

# 1 STRESZCZENIE

---

Poznanie profilu molekularnego raka jelita grubego (RJG) i jego modulacji w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne i wewnętrzne jest warunkiem opracowania skutecznych terapii molekularnych i/lub identyfikacji biomarkerów molekularnych umożliwiające jak najlepsze dopasowanie strategii leczenia do indywidualnego pacjenta, co jest podstawą rozwoju i implementacji medycyny precyzyjnej. Naturalna historia RJG, z dobrze wodrębnionymi stanami przedrakowymi, tj. gruczolakami lub polipami ząbkowanymi w raku sporadycznym a dysplazją indukowaną chronicznym stanem zapalnym w raku rozwijającym się u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit (CAC), oraz z wieloletnią progresją do raka inwazyjnego, stwarza unikalne możliwości zaimplementowania strategii chemoprewencyjnych. Ze względu na rolę stanu zapalnego w indukcji transformacji nowotworowej i dalszy udział w rozwoju guza poprzez dostarczanie czynników wzrostowych i desensytyzacji układu odpornościowego, a w szczególności znaczenie szlaku cyklooksygenazy (COX)-2/prostaglandyny (PG)-E<sub>2</sub>, badania w zakresie potencjalnych leków do wykorzystania w chemoprewencji RJG koncentrują się na inhibitorach COX2, z których leki działające selektywnie na COX2 cechuje mniejsza toksyczność wobec przewodu pokarmowego przy zachowanej skuteczności. Choć oksykamy należą do niesteroidalnych leków przeciwzapalnych i meloksykam jest nawet uważany za inhibitor selektywny wobec COX2 a i piroksykam ma udokumentowaną skuteczność w zmniejszaniu ryzyka rozwoju RJG, niewiele jest wiadomo na temat mechanizmów molekularnych leżących u podłoża przeciwnowotworowej aktywności oksykamów. Celem niniejszej pracy było więc scharakteryzowanie profilu molekularnego RJG na poziomie transkryptomu (ocenianego techniką ilościowego PCR) i metabolomu (ocenianego techniką spektrometrii mas) w zakresie szlaku lipidowych mediatorów zapalnych COX2/PGE<sub>2</sub> w odniesieniu do cech histopatologicznych gruczolakoraków wraz z oceną mocy diagnostycznej badanych eikozanoidów (13,14-dihydro-PGE<sub>1</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, TXB<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, PGD<sub>2</sub>, 15-deoxy-12,14-PGJ<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>). Dodatkowo, podjęłam się oceny potencjalnego modulującego wpływu klasycznych oksykamów i nowych związków z tej grupy na ekspresję białek szlaku (ocena ekspresji mRNA i immunoreaktywności *PTGS2/COX2*, *HPGD*, *MRP4*, *PGT*, *PTGER2/EP2* i *PTGER4/EP4*). Uzyskane przeze mnie wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków ogólnych:

- (1) W raku jelita grubego dochodzi do deregulacji szlaku COX2/PGE<sub>2</sub> na poziomie lokalnym i ogólnoustrojowym, w powiązaniu z cechami histopatologicznymi RJG oraz w sposób odzwierciedlający dobrostan pacjenta;
- (2) PGF<sub>2</sub> jest doskonałym markerem RJG, lecz umiarkowaną obecności przerzutów w węzłach chłonnych. Pozostałe eikozanoidy cechuje dobra–bardzo dobra moc diagnostyczna w różnicowaniu pacjentów z RJG i osób zdrowych, lecz umiarkowana w różnicowaniu stopnia zaawansowania histologicznego;
- (3) Oksykamy modulują szlak COX2/PGE<sub>2</sub> na poziomie transkryptomu i proteomu, przy czym wpływ nowosyntetyzowanych pochodnych oksykamów jest silniejszy i bardziej powtarzalny niż leków wykorzystywanych w praktyce klinicznej – piroksykamu i meloksykamu, a najbardziej obiecującym związkiem jest pochodna charakteryzująca się propylenowym linkerem łączącym arylopiperyzynowy farmakofor z azotem pierścienia tiazynowego oraz pojedynczym podstawnikiem fluorowym umiejscowionym w reszcie arylopiiperazynowej.

## 2 SUMMARY

---

A better understanding of molecular landscape of colorectal cancer (CRC) as well as its adaptations to internal and external modifiers is a prerequisite to designing successful molecular-targeted therapies and/or selection of molecular markers facilitating tailoring treatment strategy to individual patient, which is a foundation of precision medicine. Natural history of CRC, with well defined precancerous stage involving adenomas or serrated polyps in sporadic cancer and inflammation-driven dysplasia in colitis-associated cancer (CAC), combined with long-term progression to cancer, create a unique frame for chemoprevention. Due to the fundamental role in neoplastic transformation as well as nurturing properties during tumor growth, cancer-associated inflammation and its mediators are primary targets for chemoprevention. In particular, cyclooxygenase (COX)-2/prostaglandin (PG)-E<sub>2</sub> pathway, involved in facilitating immune evasion and supporting cancer cells' survival, growth, migration and invasiveness is targeted by nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs), such as selective competitive COX2 inhibitors renowned for their diminished gastrointestinal toxicity. Oxikams belong to NSAIDs and its representative, meloxicam, is even considered

an almost selective COX2 inhibitor while the other one, piroxicam, has a well documented history of CRC prevention. Yet, little is known on the molecular mechanisms underlying the antitumor activities of those drugs. Therefore, the aim of my PhD thesis was molecular profiling of key players in COX2/PGE2 pathway in CRC at transcriptional (using quantitative PCR technique) and metabolic level (using the mass spectrometry) in reference to histopathology of resected tumors together with determining the diagnostic power of lipid mediators (13,14-dihydro-PGE<sub>1</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, TXB<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, PGD<sub>2</sub>, 15-deoxy-12,14-PGJ<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>) as potential CRC biomarkers. Additionally, I aimed at evaluating the modulatory properties of classic and novel oxicams against key pathway proteins (*PTGS2/COX2*, *HPGD*, *MRP4*, *PGT*, *PTGER2/EP2* i *PTGER4/EP4*) using transcriptomic analysis as well as immunoreactivity detection techniques. The obtained results justify formulation of the following general conclusions:

- (1) CRC is associated the aberrant COX2/PGE2 pathway, deregulated at both local and systemic level and reflecting histopathological features as well as the general wellbeing of cancer patient;
- (2) PGF<sub>2</sub> is an excellent CRC marker but a moderate one as an indicator of lymph node involvement. The remaining eicosanoids are characterized by good-to-very good discriminating power in differentiating CRC patients and healthy individuals but only moderate in differentiating stages of histological aggressiveness;
- (3) Oxicams modulate COX/PGE2 pathway on transcriptomic and proteomic level, although newly synthesized analogs have greater and more repeatable effect than clinically approved reference oxicams. The most promising analog is one with a propylene linker between two nitrogens belonging to thiazine ring and arylpiperazine pharmacophore, which is additionally substituted with single fluoride.