

Streszczenie

Rak jelita grubego pozostaje jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych na świecie, którego bardzo duża heterogenność utrudnia opracowanie skutecznych terapii molekularnie ukierunkowanych oraz molekularnych biomarkerów. W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie zmianami molekularnymi poprzedzającymi zmiany histopatologiczne i morfologiczne, które mogą pojawiać się również w tkance otaczającej guz, długo uznawanej za bierną. Nowotworom towarzyszy deregulacja odpowiedzi zapalnej i immunologicznej, podobnie jak zabiegowi operacyjnemu, będącemu głównym narzędziem walki z RJG. W ostatnich latach na popularności zyskuje chirurgia robotowa, lecz podłoże molekularne obserwowanych korzyści klinicznych z jej stosowania jest wciąż słabo poznane a zespół, w którym pracowałam prowadził pionierskie badania w tym zakresie. Mając powyższe na uwadze, podjęłam się przybliżenia wzorców ekspresji (i wydzielania) chemokin z rodziny białek MCP i MIP oraz ich receptorów, jako potencjalnych celi molekularnych i biomarkerów ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjalnego udziału w zdarzeniach okołoperacyjnych. Dodatkowo, wpisując się w nurt badań nad chemoprewencją w RJG, oceniłam w badaniu pilotowym NLPZ z grupy oksykamów oraz ich pochodne jako modulatory ekspresji i sekrecji chemokin.

Korzystając z technik ilościowego PCR (PCR w czasie rzeczywistym) w badaniu ekspresji i jednoczesnej analizy ilościowej analitów w zawieszynie macierzy w czasie rzeczywistym (Luminex) w ocenie stężenia chemokin we krwi i płynach pochodzących, zaobserwowałam zmienione sygnatury chemokin i ich receptorów u pacjentów z RJG, zarówno w tkankach guza, jak i okolic marginesu resekcji, i makroskopowo i histologicznie prawidłowych. Jest to obserwacja niepokojąca, która może tłumaczyć niepowodzenia chirurgiczne w leczeniu RJG i/lub odpowiadać powstawaniu guzów synchronicznych. Zmiany ekspresji i sekrecji chemokin i ich receptorów wiązały się szczególnie z przerzutowaniem do węzłów chłonnych oraz z agresywnością RJG. Ponadto dowiodłam, że heterogenność RJG wynikająca z sublokalizacji nie ogranicza się do zmian w profilu genetycznym i epigenetycznym, w szczególności genów związanych z cyklem komórkowym, przeżyciem i wzrostem, ani też do samego guza, ale może dotyczyć mediatorów lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej i immunologicznej (*CCL8*, *CCR2*, *ACKR4*, *MIP-1 α* i β) oraz pozornie prawidłowej tkanki otaczającej, co należy uwzględnić projektując molekularnie ukierunkowane terapie i biomarkery, będące filarami medycyny spersonalizowanej.

Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na inwazyjność operacji (operacje otwarte vs. minimalnie inwazyjne operacje robotowe), długość zabiegu operacyjnego oraz dużą utratę krwi i związaną z nią konieczność przetoczenia krwi, jako główne czynniki odpowiedzialne za dużą amplitudę zmian stężeń badanych chemokin we wczesnym okresie okołoperacyjnym. Tym samym, minimalizacja stresu operacyjnego przez wykorzystanie chirurgii robotowej obejmuje również mniejszy wyrzut i łagodniejsze fluktuacje stężenia badanych chemokin, w szczególności MCP-1 – najważniejszej chemokiny leukocytów, w szczególności monocytów i neutrofilii.

Zaobserwowałam również, że zmiany stężenia MCP-1, tj. utrzymujące się wysokie stężenie tej chemokiny lub jej przyrost poprzedzają kliniczną manifestację niekorzystnych zdarzeń klinicznych, takich jak zakażenia rany pooperacyjnej, pooperacyjny ileus czy, stanowiący zagrożenie życia, przeciek z zespolenia o dobrej sile predykcyjnej. Tym samym monitorowanie zmian MCP-1 w tym okresie, indywidualnie lub w zestawie z innymi markerami, może być cenne i wykorzystane do wdrożenia kroków zaradczych jeszcze przed pojawieniem się objawów klinicznych.

Wpisując się z kolei w nurt badań nad chemioterapeutykami w zapobieganiu rozwojowi RJG lub w odwracaniu procesu karcynogenezy we wczesnych jego etapach wykazałam, że pochodne oksyksamów są skuteczniejsze niż klasyczne leki referencyjne (piroksykam i meloksykam), a jednocześnie, jak wynika z badań nad ich toksycznością prowadzonych przez dr Szczęśniak-Sięgę, mniej toksyczne wobec żołądka i jelit, co jest szczególnie istotne w kontekście chemoprewencji RJG u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit, u których ryzyko tego powikłania jest znacznie większe niż w populacji ogólnej, a którzy cierpią na zaburzenia pracy jelit i z klasycznych NLPZ korzystać nie mogą.

Chemicznie, modyfikacje, które wydają się być szczególnie efektywne w modulowaniu ekspresji i stężenia chemokin to analogi z pierścieniem tiazynowym podstawionym ugrupowaniami arylopiperazyny i benzoilu z łącznikiem propylenowym pomiędzy atomami azotu tiazyny i piperazyny oraz jeden atom fluory przyłączono do pierścienia arylopiperazyny.

Summary

Colorectal cancer (CRC) remains one of the commonest cancers worldwide, the overwhelming heterogeneity of which hinders designing effective molecular therapies and discovering molecular biomarkers. The research focus has recently shifted towards discerning molecular changes occurring in morphologically and histologically unaltered tissue closing on resection margins, previously considered passive and unchanged. Cancers, including CRC, negatively affects body immune and inflammatory responses. Likewise, these are evoked and altered by surgical stress associated with curative resection of tumors, a mainstay in CRC therapy. There is a growing interest in robot-assisted surgery, although the molecular background for the observed benefits in terms of clinical outcomes remains obscure and has only recently being discern. To this pioneering research branch, the team I was working with has greatly contributed. Therefore, I aimed at discerning local and systemic signatures of chemokines and their receptors as potential molecular targets or biomarkers with particular interest in their possible contribution to early postoperative clinical outcomes. In addition, to contribute to research on NSAIDs such as oxicams as chemopreventive agents in CRC, I have conducted a pilot study on Caco-2 cell line treated with classic and newly synthesized oxicams in order to determine their modulatory potential on expression and secretion of chemokines.

Using quantitative PCR (real-time PCR) in transcriptomic analysis and Luminex xMAP technology for chemokine determination in sera and conditioned medium, I found chemokine and their receptor signatures to be altered in patients with CRC not only in tumors but also in apparently unaltered tissue fragments near resection margins. This observation is disturbing as the presence of such changes may facilitate cancer recurrence or be a contributor to synchronous cancers. In CRC patients, lymph node metastasis and tumor aggressiveness were particularly associated with alterations in chemokine and their receptor profiles. My research has proven that changes in inflammatory and immune responses, both local and systemic, either in tumors or nearby tissue, add to subsite heterogeneity of CRC and ought to be considered while designing molecular therapies or establishing molecular biomarkers, two main pillars of personalized medicine.

My results point at invasiveness of surgical approach (open surgeries), length of the procedure, and estimated blood loss with resulting blood transfusion as main factors contributing to large amplitude of changes in chemokine concentrations in early postoperative period. Therefore, the approach of minimalizing the surgical stress by employing robot-

assistance involves attenuation of chemokine secretion, particularly that of MCP-1, the key chemoattractant for leukocytes, monocytes and neutrophils in particular.

Moreover, I have observed that MCP-1 concentrations stay high, predicting various adverse events such as surgical site infections, postoperative ileus, and anastomotic leak—all prior to their clinical manifestations implying the usefulness of MCP-1 monitoring individually or as a part of a marker panel as a predictive tool allowing for early implementation of proper countermeasures.

As a contribution to the research on chemoprevention in CRC, I have tested potential of classic oxicams (piroxicam and meloxicam) as well as their novel analogues in modulating chemokine expression and secretion and demonstrated that novel derivatives are not only less toxic than their precursors, as proven by their architect dr Berenika Szczęśniak-Sięga, but more effective in down-regulating immune and inflammatory response mediated by studied chemokines. The lower toxicity of the analogues is of utmost clinical relevance as it may allow for their application in CRC chemoprevention in patients with inflammatory bowel disease, in whom standard NSAIDs are discouraged.

Chemically, the most effective analogue was characterized by a propylene linker between the nitrogen atoms of thiazine and piperazine and one arylpiperazine fluoride.