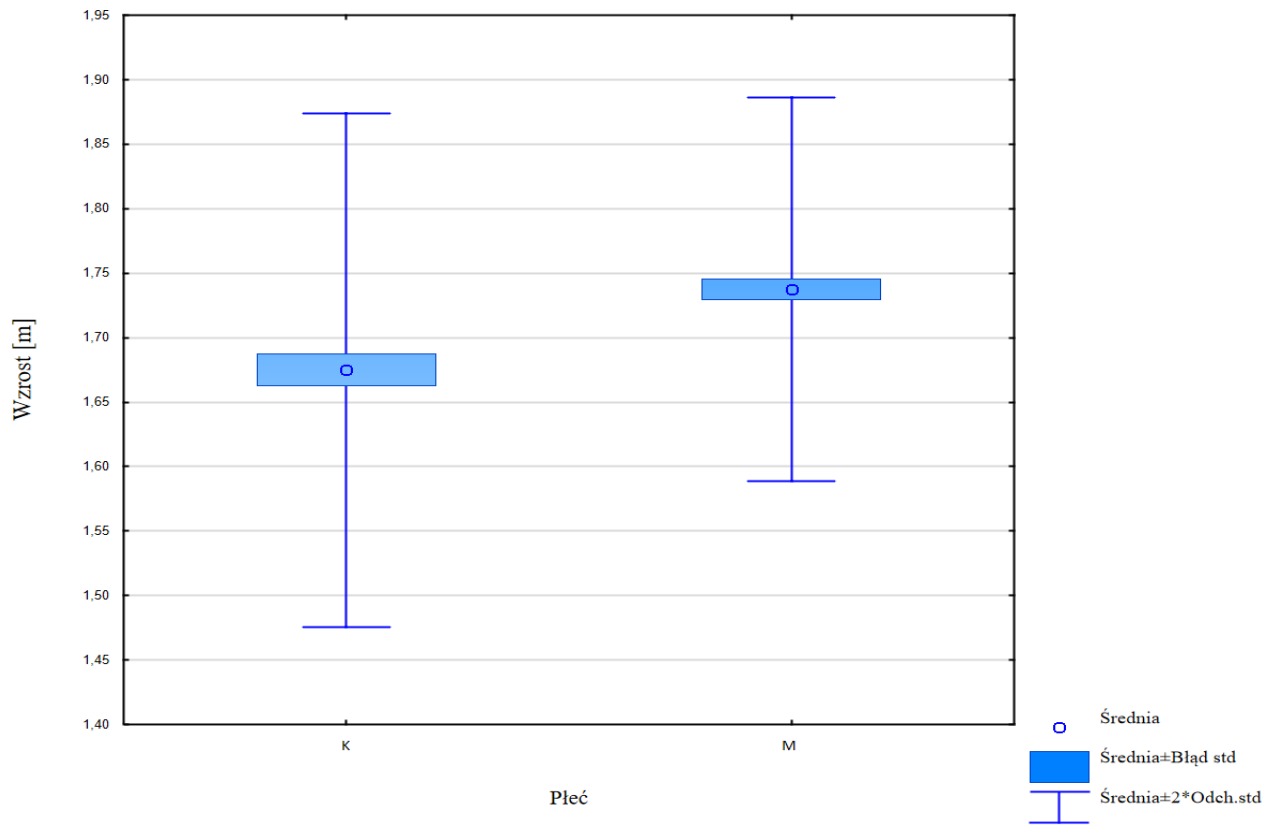
Zmienna	Średnia	SD	Mediana	Minimum	Maximum
Wiek [lata]	67,37	11,09	69,00	32,000	93,00
Wzrost [m]	1,71	0,09	1,72	1,49	1,90
Masa [kg]	80,54	14,84	80,50	43,00	120,00
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	27,50	4,62	27,45	19,15	41,66

BMI – wskaźnik masy ciała; SD – odchylenie standardowe.

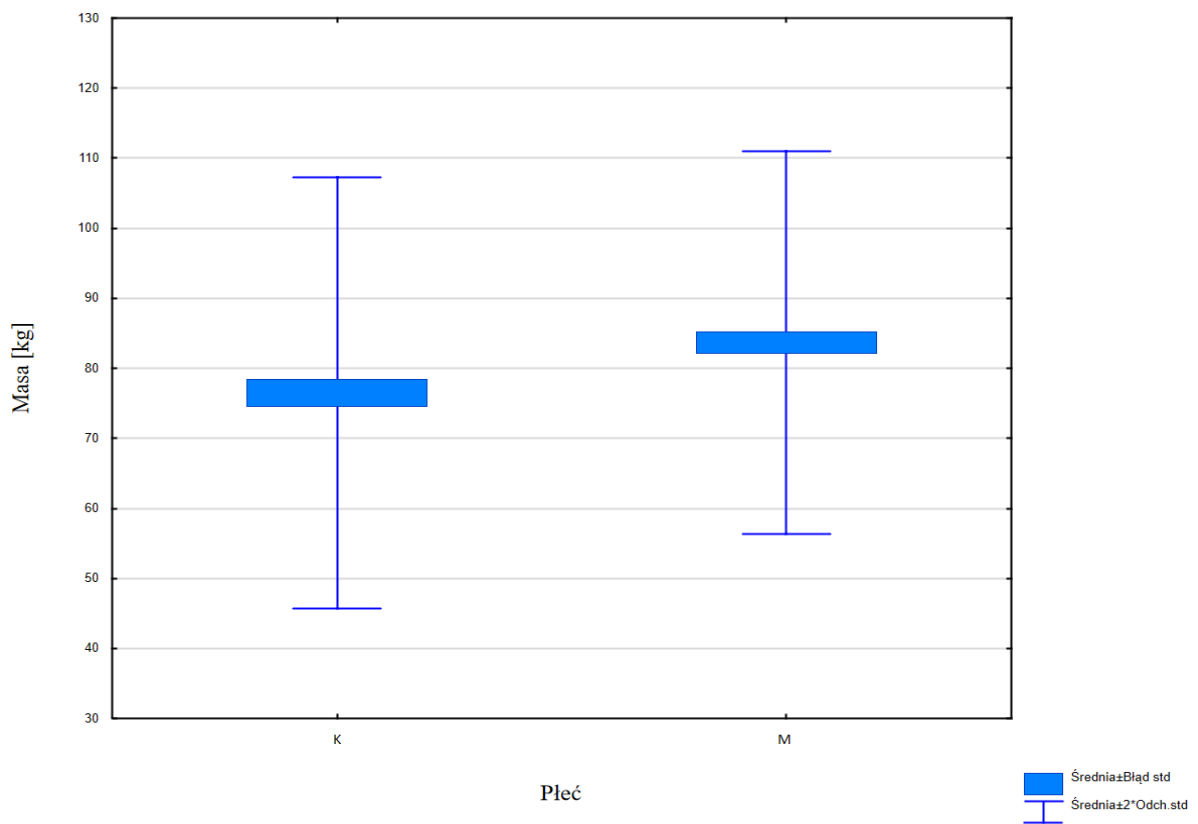
**Tabela 4.1.6. Porównanie względem płci w całej grupie badanej.**

Zmienna	Cała grupa	Kobiety	Mężczyźni	Wartość p
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]				
Średnia	27,51	27,23	27,72	=0,58
SD	4,62	4,95	4,38	
Masa [kg]				
Średnia	80,55	76,46	83,67	=0,0029
SD	14,84)	15,39	13,69	
Wzrost [m]				
Średnia	1,71	1,67	1,74	=0,00007
SD	0,09	0,1	0,07	
Wiek [lata]				
Średnia	67,37	68,17	66,76	=0,47
SD	11,10	11,44	10,86	

BMI – wskaźnik masy ciała; SD – odchylenie standardowe



Rycina 4.1.4. Porównanie wzrostu pomiędzy płciami w całej grupie badanej.



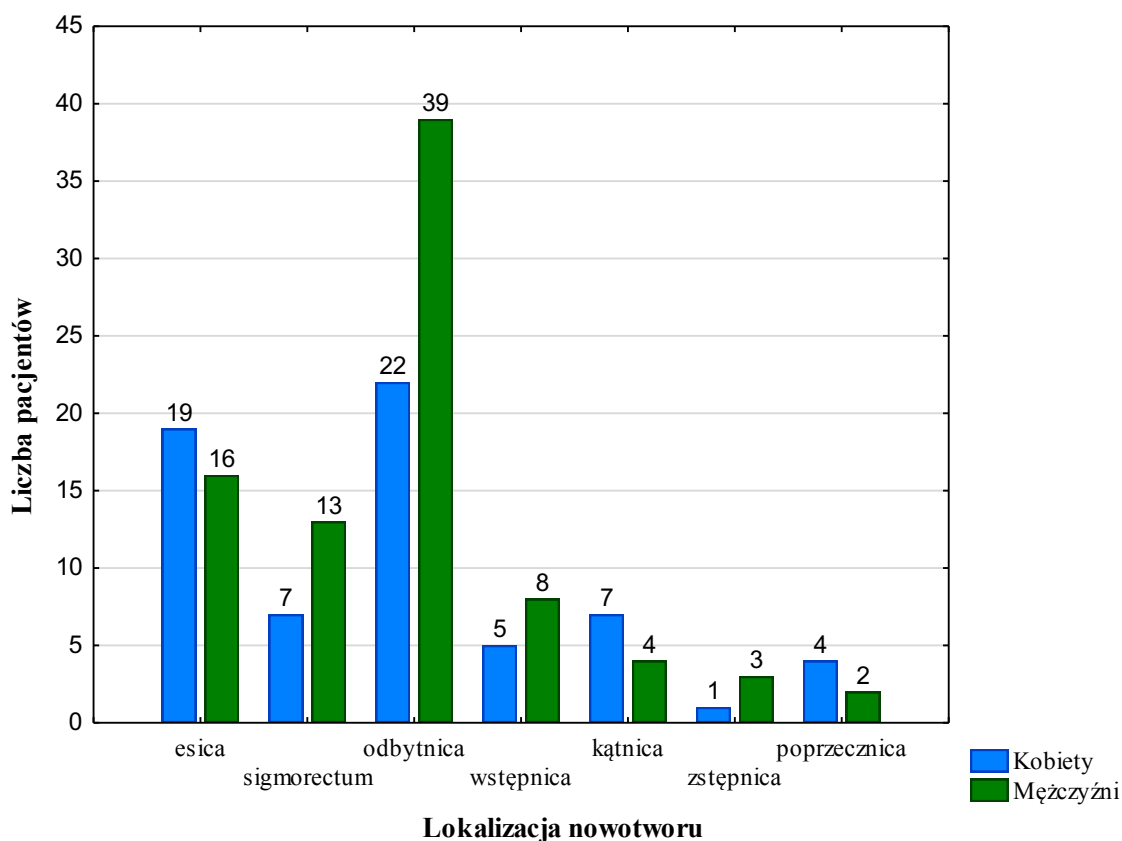
Rycina 4.1.5. Porównanie wagi pomiędzy płciami w całej grupie badanej.

## 4.2 Charakterystyka histopatologiczna badanej grupy

Kolejnym ważnym aspektem badania była analiza patomorfologiczna badanych guzów. Przeanalizowano wszystkie wyniki histopatologiczne pacjentów w zakresie operacji, w czasie której usunięto guz pierwotny. W pierwszej kolejności określono jego lokalizację – zgodną z protokołem operacyjnym. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy płciami w zakresie pierwotnej lokalizacji nowotworu ( $p=0,81$ ) [Tabela 4.2.1].

**Tabela 4.2.1. Charakterystyka lokalizacji guza na podstawie oceny operacyjnej i potwierdzeniu histopatologicznym w całej badanej grupie oraz porównanie względem płci.**

Lokalizacja	Liczba pacjentów [n=150]	Procent [n=150]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
Odbytnica	61	40,00%	22	39	=0,81
Zagięcie esiczko-odbytnicze	20	13,33%	7	13	
Esica	35	23,33%	19	16	
Zstępnicza	4	3,33%	1	3	
Poprzecznicza	6	4,00%	4	2	
Wstępnicza	13	8,67%	5	8	
Kątnica	11	7,33%	7	4	



**Rycina 4.2.1. Lokalizacja guza pierwotnego w całej grupie badanej.**

Średnia objętość guza w całej grupie badanej wynosiła  $36,32 \pm 56,45 \text{ cm}^3$ . Dane dotyczące długości, szerokości, wysokości i objętości guza pierwotnego zostały przedstawione w tabeli poniżej [Tabela 4.2.2]. Natomiast nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy płciami w zakresie powyższych danych [Tabela 4.2.3].

**Tabela 4.2.2. Podstawowe wymiary guzów pierwotnych wg przeanalizowanych badań histopatologicznych w całej grupie badanej.**

Zmienna	Średnia	SD	Mediana	Minimum	Maksimum
Długość guza [cm]	3,89	1,78	3,50	0,30	10,00
Szerokość guza [cm]	3,29	1,56	3,00	0,50	8,00
Wysokość guza [cm]	1,84	1,29	1,50	0,30	6,00
Objętość guza [ $\text{cm}^3$ ]	36,32	56,45	18,00	0,16	336,00

SD – odchylenie standardowe

**Tabela 4.2.3. Różnice w zakresie rozmiarów guza pomiędzy płciami.**

Zmienna	Cała grupa [n=150]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
Długość guza [cm]				
Średnia	3,89	3,90	3,89	=0,99
SD	1,78	1,62	1,92	
Szerokość guza [cm]				
Średnia	3,29	3,30	3,28	=0,96
SD	1,56	1,53	1,59	
Wysokość guza [cm]				
Średnia	1,84	1,91	1,79	=0,57
SD	1,29	1,35	1,26	
Objętość guza [cm <sup>3</sup> ]				
Średnia	36,32	38,56	34,59	=0,72
SD	56,45	65,54	49,62	

SD – odchylenie standardowe

Opisano i analizowano następujące aspekty histopatologiczne:

- rodzaj nowotworu w ostatecznym rozpoznaniu histopatologicznym: znaczną część grupy stanowiły gruczolakoraki (80,67% całej grupy badanej) w różnych podgrupach [Tabela 4.2.4]

- angioinwazja: wykazano jej obecność u 41 badanych pacjentów, czyli 27,33% całej badanej grupy [Tabela 4.2.5];

- neuroinwazja: wykazano jej obecność u 23 badanych pacjentów, czyli 15,33% całej badanej grupy [Tabela 4.2.5];

- stopień zróżnicowania guza (oznaczony cechą G): w grupie badanej dominuje stopień 2 (58%), następnie 1 (28,67%) i jako ostatni stopień 3 (13,33%) [Tabela 4.2.5];

- ilość zajętych lokalnie węzłów chłonnych (średnio 2,48) oraz lokalizacje przerzutów odległych (najczęściej do wątroby) [Tabela 4.2.6].

Dla wszystkich powyższych cech nie znaleziono różnic statystycznych pod względem płci, co oznacza, że grupa badana jest homogenna. Wykazano natomiast w statystykach porównawczych, że stopień zróżnicowania guza (G) jest zależny od skali klinicznych: Dukesa, Astlera-Collera oraz TNM (wartość p dla wszystkich tych porównań wynosi <0,0001).

**Tabela 4.2.4. Ostateczne rozpoznanie histopatologiczne i podział ze względu na płeć.**

Rozpoznanie	Ogólnie [n=150]	Procent [100%]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
Adenocarcinoma tubulare	121	80,67%	52	69	=0,94
Adenocarcinoma mucinosum	6	4,00%	2	4	
Adenocarcinoma tubulare partim mucinosum	18	12,00%	9	9	
Rak neuroendokryny	3	2,00%	1	2	
Rakowiako-gruczolakorak	2	1,33%	1	1	

**Tabela 4.2.5. Wyniki statystyczne dla całej grupy badanej w zakresie następujących cech: angioinwazji, neuroinwazji oraz stopnia złośliwości guza (G).**

Zmienna	Liczba pacjentów [n=150]	Procent [100%]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
Angioinwazja					
Tak	109	72,67	49	60	=0,86
Nie	41	27,33	16	25	
Neuroinwazja					
Tak	127	84,67	57	70	=0,79
Nie	23	15,33	8	15	
Stopień złośliwości guza (G)					
1	43	28,67	17	26	=0,45
2	87	58,00	38	49	
3	20	13,33	10	10	

**Tabela 4.2.6. Ilość zajętych nowotworowo lokalnych węzłów chłonnych oraz lokalizacja przerzutów odległych w całej grupie badanej i względem płci.**

Zmienna	Liczba pacjentów [n=150]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
Ilość węzłów chłonnych lokalnie zajętych				
Średnia	2,48	1,87	2,95	=0,43
SD	3,94	3,07	4,45	
Przerzuty odległe do wątroby	13	5	8	=0,88
Rozsiana choroba nowotworowa	3	0	3	=0,93
Przerzuty do innych narządów odległych	7	5	2	=0,78



### 4.3. Charakterystyka cech klinicznych w grupie badanej

W dalszej kolejności przeanalizowano grupę badaną pod względem wybranych cech klinicznych i charakterystyki leczenia onkologicznego. Prawie połowa chorych (48%) przyznało się do przedoperacyjnego, przewlekłego palenia wyrobów tytoniowych czy papierosów elektronicznych. Częściej w badanej grupie palili mężczyźni niż kobiety (65% vs 35%,  $p=0,86$ ). Przeanalizowano także fakt szkodliwego spożywania alkoholu (46 z 150 pacjentów – 30,67%, tutaj także dominowali mężczyźni - 78%). Najczęstszą współistniejącą chorobą przewlekłą było nadciśnienie tętnicze (63,33%), w dalszej kolejności cukrzyca typu II (39,33%) oraz inne choroby układu krążenia (55,67%) oraz układu oddechowego (33,33%) – wybrane szczegółowe dane przedstawiono w tabeli poniżej [Tabela 4.3.1].

**Tabela 4.3.1. Analiza danych związanych z chorobami przewlekłymi oraz spożywania używek w całej grupie badanej.**

Zmienna	Liczba pacjentów [n=150]	Procent [100%]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
Palenie wyrobów tytoniowych					
NIE	78	52,00	33	45	=0,86
TAK	72	48,00	32	40	
Szkodliwe spożywanie alkoholu					
NIE	104	69,33	43	61	=0,47
TAK	46	30,67	22	24	
Nadciśnienie tętnicze					
NIE	55	36,67	23	32	=0,77
TAK	95	63,33	42	53	
Cukrzyca typu II					
NIE	91	60,67	39	52	=0,88
TAK	59	39,33	26	33	
Choroba niedokrwienność serca					
NIE	81	54,00	34	47	=0,71
TAK	69	46,00	31	38	
Przewlekła niewydolność serca					
NIE	101	67,33	45	56	=0,66
TAK	49	32,67	20	29	
Przewlekła obturacyjna choroba płuc					
NIE	115	76,67	48	67	=0,47
TAK	35	23,33	17	18	

Kolejne analizy statystyczne dotyczyły potrzeby i kwalifikacji do leczenia neoadiuwantowego oraz potrzeby uzupełniającego leczenia pooperacyjnego. Nie wszyscy pacjenci z guzem zlokalizowanym w odbytnicy przeszli przedoperacyjną radioterapię – 57 z 60 pacjentów. 65% badanych z guzem odbytnicy według danych przeszło radioterapię przedoperacyjną tzw. „krótką ścieżką” a 35% tzw. długą radiochemioterapię. Pooperacyjnie ponad 50% chorych (73 pacjentów z całej grupy badanej) w grupie otrzymało uzupełniającą chemioterapię, a 10 pacjentów radiochemioterapię (6,67%) [Tabela 4.3.2]. Większość pacjentów (85%) przyjmowała chemioterapię w schemacie FOLFIRI.

**Tabela 4.3.2. Charakterystyka leczenia onkologicznego przed- i pooperacyjnego w całej grupie badanej.**

Zmienna	Liczba pacjentów [n=150]	Procenty [100%]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
Leczenie neoadiuwantowe (radioterapia lub radiochemioterapia)					
NIE	93	62,00	42	51	=0,28
TAK	57	38,00	24	33	
Leczenie adiuwantowe (chemioterapia lub radiochemioterapia)					
NIE	74	49,33	36	38	=0,19
TAK	76	50,67	29	47	

#### 4.4. Analiza izolacji RNA oraz badań genu referencyjnego (GAPDH)

Pierwszą analizowaną cechą jakościową i ilościową w zakresie badań genetycznych była izolacja materiału genetycznego, a konkretnie izolacja RNA z tkanek guza oraz tkanki zdrowej. Stwierdzono, że wszystkie badane próbki były dobrej jakości i udało się wyizolować RNA ze wszystkich próbek. W tabeli poniżej przedstawiono większą ilość RNA zmierzoną za pomocą spektrometru i analizy porównawcze pomiędzy ilością wyizolowanego RNA w tkance zdrowej oraz dwóch grupach tkanek nowotworowych. Średnia ilość RNA w tkance zdrowej wynosiła  $810,94 \pm 606,34$  ng/ml, natomiast w próbkach pobranych z guza odpowiednio  $903,69 \pm 632,67$  ng/ml oraz  $964,99 \pm 622,39$  ng/ml. Jak przedstawiła analiza porównawcza – wykazano znaczącą statystycznie różnicę w ilości RNA pomiędzy tkanką zdrową a ilością RNA w próbkach guza ogólnie oraz w próbkach brzeżnych guza (odpowiednio  $p=0,03$  oraz  $p=0,03$ ). Jednakże, jak można zauważyć obie próbki z guza miały o wiele większą ilość RNA niż tkanki zdrowe. Statystycznie ilość RNA nie różniła się pomiędzy próbkami guza nr 1 i 2 [Tabela 4.4.1 i 4.4.2].

**Tabela 4.4.1. Wyniki ilości wyizolowanego RNA za pomocą zestawu Total RNA w całej grupie badanej.**

Zmienna	Średnia	Mediana	Minimum	Maximum	SD
Ilość RNA TZ [ng/ml]	810,94	707,90	6,370	2965,40	606,34
Ilość RNA Próbką GO [ng/ml]	934,34	800,60	12,30	3278,50	627,26
Ilość RNA Próbką G1 [ng/m]	903,69	800,40	39,29	2555,60	632,67
Ilość RNA Próbką G2 [ng/ml]	964,99	849,65	12,30	3278,50	622,39

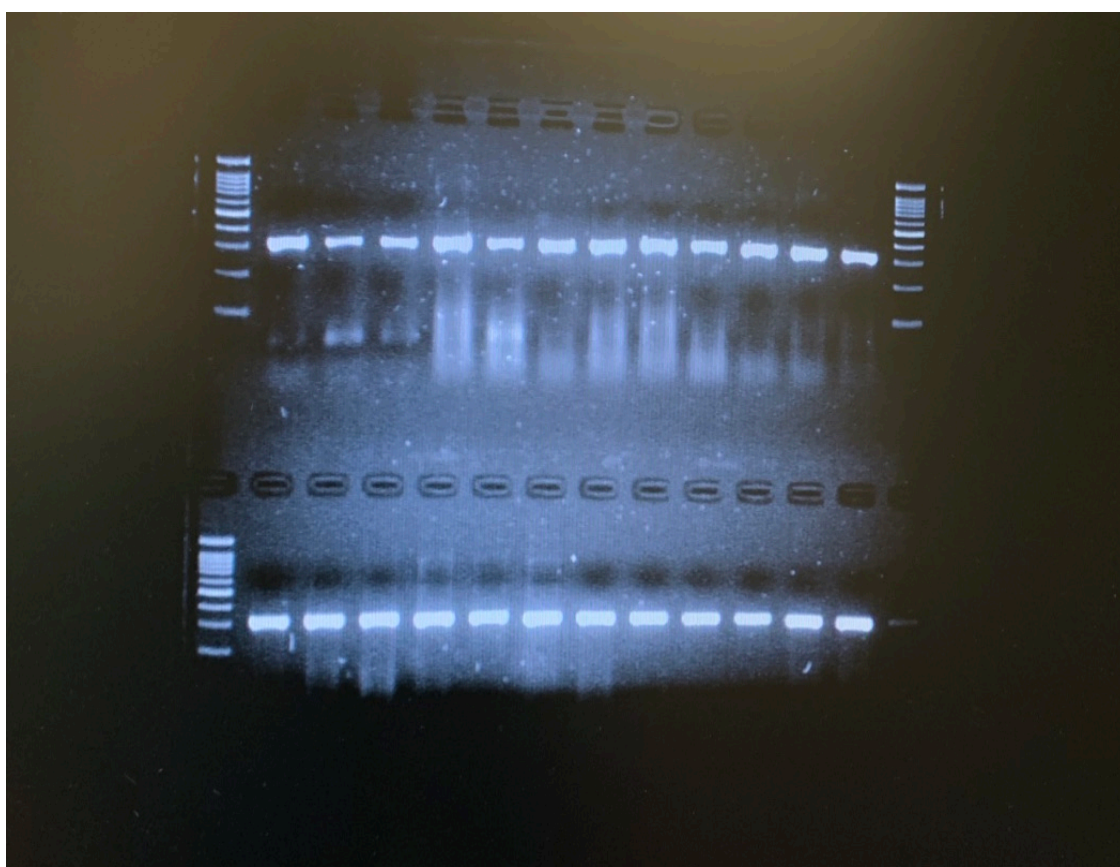
TZ – tkanka zdrowa; GO – guz ogólnie; G1 – guz część centralna; G2 – guz część brzeżna

**Tabela 4.4.2. Porównanie ilościowe otrzymanego RNA między wszystkimi podgrupami w całej populacji badanej.**

Zmienna [ng/ml]	Średnia Grupa 1	Średnia Grupa 2	SD Grupa 1	SD Grupa 2	Wartość p
Ilość RNA TZ vs. Ilość RNA G0	810,94	934,34	606,34	627,25	=0,036
Ilość RNA Z vs. Ilość RNA G1	810,94	903,69	606,34	632,67	=0,198
Ilość RNA Z vs. Ilość RNA G2	810,94	964,99	606,34	622,39	=0,032
Ilość RNA G1 vs. Ilość RNA G2	903,69	964,99	632,67	622,39	=0,393

TZ – tkanka zdrowa; G0- guz ogólnie; G1 – guz część centralna; G2 – guz część brzeżna

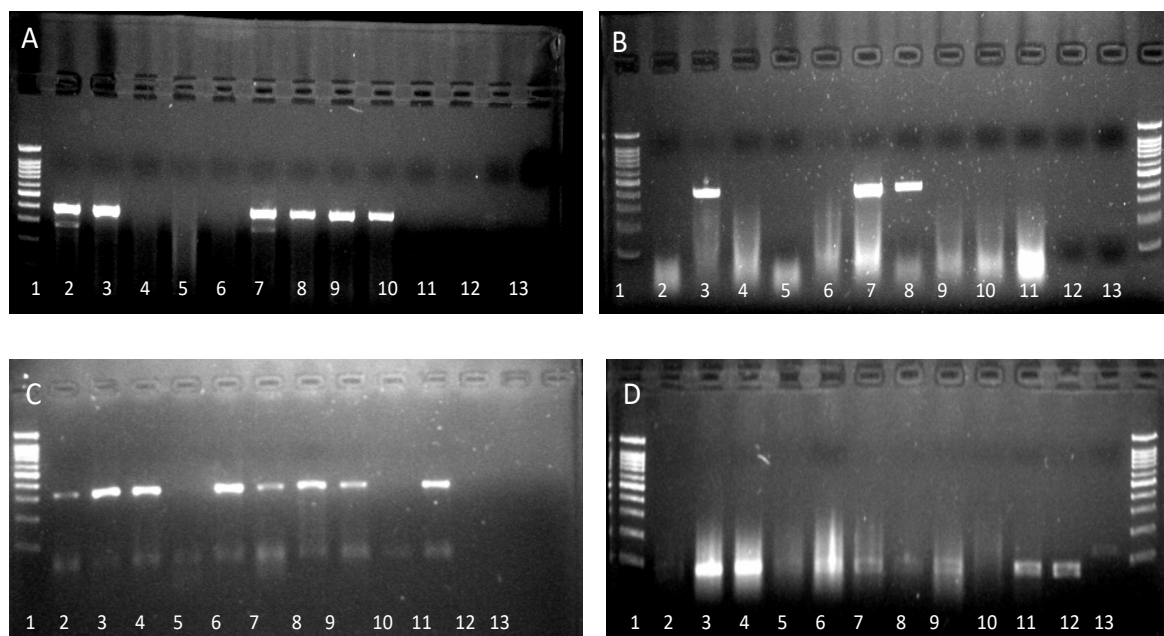
Wszystkie próbki włączone do badania miały pozytywny rezultat podczas elektroforezy białek dla genu GAPDH. Poniżej przedstawiono rycinę obrazującą wynik elektroforezy produktów genu GAPDH dla wybranych 24 pacjentów [Rycina 4.4.1].



**Rycina 4.4.1. Fotografia przedstawiająca rozdział elektroforetyczny DNA genu referencyjnego GAPDH.**

#### 4.5. Analiza ekspresji jakościowej genów pluripotencji

Największą grupą analiz była ocena ekspresji poszczególnych genów oraz ich powiązania z cechami demograficznymi, klinicznymi oraz patomorfologicznymi. W większości przypadków nie wykazano znaczących różnic statystycznych pomiędzy poziomem jakościowej ekspresji a płcią. Jednakże porównanie dla ekspresji SOX2 w tkance zdrowej pomiędzy płciami okazało się istotnie różne. Wykazano, że większa ekspresja SOX2 w tkance zdrowej występuje u mężczyzn w porównaniu do kobiet ( $p=0,0168$ ). Podstawowe dane takie jak ocena jakościowa ekspresji genów i ich porównanie względem płci zostały przedstawione w 4 tabelach [Tabele 4.5.1, 4.5.2, 4.5.3, 4.5.4].



**Rycina 4.5.1. Fotografie przedstawiające rozdziel elektroforetyczny DNA genów pluripotencji: A – NANOG; B – KLF4; C – OCT4; D – SOX2. Numer 1 – marker masy DNA; Numery 2-12 – gen badany (wraz z kontrolą pozytywną); Numer 13 – kontrola negatywna.**

**Tabela 4.5.1. Ocena ekspresji jakościowej genu OCT4 względem płci.**

Ekspresja	Cała grupa [n=150]	Procent [100%]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
<b>OCT4 Tkanka zdrowa</b>					
dodatnia	31	20,67%	15	16	=0,39
ujemna	119	79,33%	50	69	
<b>OCT4 Tkanka guza (ogólnie)</b>					
dodatnia	130	86,67%	56	74	=0,66
ujemna	20	13,33%	9	11	
<b>OCT4 Tkanka guza – część centralna</b>					
dodatnia	105	70,00%	43	62	=0,27
ujemna	45	30,00%	22	23	
<b>OCT4 Tkanka guza – część brzeżna</b>					
dodatnia	70	46,67%	20	50	=0,88
ujemna	80	53,33%	45	35	

**Tabela 4.5.2. Ocena ekspresji jakościowej genu SOX2 względem płci.**

Ekspresja	Cała grupa [n=150]	Procent [100%]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
<b>SOX2 Tkanka zdrowa</b>					
dodatnia	11	7,33%	2	9	=0,0168
ujemna	139	92,67%	63	76	
<b>SOX2 Tkanka guza (ogólnie)</b>					
dodatnia	139	92,67%	60	79	=0,88
ujemna	11	7,33%	5	6	
<b>SOX2 Tkanka guza – część centralna</b>					
dodatnia	121	80,67%	52	69	=0,86
ujemna	29	19,33%	13	16	
<b>SOX2 Tkanka guza – część brzeżna</b>					
dodatnia	111	74,00%	45	66	=0,24
ujemna	39	26,00%	20	19	

**Tabela 4.5.3. Ocena ekspresji jakościowej genu KLF4 względem płci.**

Ekspresja	Cała grupa [n=150]	Procent [100%]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
KLF4 Tkanka zdrowa					
dodatnia	115	76,67%	46	69	=0,08
ujemna	35	23,33%	19	16	
KLF4 Tkanka guza (ogólnie)					
dodatnia	88	58,67%	39	49	=0,63
ujemna	62	41,33%	26	36	
KLF4 Tkanka guza – część centralna					
dodatnia	88	58,67%	39	49	=0,63
ujemna	62	41,33%	26	36	
KLF4 Tkanka guza – część brzeżna					
dodatnia	39	26,00%	21	18	=0,12
ujemna	111	74,00%	44	67	

**Tabela 4.5.4. Ocena ekspresji jakościowej genu NANOG względem płci.**

Ekspresja	Cała grupa [n=150]	Procent [100%]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
NANOG Tkanka zdrowa					
dodatnia	18	12,00%	5	13	=0,15
ujemna	132	88,00%	60	72	
NANOG Tkanka guza (ogólnie)					
dodatnia	130	86,67%	56	74	=0,67
ujemna	20	13,33%	9	11	
NANOG Tkanka guza – część centralna					
dodatnia	111	74,00%	35	49	=0,51
ujemna	39	26,00%	3	36	
NANOG Tkanka guza – część brzeżna					
dodatnia	98	65,33%	43	55	=0,87
ujemna	52	34,67%	22	30	

#### 4.6. Porównanie ekspresji genów pluripotencji z cechami klinicznymi i patomorfologicznymi

Następnym zagadnieniem jest porównanie jakościowej ekspresji pomiędzy tkanką zdrową (TZ), tkanką guza ogólnie oraz osobno w części centralnej (G1) oraz brzeżnej (G2). Wykazano wiele istotnych różnic statystycznych szczególnie pomiędzy ekspresją w tkance zdrowej oraz guza, ale także pomiędzy tkanką w obrębie samego guza [Tabela 4.6.1].

**Tabela 4.6.1. Porównanie ekspresji jakościowej genów pomiędzy miejscami pobrania tkanki w całej grupie badanej.**

Porównanie	Chi-2	Wartość p
OCT4 TZ vs GO	126,13	<0,0001
OCT4 TZ vs G1	69,73	<0,0001
OCT4 TZ vs G2	45,00	<0,0001
OCT4 G1 vs G2	3,27	=0,047
SOX2 TZ vs GO	221,89	<0,0001
SOX2 TZ vs G1	166,96	<0,0001
SOX2 TZ vs G2	141,29	<0,0001
SOX2 G1 vs G2	1,90	=0,16
KLF4 TZ vs GO	9,60	=0,0019
KLF4 TZ vs G1	65,45	=0,0031
KLF4 TZ vs G2	75,03	<0,0001
KLF4 G1 vs G2	69,12	<0,0001
NANOG TZ vs GO	164,35	<0,0001
NANOG TZ vs G1	63,09	<0,0001
NANOG TZ vs G2	88,00	<0,0001
NANOG G1 vs G2	2,72	=0,09

TZ – tkanka zdrowa; GO – tkanka guza ogólnie; G1 – tkanka guza część centralna; G2 – tkanka guza część brzeżna

W dalszej części poszerzono analizy o ocenę porównań pomiędzy ekspresją jakościową a cechami klinicznymi oraz histopatologicznymi. Po przeanalizowaniu przeprowadzanych testów statystycznych dowiedziono, że następujące czynniki mogą mieć wpływ na obecność ekspresji genów pluripotencji w powyższej grupie badanej:

- skala Astlera-Collera;
- skala Dukeasa;



- wielkość guza (T);
- histopatologiczny rodzaj guza;
- obecność angioinwazji;
- wielkość guza.

Szczegółowe wyniki zostały zebrane w tabeli poniżej [Tabela 4.6.2.]. W osobnej tabeli przedstawiono zależności ilościowe związane z wielkością guza [Tabela 4.6.3.].

**Tabela 4.6.2. Szczegółowe wyniki porównań ekspresji genów pluripotencji i wybranych cech klinicznych oraz histopatologicznych w całej grupie badanej (istotnych statystycznie).**

Porównanie	Chi-2	Wartość p
OCT4 GO do A-C	12,50	=0,0286
OCT4 GO do T	6,78	=0,0484
OCT4 GO do HIST-PAT	15,42	=0,0352
OCT4 G2 do A-C	11,77	=0,0381
SOX2 GO do DUKESA	10,60	=0,0141
SOX2 GO do A-C	10,47	=0,0427
SOX2 GO do HIST-PAT	17,85	=0,0013
KLF4 GO do A-C	16,88	=0,0047
KLF4 GO do AI	3,12	=0,0247
KLF4 G1 do A-C	17,12	=0,0126
KLF4 G1 do AI	2,42	=0,0413
NANOG GO do A-C	12,50	=0,0286
NANOG GO do T	8,25	=0,0375
NANOG GO do HIST-PAT	14,88	=0,0179
NANOG G1 do HIST-PAT	9,79	=0,0441
NANOG G2 do A-C	24,92	=0,0001
NANOG G2 do AI	4,66	=0,0310
NANOG G2 do HIST-PAT	11,11	=0,0253

A-C – skala Astlera-Collera; T - guz pierwotny; HIST-PAT – rozpoznanie histopatologiczne; DUKES – skala Dukesa; AI – angioinwazja.

**Tabela 4.6.3. Różnice w ekspresji genów pluripotencji w zależności od wielkości guza w całej grupie badanej.**

Ekspresja pozytywna genu w danej tkance	Z	Wartość p
OCT4 GO	-3,44	=0,00056
OCT4 G2	-2,21	=0,026
SOX GO	-3,21	=0,0018
KLF4 GO	-2,72	=0,0063
KLF4 G1	-2,72	=0,0063
NANOG TZ	-3,37	=0,00073
NANOG GO	-3,44	=0,00057
NANOG G2	-2,02	=0,043

TZ – tkanka zdrowa; GO – tkanka guza ogólnie; G1 – tkanka guza część centralna; G2 – tkanka guza część brzeżna

Zbadano także zależności statystyczne w przypadku podziału całej grupy badanej na prawo- bądź lewostronną lokalizację nowotworu (opis podziału w rozdziale 3.1). Zarówno w całej grupie jak i względem płci częściej guz pierwotny lokalizowano lewostronnie. Jednakże pomiędzy płciami różnice nie osiągnęły istotności statystycznej [Tabela 4.6.4.]. Nie wykazano także znaczących różnic porównując jakościową ekspresję wszystkich genów pluripotencji, we wszystkich grupach tzn. tkance zdrowej, tkance guza w części brzeżnej oraz centralnej, a lokalizacją prawo- lub lewostronną nowotworu. Stwierdzono istotne różnice względem skali TNM ( $p=0,037$ ), stopnia złośliwości G ( $p=0,0017$ ) oraz angioinwazji ( $p=0,045$ ). Trzy powyższe cechy miały wyniki znamienne wyższe w przypadku guzów lewej połowy okrężnicy (Grupa L).

**Tabela 4.6.4. Podział guzów ze względu na lokalizację i kategorią wiekową.**

Lokalizacja nowotworu	Cała grupa [n=150]	Kobiety [n=65]	Mężczyźni [n=85]	Wartość p
Grupa P [n=]	31	17	14	=0,14
Grupa L [n=]	119	48	71	
	Grupa 1 (do 59 r.ż.) [n=32]	Grupa 2 (60-74 r.ż.) [n=81]	Grupa 3 (od 75 r.ż.) [n=37]	
Grupa P [n=]	5	16	10	=0,62
Grupa L [n=]	27	65	27	
Pierwotna lokalizacja	Grupa 1 (do 59 r.ż.) [n=32]	Grupa 2 (60-74 r.ż.) [n=81]	Grupa 3 (od 75 r.ż.) [n=37]	
Kątnica [n=]	0	7	4	=0,12
Wstępnicza [n=]	2	5	6	
Poprzecznicza [n=]	3	3	0	
Zstępnicza [n=]	1	3	0	
Esica [n=]	10	19	6	
Zagięcie esiczo-odbytnicze [n=]	5	9	6	
Odbytnica [n=]	11	35	15	

Grupa I – lokalizacja prawostronna; Grupa II – lokalizacja lewostronna

W kolejnych analizach mających na celu zbadanie różnic w ekspresji genów względem ustalonych podgrup wiekowych nie wykazano istotnych różnic statystycznych. Wyniki te obrazuje tabela poniżej [Tabela 4.6.5.]. Nie wykazano istotnych różnic przy porównaniu podgrup wiekowych i lokalizacji nowotworu. Jednakże, wykazano różnice istotne statystycznie pomiędzy podgrupami wiekowymi a: skalą TNM ( $p=0,037$ ), obecnością przerzutów odległych M ( $p=0,03$ ) oraz neuroinwazją ( $p=0,047$ ).

**Tabela 4.6.5. Ekspresja genów pluripotencji w poszczególnych genach oraz w zależności od miejsca wyizolowania materiału genetycznego w całej grupie badanej.**

Ekspresja pozytywna genu w danej tkance	Grupa 1 (do 59 r.ż.) [n=32]	Grupa 2 (60-74 r.ż.) [n=81]	Grupa 3 (od 75 r.ż.) [n=37]	Wartość p
OCT4 TZ [n=]	7	17	8	=0,99
OCT4 GO [n=]	29	69	31	=0,66
OCT4 G1 [n=]	24	57	23	=0,49
OCT4 G2 [n=]	12	34	15	=0,90
SOX2 TZ [n=]	3	6	1	=0,45
SOX2 GO [n=]	31	73	35	=0,37
SOX2 G1 [n=]	26	64	31	=0,82
SOX2 G2 [n=]	24	63	24	=0,34
KLF4 TZ [n=]	22	60	32	=0,16
KLF4 GO [n=]	20	44	25	=0,36
KLF4 G1 [n=]	20	44	25	=0,36
KLF4 G2 [n=]	9	18	12	=0,48
NANOG TZ [n=]	3	13	2	=0,19
NANOG GO [n=]	29	69	31	=0,66
NANOG G1 [n=]	16	33	18	=0,57
NANOG G2 [n=]	22	50	25	=0,71

TZ – tkanka zdrowa; GO – tkanka guza ogólnie; G1 – tkanka guza część centralna; G2 – tkanka guza część brzeżna

#### **4.7. Analiza subpopulacji ze względu na koekspresję genów pluripotencji oraz współzależności do parametrów klinicznych i patomorfologicznych.**

Ostatnim etapem było wyznaczenie subpopulacji pacjentów względem koekspresji kilku genów pluripotencji u jednego pacjenta.

W zakresie współwystępowania genów pluripotencji w skumulowanej tkance guza można wyróżnić dwie dominujące subpopulacje: OCT4<sup>+</sup>/SOX2<sup>+</sup>/KLF4<sup>+</sup>/NANOG<sup>+</sup> (91 pacjentów) oraz OCT4<sup>+</sup>/SOX2<sup>+</sup>/KLF4<sup>-</sup>/NANOG<sup>+</sup> (38 pacjentów). Dodatkowo porównano zależność koekspresji u poszczególnych pacjentów do cech klinicznych, patomorfologicznych i epidemiologicznych. Brak ekspresji oznaczono 0, a ekspresję wszystkich 4 genów – oznaczono liczbą 4. Dowiedziono, że obecność koekspresji genów może korelować z:

- stopniem TNM (p=0,035);
- skalą Dukesa (p=0,045);
- skalą Astlera-Collera (p=0,0069);
- typem rozpoznania histopatologicznego (p=0,0094);
- obecność angioinwazji (p=0,0087).

Podobne zależności zbadano, szczegółowo w podgrupie G1 i G2 oraz w tkance zdrowej (TZ). Natomiast, w podgrupie G1, czyli w tkance guza pobranej z części centralnej wyodrębniono subpopulacje (oprócz subpopulacji OCT4<sup>+</sup>/SOX2<sup>+</sup>/KLF4<sup>+</sup>/NANOG<sup>+</sup>- 53 pacjentów): liczącą 31 pacjentów OCT4<sup>+</sup>/SOX2<sup>+</sup>/KLF4<sup>+</sup>/NANOG<sup>-</sup> oraz OCT4<sup>+</sup>/SOX2<sup>+</sup>/KLF4<sup>-</sup>/NANOG<sup>+</sup> (40 pacjentów). Wykonano następujące zależności od koekspresji genów:

- klasyfikacja TNM (p=0,00378);
- klasyfikacja Astlera-Collera (p=0,00897);
- klasyfikacja Dukesa (p=0,0357);
- obecność przerzutów do narządów odległych (p=0,0043).

W dalszej kolejności, w podgrupie G2, czyli w tkance guza pobranej z części centralnej wyodrębniono subpopulacje: znacznie dominującą - OCT4<sup>+</sup>/SOX2<sup>+</sup>/KLF4<sup>-</sup>/NANOG<sup>+</sup> (50 pacjentów) oraz dwie mniejsze OCT4<sup>+</sup>/SOX2<sup>+</sup>/KLF4<sup>+</sup>/NANOG<sup>+</sup> (45 pacjentów) i OCT4<sup>+</sup>/SOX2<sup>+</sup>/KLF4<sup>+</sup>/NANOG<sup>-</sup> (14 pacjentów). Dużą część grupy stanowili pacjenci z ekspresją tylko jednego z genów – najczęściej SOX2, ale także NANOG.

Wykonano także następujące korelacje skumulowanej ekspresji genów:

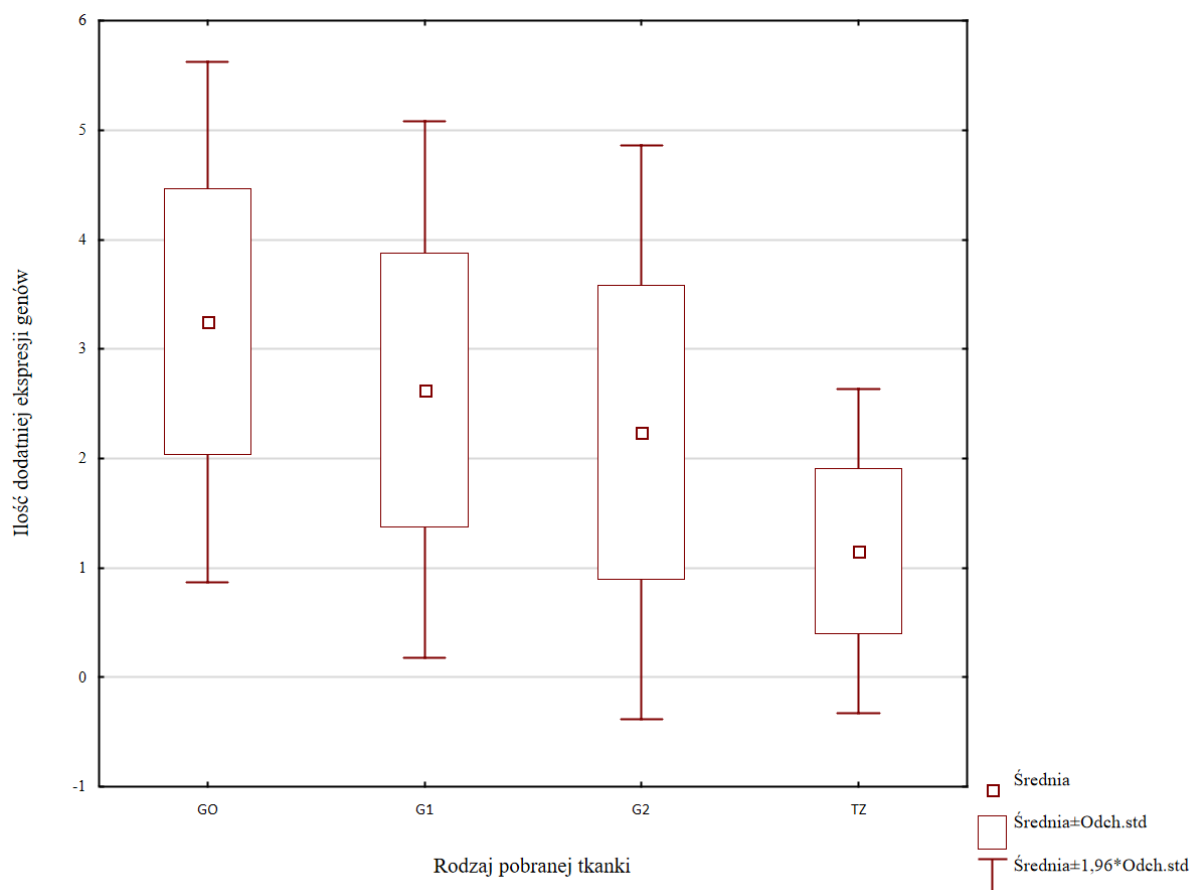
- klasyfikacja Astlera-Collera ( $p=0,0065$ );
- klasyfikacja Dukesa ( $p=0,0465$ );
- pierwotną lokalizacją nowotworu ( $0,0495$ );
- rozpoznaniem histopatologicznym ( $0,0076$ );
- stopnie zróżnicowania nowotworu ( $0,0086$ );
- wielkością guza ( $0,00126$ ).

W podgrupie TZ, czyli w tkance guza pobranej z części centralnej wyodrębniono jedną znaczącą subpopulację:  $OCT4^+/SOX2^-/KLF4^+/NANOG^-$  (30 pacjentów), natomiast zdecydowanie najwięcej pacjentów posiadało jedynie jedną dodatnią ekspresję (80 pacjentów) albo brak ekspresji (27 pacjentów). W przypadku pojedynczej ekspresji najczęściej w tkance zdrowej znajdowano ekspresję KLF4. W TZ nie znaleziono ani jednej równoczesnej koekspresji wszystkich genów badanych. W przypadku podgrupy TZ, dowiedziono że, jedynie palenie papierosów korelowało z koekspresją genów ( $p=0,0204$ ).

Kolejną analizę porównującą skumulowaną ilość ekspresji genów pluripotencji, przeprowadzono w porównaniu z rodzajem tkanki pobranej do badania. Stwierdzono jednoznacznie znaczącą statystycznie różnicę pomiędzy ekspresją genów, a miejscem pobrania tkanki do badania. Największe różnice stwierdzono, pomiędzy tkanką zdrową (TZ), a skumulowaną ekspresją w tkance guza (GO) oraz pomiędzy grupą TZ a odpowiednio grupą G1 i G2. Dodatkowo, obliczono podobne różnice pomiędzy grupą GO a G1 oraz GO a G2. Nie było różnic statystycznych pomiędzy grupami G1 a G2. Wyniki przedstawiono odpowiednio w tabeli oraz za pomocą wykresu [Tabela 4.7.1 oraz Wykres 4.7.1].

**Tabela 4.7.1. Różnice liczby ekspresji genów pluripotencji w poszczególnych tkankach w całej grupie badanej.**

Liczba ekspresji genów pluripotencji [0-4]	GO	G1	G2	TZ
GO	1,00	0,000046	0,000000	0,000000
G1	0,000046	1,00	0,167907	0,000000
G2	0,000000	0,167907	1,00	0,000000
TZ	0,000000	0,000000	0,000000	1,00



**Rycina 4.7.1. Porównanie liczby ekspresji genów w zależności od rodzaju miejsca pobranej tkanki w całej grupie badanej.**

## 5. DYSKUSJA

### 5.1 Omówienie danych demograficznych, klinicznych i histopatologicznych

Na Świecie, co roku odnotowuje się około 1,85 miliona nowych przypadków, co stanowi ponad 10% wszystkich złośliwych nowotworów. Stwierdza się także, że mężczyźni mają zwiększone ryzyko zachorowania jak i też śmiertelności w porównaniu do kobiet o około 50% (100).

W niniejszej pracy, największą grupę stanowili chorzy po 60 roku życia. Jednakże, znaleziono różnice istotne statystycznie pomiędzy stworzonymi podgrupami wiekowymi a: skalą TNM ( $p=0,037$ ) obecnością przerzutów odległych M ( $p=0,03$ ) oraz obecnością neuroinwazji ( $p=0,047$ ). W naszej grupie badanej przeważali mężczyźni i stanowili ponad 56% całej grupy badanej.

Znanymi czynnikami ryzyka są: palenie tytoniu, zwiększone spożycie alkoholu czy nadwaga/otyłość (100). Do regularnego palenia tytoniu lub wyrobów tytoniowych (także e-papierosów) przyznało się 48% badanych (72 chorych). Fakt ten nie miał, jednakże w analizach statystycznych wpływu na częstość ekspresji badanych genów pluripotencji. Jednakże, można zauważyć tendencję, że w grupie z dodatnią ekspresją OCT4, SOX2, NANOG było więcej pacjentów palących wyroby tytoniowe, aczkolwiek nie były to powiązania istotne statystycznie. Jedynie wykazano, że znacząco częściej do palenia papierosów przyznały się osoby pomiędzy 60 a 74 rokiem życia w porównaniu do pozostałych kategorii wiekowych. Nie wykazano w obecnej pracy różnic ekspresji genów pluripotencji pomiędzy w obrębie płci.

Do regularnego nadużywania alkoholu przyznało się 48 z 150 pacjentów, co nie niosło znamienności statystycznej. Nie wykazano, także związku pomiędzy nadużywaniem alkoholu a ekspresją badanych genów. Przyczyną tego stanu może być ukrywanie lub bagatelizowanie ewentualnych problemów ze spożyciem alkoholu u chorych (101).

Grupa badana pod względem BMI klasyfikowała się jako grupa z nadwagą, ponieważ średnia wartość BMI wynosiła 27,50 kg/m<sup>2</sup>. Mężczyźni i kobiety nie różnili się istotnie statystycznie pod względem wartości BMI, co stanowi o jednorodności grupy pod tym względem ( $p=0,58$ ). Mężczyźni mają jednak większe wartości w zakresie średnich wartości masy ciała oraz wzrostu.

W badaniu histopatologicznym ponad 90% pacjentów stanowiły rozpoznania gruczolakoraka. Największą podgrupę wśród gruczolakoraków stanowiły raki cewkowe (ponad 80%) i gruczolakoraki cewkowo-śluzówkowe (12%). Jedynie 3,33% grupę badaną stanowiły



inne rodzaje nowotworów jelita grubego. Nie wykazano różnic statystycznych pomiędzy płciami, jeżeli chodzi o rodzaj rozpoznania histopatologicznego ( $p=0,94$ ).

Dużą wartość powyższej pracy stanowiła analiza innych parametrów badania histopatologicznego. W obecnej pracy, średnia wielkość guza wynosiła  $36,32 \text{ cm}^3$ . Do tego parametr ten porównywano w dalszej kolejności z ekspresją i koekspresją genów i wszystkimi innymi cechami klinicznymi patomorfologicznymi. Parametry te nie różniły się w obrębie płci, ale także w badanych grupach wiekowych czy w zależności od wartości BMI.

Natomiast, u 109 pacjentów wykazano obecność (73%) angioinwazji a aż u 127 (blisko 85%) obecność neuroinwazji. W dotychczasowych publikacjach, parametry te były rzadko przedmiotem badań. Jednakże Nasze nowatorskie analizy wykazały zależność tych parametrów (zwłaszcza angioinwazji) od ekspresji genów badanych. Nie było za to znamiennych różnic w zależności od płci, wieku czy BMI.

W zakresie stopnia zróżnicowania nowotworu 87 przypadków (58% całej grupy) stanowili pacjenci w stopniu 2, a o prawie połowę mniej było pacjentów w stopniu 1 (43 pacjentów). Czynniki te również nie były zależne od płci, wieku czy BMI, jednakże korelowały z koekspresją genów w tkance brzeżnej guza [Grupa G2] ( $p=0,0086$ ).

W przypadku przerzutowania do lokalnych węzłów chłonnych, dochodziło średnio do zajęcia prawie 2,5 węzłów chłonnych (brak różnic w zależności od płci, wieku i BMI). U 13 pacjentów (8,6% grupy badanej) równocześnie z pierwotnym CRC wykryto przerzuty do wątroby, u 7 rozsiałą chorobę nowotworową a u 3 przerzuty do innych narządów odległych (w tym odległych węzłów chłonnych).

Prawie wszyscy pacjenci z rakiem odbytnicy przeszli neoadiuwantową radioterapię (57 z 61 chorych (93,44%). Wpisuje się to w standardowe, przyjęte przez wszystkie Towarzystwa Onkologiczne i Chirurgiczne postępowanie w tym typie nowotworu. Natomiast, według analiz nieznacznie ponad połowa pacjentów (50,33%, 76/150) wymagała adiuwantowej chemioterapii (w kilku przypadkach chemioradioterapii). Z danych, które udało się uzyskać większość pacjentów przyjmowała chemioterapię w schemacie FOLFIRI (rzadziej FOLFOX).

## 5.2. Analiza ekspresji genów pluripotencji i ich implikacja kliniczna

### 5.2.1 SOX2

Rodzina genów SOX składa się obecnie z ponad 20 członków (podzielonych na 8 podgrup – od SOXA do SOXH), którzy pośredniczą w wiązaniu DNA przez domenę HMG i pełnią funkcje regulacyjne w zakresie rozwoju i różnicowaniu komórkowym. Jak już wiadomo ten czynnik transkrypcyjny przyczynia się w różnych mechanizmach do przeprogramowania zróżnicowanych ludzkich komórek somatycznych do stanu pluripotencji (102). Nadekspresja genów SOX2, SOX4, SOX5, SOX8, SOX9 i SOX18 została wykryta w różnych typach nowotworów. Potwierdzono, związane z tym złe rokowanie. Co ciekawe, w literaturze nie znaleziono wielu związków między SOX7, a CRC – choć w ostatnich latach nowe doniesienia na ten temat się pojawiają. Podczas gdy wyżej wspomniani członkowie rodziny SOX w przeważającej mierze sprzyjają rozwojowi i ekspansji nowotworów, SOX7 ma aktywność supresyjną guzów w CRC (103). Innymi wyjątkami jest nadekspresja SOX11 i SOX30, która wydaje się być korzystna w niektórych typach raków u ludzi. SOX2, SOX4, SOX5 i inni członkowie SOX biorą udział w tumorogenezie, np. ekspresja SOX2 jest wyraźnie zwiększona w komórkach, które wykazują znaczną odporność na chemioterapię. Podgrupa SOXF (SOX7, SOX17, SOX18) odgrywa ważną rolę w angiogenezie i limfangiogenezie, przy czym wydają się one być atrakcyjnym celem dla terapii celowanej, a w szczególności leczenia przerzutów (56, 104). Niektórzy z autorów dowiedli, że SOX4 kontroluje rozwój CRC poprzez białko Cyr-61, które bierze udział w adhezji komórek (105). Natomiast SOX10 ma działanie hamujące rozwój guza i następuje jego dezaktywacja, gdy dochodzi do rozwoju CRC (106). Podobna sytuacja występuje w przypadku SOX17, kiedy obniżenie poziomu ekspresji tego czynnika przyczynia się do postępu rozwoju CRC (107). Hamowanie przerzutowania CRC wiąże się również z podwyższeniem ekspresji SOX17 i E-kadheryny (genu CDH-1), podczas którego ich promotory są hipometylowane (108). Z drugiej strony inni autorzy dowodzą, że hipermetylacja promotora SOX17 prowadzi do wyciszenia tego genu, co ułatwia rozwoju CRC (109). Można wywnioskować więc, że badania są sprzeczne w wielu z tych kluczowych dla rozwoju CRC sytuacjach.

W większości z rodzajów nowotworów przewodu pokarmowego wykryto różnego rodzaju deregulację w zakresie ekspresji SOX. W zależności od indywidualnej sytuacji deregulacja ta może oznaczać, że występuje nadekspresja lub wyciszenie ekspresji mRNA i produkcji białek jednego z członka SOX. Dla przykładu, jeśli chodzi o rolę SOX2 w raku

żołądka, obecne wyniki badań są niespójne. Istnieją badania sugerujące, że SOX2 promuje rozwój raka żołądka, ponieważ dowiedziono, że hamuje oraz ogranicza proliferację i migrację komórek, ale zwiększa apoptozę (110). Z drugiej strony, inne badania wskazują na możliwość, że SOX2 może się przyczyniać do hamowania rozwoju raka żołądka (111). Znaczące różnice w tych badaniach można wyjaśnić w następujący sposób: promotory różnych genów mogą być celem w różnych sytuacjach (112). Uznaje się, że SOX2 bierze udział w utrzymywaniu trzustkowych komórek macierzystych. Jego nadekspresja jest również dowiedzionym markerem raka trzustki (113). In vivo przyrost komórek inicjujących nowotwór trzustki wymaga synergistycznej aktywacji przez SOX2 i SOX9 (114). CRC z wysoką ekspresją SOX9 były związane z statystycznie istotnym niższym 5-letnim współczynnikiem przeżycia (115).

Rola SOX2 w CRC stanowi przedmiot intensywnych badań. Ponadto SOX2 to najczęściej opisywany przedstawiciel rodziny SOX w badaniach nad CRC. Wraz z czynnikami transkrypcyjnymi OCT3/4 i KLF4, SOX2 jest zdolny do transdukcji komórek raka jelita grubego do komórek macierzystych raka jelita grubego (116). Okazuje się także, że wysokie poziomy ekspresji SOX2 prowadzą do lekooporności (58). Nadekspresja SOX2 prowadzi do intensywnego promowania komórek pnia CRC i ponadto odgrywa ważną rolę w przerzutowaniu do narządów odległych (117, 118). Jeśli jego translacja jest hamowana przez odpowiednie mikroRNA (*ang. microRNA*, miRNA), takie jak miRNA-203 i miRNA-126, rakotwórczość poszczególnych guzów jest statystycznie zmniejszona (119, 120). Istnieją jednak inne doniesienia, które wskazują, że miRNA-429 hamuje apoptozę przez obniżony poziom SOX2 (121).

W całej sieci pluripotencji SOX2 oraz OCT4 tworzą zespół i jako czynniki transkrypcyjne, mają znaczny wpływ na niekorzystne implikacje prognostyczne w raku jelita grubego (41). Na podstawie jednej z linii komórkowych raka jelita grubego - CaCo2, pokazano, że funkcja transkrypcyjna SOX2 prowadzi do ujemnej ekspresji E-kadheryny i Snail oraz w przeciwieństwie do OCT4, także do zmniejszenia ekspresji wimentyny (122). Autorzy powyższych odkryć wykazali także, że u chorych na CRC ekspresja SOX2 jest odwrotnie skorelowana z ekspresją CDX2 – czyli czynnika transkrypcyjnego odpowiedzialnego m.in. za różnicowanie jelitowe (122). Zmniejszenie poziomu ekspresji CDX2 obserwuje się u około 5% pacjentów z CRC i wiąże się z niekorzystnym rokowaniem (123).

Zwiększenie poziomu ekspresji SOX2 obserwuje się częściej w CRC z obecnością mutacji kinazy protoonkogennej BRAF (*ang. Type B Rapid Accelerated Fibrosarcoma*) V600E

w porównaniu z pacjentami z mutacją BRAF typu dzikiego. Jednakże, nadekspresja SOX2 nie jest obserwowana w przypadkach mutantów K-Ras G12V (124). Dane te dowodzą, że aktywacja sygnalizacji kinazy BRAF przynajmniej w niektórych przypadkach prowadzi do zjawiska pluripotencji i może doprowadzać do nieprawidłowej aktywacji K-Ras. SOX2 jest w stanie indukować wyciszenie linii komórkowych CRC, poprzez zakłócanie funkcji szlaku sygnalizacyjnego Akt/mTOR/pS6/CyklinaD, który to szlak jest aktywowany przez białko K-Ras (125). Zatem mutacja prowadząca do nadmiernej aktywacji białka K-Ras może utrudniać wyciszenie przez SOX2 linii komórkowych CRC, co może być z kolei ważne dla tworzenia komórek macierzystych.

Jedno z badań klinicznych wykazało, że podwyższona ekspresja białka SOX2 istotnie koreluje z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych ( $p = 0,006$ ) i przerzutów odległych ( $p=0,022$ ). Natomiast, jądrowa ekspresja  $\beta$ -kateniny korelowała istotnie tylko z przerzutami odległymi ( $p=0,001$ ). Mniej niż 10% pacjentów wykazywało koekspresję wysokich poziomów  $\beta$ -kateniny i SOX2. W przypadku, gdy następowała koekspresja tych markerów, wiązało się to z bardzo wysokim ryzykiem przerzutów do węzłów chłonnych ( $p=0,007$ ) i przerzutów odległych ( $p=0,028$ ) (58).

W pracy tej wykazano istotnie wyższą ekspresję SOX2 w tkance guza niż w tkance zdrowej ( $p=0,0168$ ). Dalsza ocena poziomu ekspresji wykazała, że znacznie większy poziom ekspresji jakościowej występuje w tkankach guza (jako oznaczenie skumulowane [GO] oraz osobno w części centralnej [G1] i brzeżnej guza [G2]) niż w tkance zdrowej. Natomiast wydaje się (przynajmniej statystycznie), że poziom ekspresji SOX2 w CRC nie różni się istotnie pod względem miejsca pobrania próbki guza ( $p=0,16$ ). W naszych analizach wykazaliśmy także zależność obecności ekspresji SOX2 z wysokim stopniem zaawansowania choroby (wg TNM, ale także skalą Duke'a czy Astlera-Collera) oraz rodzajem rozpoznania histopatologicznego czy angioinwazją. Także wielkość guza ma znaczenie i tak im większy guz tym częstsza ekspresja ( $p=0,0018$ ). Brak, jednakże znalezionych powiązań pomiędzy takimi cechami klinicznymi jak wiek, pierwotna lokalizacja nowotworu (w dwóch przeprowadzonych metodach) oraz BMI.

### 5.2.2 OCT4

Z dotychczasowych badań wynika, że gen OCT4 jest niezbędny do ustalenia i utrzymania pluripotencji w komórkach. Jest to także marker kliniczny o udowodnionym znaczeniu w diagnozowaniu guzów zarodkowych i związany z kilkoma szlakami odpowiedzialnym za rozwój CRC, w tym z sygnalizacją  $\beta$ -kateniny i mutacji K-Ras (41). Ekspresja OCT4 w komórkach CRC prowadzi do zwiększonej ekspresji  $\beta$ -kateniny w jądrze komórkowym, gdzie działa jako czynnik transkrypcyjny powodujący niskie zróżnicowanie, a także indukcję wimentyny, czyli markera EMT. Z drugiej strony, obniżenie aktywności OCT4 spowodowało zmniejszenie migracji in vitro komórek CRC i zmniejszenie średniej ilości przerzutów in vivo u myszy z przeszczepem ksenogenicznym (126). Ponadto inne linie komórek CRC hodowane w warunkach promujących oporność na chemioterapię zwiększają poziom OCT4 zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, a także zwiększają poziom markerów powierzchniowych komórek macierzystych - CD133 i CD44 (127).

Saigusa i wsp. wykazali, że ekspresja OCT4 jest skorelowana z odległym nawrotem raka odbytnicy po chemioterapii (97). Natomiast greccy autorzy, stwierdzili, że poziom ekspresji OCT4 (a konkretniej izoformy OCT4B1) w tkankach CRC były wyższe w porównaniu z sąsiadującymi tkankami nienowotworowymi. Pacjenci w IV stadium wg TNM wykazywali około 5-krotnie wyższy poziom mRNA OCT4B1 niż pacjenci ze stadium I wg TNM ( $p < 0,01$ ) lub 3-krotnie więcej niż pacjenci ze stadium II wg TNM ( $p < 0,05$ ). Dodatkowo wyższa ekspresja mRNA OCT4B1 jest znacząco skorelowana ze stopniem zróżnicowania guzów. Słabo i umiarkowanie zróżnicowane CRC wyrażały wyższy poziom mRNA OCT4B1 niż dobrze zróżnicowane CRC ( $p < 0,05$ ). Jednak ekspresja mRNA OCT4B1 nie była powiązana z żadnymi innymi czynnikami: takimi jak wiek pacjenta, płeć, wielkość guza lub obecność przerzutów do węzłów chłonnych (98).

Jako biomarker CSC u pacjentów z CRC, OCT4 jest związany z gorszym rokowaniem, bardziej agresywnym przebiegiem choroby, krótszym ogólnym przeżyciem i chemioopornością CRC (126, 128). OCT4 jest zaangażowany w utrzymanie rozwoju komórek macierzystych, hamowanie różnicowania komórek macierzystych, promowanie proliferacji komórkowej oraz nowotworzenia, głównie poprzez szlak sygnałowy JAK-STAT i szlak sygnałowy Wnt (49).

Natomiast dane Autora wykazały, że aż 130 pacjentów (80%) prezentowało dodatnią ekspresję OCT4 w tkance guza sumując tkankę brzezną i centralną. Jednakże istotnie statystycznie częstsza ekspresja występowała w tkance centralnej niż brzeżnej ( $p < 0,042$ ). Z kolei w tkance zdrowej znacząco więcej było ekspresji ujemnej (31 vs 119,  $p < 0,0001$ ).

Ostatnie badania wykazały, że wysoki poziom ekspresji OCT4 był związany ze gorszymi wynikami leczenia CRC w obrębie prawej połowy okrężnicy (*ang. Right Colon Cancer, RCC*), ale autorzy tego badania oceniali także ekspresję OCT4 w rakach lewej połowy okrężnicy (*ang. Left Colon Cancer, LCC*). Mediana okresu przeżycia w grupach OCT4-ujemnych i OCT4-dodatnich wyniosła odpowiednio, 68,11 i 48,92 miesiące. Wskaźnik 5-letnich przeżyć w grupach OCT4-ujemnej i OCT4-dodatniej wyniosły odpowiednio, 56,9% oraz 37,5% ( $p < 0,0001$ ). W grupach pacjentów z nawrotem choroby nowotworowej mediana okresów przeżycia w grupach OCT4-ujemnych i OCT4-dodatnich wynosiła odpowiednio, 56,67 i 47,00 miesiące. Ponadto wśród tej samej grupy pacjentów wskaźnik 5-letnich przeżyć w grupach OCT4-ujemnych i OCT4-dodatnich wynosił odpowiednio, 56,9% oraz 37,5% ( $p = 0,01$ ) (129).

Wang i wsp. przeprowadzili analizę, gdzie porównywali obecność i poziom ekspresji genów pluripotencji pomiędzy RCC a LCC. Chociaż nie wykazali żadnej różnicy w ekspresji OCT4 między LCC i RCC, stwierdzili, że poziomy mRNA i białka OCT4 w tkankach i komórkach CRC były znacząco podwyższone w porównaniu z odpowiednimi poziomami w tkance zdrowej i linii komórkowej nabłonka okrężnicy. W kolejnych wnioskach wykazano, że wysoki poziom ekspresji OCT4 był związany z gorszym poziomem zróżnicowania nowotworów zarówno w LCC i korelował z wyższym stopniem w skali Duke'a. W dalszej kolejności wyższy poziom ekspresji OCT4 skorelowany był z niższym zróżnicowaniem nowotworów, inwazją do układu limfatycznego oraz wyższym stopniem w skali Duke'a w RCC. Korelacja z przerzutowaniem do układu limfatycznego dotyczyła tylko RCC. W analizie Kaplana-Meiera powyżej omawiane badanie wykazało, że 5-letni wskaźnik przeżycia dla LCC był znacznie wyższy statystycznie niż dla RCC (130). Podobne wyniki znaleziono we wcześniejszych badaniach, w tym w jednej przeprowadzonej metaanalizie (131).

W niniejszej pracy stwierdzono, przy takim samym podziale lokalizacyjnym jak autorzy powyżej, różnice istotne statystycznie w zakresie skali TNM ( $p = 0,037$ ), stopnia złośliwości G ( $p = 0,0017$ ) oraz angioinwazji ( $p = 0,045$ ). Trzy powyższe cechy miały wyniki znamienne wyższe w przypadku guzów lewej połowy okrężnicy (Grupa L). Jednakże nie znaleziono

jednoznacznych różnic w ekspresji genów (także OCT4) pomiędzy grupą prawej i lewej okrężnicy.

Z drugiej strony, Hu i wsp., nie znaleźli żadnej korelacji między ekspresją OCT4 a badanymi czynnikami klinicznymi i patomorfologicznymi w tym: wiekiem, płcią, rozmiarem guza, stopniem przerzutowania do węzła nowotworowego (cecha N), zróżnicowaniem nowotworu (cecha G), inwazją do naczyń limfatycznych i kształtem guza. Jedynym wnioskiem był znaczący wzrost nawrotów u pacjentów z RCC oraz podwyższoną ekspresją OCT4 (129).

Natomiast w niniejszej, autorzy powyższej dysertacji doktorskiej wykazano istotną różnicę w jakościowej ekspresji OCT4, a następującymi cechami klinicznymi: skali TNM, Astlera-Collera, zaawansowania guza pierwotnego (cecha T), rozpoznania histopatologicznego. Także ekspresja była zależna od wielkości guza. Natomiast nie stwierdzono różnic względem wieku, jeżeli chodzi o pierwotną lokalizację guza czy BMI.

Ciekawym zagadnieniem wydaje się także wpływ chemioterapii na obecność i poziom ekspresji genów pluripotencji. Padín-Iruega i wsp. porównywali poziom ekspresji w krwi obwodowej oraz tkance guza i w różnych sytuacjach klinicznych oraz w zależności od zaawansowania cyklu chemioterapii i odpowiedzi na leczenie. Najpierw porównano pacjentów przed rozpoczęciem chemioterapii z grupą kontrolą (zdrowymi pacjentami). Wykazano znaczące różnice w ekspresji CD133, SOX2, OCT4 i TWIST1 (odpowiednio:  $p=0,0002$ ;  $p=0,0182$ ;  $p=0,0217$ ;  $p=0,0031$ ). Natomiast, kiedy przeanalizowano poziomy tych samych markerów u pacjentów po podaniu pierwszego cyklu chemioterapii i przed podaniem drugiego, uzyskane wyniki były podobne. Istniały znaczące różnice w poziomach ekspresji tych samych markerów: CD133 ( $p = 0,008$ ), SOX2 ( $p = 0,036$ ), OCT4 ( $p = 0,04$ ) i TWIST1 ( $p = 0,0002$ ). Co ważne u pacjenta z progresją guza stwierdzono różnice w poziomach wszystkich badanych markerów. Różnice były znaczące także pomiędzy grupami z „dobrą” i „złą” odpowiedzią na leczenie a grupą kontrolną. Ostatecznie porównano pacjentów po czwartym (ostatnim) cyklu chemioterapii oraz z progresją guza lub bez progresji; ekspresja wszystkich powyższych markerów wykazała znaczące różnice (jednakże, co warte podkreślenia, z wyjątkiem SOX2) (128).

### 5.2.3. KLF4

Znaczenie KLF4 jako czynnika odpowiedzialnego za pluripotencję pojawiło się po raz pierwszy w 2006 roku, na łamach pracy Takahashi i Yamanaki, gdzie po raz pierwszy autorzy ci wykazali, (w specyficznych warunkach hodowlanych) że embrionalne oraz dojrzałe mysie fibroblasty posiadają nadekspresję pluripotencjalnych komórek macierzystych poprzez nadekspresję czterech specyficznych czynników: OCT3/4, SOX2, c-MYC i KLF4 (132).

KLF4 został co ważne po raz pierwszy wykryty w jelitach (83). Dlatego jego rola w CRC wydaje się kluczowa. Dalsze badania nad tkanką jelitową zlokalizowały ekspresję KLF4 w post-mitotycznych, ostatecznie zróżnicowanych kolumnowych komórkach nabłonkowych jelit (133, 134, 135). W nabłonku jelitowym KLF4 odgrywa kilka ważnych ról w regulacji homeostazy nabłonkowej jelit. KLF4 ma ważną rolę w rozwoju i końcowym różnicowaniu komórek kubkowych (85). W badaniach na myszach z delecją KLF4 wykazano, że gen ten jest niezbędny do ostatecznego zróżnicowania enterocytów. W przypadku delecji KLF4, myszy te miały zmniejszoną ekspresję fosfatazy alkalicznej i anhydrazy węglanowej w komórkach szczoteczkowych, zarówno w jelicie cienkim jak i okrężnicy (133). KLF4 może odpowiadać za regulację pozycjonowania komórkowego. Specyficzna dla jelit delecja KLF4 prowadzi do niewłaściwego pozycjonowania komórek Panetha (biorą udział w reakcjach obronnych jelit m.in. w fagocytozie mikroorganizmów), które umiejscawiają się w górnym regionie krypt jelita cienkiego zamiast fizjologicznie u ich podstawy (133). Zgodnie z wykazaną *in vitro* rolą KLF4, jako inhibitora postępu cyklu komórkowego, badania *in vivo* pokazują, że myszy haploidalne z odpowiednim poziomem *Klf4*, mają zwiększoną ekspresję genu kodującego cyklinę D1 (*ang. Gene Protein Coding Protein Cyclin D1, CCND1*) w kryptach jelitowych (133). Gen ten odpowiedzialny jest za regulację ekspresji cykliny D1, natomiast nadekspresja cykliny D1 koreluje z szybkim rozwojem i progresją nowotworów oraz prowadzi bezpośrednio do onkogenezy poprzez wytwarzanie czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (*ang. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF*). Czynniki te z kolei prowadzi np. do nadmiernej angiogenezy (136). Z kolei w innym badaniu myszy z delecją KLF4, wykazywały statystycznie istotny wzrost zarówno liczby, jak i szybkości migracji komórek nabłonkowych (133). Co więcej, udowodniono, że usunięcie KLF4 z nabłonka jelitowego powoduje aktywację genów w obrębie szlaku sygnalizującego Wnt i poprzez to zmniejszenie ekspresji genów odpowiedzialnych za kodowanie regulatorów różnicowania komórkowego. Zupełnie nowym odkryciem jest powiązanie KLF4 z szlakiem sygnałowym Hippo. Wykazano, że szlak ten, poprzez białka YAP1 (*ang. Yes-Associated Protein 1*) i TAZ (*ang. Tafazzin*) promuje



proliferaację komórek macierzystych i progenitorowych, przez wiązanie z czynnikami transkrypcyjnymi TEAD (*ang. Transcriptional Enhancer Factor TEF-1* albo *TEA Domain Family Member 1*) i indukowanie różnicowania progenitorowych komórek do komórek kubkowych przez wiązanie z czynnikiem transkrypcyjnym KLF4 (137). Powyższe fakty stabilizują tym samym kluczową rolę KLF4 w utrzymaniu prawidłowej homeostazy nabłonkowej jelit.

Co ciekawe, nadekspresja szeregu macierzystych czynników transkrypcyjnych wiąże się z niekorzystnymi wynikami przeżycia w poszczególnych podgrupach CRC, podczas gdy nadekspresja KLF4 może być powiązana z poprawą przeżycia (41). Wiele badań wykazało, że ekspresja KLF4 jest często zmniejszona w różnych typach ludzkich nowotworów, takich jak CRC, rak żołądka, rak płaskonabłonkowy przełyku, rak jelita cienkiego, rak prostaty i rak pęcherza moczowego (138, 139, 140, 141). Wykazano, że KLF4 w przypadku raków przewodu pokarmowego, ulega mutacji (głównie metylacji) w obrębie promotora i przez to ostatecznie utracie heterozygotyczności (138). Zgodnie z powyższymi informacjami, okazuje się, że nadekspresja KLF4 zmniejsza *in vivo*, potencjał nowotworowy komórek CRC oraz raka żołądka (142). W tkankach CRC poziom ekspresji KLF4 jest niższy w porównaniu z sąsiadującą tkanką nienowotworową ( $p < 0,0001$ ). Autorzy, nie znaleźli, różnic statystycznych w zakresie wieku badanych, natomiast istotnie częściej tkanka nowotworowa KLF4-pozytywna występowała u mężczyzn oraz u chorych na poziomie zaawansowania choroby I oraz III wg TNM. Za pomocą regresji logistycznej autorzy zaobserwowali trend, pokazujący, że prawdopodobieństwo ekspresji KLF4 w wyższych stadiach nowotworów jest coraz mniejsze. Natomiast poziom ekspresji KLF4 jest odwrotnie skorelowany ze stopniem zaawansowania nowotworów i przeżywalnością. W analizach jedno- i wielowymiarowych KLF4 był istotnym predyktorem wolnego od choroby przeżycia ( $p = 0,0486$ ) i nawrotu nowotworu ( $p = 0,0427$ ) (143).

W obecnym badaniu również można dojść do wniosku, że częstość ekspresji KLF4 jest znacznie niższa w tkance nowotworowej niż zdrowej. 115 próbek tkanki zdrowej wykazywało dodatnią ekspresję KLF4, zarówno u kobiet i mężczyzn (oraz całej grupie badanej) poziom ekspresji był znamienne wyższy niż w tkance guza (G0) oraz w tkance centralnej i brzeżnej guza (G1 i G2). Natomiast większą ekspresją w obrębie tkanek guza charakteryzowała się centralna część guza niż jego część brzeżna ( $p < 0,0001$ ).

Dowodzono, że ekspresja KLF4 (w grupach G0 i G2) różniła się względem skali Astlera-Collera oraz w przypadku stwierdzenia angioinwazji (wartość  $p$  odpowiednio 0,0047,

0,0247, 0,0126 oraz 0,0413). W przypadku tego genu wielkość guza odwrotnie korelowała z obecnością ekspresji KLF4 w podgrupach GO i G2.

Nie wykazano istotnie statystycznych różnic w zakresie ekspresji KLF4 skalami klinicznymi, lokalizacją CRC, wiekiem czy współczynnikiem BMI.

#### 5.2.4. NANOG

Czynnik transkrypcyjny NANOG ma zasadnicze znaczenie w indukcji i utrzymywaniu się komórek CSC, i jest obserwowany u większości pacjentów z CRC w badaniach immunohistochemicznych nawet we wczesnych stadiach choroby (144). Kilku autorów potwierdziło, że największą ekspresję NANOG można stwierdzić w obrębie cytoplazmy komórkowej – szczególnie w przypadku CRC (145). Jest dobrze udokumentowane, że NANOG jest regulowany przez dwa inne czynniki – OCT3/4 oraz SOX2 (146). O powiązaniu tych czynników świadczy także fakt, że w sytuacji wyciszenia NANOG równolegle dochodzi do obniżenia poziomu ekspresji dwóch powyższych czynników transkrypcyjnych (147).

U pacjentów z CRC wysoki poziom ekspresji NANOG wiąże się bardziej zaawansowanymi stadiami raka oraz znacznie gorszym rokowaniem (82). Jest wysoce prawdopodobne, że rola NANOG w CRC jest krytycznie ważna, ponieważ nadekspresja NANOG1 w komórkach CRC sprzyja jego proliferacji (82). Pozostaje niejasne, czy NANOG1 czy NANOGP8 jest główną postacią, która ulega ekspresji w komórkach CRC, a ekspresja i lokalizacja NANOG w tych komórkach nie zostały dobrze udokumentowane. Udowodniono, że ekspresja izoformy NANOGP8 jest dominująca w komórkach sferycznych linii komórkowych CRC, ale także w komórkach przerzutowych. Wykazano znacząco różny poziom ekspresji NANOG oraz NANOGP8 w komórkach pacjentów z CRC (145).

Egipscy autorzy wykazali z kolei korelacje i potencjalną użyteczność NANOG wraz z innymi badanymi czynnikami. Nadekspresja genów NANOG, p38 $\alpha$  (albo MAPK14, *ang. Mitogen-Activated Protein Kinase 14*), NCF2 (*ang. Neutrophil Cytosolic Factor 2*), ELF (*ang. E74-like Factor*) i TGF- $\beta$  w przypadkach gruczolakoraków oraz gruczolaków może mieć wartość diagnostyczną. Z kolei SIRT-1 i NANOG są wysoce skorelowanymi markerami biologicznymi i mogą służyć w diagnozowaniu i monitorowaniu pacjentów z gruczolakorakiem (148).

W powyższej analizie jakościowej genu NANOG stwierdzono, że ekspresja tego czynnika jest niska w tkance zdrowej – tylko u 18 pacjentów stwierdzono jednoznacznie

ekspresję. Natomiast, odwrotna sytuacja wystąpiła w przypadku ekspresji NANOG w obrębie guza. Patrząc na ogół ekspresji aż u 130 z 150 pacjentów wykazano pozytywną ekspresję NANOG. Dodatkowo, co warto podkreślić w części centralnej guza 111 próbek było pozytywnych do 98 w części brzeżnej. Stwierdzono znacznie istotną różnicę statystyczną pomiędzy poziomem ekspresji w tkance zdrowej oraz tkance guza ( $p < 0,0001$ ). Nie wykazano różnic w ekspresji pomiędzy centralną częścią guza a częścią brzeżną, ale wynik wartości istotności statystycznej był bliski ustalonemu poziomowi istotności statystycznej ( $p = 0,09$ ).

Wykazano, że obecność ekspresji NANOG może być zależna nie tylko od stopnia zróżnicowania guza pierwotnego, ale również od ostatecznego rozpoznania histopatologicznego, obecności angioinwazji w badaniu histopatologicznym oraz od wyniku w skali Astlera-Collera. Wszystkie te czynniki są bardzo mocno związane z postawieniem ostatecznej diagnozy po otrzymaniu przez klinicystę badania histopatologicznego. Poziom ekspresji nie zależał z kolei od tak ważnych czynników klinicznych jak: wiek, BMI czy lokalizacja nowotworu. Można, z drugiej strony dojść do wniosku, że powyższe czynniki będą jednolite u wszystkich pacjentów z CRC oraz badanym poziomem ekspresji NANOG.

Nie znaleziono dotychczas w literaturze, żadnych jednoznacznie sformułowanych doniesień o związku ekspresji NANOG z tak wieloma konkretnymi czynnikami klinicznymi i patomorfologicznymi, dlatego też dane powyższej pracy doktorskiej wydają się niezwykle nowatorskie.

#### **5.2.5. Wzajemne powiązania pomiędzy pluripotencjalnymi czynnikami transkrypcyjnymi.**

Eksperymentalnie transdukcja trzech pluripotencjalnych czynników transkrypcyjnych: OCT4, SOX2 i KLF4 do komórek CRC prowadzi do nabycia właściwości komórek macierzystych i zwiększonej rakotwórczości u myszy (116).

Saigusa i wsp., wykazali znacząco dodatnie korelacje między ekspresją trzech genów pluripotencji (CD133, SOX2 i OCT4) u pacjentów z CRC po chemioradioterapii. Pacjenci, u których wystąpił odległy nawrót, mieli wyższy poziom trzech genotypów w porównaniu z tymi bez nawrotu guza resztkowego po chemioradioterapii. Podwyższone poziomy ekspresji genów były istotnie statystycznie związane ze znacznie krótszym czasem przeżycia wolnym od choroby nowotworowej (97).

Amini i wsp., wykryli obecność ekspresji OCT4 we wszystkich (100%) próbkach guzów okrężnicy, pęcherza i prostaty, a także w liniach komórek raka wątroby. Ekspresję NANOG wykryli natomiast, w 100% próbek pacjentów z CRC, 90% próbek raka pęcherza moczowego i 80% próbek raka prostaty. Ekspresja genu SOX2 była dodatnia w 60% (3 z 5 próbek). Wykazano istotne związki między stopniem zaawansowania guza a obecnością ekspresji powyższych genów. W próbkach przypadków z CRC 40% do 100% genów ulegało ekspresji w stopniu I, 70% w stopniu II i 60% do 80% w guzach stopnia III. Niestety, znaczącym ograniczeniem powyższego badania jest bardzo mała liczebność grup badanych (149).

Inni badacze, za pomocą badania immunohistochemicznego, hybrydyzacji in-situ oraz odwrotnej ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (*ang. quantitative reverse transcription real-time*, RT-qPCR), ocenili transkrypcje i translokacje OCT4, SOX2, KLF4, NANOG i c-MYC w komórkach iPSC. Autorzy wykazali obecność na poziomie translacji i transkrypcji wszystkich pięciu czynników transkrypcyjnych. Natomiast, na podstawie ekspresji białek zidentyfikowano dwie subpopulacje: nabłonkową NANOG<sup>+</sup>/OCT4<sup>-</sup> oraz stromalną (macierzystą) OCT4<sup>+</sup>/NANOG<sup>-</sup>. Nie dowiedziono, ze względu na prawdopodobnie zbyt małą liczebność badanej grupy różnic w ekspresji pomiędzy nisko a wysoko zróżnicowanymi CRC (144).

Humphries i wsp., zbadali 9 próbek guzów przerzutowych CRC do wątroby pod kątem ekspresji NANOG, OCT4, SOX2, KLF4 i c-MYC. Wykazano obecność ekspresji wszystkich powyższych czynników i za pomocą immunohistochemii oraz hybrydyzacji in-situ autorzy przedstawili subpopulacje komórkowe w części centralnej guza: SOX2<sup>+</sup>/NANOG<sup>+</sup>/KLF4<sup>+</sup>/c-MYC<sup>+</sup>/OCT4<sup>-</sup>, oraz dwie subpopulacje obwodowe: SOX2<sup>+</sup>/NANOG<sup>+</sup>/KLF4<sup>+</sup>/c-MYC<sup>+</sup>/OCT4<sup>-</sup> i SOX2<sup>+</sup>/NANOG<sup>+</sup>/KLF4<sup>+</sup>/c-MYC<sup>+</sup>/OCT4<sup>+</sup> (150).

Natomiast, niezwykle interesujące rezultaty powyższej pracy doktorskiej, wskazują, że koekspresja badanych genów pluripotencji, ma istotny wpływ na wiele cech klinicznych i histopatologicznych. Należy podkreślić, że w przypadku tkanek pobranych z guza dominują różne warianty koekspresji OCT4, SOX2, KLF4, NANOG, z wyraźnie dominującą koekspresją wszystkich tych czynników. W grupie G0 aż ponad 91 pacjentów (60,67%) posiadało równoczesną ekspresję wszystkich badanych genów. Jednakże, badając osobno grupę G1 i G2, zauważono że liczba pacjentów z pełną koekspresją uległa zmniejszeniu i tak w przypadku G1 mamy tylko 53 takich pacjentów a G2 – 45 pacjentów. Najczęstszym czynnikiem, którego ekspresja nie współlistnieje z pozostałymi jest KLF4. Wynik ten koreluje także, z częścią

wcześniej przedstawionych wyników. Natomiast, w grupie G2 aż 50 pacjentów ma genotyp OCT4<sup>+</sup>/SOX2<sup>+</sup>/KLF4<sup>+</sup>/NANOG<sup>+</sup> (w grupie G1 – 41 pacjentów).

Z drugiej strony wyniki w grupie TZ pokazują, że tkanka ta jest stosunkowo uboga, zarówno jeżeli chodzi o ekspresję badanych genów, jak i koekspresję. I tak aż 80 (53,33%) pacjentów posiadało ekspresję tylko jednego z genów (najczęściej SOX2 i KLF4), u 27 pacjentów nie stwierdzono ekspresji żadnego z powyższych czynników transkrypcyjnych. Wykazano, że statystycznie więcej pacjentów z ekspresją lub koekspresją w TZ paliło papierosy lub inne wyroby tytoniowe ( $p=0,0204$ ), co niestety może wpływać na użyteczność badania tych genów u palaczy.

Ilość genów, które uległy ekspresji w tkankach G1, G2 oraz GO, różniła się istotnie względem grupy TZ ( $p<0,00001$ ). Również, gdy porównać zsumowaną grupę GO do G1 i G2 to stwierdzono różnice statystycznie. Jedynie, nie można dowieść różnic pomiędzy grupami G1 i G2, co pokazuje, że obie lokalizacje, skąd pobieramy tkankę guza, są podobnej jakości klinicznej.

W grupach tkanki nowotworowej (GO, G1 i G2), znaleziono bardzo wiele istotnych zależności. Potwierdzono, że stopień zaawansowania choroby (według ocenianych klasyfikacji), jest zależny od poziomu i rodzaju koekspresji. Także lokalizacja pierwotna nowotworu ma znaczenie i większą koekspresję genów badanych obserwuje się w guzach esicy oraz odbytnicy. Inne udowodnione selektywnie cechy to rozpoznanie histopatologiczne, stopień zróżnicowania nowotworu czy obecność przerzutów odległych (cecha M).

Wydaje się, więc, że to właśnie badanie koekspresji genów pluripotencji zyskuje największą wartość kliniczną u pacjentów. Dalsze analizy w tym zakresie będą miały wobec tego najlepsze przełożenie i realny wpływ na diagnostykę i leczenie pacjentów z CRC.

### 5.3. Ograniczenia badania

W obliczu ogromnego problemu epidemiologicznego jakim jest CRC, ograniczeniem powyższego badania jest liczba badanych pacjentów. Jednak badanie to miało na celu ocenę ekspresji 4 genów pluripotencji. Opracowana metodyka zakładała pobranie od każdego pacjenta aż 3 próbek z preparatu histopatologicznego. Ostatecznie dało to blisko 2500 analiz ekspresji genów (genów pluripotencji oraz genu referencyjnego). Wiązały się z tym bardzo duże koszty finansowe oraz czasowe.

Drugim ograniczeniem jest bardzo heterogenna grupa chorych. Chociaż większość danych wskazuje na brak różnic istotnych statystycznie w zakresie np. wieku pomiędzy płciami czy różnic w BMI oraz klasyfikacjach zaawansowania nowotworu to cała grupa była mocno zdominowana przez guzy esicy, zagięcia esiczo-odbytniczego oraz odbytnicy. Właściwszym wydawałby się, lepszy dobór i ewentualna randomizacja grupy badanej (większe zrównoważenie pomiędzy nowotworami prawej i lewej połowy okrężnicy). Także w zakresie kategorii wiekowych (co oczywiście zgodne z danymi epidemiologicznymi) zebrana grupa była zdecydowanie w wieku znacznie zaawansowanym (średnia ponad 67 lat), przez co trudno było porównać te dane względem nowotworów powstałych we względnie młodym wieku (poniżej 40 roku życia), których etiologia może być mocno związana z aspektem genetycznym.

Trzecim ograniczeniem wydaje się brak dokładnej oceny ekspresji ilościowej, która mogłaby adekwatniej określić ewentualne zależności i różnice pomiędzy danymi klinicznymi, histopatologicznym i doprowadzić do lepszej oceny przydatności powyższych genów pluripotencji.

Ostatnim, w ocenie autora poważnym ograniczeniem jest brak długoterminowej obserwacji wyników leczenia i przeżycia pacjenta co mogłoby prowadzić do bardzo ważnych, klinicznie istotnych i ciekawych wniosków.

## 5.4. Perspektywy i dalsze plany

Tworząc pomysł na badanie będące tematem pracy Autora, jego metodologię oraz opracowując wyniki dostrzeżono wiele ograniczeń tego działania, jednak wyniki ujawniły bardzo wiele potencjalnych przyszłych możliwości rozwoju powyższego tematu w aspekcie zarówno badań podstawowych oraz klinicznych. Poniżej przedstawiono listę możliwych kierunków jego rozwoju:

- zwiększenie liczebności grupy badanej oraz ponowna ocena powiązań względem parametrów demograficznych, klinicznych oraz patomorfologicznych. Część wyników analiz statystycznych była na granicy istotności a zwiększenie grup badanych mogłoby spowodować dokładniejszą ocenę i wyciągnięcie w części przypadków nowych wniosków. Jednym z mechanizmów do tego potrzebnych, wydaje się współpraca międzyośrodkowa i przeprowadzenie w przyszłości badań kohortowych;

- poszerzenie badania o całościową analizę ilościową ekspresji powyższych genów. Analiza ta zdaje się kluczowa do pełnej oceny i weryfikacji powyższych i tak rozległych i ciekawych wniosków. Jednakże, wiąże się z ogromnym nakładem pieniężnym i czasowym;

- ocena na poziomie komórkowym ekspresji produktów powyższych genów (białek) i ich wpływ na dalsze losy komórek, tkanek i całego organizmu. Obecnie bardzo szeroko badany temat na całym świecie pozwalający lepiej zrozumieć rolę powyższych genów w naszym organizmie;

- poszerzenie tematyki o ekspresje jakościową i ilościową pozostałych (szczególnie nowych) czynników transkrypcyjnych odgrywających rolę w rozwoju litych guzów oraz innych nowotworów w ludzkim organizmie. Można wymienić choćby takie czynniki jak: Bmi2, LIN28B, c-MYC, CD133, p53 i wiele innych;

- ocena na poziomie komórkowym mediatorów szlaków sygnałowych, które wydają się być kluczowe do wykorzystania i tworzenia ewentualnych inhibitorów powyższych czynników. Może to potencjalnie doprowadzić do stworzenia miejsc hamowania rozwoju CRC;

- zbadanie ekspresji powyższych czynników transkrypcyjnych w obrębie węzłów chłonnych przerzutowych (lokalnych i odległych) oraz w obrębie zmian przerzutowych, szczególnie do innych narządów;

- badanie powyższych czynników w innych stanach chorobowych jelita grubego, takich jak: w dziedzicznych oraz przypadkowo wykrytych polipach jelita grubego czy chorobach zapalnych jelita grubego. Pozwoliłoby to ewentualnie na porównanie i wpływ innych chorób jelita grubego, które w części są uznawane jako stany predysponujące lub stany przednowotworowe;

- konieczne zebranie danych i dalsza ich analiza danych na temat odległych wyników leczenia oraz czasu przeżycia wolnego od progresji choroby nowotworowej (*ang. Progression-Free Survival, PFS*) oraz przeżycia całkowitego (*ang. Overall Survival, OS*). To obecnie jeden z ważniejszych wskaźników w pracach badawczych, po którym ocenia się skuteczność terapii i szacuje czynniki, mogące mieć wpływ na lepsze bądź gorsze wyniki ostateczne.



## 5.5. Wnioski

W rezultacie analizy otrzymanych wyników oraz porównaniu ich z aktualną wiedzą medyczną oraz literaturą, Autor przedstawia poniższe wnioski zgodnie z założonymi celami (hipotezami) pracy:

1. Wykazano ekspresję (na różnych poziomach) badanych czynników transkrypcyjnych (OCT4, SOX2, KLF4 i NANOG) we wszystkich rodzajach badanych tkanek.

2. Udowodniono znaczące różnice w poziomie ekspresji jakościowej w zależności od stanu klinicznego pacjenta, większości cech patomorfologicznych guza, klasyfikacji klinicznych czy wpływu niektórych czynników klinicznych.

3. OCT4, KLF4, SOX2, NANOG mogą być ważnymi czynnikami przesiewowymi, i można je uznać potencjalnie za uniwersalne i atrakcyjne w kontekście ewentualnych badań populacyjnych.

Podsumowując, powyższe badanie pokazuje bardzo duży potencjał związany z tematyką genów pluripotencji w CRC. Oczywiście, pomimo wielu elementów, które wymagają dalszego opracowania i poszerzenia, powyższe badanie i jego wyniki wskazują na bardzo obiecującą rolę badanych czynników transkrypcyjnych jako predyktorów stadium i rozwoju progresji choroby.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Wojciechowska U. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. . In: *Didkowska J*, editor. <http://onkologia.org.pl/raporty>: Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy.; 2020.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
3. Syriopoulou E, Morris E, Finan PJ, Lambert PC, Rutherford MJ. Understanding the impact of socioeconomic differences in colorectal cancer survival: potential gain in life-years. *Br J Cancer*. 2019;120(11):1052-8.
4. Weisburger JH. Lifestyle, health and disease prevention: the underlying mechanisms. *Eur J Cancer Prev*. 2002;11 Suppl 2:S1-7.
5. Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients*. 2019;11(1).
6. McNabb S, Harrison TA, Albanes D, Berndt SI, Brenner H, Caan BJ, et al. Meta-analysis of 16 studies of the association of alcohol with colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2020;146(3):861-73.
7. Yao Y, Suo T, Andersson R, Cao Y, Wang C, Lu J, et al. Dietary fibre for the prevention of recurrent colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;1:CD003430.
8. Keller DS, Windsor A, Cohen R, Chand M. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. *Tech Coloproctol*. 2019;23(1):3-13.
9. Stoffel EM. Updates on Translational Research on Prevention of Polyps and Colorectal Cancer. *Clin Colon Rectal Surg*. 2018;31(3):153-60.
10. Mangas-Sanjuan C, Jover R, Cubiella J, Marzo-Castillejo M, Balaguer F, Bessa X, et al. Endoscopic surveillance after colonic polyps and colorectal cancer resection. 2018 update. *Gastroenterol Hepatol*. 2019;42(3):188-201.
11. StatPearls. 2020.
12. Carr S, Kasi A. Familial Adenomatous Polyposis. *Stat Pearls*: StatPearls Publishing; 2020.
13. Linhart H, Bormann F, Hutter B, Brors B, Lyko F. Genetic and epigenetic profiling of a solitary Peutz-Jeghers colon polyp. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2017;3(3): a001610.

14. Ma H, Brosens LAA, Offerhaus GJA, Giardiello FM, de Leng WWJ, Montgomery EA. Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. *Pathology*. 2018;50(1):49-59.
15. Michailidi C, Theocharis S, Tsourouflis G, Pletsas V, Kouraklis G, Patsouris E, et al. Expression and promoter methylation status of hMLH1, MGMT, APC, and CDH1 genes in patients with colon adenocarcinoma. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015;240(12):1599-605.
16. Sinicrope FA. Lynch Syndrome-Associated Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(8):764-73.
17. Lung MS, Trainer AH, Campbell I, Lipton L. Familial colorectal cancer. *Intern Med J*. 2015;45(5):482-91.
18. Hermanek P. Colorectal carcinoma: histopathological diagnosis and staging. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 1989;3(3):511-29.
19. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3):153-73.
20. Puppa G, Sonzogni A, Colombari R, Pelosi G. TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(6):837-52.
21. Bipat S, Glas AS, Slors FJ, Zwinderman AH, Bossuyt PM, Stoker J. Rectal cancer: local staging and assessment of lymph node involvement with endoluminal US, CT, and MR imaging--a meta-analysis. *Radiology*. 2004;232(3):773-83.
22. den Dulk M, Putter H, Collette L, Marijnen CAM, Folkesson J, Bosset JF, et al. The abdominoperineal resection itself is associated with an adverse outcome: the European experience based on a pooled analysis of five European randomised clinical trials on rectal cancer. *Eur J Cancer*. 2009;45(7):1175-83.
23. Ricci-Vitiani L, Fabrizi E, Palio E, De Maria R. Colon cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87(11):1097-104.
24. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007;445(7123):111-5.
25. Takebe N, Ivy SP. Controversies in cancer stem cells: targeting embryonic signaling pathways. *Clin Cancer Res*. 2010;16(12):3106-12.
26. Werbowetski-Ogilvie TE, Bhatia M. Pluripotent human stem cell lines: what we can learn about cancer initiation. *Trends Mol Med*. 2008;14(8):323-32.

27. Ji J, Werbowetski-Ogilvie TE, Zhong B, Hong SH, Bhatia M. Pluripotent transcription factors possess distinct roles in normal versus transformed human stem cells. *PLoS One*. 2009;4(11):e8065.
28. Pandurangan AK, Divya T, Kumar K, Dineshbabu V, Velavan B, Sudhandiran G. Colorectal carcinogenesis: Insights into the cell death and signal transduction pathways: A review. *World J Gastrointest Oncol*. 2018;10(9):244-59.
29. Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol*. 2016; 11:47-76.
30. Pópulo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(2):1886-918.
31. Simioni C, Cani A, Martelli AM, Zauli G, Tabellini G, McCubrey J, et al. Activity of the novel mTOR inhibitor Torin-2 in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential to prevent Akt reactivation. *Oncotarget*. 2014;5(20):10034-47.
32. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004;18(16):1926-45.
33. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124(3):471-84.
34. Goś M. Rola przejścia epitelialno-mezenchymalnego w progresji nowotworów. . In: Miłoszewska J, Przybyszewska M, editors. *Postępy Biochem*. 2009. p. 121-8.
35. Fortin J, Mak TW. Targeting PI3K Signaling in Cancer: A Cautionary Tale of Two AKTs. *Cancer Cell*. 2016;29(4):429-31.
36. Colakoglu T, Yildirim S, Kayaselcuk F, Nursal TZ, Ezer A, Noyan T, et al. Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence? *Am J Surg*. 2008;195(6):719-25.
37. Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal*. 2009;21(4):470-6.
38. Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J*. 2008;415(3):333-44.
39. Zhang L, Chen C, Duanmu J, Wu Y, Tao J, Yang A, et al. Cryptotanshinone inhibits the growth and invasion of colon cancer by suppressing inflammation and tumor angiogenesis through modulating MMP/TIMP system, PI3K/Akt/mTOR signaling and HIF-1 $\alpha$  nuclear translocation. *Int Immunopharmacol*. 2018; 65:429-37.

40. Lin F, Lin P, Zhao D, Chen Y, Xiao L, Qin W, et al. Sox2 targets cyclinE, p27 and survivin to regulate androgen-independent human prostate cancer cell proliferation and apoptosis. *Cell Prolif.* 2012;45(3):207-16.
41. Voutsadakis IA. Pluripotency transcription factors in the pathogenesis of colorectal cancer and implications for prognosis. *Biomark Med.* 2015;9(4):349-61.
42. Shan J, Shen J, Liu L, Xia F, Xu C, Duan G, et al. Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2012;56(3):1004-14.
43. Yao C, Su L, Shan J, Zhu C, Liu L, Liu C, et al. IGF/STAT3/NANOG/Slug Signaling Axis Simultaneously Controls Epithelial-Mesenchymal Transition and Stemness Maintenance in Colorectal Cancer. *Stem Cells.* 2016;34(4):820-31.
44. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1653(1):1-24.
45. Polakis P. Drugging Wnt signalling in cancer. *EMBO J.* 2012;31(12):2737-46.
46. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006;127(3):469-80.
47. Johnson ML, Rajamannan N. Diseases of Wnt signaling. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006;7(1-2):41-9.
48. Koziański K, Dobrzyń A. [Wnt signaling pathway--its role in regulation of cell metabolism]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2013; 67:1098-108.
49. Madeja ZE, Hryniewicz K, Orsztynowicz M, Pawlak P, Perkowska A. WNT/ $\beta$ -catenin signaling affects cell lineage and pluripotency-specific gene expression in bovine blastocysts: prospects for bovine embryonic stem cell derivation. *Stem Cells Dev.* 2015;24(20):2437-54.
50. Voutsadakis IA. Pathogenesis of colorectal carcinoma and therapeutic implications: the roles of the ubiquitin-proteasome system and Cox-2. *J Cell Mol Med.* 2007;11(2):252-85.
51. Li J, Chen B. Oct4 was a novel target of Wnt signaling pathway. *Mol Cell Biochem.* 2012;362(1-2):233-40.
52. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998;281(5382):1509-12.
53. Parenti S, Montorsi L, Fantini S, Mammoli F, Gemelli C, Atene CG, et al. KLF4 Mediates the Effect of 5-ASA on the  $\beta$ -Catenin Pathway in Colon Cancer Cells. *Cancer Prev Res (Phila).* 2018;11(8):503-10.
54. Liu K, Lin B, Zhao M, Yang X, Chen M, Gao A, et al. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cell Signal.* 2013;25(5):1264-71.

55. Kumar P, Mistri TK. Transcription factors in SOX family: Potent regulators for cancer initiation and development in the human body. *Semin Cancer Biol.* 2019.
56. Grimm D, Bauer J, Wise P, Krüger M, Simonsen U, Wehland M, et al. The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2019.
57. Fang X, Yu W, Li L, Shao J, Zhao N, Chen Q, et al. ChIP-seq and functional analysis of the SOX2 gene in colorectal cancers. *OMICS.* 2010;14(4):369-84.
58. Neumann J, Bahr F, Horst D, Kriegl L, Engel J, Luque RM, et al. SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer. *BMC Cancer.* 2011; 11:518.
59. Uozaki H, Barua RR, Minhua S, Ushiku T, Hino R, Shinozaki A, et al. Transcriptional factor typing with SOX2, HNF4aP1, and CDX2 closely relates to tumor invasion and Epstein-Barr virus status in gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011;4(3):230-40.
60. Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG, et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet.* 2009;41(11):1238-42.
61. Liu A, Yu X, Liu S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. *Chin J Cancer.* 2013;32(9):483-7.
62. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* 2003;113(5):643-55.
63. Scerbo P, Markov GV, Vivien C, Kodjabachian L, Demeneix B, Coen L, et al. On the origin and evolutionary history of NANOG. *PLoS One.* 2014;9(1):e85104.
64. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 2003;113(5):631-42.
65. Oh JH, Do HJ, Yang HM, Moon SY, Cha KY, Chung HM, et al. Identification of a putative transactivation domain in human Nanog. *Exp Mol Med.* 2005;37(3):250-4.
66. Do HJ, Lee WY, Lim HY, Oh JH, Kim DK, Kim JH, et al. Two potent transactivation domains in the C-terminal region of human NANOG mediate transcriptional activation in human embryonic carcinoma cells. *J Cell Biochem.* 2009;106(6):1079-89.
67. Wang J, Levasseur DN, Orkin SH. Requirement of Nanog dimerization for stem cell self-renewal and pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(17):6326-31.
68. Booth HA, Holland PW. Eleven daughters of NANOG. *Genomics.* 2004;84(2):229-38.

69. Hart AH, Hartley L, Ibrahim M, Robb L. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev Dyn*. 2004;230(1):187-98.
70. Ambady S, Malcuit C, Kashpur O, Kole D, Holmes WF, Hedblom E, et al. Expression of NANOG and NANOGP8 in a variety of undifferentiated and differentiated human cells. *Int J Dev Biol*. 2010;54(11-12):1743-54.
71. Zhang J, Espinoza LA, Kinders RJ, Lawrence SM, Pfister TD, Zhou M, et al. NANOG modulates stemness in human colorectal cancer. *Oncogene*. 2013;32(37):4397-405.
72. Liu CW, Li CH, Peng YJ, Cheng YW, Chen HW, Liao PL, et al. Snail regulates Nanog status during the epithelial-mesenchymal transition via the Smad1/Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 2014;5(11):3880-94.
73. Gong S, Li Q, Jeter CR, Fan Q, Tang DG, Liu B. Regulation of NANOG in cancer cells. *Mol Carcinog*. 2015;54(9):679-87.
74. Jeter CR, Liu B, Liu X, Chen X, Liu C, Calhoun-Davis T, et al. NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene*. 2011;30(36):3833-45.
75. Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, Ngwabyt SN, Borges I, Ruiz i Altaba A. NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *EMBO J*. 2010;29(15):2659-74.
76. Du Y, Ma C, Wang Z, Liu Z, Liu H, Wang T. Nanog, a novel prognostic marker for lung cancer. *Surg Oncol*. 2013;22(4):224-9.
77. Nagata T, Shimada Y, Sekine S, Hori R, Matsui K, Okumura T, et al. Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer. *Breast Cancer*. 2014;21(1):96-101.
78. Lu Y, Zhu H, Shan H, Lu J, Chang X, Li X, et al. Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett*. 2013;340(1):113-23.
79. Siu MK, Wong ES, Kong DS, Chan HY, Jiang L, Wong OG, et al. Stem cell transcription factor NANOG controls cell migration and invasion via dysregulation of E-cadherin and FoxJ1 and contributes to adverse clinical outcome in ovarian cancers. *Oncogene*. 2013;32(30):3500-9.
80. Noh KH, Lee YH, Jeon JH, Kang TH, Mao CP, Wu TC, et al. Cancer vaccination drives Nanog-dependent evolution of tumor cells toward an immune-resistant and stem-like phenotype. *Cancer Res*. 2012;72(7):1717-27.
81. Noh KH, Kim BW, Song KH, Cho H, Lee YH, Kim JH, et al. Nanog signaling in cancer promotes stem-like phenotype and immune evasion. *J Clin Invest*. 2012;122(11):4077-93.

82. Meng HM, Zheng P, Wang XY, Liu C, Sui HM, Wu SJ, et al. Over-expression of Nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther.* 2010;9(4):295-302.
83. Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem.* 1996;271(33):20009-17.
84. Ghaleb AM, Nandan MO, Chanchevalap S, Dalton WB, Hisamuddin IM, Yang VW. Krüppel-like factors 4 and 5: the yin and yang regulators of cellular proliferation. *Cell Res.* 2005;15(2):92-6.
85. Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Lee CS, Labosky PA, Yang VW, et al. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development.* 2002;129(11):2619-28.
86. Segre JA, Bauer C, Fuchs E. Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet.* 1999;22(4):356-60.
87. Panigada M, Porcellini S, Sutti F, Doneda L, Pozzoli O, Consalez GG, et al. GKLF in thymus epithelium as a developmentally regulated element of thymocyte-stroma cross-talk. *Mech Dev.* 1999;81(1-2):103-13.
88. Behr R, Kaestner KH. Developmental and cell type-specific expression of the zinc finger transcription factor Krüppel-like factor 4 (Klf4) in postnatal mouse testis. *Mech Dev.* 2002;115(1-2):167-9.
89. Yet SF, McA'Nulty MM, Folta SC, Yen HW, Yoshizumi M, Hsieh CM, et al. Human EZF, a Krüppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains. *J Biol Chem.* 1998;273(2):1026-31.
90. Adam PJ, Regan CP, Hautmann MB, Owens GK. Positive- and negative-acting Kruppel-like transcription factors bind a transforming growth factor beta control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker SM22alpha in vivo. *J Biol Chem.* 2000;275(48):37798-806.
91. Zhang W, Geiman DE, Shields JM, Dang DT, Mahatan CS, Kaestner KH, et al. The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *J Biol Chem.* 2000;275(24):18391-8.
92. Dang DT, Bachman KE, Mahatan CS, Dang LH, Giardiello FM, Yang VW. Decreased expression of the gut-enriched Krüppel-like factor gene in intestinal adenomas of multiple intestinal neoplasia mice and in colonic adenomas of familial adenomatous polyposis patients. *FEBS Lett.* 2000;476(3):203-7.



93. Shie JL, Chen ZY, O'Brien MJ, Pestell RG, Lee ME, Tseng CC. Role of gut-enriched Krüppel-like factor in colonic cell growth and differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(4):G806-14.
94. Ovitt CE, Schöler HR. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol Hum Reprod*. 1998;4(11):1021-31.
95. Alwhaibi A, Verma A, Adil MS, Somanath PR. The unconventional role of Akt1 in the advanced cancers and in diabetes-promoted carcinogenesis. *Pharmacol Res*. 2019; 145:104270.
96. Alwhaibi A, Verma A, Artham S, Adil MS, Somanath PR. Nodal pathway activation due to Akt1 suppression is a molecular switch for prostate cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis. *Biochem Pharmacol*. 2019; 168:1-13.
97. Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, et al. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2009;16(12):3488-98.
98. Gazouli M, Roubelakis MG, Theodoropoulos GE, Papailiou J, Vaiopoulou A, Pappa KI, et al. OCT4 spliced variant OCT4B1 is expressed in human colorectal cancer. *Mol Carcinog*. 2012;51(2):165-73.
99. Rizzino A, Wuebben EL. Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1859(6):780-91.
100. Mattiuzzi C, Sanchis-Gomar F, Lippi G. Concise update on colorectal cancer epidemiology. *Ann Transl Med*. 2019;7(21):609.
101. Alattas M, Ross CS, Henahan ER, Naimi TS. Alcohol policies and alcohol-attributable cancer mortality in U.S. States. *Chem Biol Interact*. 2020; 315:108885.
102. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
103. Zhang W, Glöckner SC, Guo M, Machida EO, Wang DH, Easwaran H, et al. Epigenetic inactivation of the canonical Wnt antagonist SRY-box containing gene 17 in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2008;68(8):2764-72.
104. She ZY, Yang WX. SOX family transcription factors involved in diverse cellular events during development. *Eur J Cell Biol*. 2015;94(12):547-63.
105. Wu G, Zhu YZ, Zhang JC. Sox4 up-regulates Cyr61 expression in colon cancer cells. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34(2):405-12.

106. Tong X, Li L, Li X, Heng L, Zhong L, Su X, et al. SOX10, a novel HMG-box-containing tumor suppressor, inhibits growth and metastasis of digestive cancers by suppressing the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Oncotarget*. 2014;5(21):10571-83.
107. Du YC, Oshima H, Oguma K, Kitamura T, Itadani H, Fujimura T, et al. Induction and down-regulation of Sox17 and its possible roles during the course of gastrointestinal tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2009;137(4):1346-57.
108. Li W, Wu D, Niu Z, Jiang D, Ma H, He H, et al. 5-Azacytidine suppresses EC9706 cell proliferation and metastasis by upregulating the expression of SOX17 and CDH1. *Int J Mol Med*. 2016;38(4):1047-54.
109. Zhang Y, Huang S, Dong W, Li L, Feng Y, Pan L, et al. SOX7, down-regulated in colorectal cancer, induces apoptosis and inhibits proliferation of colorectal cancer cells. *Cancer Lett*. 2009;277(1):29-37.
110. Hütz K, Mejías-Luque R, Farsakova K, Ogris M, Krebs S, Anton M, et al. The stem cell factor SOX2 regulates the tumorigenic potential in human gastric cancer cells. *Carcinogenesis*. 2014;35(4):942-50.
111. Wang S, Tie J, Wang R, Hu F, Gao L, Wang W, et al. SOX2, a predictor of survival in gastric cancer, inhibits cell proliferation and metastasis by regulating PTEN. *Cancer Lett*. 2015;358(2):210-9.
112. Carrasco-Garcia E, Santos JC, Garcia I, Brianti M, García-Puga M, Pedrazzoli J, et al. Paradoxical role of SOX2 in gastric cancer. *Am J Cancer Res*. 2016;6(4):701-13.
113. Prasad NB, Biankin AV, Fukushima N, Maitra A, Dhara S, Elkahlon AG, et al. Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Res*. 2005;65(5):1619-26.
114. Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, Loipetzberger A, Damhofer H, Zoidl K, et al. Hedgehog-EGFR cooperation response genes determine the oncogenic phenotype of basal cell carcinoma and tumour-initiating pancreatic cancer cells. *EMBO Mol Med*. 2012;4(3):218-33.
115. Lü B, Fang Y, Xu J, Wang L, Xu F, Xu E, et al. Analysis of SOX9 expression in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(6):897-904.
116. Oshima N, Yamada Y, Nagayama S, Kawada K, Hasegawa S, Okabe H, et al. Induction of cancer stem cell properties in colon cancer cells by defined factors. *PLoS One*. 2014;9(7):e101735.
117. Han X, Fang X, Lou X, Hua D, Ding W, Foltz G, et al. Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients. *PLoS One*. 2012;7(8):e41335.

118. Yang D, Wang H, Zhang J, Li C, Lu Z, Liu J, et al. In vitro characterization of stem cell-like properties of drug-resistant colon cancer subline. *Oncol Res.* 2013;21(1):51-7.
119. Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol.* 2009;11(12):1487-95.
120. Ebrahimi F, Gopalan V, Smith RA, Lam AK. miR-126 in human cancers: clinical roles and current perspectives. *Exp Mol Pathol.* 2014;96(1):98-107.
121. Li J, Du L, Yang Y, Wang C, Liu H, Wang L, et al. MiR-429 is an independent prognostic factor in colorectal cancer and exerts its anti-apoptotic function by targeting SOX2. *Cancer Lett.* 2013;329(1):84-90.
122. Lundberg IV, Edin S, Eklöf V, Öberg Å, Palmqvist R, Wikberg ML. SOX2 expression is associated with a cancer stem cell state and down-regulation of CDX2 in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2016; 16:471.
123. Dalerba P, Sahoo D, Paik S, Guo X, Yothers G, Song N, et al. CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med.* 2016;374(3):211-22.
124. Lundberg IV, Löfgren Burström A, Edin S, Eklöf V, Öberg Å, Stenling R, et al. SOX2 expression is regulated by BRAF and contributes to poor patient prognosis in colorectal cancer. *PLoS One.* 2014;9(7):e101957.
125. Liu H, Du L, Wen Z, Yang Y, Li J, Dong Z, et al. Sex determining region Y-box 2 inhibits the proliferation of colorectal adenocarcinoma cells through the mTOR signaling pathway. *Int J Mol Med.* 2013;32(1):59-66.
126. Dai X, Ge J, Wang X, Qian X, Zhang C, Li X. OCT4 regulates epithelial-mesenchymal transition and its knockdown inhibits colorectal cancer cell migration and invasion. *Oncol Rep.* 2013;29(1):155-60.
127. Wen K, Fu Z, Wu X, Feng J, Chen W, Qian J. Oct-4 is required for an antiapoptotic behavior of chemoresistant colorectal cancer cells enriched for cancer stem cells: effects associated with STAT3/Survivin. *Cancer Lett.* 2013;333(1):56-65.
128. Padin-Iruegas ME, Herranz-Carnero M, Aguin-Losada S, Brozos-Vazquez E, Anido-Herranz U, Antunez-Lopez JR, et al. Prognostic value of changes in the expression of stem cell markers in the peripheral blood of patients with colon cancer. *Oncol Rep.* 2013;29(6):2467-72.
129. Hu J, Li J, Yue X, Wang J, Liu J, Sun L, et al. Expression of the cancer stem cell markers ABCG2 and OCT-4 in right-sided colon cancer predicts recurrence and poor outcomes. *Oncotarget.* 2017;8(17):28463-70.

130. Wang QH, Zhang M, Shi CT, Xie JJ, Chen F, Shi QF, et al. High Oct4 predicted worse prognosis of right-sided colon cancer patients. *Future Oncol.* 2018;14(22):2279-91.
131. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, et al. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2017;3(2):211-9.
132. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76.
133. Ghaleb AM, McConnell BB, Kaestner KH, Yang VW. Altered intestinal epithelial homeostasis in mice with intestine-specific deletion of the Krüppel-like factor 4 gene. *Dev Biol.* 2011;349(2):310-20.
134. Flandez M, Guilmeau S, Blache P, Augenlicht LH. KLF4 regulation in intestinal epithelial cell maturation. *Exp Cell Res.* 2008;314(20):3712-23.
135. McConnell BB, Ghaleb AM, Nandan MO, Yang VW. The diverse functions of Krüppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology. *Bioessays.* 2007;29(6):549-57.
136. Diehl JA. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther.* 2002;1(3):226-31.
137. Hong AW, Meng Z, Guan KL. The Hippo pathway in intestinal regeneration and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;13(6):324-37.
138. Wei D, Gong W, Kanai M, Schlunk C, Wang L, Yao JC, et al. Drastic down-regulation of Krüppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer Res.* 2005;65(7):2746-54.
139. Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, Babbitt BA, Lamb NE, Yang VW. Identification of Krüppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene.* 2004;23(2):395-402.
140. Ton-That H, Kaestner KH, Shields JM, Mahatanankoon CS, Yang VW. Expression of the gut-enriched Krüppel-like factor gene during development and intestinal tumorigenesis. *FEBS Lett.* 1997;419(2-3):239-43.
141. Zhang N, Zhang J, Wang ZW, Zha L, Huang Z. Altered expression of Krüppel-like factor 4 and  $\beta$ -catenin in human gastric cancer. *Oncol Lett.* 2012;3(5):1017-22.
142. Zhang N, Zhang J, Shuai L, Zha L, He M, Huang Z, et al. Krüppel-like factor 4 negatively regulates  $\beta$ -catenin expression and inhibits the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer. *Int J Oncol.* 2012;40(6):2038-48.
143. Patel NV, Ghaleb AM, Nandan MO, Yang VW. Expression of the tumor suppressor Krüppel-like factor 4 as a prognostic predictor for colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(10):2631-8.

144. Munro MJ, Wickremesekera SK, Peng L, Marsh RW, Itinteang T, Tan ST. Cancer stem cell subpopulations in primary colon adenocarcinoma. *PLoS One*. 2019;14(9): e0221963.
145. Ishiguro T, Sato A, Ohata H, Sakai H, Nakagama H, Okamoto K. Differential expression of nanog1 and nanogp8 in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;418(2):199-204.
146. Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, Shaffer SM, Persson JL, Gudas LJ, et al. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev*. 2009;18(7):1093-108.
147. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005;122(6):947-56.
148. Osama A, Sabry D, Hassany SM, Abdelmoneim SS, Sabry A. SIRT-1 expression is associated with expression of NANOG in patients with colorectal adenocarcinoma. *Cancer Biomark*. 2016;17(2):155-63.
149. Amini S, Fathi F, Mobalegi J, Sofimajidpour H, Ghadimi T. The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tc11, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines. *Anat Cell Biol*. 2014;47(1):1-11.
150. Humphries HN, Wickremesekera SK, Marsh RW, Brasch HD, Mehrotra S, Tan ST, et al. Characterization of Cancer Stem Cells in Colon Adenocarcinoma Metastasis to the Liver. *Front Surg*. 2017; 4:76.

## 7. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

**Wstęp:** Rak jelita grubego (*ang. colorectal cancer, CRC*) jest trzecim co do częstości występowania nowotworem złośliwym w Polsce. W ostatnich latach obserwuje się również zwiększoną dynamikę zachorowalności na CRC. Pomimo dużego postępu w rozwoju metod diagnostycznych, nadal brakuje łatwego i małoinwazyjnego testu diagnostycznego. Chociaż czułość i swoistość kolonoskopii w wykrywaniu raka jelita grubego jest wysoka to jest to metoda nie akceptowalna przez każdego pacjenta i mogąca się wiązać z powikłaniami. Z kolei ocena kliniczna opiera się obecnie na powszechnie stosowanych klasyfikacjach, jednakże ich wiarygodność jest niepełna ze względu na brak uwzględnienia wielu ważnych cech klinicznych i patomorfologicznych. Obecnie najczęściej dowodzi się, że nowotwory mogą się rozwijać z mniejszości komórek o właściwościach komórek macierzystych zwanych rakowymi komórkami macierzystymi (*ang. cancer stem cells, CSC*). Czynniki transkrypcyjnymi odpowiedzialnymi za utrzymanie pluripotencji komórek są m.in. OCT4, NANOG, KLF4 oraz SOX2.

**Cele pracy:** Określono 3 cele pracy doktorskiej. 1. Próba wytypowania nowych, potencjalnych markerów raka jelita grubego i usprawnienie metod screeningowych. 2. Ocena ekspresji jakościowej OCT4, SOX2, KLF4 i NANOG w raku jelita grubego. 3. Wykazanie zależności między ekspresją genów pluripotencji a skalami zaawansowania choroby nowotworowej, danymi demograficznymi, histopatologicznymi oraz parametrami klinicznymi.

**Metodyka:** Grupa badana składała się ze 150 pacjentów z rozpoznaniem pierwotnym CRC. Każdego pacjenta sklasyfikowano wg: skali TNM, Dukesa oraz Astlera-Collera oraz podzielono względem lokalizacji nowotworu i wieku. Bezpośrednio po zabiegu od każdego pacjenta pobrano kilkakrotnie materiał biopsyjny tkanki nowotworowej – dwie próbki z samego guza (jedna próbka z obrzeża guza [Grupa G2], druga z części centralnej [Grupa G1]) oraz jedna próbka z teoretycznie zdrowej tkanki jelita grubego [Grupa TZ]. Następnie tkanki były przekazywane do dalszych badań w Zakładzie Immunologii, gdzie wykonano ekstrakcję RNA z tkanek pobranych i analizę genów pluripotencji (OCT4, SOX2, KLF4, NANOG) za pomocą reakcji jednostopniowej odwrotnej reakcji łańcuchowej polimerazy. Produkty reakcji poddano elektroforezie białek na żelu agarozowym i wykonano odpowiednia dokumentacje fotograficzną. Wszystkie dane i wyniki analiz molekularnych przeanalizowano za pomocą metod statystycznych.

**Wyniki:** Z analiz cech demograficznych średni wiek wyniósł ponad  $67 \pm 11,09$  lat a średnie BMI  $27,5 \pm 4,62$  kg/m<sup>2</sup>. Najwięcej pacjentów klasyfikowało się do grupy I oraz IIA wg TNM. Najczęściej guz pierwotny lokalizował się w odbytnicy (40%) a stopień zróżnicowania 2 występował u 58% pacjentów. 38% pacjentów przeszło przedoperacyjną radioterapię (w małym odsetku również chemioterapię). Ekspresja SOX2, OCT4 i NANOG w tkance guza wynosiła około 90%, natomiast w przypadku KLF4 jedynie około 58%. Nie wykazano znaczących różnic statystycznych pomiędzy wiekiem, płcią czy BMI w tym zakresie. Bardzo wiele czynników klinicznych i patomorfologicznych było zależnych od pojedynczo badanych ekspresji jak i koekspresji badanych czynników transkrypcyjnych. Najczęściej można było obserwować genotyp OCT4<sup>+</sup>/SOX2<sup>+</sup>/KLF4<sup>+</sup>/NANOG<sup>+</sup> (60,67%) oraz OCT4<sup>+</sup>/SOX2<sup>+</sup>/KLF4<sup>-</sup>/NANOG<sup>+</sup> (25,33%) w tkance guza (GO). W tkance zdrowej (TZ) najczęściej (u 53,33% pacjentów) występowała pojedyncza ekspresja genu SOX2 lub KLF4. Zaobserwowano znacząco różnice w ekspresji (i koekspresji) pomiędzy tkanką zdrową a grupami badanych tkanek guza.

**Wnioski:** Wyniki wskazują na bardzo obiecującą rolę badanych czynników transkrypcyjnych jak predyktorów stadium i rozwoju choroby. Powyżej badane czynniki mogą być także ważnymi czynnikami w badaniach przesiewowych, ponieważ ich ekspresja (zwłaszcza koekspresja) jest znacząco różna w zależności od rodzaju tkanki badanej (zdrowej oraz guza) oraz stanu klinicznego i badania histopatologicznego.

## 8. STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM

**Introduction:** Colorectal cancer (CRC) is the third most common malignancy in Poland. In recent years, an increased dynamics of CRC incidence has been observed. Despite the great progress in the development of diagnostic methods, an easy and minimally invasive diagnostic test is still missing. Although, the sensitivity and specificity of colonoscopy for the detection of CRC is high, it is a method that is unacceptable to all patients and may involve complications. In turn, clinical evaluation is currently based on commonly used classifications, however, their reliability is incomplete due to the lack of consideration of many important clinical and pathomorphological features. Currently, it is most often argued that cancers can develop from a minority of cells with the properties of stem cells called cancer stem cells (CSCs). Transcription factors responsible for maintaining cell pluripotency are, among others OCT4, NANOG, KLF4 and SOX2.

**Aims of the study:** Three goals of the PhD thesis were defined. 1. Attempt to select new potential markers for CRC and improve screening methods. 2. The qualitative assessment of the expression of OCT4, SOX2, KLF4 and NANOG genes in CRC. 3. Demonstration of the relationship between expression of pluripotency genes and cancer scales, demographic, histopathological and clinical parameters.

**Methods:** The study group consisted of 150 patients with diagnosed primary CRC. The clinical and demographical data of patients were recorded. Each patient was classified according to the TNM classification (also Dukes and Astler-Coller classifications) and divided according to tumor location, histopathological results, age and many others features. Three tissue samples were collected from each patient - two samples from the tumor itself (one sample from the tumor periphery [Group G1] and the other from the central part [Group G2]) and one sample from the theoretically colon healthy tissue [Group TZ]. Subsequently, the tissues were immediately transported for further research at the Department of Immunology, where ribonucleic acid (RNA) was extracted from the collected tissues. The qualitative analysis of pluripotency genes (OCT4, SOX2, KLF4, NANOG) were carried out using one-step RT-PCR and the reaction products were imaged using electrophoresis with agarose gel. All data and results of molecular analysis were analyzed using statistical methods.

**Results:** The mean age of patients was  $67 \pm 11,09$  years and the mean body mass index (BMI) was  $27.5 \pm 4,62$  kg/m<sup>2</sup>. The majority of patients was classified as I and IIA groups in TNM score. The most frequent tumor localization was rectum region (40%). Differentiation grade 2 was observed in 58% of patients. 38% of patients underwent pre-operative radiotherapy (chemotherapy in a small percentage). The positive expression of SOX2, OCT4 and NANOG genes was detected in at least 90% of tumor tissues, whereas for KLF4 was detected in 58% tumor specimens. The SOX2, OCT4, NANOG and KLF4 expression level was correlated with age, gender, neither BMI. In tumor tissue (GO), all genes co-expression was observed in 60,67% of patients and genotype OCT4<sup>+</sup>/SOX2<sup>+</sup>/KLF4<sup>+</sup>/NANOG<sup>+</sup> was observed in 25,33% tumor tissue. In 53,33% healthy colon tissue, single expression of the SOX2 or KLF4 most often occurred. Significant differences in expression (and co-expression) between healthy tissue and all groups of tumor tissues examined were observed.

**Conclusions:** The results indicate a very promising role of the transcription factors studied as stage predictors and disease development. The above factors may also be important factors in screening, because their expression (especially co-expression) is significantly different depending on the type of tissue examined (healthy and tumor) as well as the clinical condition and histopathological examination.

## 9. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius  
ul. Fredry 10  
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60  
fax. (+48 61) 854 61 07  
www.bioetyka.ump.edu.pl

### Uchwała nr 543/15

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz.480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Hełbińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznym z Udziałem Ludzi.

**Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 11 czerwca 2015 r.  
rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.**

**Kierownik projektu:**

**Prof. dr hab. Jacek Szmaja oraz prof. dr hab. Tomasz Banasiewicz**

**Miejsce prowadzenia badań:**

**Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Onkologii  
Gastroenterologicznej oraz Klinika Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób  
Metabolicznych UM w Poznaniu**

**Główny badacz: lek. med. Krzysztof Szmyt**

**Członkowie zespołu**

**badawczego:**

**prof. dr hab. Michał Drews, prof. dr hab. Jan Sikora, prof. dr hab. Ryszard  
Marciniak, dr Mariusz Kaczmarek, dr Maciej Borejsza- Wysocki, dr  
Łukasz Krokowicz, lek. Adam Bobkiewicz, lek. Sylwia Sławek**

**Temat badań:**

**„Ekspresja genów Oct4, SOX2, Klf4 i Nanog w komórkach  
nowotworowych u chorych leczonych chirurgicznie z powodu raka jelita  
grubego”.**

**Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku**

Przewodniczący Komisji

prof. dr hab. med. Paweł Chęciński