



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

ROZPRAWA DOKTORSKA

wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Małgorzaty Krzystek-Korpackiej

Analiza białek szlaku COX-2/PGE₂
w raku jelita grubego

mgr Natalia Jamrozik

Zakład Biochemii Lekarskiej
Katedry Biochemii i Immunochemii

Wrocław, 2023

*Pragnę serdecznie podziękować mojej Promotor,
Pani prof. dr hab. Małgorzacie Krzystek-Korpackiej
za niezwykłą cierpliwość, zaangażowanie i merytoryczną pomoc
w przygotowaniu niniejszej rozprawy.*

*Jednocześnie pragnę wyrazić ogromną wdzięczność
pracownikom Katedry Biochemii i Immunochemii
za zaangażowanie i życzliwą atmosferę współpracy.*

*Dziękuję również rodzinie i przyjaciołom
za zrozumienie, motywację oraz nieocenione wsparcie
podczas mojej dotychczasowej drogi naukowej.*

1 SPIS TREŚCI

1	SPIS TREŚCI.....	3
2	WYKAZ SKRÓTÓW	5
3	WSTĘP	7
3.1	RAK JELITA GRUBEGO.....	7
3.2	NIESTEROIDOWE LEKI PRZECIWPALNE I SZLAK COX2/PGE ₂	11
4	CEL PRACY — HIPOTEZY BADAWCZE	19
5	MATERIAŁY I METODY.....	20
5.1	MATERIAŁY	20
5.1.1	MATERIAŁ KLINICZNY	20
5.1.2	LINIE KOMÓRKOWE.....	24
5.1.3	NIESTEROIDOWE LEKI PRZECIWPALNE Z GRUPY OKSYKAMÓW	25
5.1.4	POZOSTAŁE ODCZYNNIKI.....	26
5.1.5	APARATURA.....	29
5.2	METODY.....	31
5.2.1	BADANIA <i>IN VITRO</i>	31
5.2.2	METODY ANALITYCZNE	33
5.2.3	METODY STATYSTYCZNE	38
6	WYNIKI	40
6.1	INTERMEDIATY SZLAKU COX2/PGE ₂ U PACJENTÓW Z RAKIEM JELITA GRUBEGO	40
6.1.1	EKSPRESJA GENÓW BIAŁEK SZLAKU COX2/PGE ₂ W TKANKACH JELIT	40

6.1.2	STĘŻENIE PGE2 I INNYCH WYBRANYCH EIKOZANOIDÓW W KRAŻENIU	55
6.1.3	ZNACZENIE DIAGNOSTYCZNE EIKOZANOIDÓW W RAKU JELITA GRUBEGO.....	67
6.2	WPŁYW OKSYKAMÓW I ICH POCHODNYCH NA EKSPRESJĘ BIAŁEK SZLAKU COX2/PGE2 W KOMÓRKACH RAKA JELITA GRUBEGO.....	72
6.2.1	EKSPRESJA <i>PTGS2</i> /CYKLOOKSYGENAZY (COX)-2	72
6.2.2	EKSPRESJA <i>HPGD</i> / DEHYDROGENAZA 15-HYDROKSYPROSTAGLANDYNY (HPGD).....	79
6.2.3	Białko 4 oporności wielolekowej (MRP4).....	86
6.2.4	<i>PGT (SLCO2A1)</i> / transporter prostaglandyn PGT (<i>OATP2A1</i>)	93
6.2.5	<i>PTGER2</i> /receptor PGE2 (EP2)	96
6.2.6	<i>PTGER4</i> /receptor PGE2 (EP4)	102
7	DYSKUSJA	106
8	WNIOSKI	113
9	STRESZCZENIE.....	116
10	SUMMARY	118
11	WYKAZ TABEL.....	120
12	WYKAZ WYKRESÓW	122
13	WYKAZ RYSUNKÓW I ZDJĘĆ	124
14	LITERATURA.....	125
15	ZAŁĄCZNIKI.....	133

2 WYKAZ SKRÓTÓW

Skrót	Rozwinięcie/objaśnienie
AA	Kwas arachidonowy
ACN	Acetonitryl
ASA	Skala ryzyka zgonu podczas operacji nie-kardiochirurgicznych opracowana przez American Society of Anesthesiologists
AUC	Pole pod krzywą ROC
BMI	Wskaźnik masy ciała
CAC	Colitis-associated cancer; RJG związany z NZJ
CD	Choroba Leśniowskiego- Crohna
CI	Przedział ufności
CIMP	Fenotyp metylatora wysp CpG
CIN	Niestabilność chromosomalna
COX	Cyklooksygenaza
DGLA	Kwas dihomog- γ -linolenowy
ECM	Macierz zewnątrzkomórkowa
EET	Kwasy epoksyeikozatrienoinowe
EMT	Przemiana epithelialno-mezenchymalna
EP	Receptor PGE ₂
FA	Kwas mrówkowy
FAP	Rodzinna polipowatość gruczolakowata
HETE	Kwasy hydroksyeikozatetraenoinowe
HNPCC	Dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego
HPGD	Dehydrogenaza 15-hydroksyprostaglandynowa
HSP	Białka szoku termicznego
IQR	Zakres/odstęp kwartyłowy (kwartalny)
LA	Kwas linolowy
LOX	Lipooksygenaza
LPS	Lipopolisacharyd
LT	Leukotrieny
LTA	Kwas lipotejchowy
LX	Lipoksyny
MDSC	Mieloidalne komórki supresorowe (myeloid derived suppressor cells)
MMP	Metaloproteinazy macierzy
MMR	Mechanizmu napraw błędnie sparowanych par zasad (ang. mismatch repair)
MPO	mieloperoksydaza
MRP4	Białko 4 oporności wielolekowej
MSI	Niestabilność mikrosomalna
NA-NLPZ	Nie-aspirynowe, niesteroidowe leki przeciwzapalne
NLPZ	Niesteroidowe leki przeciwzapalne
NOS	Syntaza tlenu azotu
PAMPs	Wzorce molekularne związane z patogenami

PG	Prostaglandyny
PGT	Transporter prostaglandyn
PLA ₂	Fosfolipaza A ₂
RJG	Rak jelita grubego
ROC	Receiver operating characteristics
RT	Temperatura pokojowa
SD	Odchylenie standardowe
TBP	Białko wiążące sekwencję TATA
TLR	Receptory Toll-podobne
TMAO	N tlenek trimetyloaminy
TX	Tromboksany
UC	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego

3 WSTĘP

3.1 RAK JELITA GRUBEGO

Nowotwory stanowią główny problem zdrowotny Europy, na którą przypada około $\frac{1}{4}$ światowych przypadków raka, mimo że kontynent zamieszkuje $\frac{1}{10}$ światowej populacji. Rak jelita grubego (RJG) jest drugim co do częstości występowania nowotworem w Europie po raku piersi. Zajmuje też drugie miejsce – po raku płuc – jako przyczyna śmierci z powodu nowotworu [Dyba T i in., 2021]. Szacuje się, że w skali globalnej, RJG stanowi około 10% wszystkich rocznie diagnozowanych nowotworów, a jego wskaźnik śmiertelności wynosi 9,4% [Sung H i in., 2021]. Wskazuje się też, że liczba nowych przypadków na całym świecie do 2030r. wzrośnie do 2,2 miliona, a śmierci spowodowanych tym typem nowotworu do 1,1 miliona. Gwałtowny przyrost nowych przypadków dotyczy przede wszystkim krajów o niskim i średnim statusie ekonomicznym, czy krajów podlegających transformacji. Natomiast zachorowalność wyhamowuje, czy nawet lekko spada, w krajach najwyżej rozwiniętych, w których jednak odsetek zachorowań pozostaje bardzo wysoki [Arnold M i in., 2017]. Powolne odwracanie trendu jest przypisywane przede wszystkim ogólnokrajowym programom przesiewowym oraz zwiększonej liczbie przeprowadzanych kolonoskopii [Ait Ouakrim B i in., 2015].

Obserwacje ostatnich lat, w szczególności duży wzrost zapadalności na RJG wśród osób urodzonych w latach 50 i 60 sugeruje, że czynniki ryzyka rozwoju tego typu nowotworu pojawiają się bardzo wcześnie i prawdopodobnie są związane z ekspozycją na czynniki środowiskowe w życiu płodowym, dzieciństwie, czy wczesnej młodości [Murphy CC i in., 2023].

RJG w Polsce plasuje się na trzecim miejscu wśród mężczyzn pod względem częstości występowania (12,6%) a na drugim wśród kobiet (9,7%), ale już jako przyczyna zgonów związanych z nowotworami złośliwymi zajmuje miejsce drugie u mężczyzn (12,6%) a trzecie u kobiet (11,8%). Wspomniane stabilizujące się lub malejące tendencje w występowaniu RJG nie dotyczą Polski, w której na rok 2025 przewiduje się 24600 nowych zachorowań, co, w stosunku do 2006r., będzie stanowiło przyrost aż o 75%. Polska nie ma się też czym pochwalić w zakresie wczesnej diagnostyki i leczenia,

ponieważ odsetek przeżyć pięcioletnich jest u nas jednym z najniższych w Europie. Mimo niewielkiej poprawy obserwowanej w ostatnich latach, odsetki przeżyć pięcioletnich polskich pacjentów z RJG są niższej niż uśrednione wskaźniki europejskie o ponad 10 punktów procentowych [Jaroszyńska Z i in., 2021]. Także odsetek całkowitych wyleczeń jest dwukrotnie niższy w Polsce, wynosząc 30-35% wobec 65% w Europie Zachodniej [Olędzki J, 2006].

Zachorowalność na RJG wzrasta wraz z wiekiem i około 90% nowych przypadków dotyczy osób powyżej 50 roku życia [Thélin C i in., 2015]. Jednakże w Europie, Ameryce Północnej, Australii oraz Chinach zaobserwowano niepokojący wzrost liczby zachorowań u osób w wieku 20-49 lat, co prawdopodobnie jest spowodowane zmianą kierunku i dynamiki funkcjonowania społeczeństwa [Vuik FE i in., 2019]. Przypuszcza się, że trend wzrostowy zachorowalności i śmiertelności koreluje z obecnymi poziomami rozwoju społecznego, a jego wzrost może odzwierciedlać przyjęcie bardziej zachodniego stylu życia [Arnold M i in., 2017]. Coraz bardziej powszechny siedzący tryb życia prowadzi do otyłości, powodującej zwiększenie zarówno obwodu talii, jak i wskaźnika masy ciała (BMI), które są cechami somatycznymi wykorzystywanymi do oceny predyspozycji zachorowania na RJG [Rawla P i in., 2019]. Spożycie czerwonego i przetworzonego mięsa jest związane z wystąpieniem RJG [Zhao Z i in., 2017], podobnie jak nawet niewielka ilość alkoholu dziennie [Choi Y i in., 2018]. Rak jelita grubego koreluje z długotrwałym paleniem tytoniu, intensywne palenie (>40 papierosów/dzień) przez ponad 30 lat zwiększa ryzyko zachorowania o 40% i podwaja śmiertelność w porównaniu z osobami niepalącymi [Botteri E i in., 2020]. Co więcej, nikotynizm wiąże się z prewalencją specyficznych mutacji prowadzących do rozwoju RJG, np. z mutacjami w genie *BRAF* oraz niestabilnością mikrosatelitarną (MSI) i fenotypem metylatora wysp CpG (CIMP), lecz nie mutacjami w genach *APC* i *KRAS* [Chen K i in., 2015; Botteri E i in., 2020].

W większości przypadków (c.a. 70%) rozwój raka jelita grubego nie jest genetycznie uwarunkowany i ma charakter sporadyczny. Jedynie u około 5% jest związany z chorobami dziedzicznymi. Dwa najczęstsze zespoły predysponujące do rozwoju RJG to dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego (HNPCC), znany również jako zespół Lyncha, oraz rodzinna polipowatość gruczolakowata (FAP). Oba zaburzenia dziedziczone są w sposób autosomalny dominujący. Natomiast u pozostałych 20-25%

widoczne są predyspozycje rodzinne, jednak bez wyodrębnionych mutacji zarodkowych [Valle L i in., 2019; Kasi A i in., 2020]. Około 90% przypadków rozwija się na podłożu wcześniejszych łagodnych zmian, takich jak gruczolaki i zmiany ząbkowane. Mechanizm molekularny klasycznej sekwencji gruczolak-gruczolakorak obejmuje mutacje a genie APC, po których pojawiają się mutacje w genach *KRAS* i *TP53*, czemu towarzyszy niestabilność chromosomalna (CIN). Natomiast w alternatywnej ścieżce polipów ząbkowanych, najczęstszą zmianą inicjującą są mutacje w genie *BRAF* oraz zmiany epigenetyczne polegające na hipermetylacji sekwencji promotorowych genów, związane z fenotypem CIMP. Trzecia droga, z gruczolakami lub polipami ząbkowanymi jako stadium przednowotworowym, prowadzi przez dysfunkcję enzymatycznego mechanizmu napraw par zasad błędnie podstawianych (parowanych) w procesie replikacji (MMR), co skutkuje MSI [Kasi A i in., 2020].

Progresja zmian przednowotworowych do raka inwazyjnego może trwać od 5 do 15 lat [Huck MB i in., 2016]. Ryzyko transformacji nowotworowej zależy od ilości polipów i ich wielkości, stopnia dysplazji i budowy histologicznej. Tylko z około 0,25% polipów rozwinię się rak, jednak posiadanie nawet jednego polipa dużego (≥ 10 mm) wiąże się z już z 7% prawdopodobieństwem konwersji w raka inwazyjnego, polipa z $>20\%$ udziałem komponenty kosmkowej – do 17%, zaś dysplazji wysokiego stopnia – do 37%, a ryzyko rośnie wraz ze współistnieniem tych czynników ryzyka transformacji [Degowska M i in., 2008]. U podstawy wymienionych zależności leżą zmiany molekularne, które kumulują wraz ze wzrostem masy polipa, udziału procentowego komponenty kosmkowej i stopnia dysplazji, co przekłada się na rosnący potencjał transformacyjny. Wykazano, że wśród zmian molekularnych pogłębiających się proporcjonalnie do rosnącego prawdopodobieństwa zezłośliwienia jest upośledzenie mechanizmów regulatorowych i obronnych organizmu. Zalicza się do nich, między innymi, wzrost ekspresji białek szoku termicznego [Szczuka I i in. 2021] a spadek ekspresji atypowych receptorów chemokin ACKR [Lewandowska P i in. 2020]. Białka szoku termicznego (HSP) to białka odpowiedzi na stres, które odpowiadają przede wszystkim za utrzymanie proteostazy. Wśród ich „klientów” są białka kluczowe dla nabycia przez komórkę cech umożliwiających transformację, przeżycie, samowystarczalność w zakresie zapewnienia sobie sygnałów wzrostowych, nieograniczoną zdolność tworzenia komórek potomnych oraz wzrost w oderwaniu od podłoża i zdolność zasiedlania odległych narządów, czyli zestawu cech

charakteryzujących komórkę nowotworową [Hanahan i Weinberg, 2000]. HSP są nadekspresjonowane w nowotworach, również w RJG, i, ze względu na swoją rolę, postrzegane jako potencjalny cel terapii przeciwnowotworowej, który mógłby pozwolić rozwiązać problem plastyczności nowotworowej [Lacey T i in., 2021]. Z kolei ACKR uczestniczą w wygaszaniu stanu zapalnego poprzez wychwyt prozapalnych cytokin i chemokin, co jest niekorzystne z punktu widzenia komórek przednowotworowych.

Stan zapalny pełni kluczową rolę w transformacji nowotworowej i późniejszej promocji wzrostu guza, co znalazło potwierdzenie w uznaniu go przez Hanahana i Weinberga za jedną z umiejętności umożliwiających nowotworzenie – „*an enabling feature*” – i włączenie w katalog cech charakteryzujących komórki nowotworowe w przełomowym opracowaniu „*Hallmarks of cancer: the new generation*” [Hanahan i Weinberg, 2011]. Komórki układu odpornościowego kierowane gradientem chemokin do miejsc zapalnych stają się źródłem reaktywnych form tlenu i azotu, które uszkadzają makrocząsteczki, w tym i kwasy nukleinowe, zwiększając prawdopodobieństwo mutacji, i białka enzymatyczne odpowiedzialne za naprawę uszkodzeń, prowadząc do, wspomnianego wcześniej, MSI [Lin S i in., 2018; Kirtonia A i in., 2020]. Wydzielają również mediatory umożliwiające podtrzymanie i propagację stanu zapalnego oraz modulację ekspresji genów, a także czynniki wzrostowe promujące przeżycie i rozwój komórek transformowanych oraz formowanie guza, a w dalszych etapach przerzutowanie i tworzenie ognisk wtórnych. Jednocześnie, promowane przez komórki nowotworowe mediatory zapalne i czynniki wzrostowe modulują odpowiedź immunologiczną gospodarza tworząc mikrośrodowisko sprzyjające rozwojowi i umożliwiające ucieczkę spod nadzoru immunologicznego [Muthusami S i in., 2021; Francuz T i in., 2016]. Mechanizmy te odpowiadają za wyższe ryzyko wystąpienia RJG u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit (NZJ), tj. z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CD), a w szczególności z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (UC) [Nebbia M i in., 2020; Gros B i in., 2023]. Prawdopodobieństwo to rośnie z nasileniem stanu zapalnego, czyli aktywnością choroby, oraz z czasem jej trwania, stanowiąc u pacjentów z UC 2% po 10 latach, 8% po 20, ale już między 18% a 30% po 30 latach [Majumder S i in., 2022; McDowell C i in., 2022]. Rak będący powikłaniem NZJ to CAC (ang. colitis-associated cancer) ma inny profil zmian genetycznych i epigenetycznych niż sporadyczny RJG, w którym mutacje *APC* są żadsze, a dominują mutacje w genach *TP53* (p53), *IDH1*

(dehydrogenaza izocytrynianowa 1) i protoonkogenie *MYC*. CAC odpowiada za około 15% zgonów wśród pacjentów z NZJ. W porównaniu z rakiem sporadycznym, CAC jest zazwyczaj bardziej agresywny, o większym stopniu odróżnicowania komórek, lokuje się raczej w okrężnicy niż odbytnicy i ma większą skłonność do tworzenia ognisk synchronicznych [Nebbia M i in., 2020]. Co więcej, ryzyko zgonu z powodu CAC jest znamienne wyższe niż w przypadku raka sporadycznego, mimo niższego stopnia zaawansowania w momencie diagnozy dzięki skutecznemu nadzorowi endoskopowemu [Olen O i in., 2020].

Dzięki wyraźnie wyodrębnionym stanom przedrakowym w RJG, osoby z grup wysokiego ryzyka, tj. pacjenci z NZJ, FAP, HNPCC oraz pacjenci z historią RJG lub polipektomią w wywiadzie, mogą być objęte nadzorem endoskopowym [Hassan C i in., 2020]. Wykonywanie endoskopii raz na 10 lat jest rekomendowane również u osób bez dodatkowych czynników ryzyka po przekroczeniu 50 roku życia. Coraz powszechniejsze stosowanie kolonoskopii wraz z identyfikacją i usuwaniem zmian przedrakowych, umożliwiły wykrywanie RJG na wcześniejszym etapie [Simon K, 2016]. Z jednej strony prowadzi to do lepszych rokowań, zwiększając szanse przeżycia pacjentów, a z drugiej do, wspomnianego wcześniej, zmniejszenia się liczby zachorowań na ten typ raka w krajach wysokorozwiniętych. Mimo niewątpliwego sukcesu kolonoskopii w wykrywaniu raka i stanu przedrakowego, nie jest to badanie, które cieszy się popularnością wśród pacjentów. Jest też badaniem inwazyjnym, niosącym ryzyko krwawienia z przewodu pokarmowego i/lub perforacji jelita, co jest stanem zagrożenia życia [Simon K, 2016]. Kolonoskopia to badanie, do którego dostęp jest utrudniony ze względu na duże wymagania techniczne w zakresie sprzętu oraz przygotowania osobyby je wykonującej. Pełne wykorzystanie czułości i swoistości metody zależy w dużej mierze od umiejętności endoskopisty, w szczególności w przypadku istnienia trudno wykrywalnych zmian płaskich i/lub badania pacjentów z NZJ, u których architektura błony śluzowej jelita jest mocno zaburzona [Simon K, 2016]. Wciąż więc poszukiwane są mniej inwazyjne i lepiej tolerowane przez pacjentów sposoby na wczesne wykrywanie RJG.

3.2 NIESTEROIDOWE LEKI PRZECIWPALNE I SZLAK COX2/PGE₂

Stan przedrakowy w RJG jest nie tylko wyraźnie wyodrębniony, ale też trwa na tyle długo, że stwarza dogodne okno czasowe na podjęcie działań chemoprewencyjnych

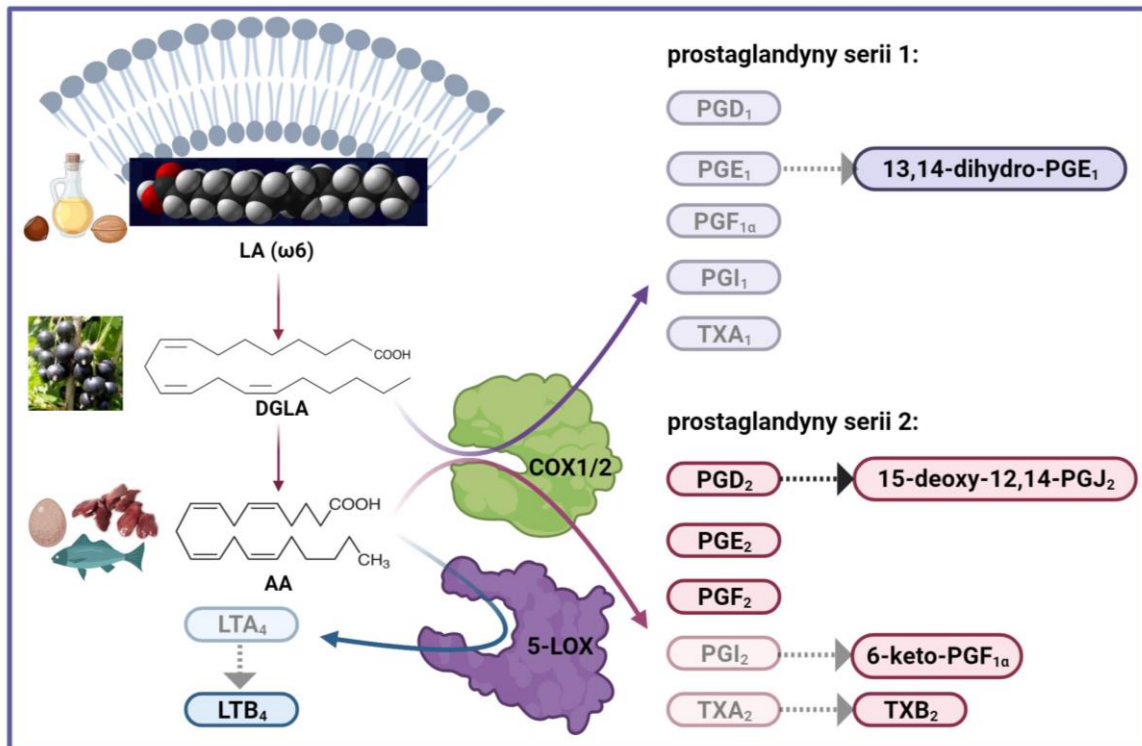
[Simon K, 2016]. Jednak wymagania stawiane ewentualnym chemoterapeutynom są wysokie, szczególnie w zakresie bezpieczeństwa i tolerancji leku oraz kosztów implementacji, ze względu na potencjalnie bardzo długi okres ich stosowania. Chemoprewencja w RJG może dotyczyć trzech etapów:

- powstawania stanów przedrakowych, tj. gruczolaków w sporadycznym RJG czy dysplazji w wyniku chronicznego stanu zapalnego w CAC;
- zezłśliwienia zmiany (transformacja nowotworowa);
- wznowy po leczniczej resekcji guza [Katona BW i in., 2020].

Lekiem o najlepiej udokumentowanej skuteczności w chemoprewencji RJG jest aspiryna, czyli lek o działaniu przeciwzapalnym polegającym na hamowaniu syntezy prostaglandyn przez cyklooksigenazę (COX), której jest nieodwracalnym inhibitorem. Już w latach 70' ubiegłego wieku odkryto wysokie stężenia PGE₂ w guzach nowotworowych, które powiązano z promocją ich wzrostu, co stanowiło przyczynek do intensywnie prowadzonych od lat 80' badań nad możliwością wykorzystania aspiryny w chemoprewencji RJG. Aspiryna jest przedstawicielem niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), do której należą też inne inhibitory COX, o odmiennym, bo kompetycyjnym, mechanizmie działania, które również stały się przedmiotem badań. Udokumentowano zdolność aspiryny i innych pochodnych kwasu acetylosalicylowego do redukcji ryzyka rozwoju gruczolaków i ich progresji do RJG w rozlicznych badaniach kliniczno-kontrolnych. Jednakże randomizowane badania kliniczne nie dają tak jednoznacznie pozytywnej odpowiedzi w kwestii zdolności aspiryny do redukcji zachorowalności na RJG i śmiertelności z jego powodu, ani efektywności w zapobieganiu powstawania gruczolaków czy zmniejszania ich liczby i rozmiaru. Skuteczny wydaje się bardzo długi czas terapii i dawki wyższe niż wykorzystywane w prewencji chorób kardiologicznych, co z kolei podnosi ryzyko krwawień wewnętrznych i działa niekorzystnie na układ pokarmowy [Katona BW i in., 2020]. Pochodną kwasu acetylosalicylowego, a więc i NLPZ, jest sulfalazyna i jej aktywny metabolit – mesalazyna. Są to leki powszechnie stosowane w praktyce klinicznej NZJ, wykorzystywane do indukcji a następnie podtrzymania remisji [Rawa T, 2012]. Badania kliniczno-kontrolne wykazały, że długotrwałe i konsekwentne leczenie mesalazyną zmniejsza ryzyko dysplazji i jej progresji do CAC u pacjentów z NZJ [Degowska M i in., 2008].

Z wyższym ryzykiem incydentów sercowo-naczyniowych oraz znaczącą toksycznością wobec przewodu pokarmowego wiąże się również stosowanie pozostałych, nieswoistych inhibitorów COX [Katona BW i in., 2020]. Stąd poszukiwanie rozwiązań, które eliminowałyby efekty uboczne długofalowego stosowania NLPZ w chemoprewencji RJG. Między innymi, celem redukcji ryzyka incydentów sercowo-naczyniowych, syntezuje się i bada pochodne aspiryny i nieaspirynowych NLPZ (NA-NLPZ), które, oprócz hamowania COX, uwalniają tlenek azotu (NO) o działaniu kardioprotekcyjnym i rozszerzającym naczynia krwionośne [Katona BW i in., 2020]. Trwają też intensywne prace nad NA-NLPZ o obniżonej toksyczności wobec przewodu pokarmowego [Kodala R i in., 2015], do których cegiełkę dokłada również niniejsza praca.

Cyklooksygenazy odgrywają kluczową rolę w biosyntezie prostaglandyn z nienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie kwasu arachidonowego (AA). Kwas arachidonowy jest uwalniany z błony komórkowej w wyniku bezpośredniego działania fosfolipazy A₂ (PLA₂), indukowanej poprzez stymulację komórki, na przykład w wyniku jej uszkodzenie, lub pośredniego, z udziałem fosfolipaz C i D. Wolny AA staje się prekursorem dla mediatorów prozapalnych, powstających w trzech szlakach metabolicznych. W wyniku aktywacji szlaku lipooksygenazy (LOX), AA może być przekształcony w leukotrieny (LT) i lipoksyny (LX). Na drodze szlaku monooksygenazy cytochromu P450 (CYP450), AA przekształcany jest w kwasy epoksyeikozatrienoinowe (EET) lub hydroksyeikozatetraenoinowe (HETE). Natomiast na szlaku angażującym COX, może być metabolizowany do prostaglandyn (PG) i tromboksanów (TX). Metabolity AA są określane jako eikozanoidy, które pełnią funkcję skutecznych autokrynych i parakrynych bioaktywnych mediatorów, szeroko zaangażowanych w różne procesy fizjologiczne i patologiczne [Zhang Y i in., 2020; Wang B i in., 2021]. Uproszczony schemat powstawania eikozanoidów z zaznaczeniem mediatorów będących przedmiotem niniejszej rozprawy przedstawiono na Rysunku 1.

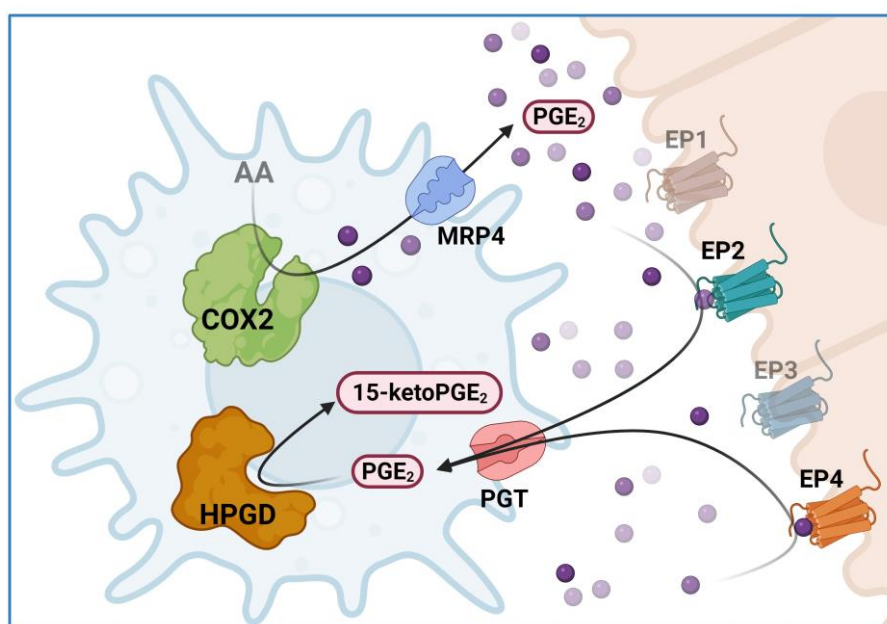


Rysunek 1. Uproszczony schemat syntezy eikozanoidów

Rysunek wykonano w programie BioRender.com (licencja prof. M. Krzystek-Korpackiej). skróty!

Cyklooksygenazy mają dwie aktywności enzymatyczne, a więc dwa miejsca wiążące substraty. Jedną to aktywność cyklooksygenazy (dioksygenazy), która katalizuje produkcję nietrwałego cyklicznego nadtlenu prostaglandyny G₂ (PGG₂) z AA, a drugą to aktywność peroksydazy, która jest odpowiedzialna za redukcję powstałego PGG₂ do prostaglandyny H₂ (PGH₂) [Kawahara K i in., 2015]. Prostaglandyna H₂ jest strukturą nietrwałą, która może być metabolizowana przez specyficzne izomeryzy (PGDS, PGES, PGFS i PGIS) do prostaglandyn i prostacyklin (PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂) lub, poprzez działanie syntazy TXA, do tromboksanu A₂ (TXA₂). [Simmons DL i in., 2004]. Prostaglandyny wywierają swoje działanie biologiczne w sposób autokryny lub parakryny poprzez wiązanie się z odpowiednimi receptorami, które należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR). Receptory te są oznaczone jako DP dla prostaglandyny D₂; EP1, EP2, EP3 i EP4 dla prostaglandyny E₂; FP dla prostaglandyny F_{2α}; IP dla prostacykliny I₂; i TP dla tromboksanu A₂. Oprócz szybkości syntezy, na stężenie pozakomórkowe prostaglandyn wpływa proces ich transportu przez błonę komórkową, w którym pośredniczą białkowe transportery – transporter prostaglandyn PGT, odpowiedzialny za wychwyt zwrotny PG, oraz białko 4 związane z opornością

wielolekową – MRP4, odpowiedzialne za uwalnianie PG do przestrzeni międzykomórkowej. Ponadto, pula aktywnych PG jest regulowana również na poziomie dehydrogenazy 15-hydroksyprostaglandynowej (HPGD/15-PGDH), odpowiedzialnej za rozkład PGE₂ do jej nieaktywnego metabolitu [Kawahara K i in., 2015]. Uproszczony schemat szlaku COX2/PGE₂ przedstawiono na Rysunku 2.



Rysunek 2. Uproszczony schemat szlaku COX2/PGE₂.

Rysunek wykonano w programie BioRender.com (licencja prof. Małgorzaty Krzystek-Korpackiej)

Na szlaku cyklooksygenazy wolny AA może być metabolizowany przez dwie izoformy enzymu, COX1 i COX2. COX1 jest izoenzymem konstytutywnym, który ulega ekspresji w wielu komórkach. Syntetyzuje prostaglandyny wykazujące działanie cytoprotekcyjne i utrzymujące homeostazę organizmu [Finetti F i in., 2020]. Ponadto COX1 uczestniczy w zachowaniu integralności błony śluzowej przewodu pokarmowego [Peng X i in., 2017] i zapobieganiu translokacji bakterii ze światła jelita do krążenia poprzez zwiększanie wydzielania mucyn stanowiących fizyczną barierę dla mikroorganizmów oraz przez regulowanie perystaltyki jelit. Mucyny chronią też przewód pokarmowy przed uszkodzającym działaniem kwasu solnego oraz innych czynników drażniących i nekrotyzujących. COX1, poprzez PGE₂, hamuje sekrecję kwasu solnego bezpośrednio oddziałując na komórki okładzinowe żołądka oraz pośrednio, poprzez hamowanie wydzielania histaminy. Równolegle, COX1/PGE₂ wzmacnia wydzielanie jonu wodorowęglanowego w dwunastnicy, co neutralizuje nadmiar kwasu solnego

zapobiegając uszkodzeniom śluzówki jelit. Dodatkowo, COX1 i produkowane przez nią PG regulują przepływ krwi w błonie śluzowej przewodu pokarmowego. Są też odpowiedzialne za zmniejszanie chemotaksji neutrofilii, będących pierwszymi komórkami układu odpornościowego pojawiającymi się w miejscu uszkodzenia tkanek i/lub inwazji patogenów oraz za hamowanie aktywności mieloperoksydazy (MPO) i indukowalnej syntazy tlenku azotu (NOS2). Oba enzymy związane są z aktywacją neutrofilii i zaangażowane w syntezę wolnych rodników, które, jako efekt uboczny, uszkodzają sąsiednie tkanki oraz wykazują aktywność mutageną [Takeuchi K, 2018]. Uważa się, że to głównie hamowanie tej izoformy COX jest odpowiedzialne za skutki uboczne długofalowego przyjmowania aspiryny i innych nieswoistych NLPZ, choć doniesienia ostatnich lat wskazują również na cytoprotekcyjne działanie COX2 w przewodzie pokarmowym [Takeuchi K, 2018]. Co intrygujące, inhibicja właśnie COX1 przez aspirynę ma również działanie przeciwnowotworowe, wynikające z hamowania interakcji komórek nowotworowych z płytkami krwi, które dostarczają im czynników wzrostowych i angiogennych, umożliwiających proliferację, angiogenezę i tranzycję epitelialno-mezenchymalną, będącą podstawą procesu przerzutowania [Ornelas i in., 2017].

W przeciwieństwie do izoformy 1, COX2 występuje fizjologicznie tylko w niektórych narządach/układach, np. w ośrodkowym układzie nerwowym [Lopez DE, 2020]. Jednakże, zdolność do syntezy enzymu posiada większość komórek, tyle że jest ona indukowana przez czynniki endogenne, m.in., hormony, mediatory prozapalne i czynniki wzrostowe, lub egzogenne w odpowiedzi na stres [Wang B i in., 2021]. Do egzogennych induktorów ekspresji COX2 należą mikroorganizmy i pochodzące od nich wzorce molekularne związane z patogenami (PAMPs), m.in., lipopolisacharyd (LPS) i kwas lipotejchowy (LTA) oraz metabolity bakteryjne, np. N tlenek trimetyloaminy (TMAO). Mikroorganizmy i PAMPs aktywują receptory Toll-podobne (TLR) i/lub inflamasomy, co skutkuje aktywacją szlaku NFκB i indukcją ekspresji COX2 [Liu Y i in., 2020; Fang Y i in., 2021; Potrykus M i in., 2021]. COX2 jest również konstytutywnie ekspresjonowany przez komórki nowotworowe w niektórych typach raka, w tym w RJK [Finetti F i in., 2020]. Inhibitory swoiste wobec COX2 wykazują własności przeciwnowotworowe w badaniach *in vitro* i na modelach zwierzęcych oraz działanie chemoprewencyjne w badaniach na

modelach zwierzęcych, potwierdzone w licznych badaniach kliniczno-kontrolnych (case-control studies) [Katona BW i in., 2020].

Wysoka aktywność szlaku COX2/PGE₂ jest uważana za cechę wyróżniającą RJG na tle innych nowotworów [Fujino H, 2016]. Poprzez ścisły związek ze stanem zapalnym, szlak COX-2/PGE₂ jest zaangażowany we wszystkie etapy karcynogenezy w jelicie, od inicjacji po przerzutowanie [Sheng J i in., 2020]. Jak już wspomniano, jedną z częstszych mutacji przyczyniających się do karcynogenezy w jelicie grubym jest mutacja w genie supresorowym *TP53*, kodującym białko p53 określane mianem „strażnika genomu” i decydującym o losach komórki [Zawacka-Pankau JE, 2022]. Między innymi, p53 hamuje w komórkach ekspresję COX2 działając bezpośrednio na promotor *PTGS2* i redukując transkrypcję do 1/4. Efekt supresorowy wynika z konkurowania przez p53 z białkiem wiążącym TATA (TBP), warunkującym inicjację transkrypcji *PTGS2* [Subbaramaiah K i in., 1999]. Ponadto, p53 indukuje ekspresję oksydazy prolinowej, która hamuje aktywność szlaku COX2/PGE₂ [Liu Y i in., 2008]. Supresja TP53 przyczynia się więc do nadekspresji COX2 w komórkach, co zwiększa zdolności komórek nabłonka przewodu pokarmowego do samoodnowy, powodując jednocześnie nagromadzenie w śluzówce komórek słabo zróżnicowanych o dużym potencjale transformacyjnym [Ohtsuka J i in., 2018]. COX2 wykorzystuje w syntezie PG i TX tlen cząsteczkowy, co wiąże się z uwalnianiem anionorodnika ponadtlenkowego jako produktu ubocznego, przyczyniając się do zachwiania równowagi redox i stresu oksydacyjnego, zwiększając tym samym prawdopodobieństwo mutacji.

Wykazano, że w rozwoju RJG uczestniczyć mogą co najmniej trzy z czterech znanych receptorów PGE₂, pośrednicząc w różnych aktywnościach promujących raka. PGE₂/EP1 uczestniczy w migracji komórek nowotworowych i zwiększa ich inwazyjność zaś PGE₂/EP2 stymuluje angiogenezę oraz indukuje immunosupresję umożliwiając komórkom nowotworowym ucieczkę spod nadzworu immunologicznego i tworząc sprzyjające rozwojowi guza mikrośrodowisko [Finetti F i in., 2020; Fujino H, 2016]. PGE₂/EP4 również promuje immunotolerancję, zmniejszając migrację do guza prekursorów konwencjonalnych komórek dendrytycznych zaangażowanych w prezentację antygeny i obronę przeciwnowotworową oraz upośledzając funkcje komórek NK [Take Y i in., 2020]. Dodatkowo, PGE₂/EP4 promuje infiltrację guza przez mieloidalne

komórki supresorowe (MDSC), aktywujące limfocyty T regulatorowe a hamujące aktywację limfocytów T cytotoksycznych oraz indukujące polaryzację makrofagów w kierunku immunosupresyjnego fenotypu M2 [Sheng J i in., 2020]. Wobec komórek nowotworowych, PGE₂/EP4 chroni przed apoptozą, promuje proliferację, migrację oraz tranzycję epithelialno-mezenchymalną (EMT), umożliwiając komórkom nowotworowym przerzutowanie. Ponadto, PGE₂/EP4 jest zaangażowane w dodatnie sprzężenie zwrotne, indukując ekspresję i syntezę COX2. Poprzez EP4, PGE₂ transaktywuje inne szlaki sygnałowe, m.in., receptory czynnika wzrostu EGF (EGFR) oraz HGF (c-Met), co z kolei prowadzi do indukcji metaloproteinaz macierzy (MMP), umożliwiając przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), kluczową dla procesów angiogenezy i metastazy [Fujino H, 2016]. Choć PGE₂ ma największe powinowactwo do receptora EP3, jego rola nie jest klarowna. Wykazano jednak, że PGE₂/EP3, podobnie jak PGE₂/EP4 transaktywowane EGF/EGFR i HGF/c-Met, indukuje ekspresję czynnika wzrostu śródlonka (VEGF) oraz jego receptora – VEGFR1, promując angiogenezę [Finetti F i in., 2020; Fujino H., 2016]. EP1 aktywuje podjednostkę Gαq i , poprzez zwiększenie stężenia wewnątrzkomórkowego jonów Ca²⁺, prowadzi do aktywacji szlaków NFκB, NFAT i MAPkinaz [Finetti F i in., 2020. Ponadto EP1 jest zaangażowany w wyciszenie szlaku COX2/PGE₂, przez tworzenie kompleksu z enzymem i promocję jego ubiquitynacji, prowadzącej do degradacji proteosomalnej [Sood R i in., 2014].

COX2 jest celem molekularnym wszystkich NLPZ [Mohammed i in., 2018], również leków z grupy oksykamów, które wyróżnia nieco odmienna budowa (brak funkcyjnej grupy -COOH), inne miejsce wiązania w miejscu aktywnym COX oraz zdolność do hamowania również syntazy PGE₂ (mPGES). Ta ostatnia właściwość wpływa na zmniejszenie skutków ubocznych towarzyszących długotrwałemu stosowaniu NLPZ [Wang J i in., 2010; Tasaki Y i in., 2012; Vartiainen N i in., 2001]. Dowiedziono skuteczności oksykamów w zapobieganiu powstawania gruczolaków i redukcji ich rozmiaru, co zainicjowało szereg badań nad molekularnymi mechanizmami leżącymi u podstaw tego zjawiska oraz inicjatyw mających na celu opracowanie modyfikacji chemicznych leków z tej grupy poprawiających ich efektywność i bezpieczeństwo [Calaluce R i in., 2000; Saini MK i in., 2012].

4 CEL PRACY

Celem badań, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie, było przybliżenie zmian na szlaku COX2/PGE₂ związanych z występowaniem RJG poprzez analizę transkryptomiczną, proteomiczną i metabolomiczną **(1)**, z założeniem, że zaobserwowane deregulacje mogą być wykorzystane jako potencjalne biomarkery RJG **(2)** i/lub cele terapeutyczne w terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem klasycznych oksykamów – piroksykam i meloksykam – oraz nowosyntetyzowanych pochodnych o obniżonej gastrotoksyczności **(3)**.

5 MATERIAŁY I METODY

5.1 MATERIAŁY

5.1.1 MATERIAŁ KLINICZNY

W pracy wykorzystano surowicę oraz cDNA tkanek zdeponowanych w repozytorium Zakładu Biochemii Katedry Biochemii i Immunochemii, a pozyskanych podczas realizacji zadania: *„Ocena i porównanie odpowiedzi zapalnej, immunologicznej i angiogennej u pacjentów z rakiem jelita grubego operowanych metodą robotową oraz tradycyjną metodą otwartą”*, kierowanego przez prof. Wojciecha Witkiewicza (Wojewódzki Szpital Specjalistyczny), w którym prof. Małgorzata Krzystek-Korpacka (UMW) była głównym badaczem. Zadanie było częścią projektu WROVASC Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej. Zgoda Komisji Bioetycznej przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym na pobór materiału biologicznego od pacjentów została umieszczona w Załączniku 1.

5.1.1.1 cDNA

cDNA wykorzystane w niniejszych badaniach zostało uzyskane przez izolację RNA metodą Chomczyńskiego (ekstrakcja fenol-chloroform) a następnie oczyszczanie metodą kolumnkową z trawieniem DNazą celem uniknięcia zanieczyszczenia genomowym DNA. Materiał do izolacji RNA stanowiły fragmenty tkanek uzyskane śródoperacyjnie z gruczolakoraka oraz okolic marginesu resekcji, zabezpieczone w roztworze RNAlater. W postoperacyjnym badaniu histo-patologicznym wyciętych guzów nowotworowych, węzłów chłonnych i, jeśli obecne, ognisk wtórnych, oceniono stopień zaawansowania choroby (pTNM) oraz potwierdzono brak komórek nowotworowych w marginesach resekcji. Tkanki homogenizowano w buforze do lizy z dodatkiem 2-merkaptoetanolu w homogenizatorze kulowym FastPrep-24.

Stężenie i czystość uzyskanego RNA określono przez analizę spektrofotometryczną na spektrofotometrze do mikro objętości Nanodrop 2000. Integralność oceniano natomiast przez elektroforezę mikroprzepływową na platformie Experion. cDNA uzyskano w reakcji odwrotnej transkrypcji, wykorzystując jako matrycę jedynie nie zanieczyszczone i integralne RNA. cDNA przechowywano w -80°C . Proces

przygotowania materiału od pacjentów, izolacji RNA i syntezy cDNA został szczegółowo opisany w publikacjach zespołu [Lewandowska P i in., 2020; Krzystek-Korpacka M i in., 2020].

Charakterystykę pacjentów, których cDNA wykorzystano w niniejszej pracy, przedstawiono w Tabeli I.

Tabela I. Charakterystyka pacjentów – analiza ekspresji w tkankach

Cecha:	Wartość:
Liczba pacjentów, n:	53
Wiek [lata], średnia±SD	68,2±10,7
Płeć, K/M, n:	21/32
Stopień zaawansowania pTNM7, n: 0/I/II/III/IV	4/8/14/23/4
Głębokość naciekania guza pierwotnego (pT), n: tis (T0)/T1/T2/T3/T4	4/4/7/30/8
Przerzuty do węzłów chłonnych (pN), n: N0/N1/N2	26/14/13
Przerzuty odległe (pM), n: M0/M1	49/4
Stopień zaawansowania histologicznego (G), n: Gx/G1/G2/G3/G4	3/8/36/7
Sublokalizacja guza pierwotnego, n: j.prawostronne/j.lewostronne/odbytnica	17/16/20

N, liczba obserwacji; SD, odchylenie standardowe; K, kobiety; M, mężczyźni; pTNM7, skala oceny patologicznej zaawansowania choroby nowotworowej, edycja 7; j., jelito.

5.1.1.2 Surowica

Surowica wykorzystana w niniejszej pracy, została uzyskana z krwi pełnej pobranej z żyły łokciowej do zestawu S-monovette i odstawionej na 30 minut w temperaturze pokojowej celem uformowania się skrzepu, który następnie odwirowywano, a uzyskany supernatant (surowica) porcjowano i mrożono w -80°C. Szczegóły pozyskiwania surowicy od pacjentów opisano w publikacjach zespołu [Krzystek-Korpacka M i in., 2021; Fleszar MG i in., 2021; Fleszar MG i in., 2020].

Charakterystykę pacjentów, których surowicę wykorzystano w niniejszej pracy, przedstawiono w Tabeli II.

Tabela II. Charakterystyka pacjentów – analiza stężenia eikozanoidów w surowicy

Cecha:	Kontrole	Pacjenci	P
Ilość pacjentów, n:	28	67	-
Wiek [lata], mediana; IQR	34,5; 15	66; 14,5	<0.001 ^M
Płeć, K/M, n:	11/17	28/39	1.0 ^F
Cecha:	Pacjenci		
Ryzyko zgonu podczas operacji (ASA), n: ASA1/ASA2/ASA3	15/41/11		
Stopień zaawansowania pTNM7, n: 0/I/II/III/IV	5/8/23/26/5		
Głębokość naciekania (pT), n: tis (T0)/T1/T2/T3/T4	5/1/11/38/12		
Przerzuty do węzłów chłonnych (pN), n: N0/N1/N2	36/15/16		
Przerzuty odległe (pM), n: M0/M1	62/5		
Zaawansowanie histologiczne (G), n: G1/G2/G3/G4	11/42/10/4		
Sublokalizacja guza pierwotnego, n: RC/LC/R	20/18/29		

N, liczba obserwacji; IQR; zakres kwartylowy; ^M, Mann-Whitney *U* test; K, kobiety; M, mężczyźni; ^F, test Fishera; ASA, skala oceny ryzyka zgonu podczas operacji nie-kardiochirurgicznej; pTNM7, skala oceny patologicznej zaawansowania choroby nowotworowej, edycja 7; RC, jelito prawostronne; LC, jelito lewostronne; R, odbytnica.

Przy określaniu skali ryzyka zgonu pacjentów podczas planowanego zabiegu leczniczej resekcji guza wykorzystano skalę ASA – im wyższy stopień, tym wyższe ryzyko. Zasady oceny, opracowane przez *American Society of Anesthesiologists* i rekomendowane przez *European Society of Anaesthesiology and Intensive Care* przedstawiono w Tabeli III.

Tabela III. Skala ASA oceny ryzyka zgonu podczas operacji pozasercowej

Stopień w skali ASA	Definicja
ASA I	<p>Pacjent bez obciążeń poddawany operacji o małym lub średnim ryzyku, tj:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ogólnie zdrowy ¹, • niepalący, • spożywający alkohol w niewielkich ilościach.
ASA II	<p>Pacjent z niezbyt nasiloną chorobą układową:</p> <ul style="list-style-type: none"> • dobrze kontrolowane nadciśnienie tętnicze, • wyrównana cukrzyca, • COPD w stadium wydolności układu oddechowego, • stabilna choroba wieńcowa, • niedokrwistość, • otyłość 1 i 2 stopnia.
ASA III	<p>Pacjent z ciężką chorobą układową, która ogranicza jego wydolność:</p> <ul style="list-style-type: none"> • zawał serca przeżyty do 3 miesięcy temu, • niestabilna choroba wieńcowa, • ciężkie schorzenia układu oddechowego, • niewyrównana cukrzyca, • alkoholicy, • otyłość 3 stopnia (olbrzymia).
ASA IV	<p>Pacjent z bardzo ciężką chorobą układową, która stanowi o zagrożeniu jego życia, np.:</p> <ul style="list-style-type: none"> • niewydolność nerek, • niewydolność serca, • wada serca z ostrą niewydolnością serca, • ostry zawał serca, • niewydolność wątroby lub innych narządów.
ASA V	<p>Pacjent z niewydolnością wielonarządową w stanie skrajnie ciężkim, z rokowaniem co do przeżycia < 24 h</p>

¹, poza chorobą podstawową wymagającą interwencji chirurgicznej; NT, nadciśnienie tętnicze; COPD (POChP), przewlekła obturacyjna choroba płuc (Tabela cytowana za Parol i wsp. [Parol G i in., 2016])

Zaawansowanie procesu nowotworowego u pacjentów oceniano w skali pTNM (ocena patologiczna), tj. głębokość nacieku ściany jelita przez guz pierwotny (T)–brak/obecność i rozległość przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (N)–

brak/obecność przerzutów odległych (M) (ang. **Tumor-Node-Metastasis**), zaproponowanej przez Międzynarodową Unię do Walki z Rakiem (UICC). Ze względu na czas zebrania materiału, w ocenie wykorzystana była edycja siódma klasyfikacji (TNM7) z 2010r. Zasady klasyfikacji przedstawiono w Tabeli IV. (cytowane za Nasierowską-Guttmejer [Nasierowska-Guttmejer A, 2014]).

Tabela IV. Stopień zaawansowania raka jelita grubego wg klasyfikacji pTNM 7. wydania klasyfikacji TNM AJCC/UICC (aktualizacja 2013 r.)

<p>Głębokość naciekania, cecha pT</p> <p>Tis – neoplazja śródnabłonkowa/dysplazja dużego stopnia, rak <i>in situ</i>, inwazja blaszki właściwej i/lub mięśniowej błony śluzowej</p> <p>T1 – naciek raka przekracza mięśniówkę właściwą błony śluzowej, obecny jest w błonie podśluzowej i nie wnika do mięśniówki właściwej – rak wczesny</p> <p>Guzy w stopniu T1 usuwane metodą polipektomii lub metodą przezodbytowej endoskopowej mikrochirurgii (<i>trans-anal endoscopic microsurgery</i> – TEM) kwalifikowane są wg głębokości naciekania błony podśluzowej:</p> <ul style="list-style-type: none"> dla polipów uszypułowanych z rakiem wg systemu Haggitta: inwazja głowy (szczytu) – poziom 1., przejście między głową i podstawą/szypułą – poziom 2., naciek podstawy szypuły – poziom 3., naciek ściany jelita w polipach nieuszypułowanych – poziom 4. dla polipów nieuszypułowanych z rakiem wg systemu Kikuchi (ryc. 1.) na podstawie głębokości naciekania błony podśluzowej: 1/3 górnej (sm1), środkowej, 2/3 (sm2), dolnej 1/3 (sm3) <p>T2 – naciekanie mięśniówki właściwej</p> <p>T3 – naciek przechodzący poza mięśniówkę właściwą do tkanek przedsurowicówkowych z określeniem głębokości: płytkie i nieprzekraczające połowy grubości oraz głębokie przekraczające połowę grubości tkanek przedsurowicówkowych</p> <p>T4a – naciekanie powierzchni trzewnej surowicówki</p> <p>T4b – naciekanie przylegających struktur</p>
<p>Liczba węzłów chłonnych z przerzutami, cecha pN</p> <p>N1a – 1 węzeł chłonny z przerzutem</p> <p>N1b – 2 do 3 węzłów chłonnych z przerzutami</p> <p>N1c – depozyty komórkowe bez obecności przerzutów w węzłach chłonnych</p> <p>N2a – 4 do 6 węzłów chłonnych z przerzutami</p> <p>N2b – 7 i więcej węzłów chłonnych z przerzutami</p>
<p>Przerzuty odległe, cecha pM</p> <p>M0 – brak przerzutów odległych</p> <p>M1a – przerzuty do jednego narządu: płuco, wątroba, pozaregionalne węzły chłonne</p> <p>M1b – przerzuty do więcej niż jednego narządu lub sieci</p>

Tabela cytowana za [Nasierowska-Guttmejer A, 2014].

5.1.2 LINIE KOMÓRKOWE

W pracy wykorzystano trzy atestowane linie komórkowe ludzkiego gruczolaka jelita grubego, zakupione w American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA):

- Caco-2 (ATCC® HTB-37™),

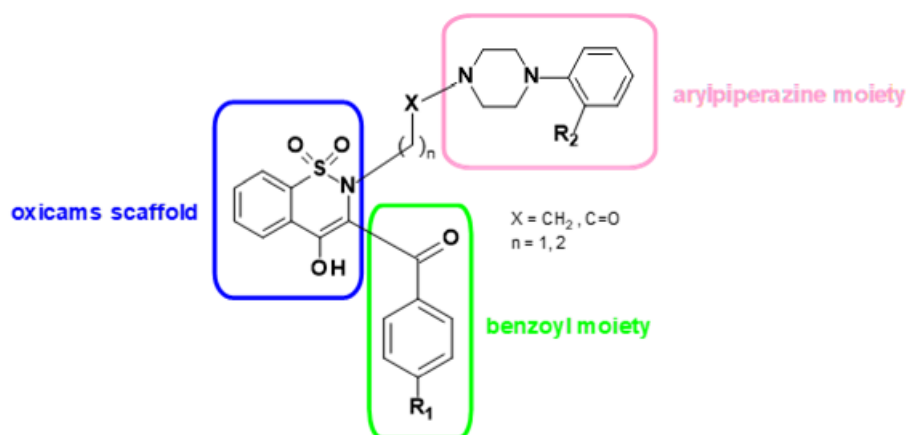
- HCT 116 (ATCC® CCL-247™),
- HT-29 (ATCC® HTB-38™).

5.1.3 NIESTEROIDOWE LEKI PRZECIWWZAPALNE Z GRUPY OKSYKAMÓW

Komórki stymulowano niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi z grupy oksykamów oraz ich pochodnymi:

- lek referencyjny: piroksykam (Sigma-Aldrich, USA),
- lek referencyjny: meloksykam (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, USA),
- nowe pochodne, które zostały opracowane i zsyntezowane w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu przez Panią dr Berenikę Szczęśniak-Sięgę.

Ogólny schemat oksykamów ze wskazanymi miejscami modyfikacji przedstawiono na Rysunku 3.



Rysunek 3. Ogólny schemat struktury oksykamów z miejscami modyfikacji.

Kolorem niebieskim zaznaczono strukturę podstawową, kolorem różowym – resztę arylpiperazynową, a zielonym – resztę benzoilową. Literą „X” oznaczono modyfikowany łącznik, literami „R1” i „R2” – miejsca podstawników stanowiących o modyfikacji. Rysunek został przygotowany przez dr Berenikę Szczęśniak-Sięgę i pochodzi z publikacji Krzystek-Korpaczka i wsp. [Krzystek-Korpaczka M, i in., 2020], której jestem współautorem.

Wzory strukturalne oksykamów wykorzystanych jako leki referencyjne oraz testowanych analogów zestawiono w Tabeli V.

Tabela V. Wzory strukturalne badanych związków i ich oznaczenia wykorzystywane w pracy

Lek referencyjny/analog	Wzór strukturalny
Piroksykam, #6	
Meloksykam, #7	
Analog 1, #1	
Analog 2, #2	
Analog 3, #3	
Analog 4, #4	
Analog 5, #5	

5.1.4 POZOSTAŁE ODCZYNNIKI

5.1.4.1 Hodowla komórkowa

- Sulforhodamina B sodium salt (SRB) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Medium DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Surowica bydlęca FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Penicylina, Streptomycyna, Amfoterycyna B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- TrypLE™ Express (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

- Błękit trypanowy (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- PBS (VWR, International, Radmor, PA, USA)
- Complete Tablets EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy)

5.1.4.2 Proteomika

- Celulozowa bibuła chromatograficzna Whatman™ (GE Healthcare, USA)
- Extra Thick Blot Filter Paper (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Pierce™ Reversible Protein Stain Kit for PVDF Membranes (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- β-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- Kazeina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- Metanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- Chlorowódór (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- Glicyna (BioShop, Burlington, ON, Kanada)
- Tris (BioShop, Burlington, ON, Kanada)
- PBS w tabletkach (BioShop, Burlington, ON, Kanada)
- Immobilon P (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA)
- 2x Laemmli Sample Buffer (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- 30% Akrylamid/Bis akrylamid (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- Nadsiarczan amonu (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- Siarczian dodecyłu sodu SDS (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- Marker masy cząsteczkowej Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- TEMED N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- Clarity Western ECL Substrate (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- β-Actin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- Przeciwciała I-rzędowe:
 - Królicze przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi EP4 (EP4 Receptor C-Term Polyclonal Antibody #101775; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)
 - Królicze przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi EP2 (EP2 Receptor Polyclonal Antibody #101750; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)
 - Królicze przeciwciała skierowane przeciwko transporterowi prostaglandyny (Prostaglandin Transporter C-Term Polyclonal Antibody #11860; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)

- Królicze przeciwciała skierowane przeciwko MRP4 (MRP4 Polyclonal Antibody #PA5-78695, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Królicze przeciwciała skierowane przeciwko COX2 (Anti-COX2/Cyclooxygenase 2 antibody #ab15191, Abcam, Cambridge, UK)
- Kozie przeciwciała skierowane przeciwko 15-PGDH (Human 15-PGDH/HPGD Antibody #AF5660; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
- Przeciwciała II-rzędowe:
 - Kozie przeciwciała anty-królicze znakowane HRP (Goat anti-Rabbit IgG (Heavy chain), Superclonal™ Recombinant Secondary Antibody, HRP, #A27036 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
 - Królicze przeciwciała anty-kozie znakowane HRP Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP (affinity isolated) #P0449 (Agilent Dako, Glostrup, Dania)

5.1.4.3 Transkryptomika

- RNAlater solution (Ambion Inc., Austin, TX, USA)
- Bufor lizujący (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, Waltham, MA, USA)
- β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, Waltham, MA, USA)
- PureLink™ DNase Set (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Chloroform (Chempur, Piekary Śląskie, Polska)
- RNA StdSens analysis kits (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- Standard mas – RNA ladder (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- Etanol (Chempur, Piekary Śląskie, Polska)
- iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- SsoFast EvaGreen® Supermix (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- Sekwencje startowe (primery) syntezowane na zamówienie przez Genomed (Warszawa, Polska)

Sekwencje primerów podano w Tabeli VI. Zostały one opracowane i zwalidowane przez OriGene™ Technologies (Rockville, MD, USA). Dodatkowo, sekwencje sprawdzono *in silico* (analiza Blast), a specyficzność potwierdzono przez analizę krzywych topnienia produktów oraz ich elektroforezę w żelu agarozowym.

Tabela VI. Primery wykorzystane w badaniach

Gen	Kodowane białko	Sekwencja 5'→3'
MRP4	Białko oporności wielolekowej	F: CTGTTGGAGGATGGTGATCTGAC R: CTGCTAACTTCCGCATCTACTGC
PGT	Transporter prostaglandyn	F: TCAAGAGGCTCCCTGGTGGATT R: CAGCAATGACGGAGGAGAAGGT
PPIA	Peptydylo-prolylo cis/trans izomeraza A	F: GGCAAATGCTGGACCCAACACA R: TGCTGGTCTTGCCATTCCTGGA
RPLP0	60S rybosomalne kwaśne białko P0	F: TCACAACAAGCATACCAAGAAGC R: GTATCCGATGTCCACAATGTCAAG
GAPDH	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfo-glicerynowego	F: TAGATTATTCTCTGATTTGGTCGTATTGG R: GCTCCTGGAAGATGGTGATGG
PTGS2	Indukowalna cyklooksyzgenaza (COX2)	F: CGGTGAAACTCTGGCTAGACAG R: GCAAACCGTAGATGCTCAGGGA
HPGD	Dehydrogenaza 15-hydroksyprostaglandyny	F: TGGAGGTGAAGGCGGCATCATT R: GCAAACCGTAGATGCTCAGGGA
PTGER2	Receptor prostaglandyn eP2	F: GACCACCTCATTCTCTGGCTA R: AACCTAAGAGCTTGGAGGTCCC
PTGER4	Receptor prostaglandyn EP4	F: TACTCATTGCCACCTCCCTGGT R: GACTTCTCGCTCCAAACTTGGC

5.1.4.4 Metabolomika

- Acetonitryl (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA)
- Metanol (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA)
- Woda LC-MS Grade (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA)
- Octan etylu Merck Millipore (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA).
- Wzorce i znakowane izotopowo wzorce wewnętrzne 6-KETO-PGF1; 6-KETO-PGF1-d4; 13,14-Dihydro-PGE1; 13,14-Dihydro-PGE1-d4; LTB4; LTB4-d4; PGD2; PGD2-d9; PGE2; PGE2-d9; PGF2; PGF2-d4; TXB2; TXB2-d4; 15-DEOXY-12,14-PGJ2; 15-DEOXY-12,14-PGJ2-d9 (Biokom, Polska).
- Wzorzec kalibracyjny do spektrometru mas Enkafalina leucynowa (Waters, Milford, MA, USA).

5.1.5 APARATURA

5.1.5.1 Hodowla komórkowa

- Inkubator CelCulture CO₂ CCL-170B-8 Incubator (Esco Micro Pte Ltd., Singapur)
- Automatyczny licznik komórek Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

- Mikroskop trójokularowy z kontrastem fazy odwróconej Olympus CK2 (Olympus, Tokio, Japonia)
- Wirówka wentylowana MPW-352 (MPW MED. INSTRUMENTS, Warszawa, Polska)
- Komora laminarna Herasafe HS12 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Spektrofotometr mikropłytkowy Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf, Szwajcaria)

5.1.5.2 Proteomika

- Homogenizator ultradźwiękowy Ultrasonic processor UP 200S (Hielscher Ultrasound Technology, Teltow, Niemcy)
- Wytwornica lodu płatkowego Scotsman AF 80 (Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA)
- Inkubator Precyzyjny Cieplarka MEMMERT INP 200 (Mettler GmbH + Co. KG, Niemcy)
- Spektrofotometr mikropłytkowy Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf, Szwajcaria)
- Wytrząsarka VX-200 Labnet Vortex Mixer z głowicą (Labnet International, Inc., USA)
- Koncentrator próżniowy Hetovac Vr-1 (Heto Lab Equipment, Ikast, Dania)
- Miniwirówka, Corning HTL SA (Warszawa, Polska)
- Wirówka wysokoobrotowa z chłodzeniem Sorvall ST8R (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Termoblok TDB-120 (Biosan, Ryga, Łotwa)
- Zestaw do elektroforezy wertykalnej Mini-Protean Tetra Cell (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- Aparat do szybkiego transferu białek Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- Urządzenie do obrazowania i analizy żeli oraz western blotów ChemiDoc MP Imaging System (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- Kołyska laboratoryjna KL-942 (JWElectronic, Warszawa, Polska)

5.1.5.3 Transkryptomika

- Homogenizator Fastprep24 Homogenizer (MP Biomedical, USA)
- Komora laminarna Herasafe HS12 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Wirówka wysokoobrotowa z chłodzeniem 5430 R (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- Termoblok TDB-120 (Biosan, Ryga, Łotwa)

- Spektrofotometr UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Platforma do elektroforezy przepływowej Experion™ Automated Electrophoresis Station (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- Termocykler do detekcji PCR w czasie rzeczywistym CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- Platforma do elektroforezy przepływowej Experion™ Automated Electrophoresis Station (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)
- Komora Aura PCR (Bioair S.p.A., Siziano (PV), Włochy)

5.1.5.4 Metabolomika

- Koncentrator próżniowy Heto Hetovac Vr-1 (Heto Lab Equipment, Ikast, Dania)
- Sigma 3-18K firmy SIGMA Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz, Niemcy)
- Chromatograf cieczowy ACQUITY UPLC I-Class, wyposażony w chłodzony automatyczny podajnik próbek oraz kolumnę Acquity UPLC BEH Shield RP18 (130Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 100 m) (Waters, Milford, MA, USA)
- Spektrometr mas Waters Xevo G2 XS QTOF (Milford, MA, USA)
- Analizę danych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania MassLynx firmy Waters (Milford, MA, USA)

5.1.5.5 Przygotowanie buforów

- Waga Ohaus Adventurer Pro AV-513 CM (Ohaus Corporation, Parsippany, NJ, USA)
- pH-Meter GLP 21 (Crison Instruments, s.a., Barcelona, Hiszpania)
- Mieszadło magnetyczne ES 21 (Wigo, Pruszków, Polska)

5.2 METODY

5.2.1 BADANIA *IN VITRO*

5.2.1.1 Prowadzenie hodowli

Komórki hodowano w pożywce Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), pozbawionej barwnika (czerwieni fenolowej), a zawierającej 25 mM glukozę z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej oraz stabilizowanego 1% r-ru antybiotyków. Antybiotyk zawierał w każdym mililitrze 10000 jednostek penicyliny, 10 mg streptomycyny i 25 µg amfoterycyny B. Podłoże hodowlane wymieniano dwukrotnie w ciągu tygodnia. Komórki rosły w inkubatorze w temperaturze 37°C i w obecności 5% CO₂, w dedykowanych sterylnych butelkach T-75 do momentu osiągnięcia około 80% konfluencji. Komórki odklejano od podłoża stosując TrypLE™ Express, po uprzednim

złaniu medium i odpłukaniu komórek solą fizjologiczną buforowaną fosforanem. R-r dodawano do butelki w ilości wystarczającej do pokrycia całego dna i inkubowano 10 minut w inkubatorze, a następnie zbierano do próbki wirówkowej. Butelka była przepłukiwana trzy razy niewielką ilością roztworu PBS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} , a zlewki były dodawane do próbki wirówkowej. Zawartość wirowano przez 5 min przy 700 x g, po czym supernatant zlewano, a osad komórek zawieszano ponownie w roztworze PBS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} i medium pełnym. Po drugim wirowaniu, 5 min przy 700 x g, supernatant zlewano a osad komórek zawieszano delikatnie w odpowiednim medium pełnym w objętości 3 mL. W celu policzenia komórek, zebrane komórki były barwione 0,4% roztworem błękitu trypanu i oznaczane ilościowo za pomocą zautomatyzowanego licznika.

5.2.1.2 Stymulacja komórek lekami i ich pochodnymi

W celu przeprowadzenia analiz: transkryptomicznej i detekcji białek szlaku, wysiewano komórki na 6-dołkowych płytkach w ilości 2×10^5 komórek na dołek. Komórki po wysianiu hodowano przez 24h w temperaturze 37°C, w obecności 5% CO_2 . Następnie, przez określony czas – 24h w przypadku badań transkryptomicznych i 48h w przypadku badań ekspresji na poziomie białka – komórki traktowano lekami referencyjnymi, tj. piroksykamem i meloksykamem lub nowymi analogami NLPZ z grupy oksykamów o stężeniu końcowym 50 μM . Zarówno czasy inkubacji, jak i stężenia związków zostały wybrane i zoptymalizowane podczas poprzednich eksperymentów [Lewandowska P i in., 2021; Szczuka I i in., 2021; Krzystek-Korpaczka M i in., 2020] na podstawie analiz przeżywalności komórek. Związki rozpuszczano w dimetylosulfotlenku (do 0,5% DMSO), który posłużył też do „zastymulowania” komórek kontrolnych, nie traktowanych badanymi lekami.

W celu przygotowania próbek do analizy białek, po 48 godzinach usunięto pożywkę z komórek, a następnie przepłukano je dwukrotnie solą fizjologiczną buforowaną fosforanami (PBS). Komórki oddzielono mechanicznie sterylnymi skrobakami w obecności koktajlu inhibitorów proteaz w roztworze PBS. Zebrano i zamrożono w porcjach medium pochodzące oraz lizaty komórkowe w -80°C .

W celu przeprowadzenia analizy transkryptomicznej, pożywkę hodowlaną zebrano po 24h, a komórki poddano lizie za pomocą odczynnika TRIzol™. Zebrane lizaty komórkowe oraz medium przechowywano w temperaturze -80°C.

Wszystkie badania wykonano minimum trzykrotnie (trzy powtórzenia biologiczne).

5.2.2 METODY ANALITYCZNE

5.2.2.1 Transkryptomika

5.2.2.1.1 Izolacja i ocena RNA

Lizaty komórkowe zawieszano w Trizolu lub analogicznym r-rze, dodawano chloroformu w stosunku 1/5 objętości mieszaniny, wymieszano przez ręczne wytrząsanie i, po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej (RT), wirowano (12 000 x g, 15 minut, 4°C). Następnie przenoszono ostrożnie górną, klarowną fazę wodną do nowej probówki typu Eppendorf, unikając pobierania fazy fenolowej. Kolejno do zebranej warstwy dodawano etanol (99%) w stosunku 1:1 i oczyszczano za pomocą zestawów kolumnkowych do oczyszczania RNA. Mieszaninę przenoszono na mikrokolumnę i wirowano (12000 x g, 15 minut, RT). Przesącz usuwano, a na membranę mikrokolumny nanoszono bufor do płukania i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Następnie, do mikrokolumny w sterylnych probówkach typu Eppendorf dodano roztwór DNazy i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji membrana była dwukrotnie przemywana buforem do płukania i poddana wirowaniu (12000 x g, 15 minut, RT). Mikrokolumny w celu osuszenia były wirowane (14000 x g, 15 minut, RT) w jałowych probówkach typu Eppendorf. Następnie, mikrokolumny przenoszono do sterylnych probówek typu Eppendorf i uwalniano RNA ze złoża poprzez nanoszenie na membranę wody wolnej od RNaz. Po dwuminutowej inkubacji odwirowywano i zbierano przesącz z RNA. Wyizolowane RNA oceniano jakościowo i ilościowo, korzystając z technik i aparatury dedykowanej do pracy z mikroobjętościami.

Stężenie wyizolowanego RNA oraz jego czystość wyznaczano za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 i wyznaczając współczynniki absorbancji przy długościach fali 260/280 nm i 260/230 nm. Integralność RNA została oceniano za pomocą elektroforezy mikroprzepływowowej na platformie Experion.

5.2.2.1.2 Odwrotna transkrypcja

Wyzolowane RNA transkrybowano na cDNA przy użyciu termocyklera i/lub bloków grzejnych oraz dedykowanych zestawów do syntezy cDNA. Mieszanina reakcyjna, składała się z 5-krotnie zateżonego mixa, zawierającego primery inicjujące transkrypcję, takie jak oligo(dT) oraz krótkie primery losowe (heksamery), które służą do inicjacji syntezy cDNA na matrycy. Dodatkowo, w skład mieszaniny wchodził iScript Reverse Transcriptase zawierający zmodyfikowaną odwrotną transkryptazę RNAza H⁺ wirusa mysiej białaczki Moloneya (MMLV), która jest enzymem odpowiedzialnym za przepisanie informacji genetycznej z RNA na DNA. Ponadto, mix został wzbogacony o inhibitory RNAzy, które zapobiegają degradacji RNA podczas reakcji. Do mieszaniny reakcyjnej dodawano matrycę wyizolowanego RNA tak, aby jego ilość w mieszaninie reakcyjnej wynosiła 1000 ng i uzupełniano ultraczystą wodą wolną od nukleaz. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w trzech etapach. Pierwszy etap to przyłączenie primerów do matrycy RNA, które odbyło się w temperaturze 25°C przez 5 minut. Następnie przeprowadzono odwrotną transkrypcję, czyli syntezę cDNA, w temperaturze 46°C przez 20 minut. Ostatecznym etapem była inaktywacja odwrotnej transkryptazy poprzez podgrzewanie do 95°C przez 1 minutę.

5.2.2.1.3 qPCR

Uzyskane cDNA zostało wykorzystane jako matryca do ilościowej reakcji PCR. Mieszanina reakcyjna składała się z 5-krotnie rozcieńczonego cDNA, 2-krotnie stężonego odczynnika SsoFast EvaGreen® Supermix oraz starterów 10 nM przedniego i wstecznego (po 1 µL każdego) oraz wody wolnej od RNaz do uzyskania objętości 20 µL. Sekwencje starterów podano w Tabeli VI. Reakcje qPCR przeprowadzano na termocyklerze CFX96 Real-Time PCR w następujących warunkach: aktywacja przy 95°C przez 30 sekund, a następnie powtarzane 35 razy – denaturacja przy 95°C przez 5 sekundi hybrydyzacja przy 61°C przez 5 sekund. Specyficzność produktu reakcji oceniano w dodatkowym kroku przez analizę krzywej topnienia, uzyskanej po stopniowym podnoszeniu temperatury od 60°C do 95°C z odczytami fluorescencyjnymi co 0,5°C.

5.2.2.1.4 Analiza ekspresji genów; normalizacja

Przed analizą statystyczną obliczono średnią geometryczną wszystkich wartości C_q dla każdego genu. Wartości C_q indywidualnych prób odejmowano od globalnej

średniej, otrzymując relatywną wartość ΔCq , którą linearyzowano przez przeliczenie $2^{\Delta Cq}$. Uzyskaną wartość następnie normalizowano do wartości genu referencyjnego lub średniej geometrycznej wielu genów referencyjnych, otrzymując znormalizowane ilości względne (NRQ).

W badaniach korzystano z genów referencyjnych wyselekcjonowanych we wcześniejszych badaniach jako najstabilniejsze dla danej matrycy biologicznej i/lub warunków. W badaniach ekspresji genów w tkankach jelita grubego korzystano z pary genów *PPIA* i *RPLP0* [Krzystek-Korpaczka M i in., 2014], a w przypadku linii komórkowych – z *GAPDH* [Krzystek-Korpaczka M i in., 2016].

5.2.2.2 Proteomika

5.2.2.2.1 Elektroforeza SDS-PAGE

Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących wg Laemmli prowadzono w żelu poliakrylamidowym, którego procentowość uwarunkowana była masą cząsteczkową białek znajdujących się w składzie badanej próbki (stosowano 12% żel rozdzielający i 4% żel zagęszczający). Do przygotowania żelu poliakrylamidowego używano następujących roztworów: 30% akrylamid/ 0,8% bis-akrylamid, bufor do żelu rozdzielającego: 1,5 M Tris-HCl, 10% SDS, pH 8,8, bufor do żelu zagęszczającego: 1,0 M Tris-HCl, 10% SDS, pH 6,8, 10% nadsiarczan amonu oraz TEMED. Po zmieszaniu składników w odpowiednich proporcjach przygotowywano żełe o grubości 0,75 mm, pozostawiając je do spolimeryzowania w temp. pokojowej przez ok. 45 min.

Próbki z zawartością białka 10 μg suszono za pomocą wirówkowego koncentratora próżniowego w temperaturze pokojowej i przechowywano w -20°C . Wyszuszone preparaty białkowe roztworzano w buforze do prób (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8) i 2x Laemmli zawierającym 5% 2-merkaptoetanol w stosunku 1:1. Próby wytrząsano przy pomocy mieszadła wibracyjnego i odwirowano w miniwirówce. Denaturację przeprowadzono w termobloku (5 min w 95°C).

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano z użyciem Mini-Protean Tetra Cell przy stałym napięciu w zakresie 100-200 V, w buforze do elektroforezy (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 1% SDS). Elektroforeza trwała do momentu, gdy czoło barwnika osiągnęło położenie około 2 mm od dolnej krawędzi żelu.

5.2.2.2.2 Transfer białek na błonę PVDF

Białka rozdzielone w żelu poliakrylamidowym przenoszono poprzez transfer półsuchy w aparacie Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell na membranę PVDF (Immobilon P) przez 30 minut, przy stałym napięciu 25V. Zastosowano dedykowany bufor do przenoszenia (25 mM Tris, 190 mM glicyna, 20% metanol).

5.2.2.2.3 Immunodetekcja

Po przeniesieniu membrany, barwienie na całkowitą zawartość białka przeprowadzono przy użyciu Pierce™ Reversible Protein Stain Kit for PVDF Membranes, zgodnie z instrukcjami producenta. Następnie, błony zostały zablokowane buforem z 1% kazeiną podczas inkubacji (1h, RT). Po przepłukaniu buforem PBS-T, składającym się z PBS i 0,05% Tween-20, membrany inkubowano ze swoistymi pierwszorzędowymi przeciwciałami przez noc, w 4°C. W badaniach wykorzystano przeciwciała przeciwko: receptorowi EP4 (EP4 Receptor C-Term Polyclonal Antibody #101775), receptorowi EP2 (EP2 Receptor Polyclonal Antibody #101750), transporterowi prostaglandyny (Prostaglandin Transporter C-Term Polyclonal Antibody #11860), MRP4 (MRP4 Polyclonal Antibody #PA5-78695), COX2 (Anti-COX2 / Cyclooxygenase 2 antibody #ab15191) oraz 15-PGDH (Human 15-PGDH/HPGD Antibody #AF5660).

Niezwiązane przeciwciała usuwano poprzez przemycie membran buforem PBS-T (trzy cykle po 5 minut). Następnie, membrany inkubowano z kozimi przeciwciałami anty-króliczymi znakowanymi HRP (Goat anti-Rabbit IgG (Heavy chain), Superclonal™ Recombinant Secondary Antibody, HRP, #A27036) lub króliczymi przeciwciałami przeciw-kozimi znakowanymi HRP Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP (affinity isolated) #P0449. Analizowane białka wizualizowano przy użyciu substratu chemiluminescencyjnego Clarity Western ECL, korzystając z platformy do obrazowania – ChemiDoc MP Imaging System. Uzyskane obrazy membran western-blot analizowano przy użyciu oprogramowania Image Lab w wersji 6.0.1 build 34. Wyniki znormalizowano względem ekspresji genu kodującego β -aktynę i całkowitej zawartości białka.

5.2.2.2.4 Odmywanie przeciwciał (stripping)

Odmywanie przeciwciał z membrany przed nałożeniem β -aktyny jako kontroli w analizie Western blot było istotnym krokiem, który pozwalał uniknąć krzyżowego reaktywowania przeciwciał, umożliwiając uzyskanie precyzyjnych wyników detekcji β -

aktywny oraz zwiększał specyficzność i czułość analizy. W eksperymencie zastosowano specjalny bufor do odmywania o pH=2,2, który składał się z glicyny, SDS i Tween 20.

Procedura rozpoczynała się od dwukrotnej 10 min. inkubacji membrany w buforze w celu usunięcia związanych przeciwciał. Następnie membrana była dwukrotnie przemywana w PBS i TBST w celu usunięcia resztek buforu. Dzięki procesowi odmywania można było zapewnić wiarygodność analizy β -aktywny jako kontroli.

5.2.2.2.5 Ocena stężenia białka całkowitego

Przed analizą, lizaty komórkowe rozmrożono na lodzie i poddawano działaniu ultradźwięków przy użyciu procesora ultradźwiękowego UP 200, podczas dwóch 30-sekundowych cykli z amplitudą ustawioną na 40%. W celu usunięcia komórek, które nie uległy lizie, zawiesinę odwirowywano (12500 $\times g$, 4°C, 10 min.). Całkowite stężenie białka mierzono kolorymetrycznie metodą z kwasem bincinoninowym, przy użyciu testu komercyjnego Pierce™ BCA Protein Assay Kit. W tym celu, 200 μ l świeżo przygotowanego odczynnika roboczego BCA dodawano do 25 μ l roztworu białka na 96-dołkowej płytce polistyrenowej. Po 30 min. inkubacji w temp. 37°C mierzono absorbancję w spektrofotometrze płytkowym Infinite® M200, przy długości fali $\lambda=562$ nm. Stężenie białka odczytywano z krzywej standardowej przygotowanej z rozcieńczeń albuminy surowicy wołowej (BSA).

5.2.2.3 *Metabolomika*

5.2.2.3.1 Przygotowanie próbek biologicznych i krzywych kalibracyjnych

Dołki z komórkami przepłukano dwukrotnie PBS. Do każdego dodano 1ml 70% metanolu w wodzie, zmrożonego uprzednio do -80°C, oraz mieszaninę wzorców wewnętrznych: 6-keyo-PGF1-d4; 13,14-dihydro-PGE1-d4; LTB4-d4; PGD2-d9; PGE2-d9; PGF2-d4; TXB2-d4; 15-deoksy-12,14-PGJ2-d9 (każda z substancji o stężeniu 50 ng/mL). Całą zawartość dołków przeniesiono do 2ml mikroprobówek i mieszano w 4°C przez 10 minut, a następnie zmrożono w -80°C. Zmrożone próbki wirowano przy 15000 RCF w 4°C przez 7 minut. Uzyskany supernatant przeniesiono do 2ml mikroprobówek i odparowano do sucha w koncentratorze próżniowym. Pozostały osad roztwarzano w 20 μ l 20% ACN w wodzie z dodatkiem 0,1% FA i przenoszono do naczynek chromatograficznych.

Krzywe kalibracyjne do oznaczania wybranych eikozanoidów przygotowano w 20% ACN z 0,1% FA w wodzie, w następującym zakresie stężeń dla wszystkich związków:

0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 i 20,0 ng/mL. Do 100 µl każdego z roztworów kalibracyjnych dodano mieszaninę wzorców wewnętrznych, 200 µl ACN oraz 250 µl octanu etylu. Próbkę mieszało (10 minut, 25°C), a następnie odwirowywano (7 minut, 15000 RCF, 4°C). Do 2ml mikropróbówek przenoszono 350 µl supernatantu i odparowywano do sucha w koncentratorze próżniowym. Osad roztwarzano w 20 µl mieszaniny 20% ACN w wodzie z dodatkiem 0,1% FA.

5.2.2.3.2 Warunki analizy UHPLC-ESI-QTOF

Rozdział chromatograficzny przeprowadzono w odwróconym układzie faz. Całkowity czas analizy, łącznie z kondycjonowaniem układu, wynosił 10,5 minuty, przy przepływie 250 µl/min. Roztworami A i B fazy ruchomej były, odpowiednio, 0,1% FA w wodzie i 0,1% FA w ACN. Na kolumnę nastrzykiwano 17 µl próbki. Użyto następującego programu do elucji gradientowej: 30% B od 0–1 min; 30%–45% B od 1–4,5 min; 45%–95% B od 4,5–5,0 min; 95% B od 5,0–7,2 min i 95%–30% B w 7,21 min.

Zoptymalizowano parametry źródła jonów w celu zmaksymalizowania intensywności i stabilności sygnału. Napięcie przyłożone do kapilary, temperatura źródła oraz temperatura odparowania rozpuszczalników wynosiły, odpowiednio, 2,0kV, 120°C i 450°C. Jako obojętny gaz suszący wykorzystywano azot. Pomiary prowadzono z dokładnością 0,05 Da. Do analizy ilościowej użyto następujące jony: 369,2285 m/z (6-keto-PGF1); 167,1382 m/z (6-keto-PGF1-d4); 337,2388 m/z (13,14-dihydro-PGE1); 341,2645 m/z (13,14-dihydro-PGE1-d4); 195,1032 m/z (LTB4); 197,1157 m/z (LTB4-d4); 271,2072 m/z (PGD2); 280,2635 m/z (PGD2-d9); 271,2080 m/z (PGE2); 280,2646 m/z (PGE2-d9); 353,2342 m/z (PGF2); 357,2594 m/z (PGF2-d4); 169,0876 m/z (TXB2); 173,1129 m/z (TXB2-d4); 271,2075 m/z (15-deoksy-12,14-PGJ2); 280,2641 m/z (15-deoksy-12,14-PGJ2-d9).

5.2.3 METODY STATYSTYCZNE

Każdorazowo rozkład danych analizowano z wykorzystaniem testu D'Agostino-Pearsona. Homogenność wariancji oceniano testem Levena. Dane z rozkładem normalnym i homogeną wariancją analizowano za pomocą testów parametrycznych:

- testu *t*-Studenta dla prób powiązanych w przypadku oceny materiału sparowanego,

- testu *t*-Studenta dla prób niepowiązanych w przypadku porównania średnich w dwóch grupach,
- w/w testu z korekcją Welcha w przypadku niehomogennych wariancji,
- jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z analizą *post-hoc* testem Tukeya-Kramera w przypadku porównania średnich w więcej niż dwóch grupach;

lub testów nieparametrycznych:

- testu Wilcozona w przypadku oceny materiału sparowanego,
- testu *U* Manna-Whitneya w przypadku porównania średnich w dwóch grupach,
- testu *H* Kruskala-Wallisa z analizą *post-hoc* testem Conora w przypadku porównania średnich w więcej niż dwóch grupach.

Przed przystąpieniem do analizy nieparametrycznej, rozkład normalny i/lub homogenność wariancji próbowano uzyskać poprzez transformację logarytmiczną surowych danych.

Dane kateryczne analizowano testem Fishera (tabele 2x2) lub Chi-kwadrat (tabele 2x3 i większe). Analizę korelacji wykonano testem rang Spearmana.

Wartość diagnostyczną metabolitów oceniano korzystając z analizy ROC (receiver operating characteristics), umożliwiającej porównanie pól pod krzywą (AUC), reprezentujących moc dyskryminacyjną potencjalnego markera. Dodatkowo, na podstawie indeksu Youdena (indeks J), wyznaczono optymalny punkt odcięcia, obliczając towarzyszące mu czułości i swoistości.

Wszystkie wartości prawdopodobieństwa były dwustronne. Wartość $p < 0.05$ uznano za istotną statystycznie.

W analizie statystycznej korzystano z oprogramowania MedCalc® Statistical Software version 22.013 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2023).

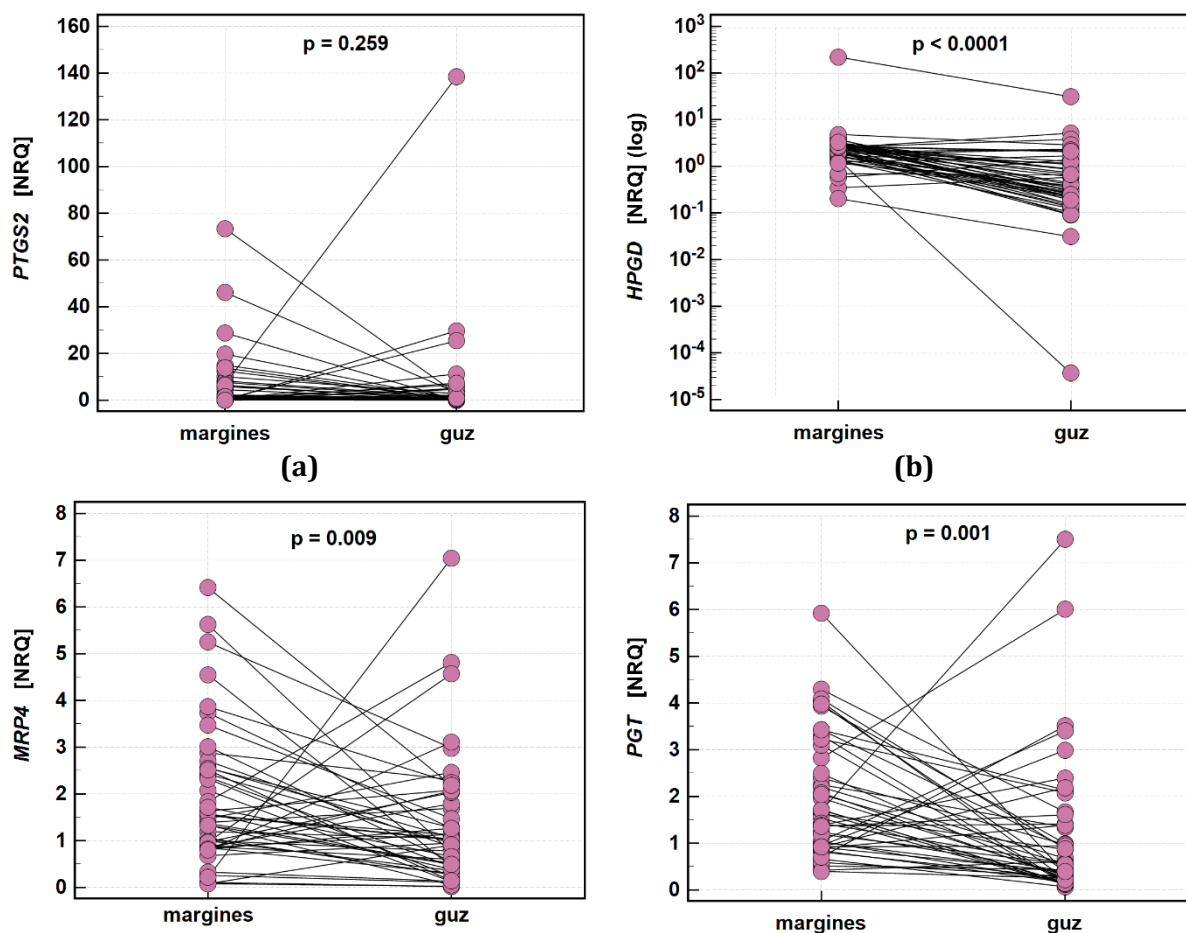
6 WYNIKI

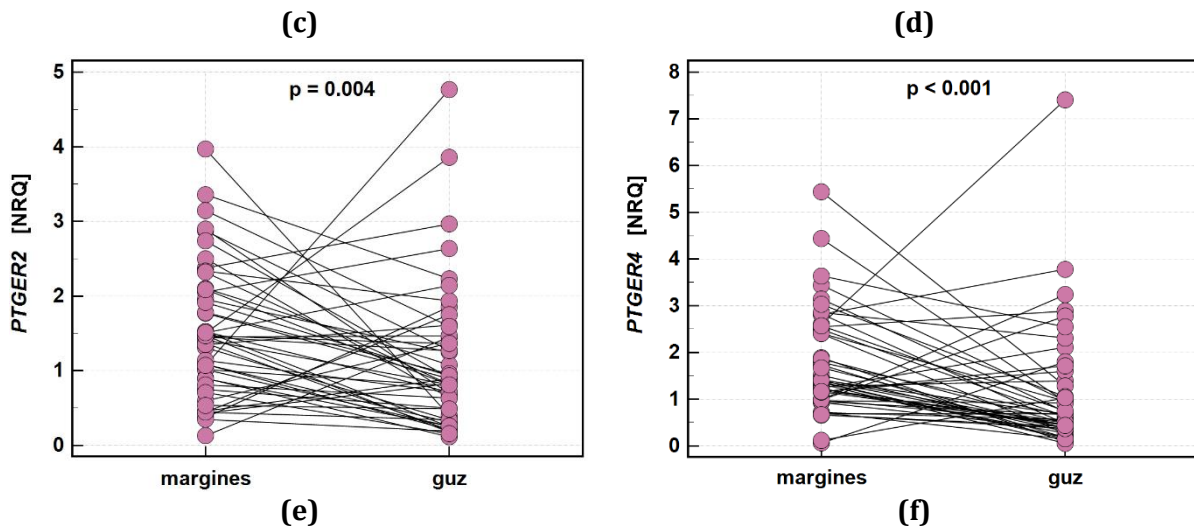
6.1 INTERMEDIATY SZLAKU COX2/PGE2 U PACJENTÓW Z RAKIEM JELITA GRUBEGO

6.1.1 EKSPRESJA GENÓW BIAŁEK SZLAKU COX2/PGE2 W TKANKACH JELIT

6.1.1.1 Analiza par „guz-margines” pochodzących od tego samego pacjenta

Porównanie ekspresji genów kodujących kluczowe białka szlaku w tkankach jelita uzyskanych z guza oraz okolic marginesu resekcji (w dalszej części rozprawy dla uproszczenia nazywanego „marginesem”) a pochodzących od tego samego pacjenta wykazało, że, z wyjątkiem *PTGS2/COX2*, jest ona znamienne niższa w guzie w porównaniu z marginesem (Wykres 1). W przypadku *PTGS2/COX2* liczba przypadków, w których ekspresja w guzie była wyższa niż marginesie był zbliżony do liczby przypadków, w których poziom ekspresji był niższy. Również średni poziom ekspresji w guzie i marginesie był porównywalny (Tabela VII).





Wykres 1 Analiza porównawcza ekspresji genów w guzach i, odpowiadających im, marginesach resekcji: (a) *PTGS2*; (b) *HPGD*; (c) *MRP4*; (d) *PGT*; (e) *PTGER2*; (f) *PTGER4*

Dane analizowano testem *t* Studenta dla prób powiązanych (*PGT*) lub testem Wilcozona (pozostałe geny). NRQ, znormalizowane wartości relatywne; *p*, prawdopodobieństwo.

W przypadku pozostałych genów (Tabela VII), porównanie wartości uśrednionych wykazało, że ekspresja w guzie jest:

- 6-krotnie niższa dla *HPGD*;
- 1,6-krotnie niższa dla *MRP4*;
- 2,9-krotnie niższa dla *PGT*;
- 1,7-krotnie niższa dla *PTGER2*;
- 2,1-krotnie niższa dla *PTGER4*.

Tabela VII. Porównanie ekspresji genów białek szlaku COX2/PGE₂ w guzach i marginesach resekcji (próby sparowane) u pacjentów z rakiem jelita grubego

Gen	Średnia ekspresji (95% CI)		<i>P</i>	Porównanie margines-guz	
	margines	guz		↑ (<i>n</i>)	↓ (<i>n</i>)
<i>PTGS2</i>	0.81 (0.49-1.78)	0.87 (0.58-1.07)	0.259	21	28
<i>HPGD</i>	2.28 (1.96-2.66)	0.38 (0.26-0.66)	<0.0001	7	42
<i>MRP4</i>	1.48 (1.01-1.82)	0.95 (0.61-1.24)	0.009	14	35
<i>PGT</i>	1.63 (1.21-2.07)	0.57 (0.37-0.94)	0.001	12	35
<i>PTGER2</i>	1.45 (1.09-1.53)	0.83 (0.70-1.22)	0.004	13	36
<i>PTGER4</i>	1.37 (1.22-1.78)	0.66 (0.46-0.95)	<0.001	12	37

Dane analizowano testem *t* Studenta dla prób powiązanych i przedstawiono jako średnie arytmetyczne (*PGT*) lub testem Wilcozona i przedstawiono jako mediany (pozostałe geny) wartości NRQ. NRQ, znormalizowane wartości relatywne ekspresji; *CI*, przedział ufności; *P*, prawdopodobieństwo; ↑ (*n*), ilość przypadków, w których ekspresja w guzie była wyższa niż w marginesie; ↓ (*n*), ilość przypadków, w których ekspresja w guzie była niższa niż w marginesie. Kolorem czerwonym wyróżniono statystycznie znamienne różnice ekspresji (*p* < 0.05).

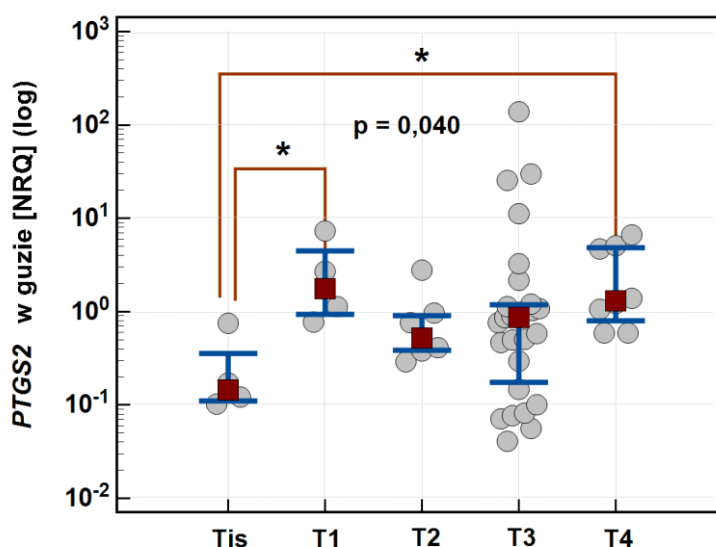
6.1.1.2 Zależność poziomu ekspresji genów kodujących białka szlaku COX2/PGE2 od głębokości nacieku guza

Spośród badanych genów, jedynie ekspresja *PTGS2* w guzie różniła się w zależności od głębokości nacieku guza pierwotnego (Tabela VIII), będąc znacząco wyższą w guzach T1 i T4 niż Tis (Wykres 2).

Tabela VIII. Zależność ekspresji genów w guzach od głębokości nacieku guza pierwotnego.

Gen	Mediana ekspresji w guzach [NRQ]; IQR					P
	Tis	T1	T2	T3	T4	
<i>PTGS2</i>	0,15; 0,3	1,92; 4,1	0,52; 0,5	0,87; 1,0	1,31; 4,0	0,040^K
<i>HPGD</i>	0,19; 0,8	11,15; 16,3	0,30; 0,6	0,44; 1,2	0,37; 0,2	0,777 ^K
<i>MRP4</i>	0,30; 0,6	1,83; 3,7	1,07; 2,2	1,02; 1,6	0,96; 0,9	0,221 ^K
<i>PGT</i>	0,74; 0,8	2,08; 0	0,40; 1,2	0,57; 1,0	0,42; 1,6	0,835 ^K
<i>PTGER2</i>	1,10; 0,8	1,21; 3,4	0,81; 0,5	0,71; 1,2	1,27; 0,6	0,579 ^K
<i>PTGER4</i>	0,67; 0,7	1,61; 1,5	0,73; 1,0	0,51; 0,5	1,36; 1,9	0,293 ^K

NRQ; znormalizowane wartości relatywnej ekspresji; IQR, rozstęp kwartylny; Tis, rak przedinwazyjny (ang. *tumor in situ*); P, prawdopodobieństwo; ^K, Kruskal-Wallis H test. Kolorem czerwonym wyróżniono wynik statystycznie znamienne ($p < 0.05$).



Wykres 2. Wpływ głębokości nacieku guza pierwotnego (cecha T) na ekspresję *PTGS2* w guzach nowotworowych pacjentów z rakiem jelita grubego

Dane prezentowane jako mediany (czerwony kwadrat) z rozstępem kwartylnym (niebieskie wąsy) i analizowane testem *H* Kruskala-Wallisa. Znamienne różnice między poszczególnymi grupami zaznaczono czerwonymi konektorami i gwiazdką. NRQ, znormalizowane wartości relatywnej ekspresji.

Głębokość nacieku guza pierwotnego nie miała znamienego wpływu na żaden z badanych genów w przypadku ekspresji w marginesach resekcji (Tabela IX) oraz w przypadku stosunku ekspresji guz/margines (Tabela X).

Tabela IX. Zależność ekspresji genów białek szlaku COX2/PGE₂ w marginesach resekcji od głębokości nacieku guza pierwotnego

Gen	Mediana ekspresji w marginesach resekcji [NRQ]; IQR					P
	Tis	T1	T2	T3	T4	
PTGS2	4,23; 5,0	0,93; 37,6	0,44; 1,1	1,02; 5,9	0,84; 4,6	0,468 ^K
HPGD	2,43; 1,0	2,97; 109	2,67; 0,4	1,97; 1,3	1,92; 1,2	0,122 ^K
MRP4	2,47; 1,3	1,33; 2,7	1,59; 1,5	1,51; 1,7	0,92; 0,8	0,214 ^K
PGT	1,72; 1,9	3,23; 0	2,40; 1,9	1,66; 1,8	0,98; 0,8	0,428 ^K
PTGER2	0,96; 1,5	1,35; 1,2	1,78; 0,9	1,22; 0,9	1,48; 2,4	0,721 ^K
PTGER4	2,35; 1,6	1,16; 2,1	1,87; 1,3	1,26; 1,4	1,31; 1,2	0,382 ^K

NRQ; znormalizowane wartości relatywnej ekspresji; IQR, rozstęp kwartylny; Tis, rak przedinwazyjny (ang. *tumor in situ*); P, prawdopodobieństwo; ^K, Kruskal-Wallis *H* test.

Tabela X. Zależność krotności ekspresji [guz/margines] genów białek szlaku COX2/PGE₂ od głębokości nacieku guza pierwotnego

Gen	Mediana krotności ekspresji [guz/margines]; IQR					P
	Tis	T1	T2	T3	T4	
PTGS2	0,10; 0,2	10,8; 88,2	0,90; 2,3	0,78; 2,8	4,47; 13,9	0,140 ^K
HPGD	0,72; 0,7	0,46; 0,4	0,10; 0,2	0,28; 0,7	0,18; 0,1	0,515 ^K
MRP4	0,08; 0,2	0,58; 24,1	0,42; 1,5	0,57; 0,9	0,60; 1,1	0,129 ^K
PGT	0,37; 0,3	0,64; 0	0,41; 0,5	0,36; 0,9	0,51; 0,9	0,953 ^K
PTGER2	1,42; 2,3	0,91; 0,6	0,49; 0,3	0,62; 0,6	0,71; 1,2	0,338 ^K
PTGER4	0,25; 0,1	0,81; 6,1	0,49; 0,7	0,37; 0,6	0,82; 2,0	0,222 ^K

IQR, rozstęp kwartylny; Tis, rak przedinwazyjny (ang. *tumor in situ*); P, prawdopodobieństwo; ^K, Kruskal-Wallis *H* test.

6.1.1.3 Zależność poziomu ekspresji genów kodujących białka szlaku COX2/PGE₂ od obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych

W przypadku żadnego z analizowanych genów, poziom ekspresji w guzach nowotworowych oraz okolicach marginesów resekcji nie był zależny od obecności i ilości przerzutów w węzłach chłonnych (Tabela XI i XII).

Tabela XI. Zależność ekspresji genów w guzach od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych

Gen	Średnia ekspresja w guzach [NRQ]			P
	N0	N1	N2	
<i>PTGS2</i>	0,72 (0,39-1,32)	0,64 (0,27-1,54)	1,57 (0,43-5,73)	0,300 ^A
<i>HPGD</i>	0,27; 1,1	0,66; 1,71	0,35; 0,56	0,125 ^K
<i>MRP4</i>	0,83 (0,52-1,31)	0,64 (0,25-1,59)	0,76 (0,35-1,63)	0,836 ^A
<i>PGT</i>	0,52 (0,33-0,81)	0,72 (0,33-1,56)	0,65 (0,32-1,32)	0,695 ^A
<i>PTGER2</i>	0,78 (0,53-1,16)	0,83 (0,45-1,52)	0,86 (0,5-1,47)	0,955 ^A
<i>PTGER4</i>	0,59 (0,42-0,82)	0,88 (0,46-1,68)	0,72 (0,35-1,51)	0,488 ^A

^A, dane analizowane jednoczynnikową ANOVA i przedstawione jako średnie geometryczne z 95%CI; ^K, dane analizowane testem *H* Kruskala-Wallisa i przedstawione jako mediany z IQR; NRQ; znormalizowane wartości relatywnej ekspresji; CI, przedział ufności; IQR, rozstęp kwartylny.

Tabela XII. Zależność ekspresji genów w marginesach od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych

Gen	Średnia ekspresja w marginesach resekcji [NRQ]			P
	N0	N1	N2	
<i>PTGS2</i>	1,21; 5,96	1,20; 12	0,48; 0,64	0,152 ^K
<i>HPGD</i>	2,42; 1,28	2,4; 0,94	1,97; 1,26	0,802 ^K
<i>MRP4</i>	1,5 (1,04-2,17)	1,0 (0,5-1,99)	1,24 (0,67-2,28)	0,478 ^A
<i>PGT</i>	1,54 (1,12-2,12)	1,79 (1,27-2,51)	1,53 (1,05-2,22)	0,773 ^A
<i>PTGER2</i>	1,09; 1,18	1,22; 0,78	1,77; 1,40	1,124 ^K
<i>PTGER4</i>	1,52; 1,42	1,32; 1,39	1,33; 1,79	0,871 ^K

^A, dane analizowane jednoczynnikową ANOVA i przedstawione jako średnie geometryczne z 95%CI; ^K, dane analizowane testem *H* Kruskala-Wallisa i przedstawione jako mediany z IQR; NRQ; znormalizowane wartości relatywnej ekspresji; CI, przedział ufności; IQR, rozstęp kwartylny.

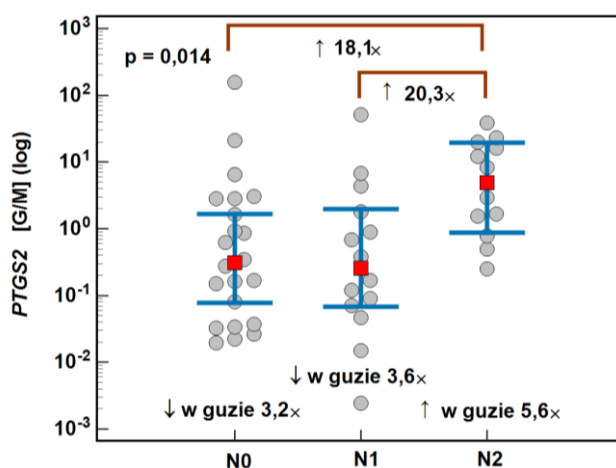
Krotność ekspresji w guzie w stosunku do umarginesu również nie zależała od obecności i ilości przerzutów w przypadku *MRP4*, *PGT*, *PTGER2* i *PTGER4*. Różniła się natomiast znamienne w przypadku *PTGS2* i wykazywała taką tendencję w przypadku *HPGD* (Tabela XIII).

Ekspresja *PTGS2* w guzie w porównaniu do okolic marginesu była 3,2-krotnie i 3,6-krotnie niższa u pacjentów z N0 i N1. Natomiast u pacjentów z N2, ekspresja w guzie była 5,6-krotnie wyższa niż w okolicach marginesu. Tym samym, u pacjentów z N2 krotność ekspresji wzrosła 18,1-razy w odniesieniu do pacjentów z N0 i 20,3-razy w odniesieniu do pacjentów N1 (Wykres 3).

Tabela XIII. Zależność krotności ekspresji genów [guz/margines] od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych

Gen	Średnia krotność ekspresji [guz/margines]			P
	N0	N1	N2	
<i>PTGS2</i>	0,31; 2,79	0,28; 1,74	5,6; 17	0,014^K
<i>HPGD</i>	0,10; 0,37	0,27; 0,8	0,21; 0,19	0,079 ^K
<i>MRP4</i>	0,52 (0,27-0,99)	0,64 (0,27-1,5)	0,62 (0,38-0,99)	0,882 ^A
<i>PGT</i>	0,35 (0,21-0,58)	0,46 (0,2-1,06)	0,37 (0,16-0,84)	0,811 ^A
<i>PTGER2</i>	0,63 (0,4-0,98)	0,72 (0,41-1,25)	0,56 (0,28-1,12)	0,820 ^A
<i>PTGER4</i>	0,4 (0,25-0,64)	0,61 (0,35-1,05)	0,52 (0,19-1,44)	0,607 ^A

^A, dane analizowane jednoczynnikową ANOVA i przedstawione jako średnie geometryczne z 95%CI; ^K, dane analizowane testem *H* Kruskala-Wallisa i przedstawione jako mediany z IQR; CI, przedział ufności; IQR, rozstęp kwartylny. Kolorem czerwonym wyróżniono wynik statystycznie znamiennej ($p < 0,05$).

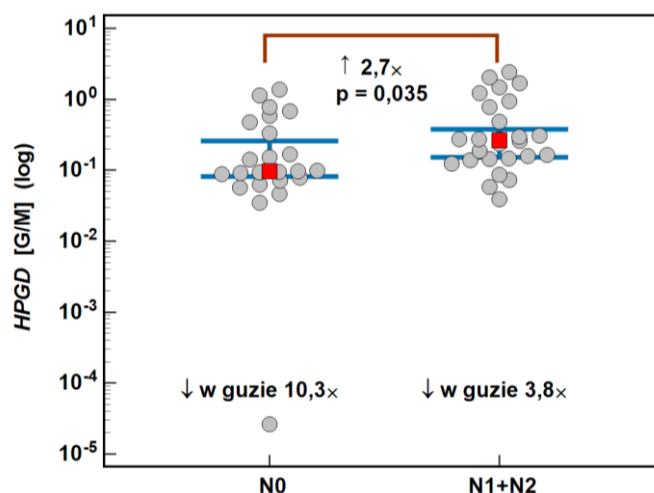


Wykres 3. Różnice krotności ekspresji *PTGS2* w guzie w stosunku do marginesu resekcji u pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od obecności i ilości przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.

Dane prezentowane jako mediany (czerwony kwadrat) z rozstępem kwartylnym (niebieskie wąsy) i analizowane testem *H* Kruskala-Wallisa. Znamienne różnice między poszczególnymi grupami zaznaczono czerwonymi konektorami. Strzałki wskazują niższe (↓) lub wyższe (↑) ekspresje w guzie w stosunku do marginesów lub wzrost (↑) krotności ekspresji [guz/margines] między pacjentami. G/M, ekspresja w guzie w stosunku do ekspresji w okolicach marginesu resekcji.

W przypadku *HPGD*, krotności ekspresji guz/margines były nieznamiennie niższe u pacjentów bez przerzutów niż z przerzutami (Tabela XIII). Dla zwiększenia mocy testu, pacjentów z przerzutami w różnym stopniu połączono i porównano do pacjentów bez przerzutów. Jak zobrazowano na Wykresie 4, stosunek ekspresji w guzie w porównaniu do ekspresji w okolicach marginesu wzrósł, ponieważ obserwowana niższa ekspresja w

guzie w przypadku pacjentów z przerzutami była znamienne, 2,7-razy mniejsza niż u pacjentów bez przerzutów.



Wykres 4. Różnice krotności ekspresji *HPGD* w guzie w stosunku do marginesu resekcji u pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.

Dane prezentowane jako mediany (czerwony kwadrat) z rozstępem kwartylnym (niebieskie wąsy) i analizowane testem *U* Manna-Whitneya. Strzałki wskazują niższe (\downarrow) lub wyższe (\uparrow) ekspresje w guzie w stosunku do marginesów lub wzrost (\uparrow) krotności ekspresji [guz/margines] między pacjentami. G/M, ekspresja w guzie w stosunku do ekspresji w okolicach marginesu resekcji.

6.1.1.4 Zależność poziomu ekspresji genów kodujących białka szlaku *COX2/PGE2* od obecności przerzutów odległych

W przypadku żadnego z analizowanych genów, poziom ekspresji w guzach nowotworowych oraz okolicach marginesów resekcji nie był zależny od obecności przerzutów odległych (Tabela XIV i XV).

Tabela XIV. Zależność ekspresji genów w guzach od obecności przerzutów odległych

Gen	Średnia ekspresja w guzach [NRQ]		P
	M0	M1	
<i>PTGS2</i>	0,77; 1,01	1,05; 2,21	0,555 ^M
<i>HPGD</i>	0,38; 0,96	0,29; 0,41	0,567 ^M
<i>MRP4</i>	0,95; 1,58	1,08; 0,63	0,858 ^M
<i>PGT</i>	0,65 (0,46-0,92)	0,29 (0,07-1,17)	0,181 ^t
<i>PTGER2</i>	0,81 (0,61-1,07)	0,90 (0,21-3,85)	0,821 ^t
<i>PTGER4</i>	0,69 (0,51-0,93)	0,77 (0,22-2,67)	0,832 ^t

Dane analizowano testem *t* Studenta dla prób niezależnych i przedstawiono jako średnie geometryczne wartości NRQ z 95% *CI* lub testem *U* Manna-Whitneya i przedstawiono jako mediany wartości NRQ z zakresem kwartalnym. NRQ, znormalizowane wartości relatywnej ekspresji; *CI*, przedział ufności; *P*, prawdopodobieństwo; M, Mann-Whitney *U* test; t, test *t* Studenta dla prób niezależnych.

Tabela XV. Zależność ekspresji genów w marginesie od obecności przerzutów odległych

Gen	Średnia ekspresja w marginesach resekcji [NRQ]		P
	M0	M1	
<i>PTGS2</i>	0,92; 5,75	0,65; 9,75	0,945 ^M
<i>HPGD</i>	2,24; 1,15	2,31; 1,87	0,583 ^M
<i>MRP4</i>	1,51; 1,67	1,21; 1,46	0,548 ^M
<i>PGT</i>	1,56 (1,27-1,9)	2,23 (1,4-3,54)	0,303 ^t
<i>PTGER2</i>	1,36; 1,13	2,32; 1,79	0,140 ^M
<i>PTGER4</i>	1,37; 1,48	1,42; 1,69	0,571 ^M

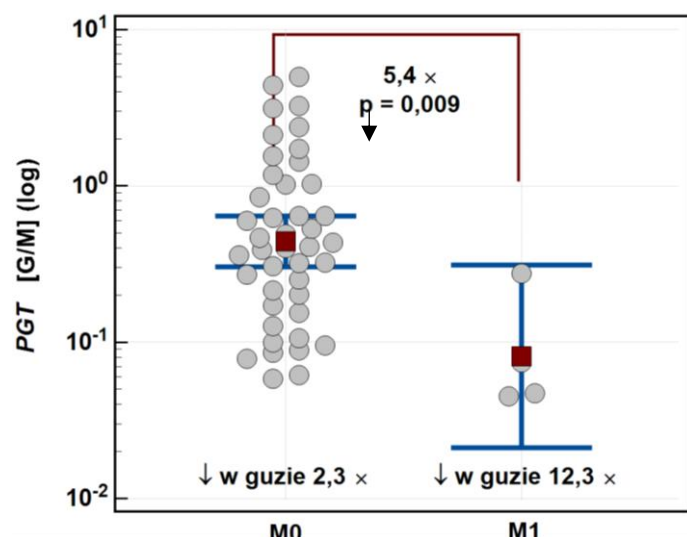
Dane analizowano testem *t* Studenta dla prób niezależnych i przedstawiono jako średnie geometryczne wartości NRQ z 95% *CI* lub testem *U* Manna-Whitneya i przedstawiono jako mediany wartości NRQ z zakresem kwartalnym. NRQ, znormalizowane wartości relatywnej ekspresji; *CI*, przedział ufności; *P*, prawdopodobieństwo; M, Mann-Whitney *U* test; t, test *t* Studenta dla prób niezależnych.

Porównanie stosunków ekspresji w guzie względem marginesu [G/M] wykazało, że u pacjentów bez przerzutów odległych, poziom ekspresji *PGT* w guzie był 2,3-krotnie niższy niż w marginesie. U pacjentów z przerzutami odległymi (M1), poziom ekspresji w guzie był 12,3-krotnie niższy (Tabela XVI). Zaobserwowany 5,4-krotnie większy spadek ekspresji *PGT* w guzach pacjentów M1 niż M0 był statystycznie znamieny, mimo niewielkiej liczby pacjentów z przerzutami odległymi (Wykres 5). Stosunki ekspresji pozostałych genów nie były zależne od obecności przerzutów odległych (Tabela XVI).

Tabela XVI. Zależność krotności ekspresji genów [guz/margines] od obecności przerzutów odległych

Gen	Średnia krotność ekspresji [guz/margines]		P
	M0	M1	
<i>PTGS2</i>	0,68; 4,78	1,62; 8,21	0,884 ^M
<i>HPGD</i>	0,17; 0,52	0,16; 0,16	0,535 ^M
<i>MRP4</i>	0,57 (0,38-0,85)	0,65 (0,29-1,47)	0,851 ^t
<i>PGT</i>	0,44 (0,31-0,64)	0,08 (0,02-0,31)	0,009^t
<i>PTGER2</i>	0,65 (0,47-0,89)	0,46 (0,26-0,79)	0,509 ^t
<i>PTGER4</i>	0,39; 0,73	0,32; 1,0	0,855 ^M

Dane analizowano testem *t* Studenta dla prób niezależnych i przedstawiono jako średnie geometryczne stosunków ekspresji w guzie względem marginesu z 95% *CI* lub testem *U* Manna-Whitneya i przedstawiono jako mediany z zakresem kwartalnym. Kolorem czerwonym wyróżniono wynik statystycznie znamieny ($p < 0,05$). *CI*, przedział ufności; *P*, prawdopodobieństwo; M, Mann-Whitney *U* test; t, test *t* Studenta dla prób niezależnych.



Wykres 5. Różnice krotności ekspresji *PGT* w guzie w stosunku do okolic marginesu resekcji w zależności od obecności przerzutów odległych.

Dane prezentowane jako mediany (czerwony kwadrat) z 95% *CI* (niebieskie wąsy) i analizowane testem *t* Studenta. Strzałki wskazują niższe (\downarrow) ekspresje w guzie w stosunku do marginesów lub spadek krotności ekspresji [G/M] między pacjentami. *CI*, przedział ufności; G/M, ekspresja w guzie w stosunku do ekspresji w okolicach marginesu resekcji.

6.1.1.5 Zależność poziomu ekspresji genów kodujących białka szlaku *COX2/PGE2* od ogólnego stopnia zaawansowania choroby (*ang. stage; TNM*)

Ekspresja żadnego z badanych genów w tkance guza (Tabela XVII) oraz marginesie resekcji (Tabela XVIII) nie korelowała ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej TNM.

Tabela XVII. Korelacja między poziomem ekspresji genów kodujących białka szlaku *COX2/PGE₂* w guzie a ogólnym stopniem zaawansowania choroby (TNM)

Gen	Współczynnik korelacji	
	Spearmana (ρ)	<i>P</i>
<i>PTGS2</i>	0,12	0,401
<i>HPGD</i>	0,14	0,333
<i>MRP4</i>	0	0,961
<i>PGT</i>	0,03	0,864
<i>PTGER2</i>	0,05	0,749
<i>PTGER4</i>	0,09	0,537

P, prawdopodobieństwo.

Tabela XVIII. Korelacja między poziomem ekspresji genów kodujących białka szlaku COX2/PGE₂ w marginesie a ogólnym stopniem zaawansowania choroby (TNM)

Gen	Współczynnik korelacji	
	Spearmana (ρ)	P
<i>PTGS2</i>	-0,05	0,709
<i>HPGD</i>	-0,11	0,458
<i>MRP4</i>	-0,16	0,245
<i>PGT</i>	0,08	0,590
<i>PTGER2</i>	0,20	0,164
<i>PTGER4</i>	0,01	0,953

P, prawdopodobieństwo.

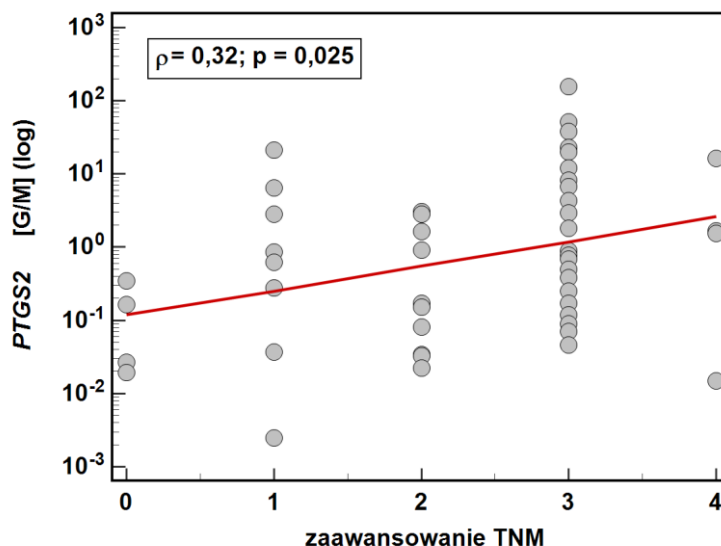
W przypadku genów *MRP4*, *PGT*, *PTGER2* i *PTGER4*, również wartość krotności ekspresji guz/margines nie wykazywała korelacji z zaawansowaniem raka (Tabela XIX).

Tabela XIX. Korelacja między krotnością ekspresji genów kodujących białka szlaku COX2/PGE₂ w guzie względem marginesu a ogólnym stopniem zaawansowania choroby (TNM)

Gen	Współczynnik korelacji	
	Spearmana (ρ)	P
<i>PTGS2</i>	0,32	0,025
<i>HPGD</i>	0,36	0,012
<i>MRP4</i>	0,13	0,382
<i>PGT</i>	-0,08	0,597
<i>PTGER2</i>	-0,07	0,623
<i>PTGER4</i>	0,07	0,619

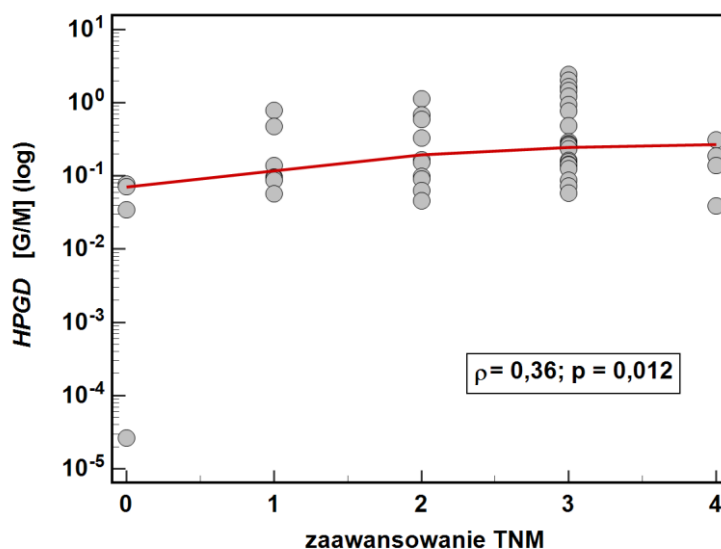
P, prawdopodobieństwo. Kolorem czerwonym wyróżniono zależności statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

Jednakże krotności ekspresji *PTGS2* i *HPGD* były tym większe im wyższy był stopień zaawansowania RJG (Wykresy 6 i 7).



Wykres 6. Korelacja między krotnością ekspresji *PTGS2* w guzie w stosunku do marginesu a stopniem zaawansowania raka jelita grubego

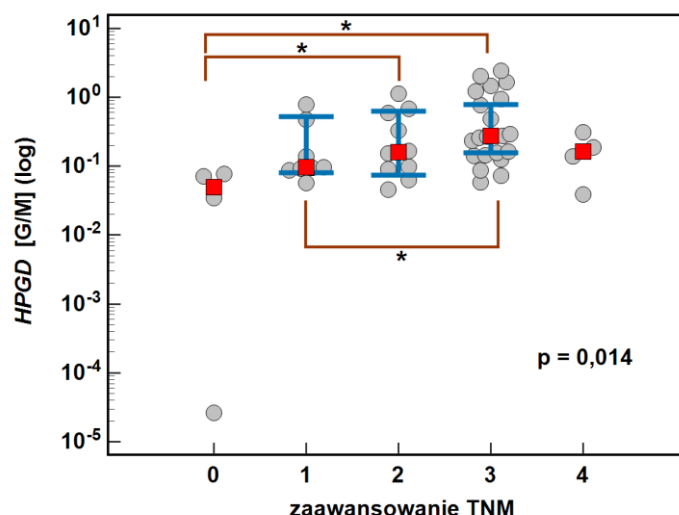
Korelację analizowano testem rang Spearmana. Kolorem czerwonym wyróżniono linię trendu.



Wykres 7. Korelacja wprost proporcjonalna między krotnością ekspresji *HPGD* w guzie w stosunku do marginesu a stopniem zaawansowania raka jelita grubego

Korelację analizowano testem rang Spearmana. Kolorem czerwonym wyróżniono linię trendu.

Oprócz liniowej zależności, średnie stężenia *HPGD* były znacząco różne między poszczególnymi stopniami zaawansowania, tj. stopniami 0 i 2, 0 i 3 oraz 1 i 3 (Wykres 8).



Wykres 8. Zależność między krotnością ekspresji *HPGD* w guzie w stosunku do marginesu w zależności od stopnia zaawansowania raka

Dane prezentowane jako mediany (czerwony kwadrat) z rozstępem kwartylnym (niebieskie wąsy) i analizowane testem *H* Kruskala-Wallisa. Znamienne różnice w krotności ekspresji guz/margines pomiędzy poszczególnymi stopniami zaawansowania TNM wyróżniono konektorami z gwiazdką. G/M, ekspresja w guzie w stosunku do ekspresji w okolicach marginesu resekcji.

6.1.1.6 Zależność ekspresji genów białek szlaku *COX2/PGE2* od stopnia zaawansowania histologicznego guza pierwotnego (G)

Ekspresja żadnego z badanych genów w tkance nowotworowej (Tabela XX) i w marginesach resekcji (Tabela XXI), a także krotność ekspresji (Tabela XXII) nie była znamienne powiązana ze stopniem zaawansowania histologicznego guza pierwotnego.

Tabela XX. Zależność ekspresji genów w guzie od stopnia zaawansowania histologicznego (G)

Gen	Średnia ekspresja w guzach [NRQ]			P
	G1	G2	G3/4	
<i>PTGS2</i>	0,78; 2,2	0,82; 0,8	1,06; 3,43	0,841
<i>HPGD</i>	0,22; 3,74	0,36; 0,64	0,58; 1,53	0,570
<i>MRP4</i>	0,95; 0,81	1,08; 1,62	0,78; 0,7	0,647
<i>PGT</i>	0,36; 0,67	0,59; 1,41	0,43; 0,79	0,401
<i>PTGER2</i>	0,71; 0,3	0,85; 1,12	1,27; 1,21	0,839
<i>PTGER4</i>	0,96; 0,67	0,66; 0,94	0,63; 1,81	0,975

Dane prezentowane jako mediany znormalizowanych wartości relatywnych ekspresji (NRQ) z rozstępem kwartylnym i analizowane testem *H* Kruskala-Wallisa.

Tabela XXI. Zależność ekspresji genów w marginesie od stopnia zaawansowania histologicznego (G)

Gen	Średnia ekspresja w marginesach resekcji [NRQ]			P
	G1	G2	G3/4	
<i>PTGS2</i>	1,66; 8,09	0,78; 6,52	0,81; 1,3	0,570
<i>HPGD</i>	2,6; 1,32	2,28; 1,19	1,86; 1,63	0,234
<i>MRP4</i>	2,0; 1,35	1,51; 1,62	1,0; 1,67	0,893
<i>PGT</i>	1,97; 2,06	1,48; 1,51	1,65; 2,87	0,879
<i>PTGER2</i>	1,09; 1,34	1,39; 0,98	1,47; 1,78	0,784
<i>PTGER4</i>	1,23; 1,02	1,38; 1,44	1,24; 1,53	0,628

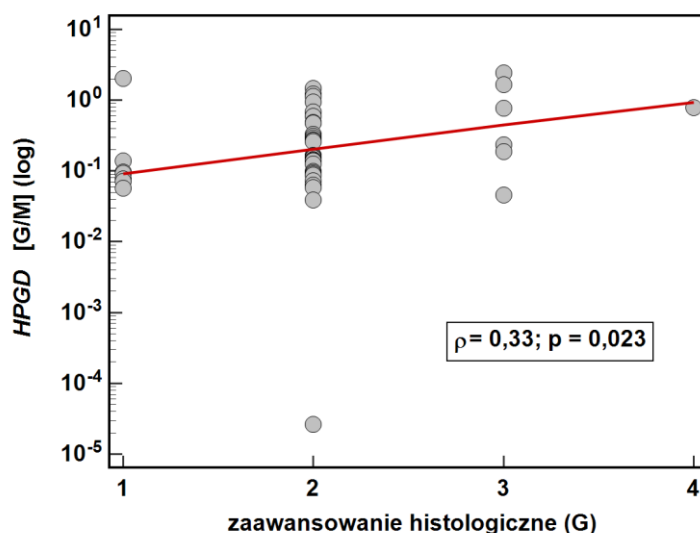
Dane prezentowane jako mediany znormalizowanych wartości relatywnych ekspresji (NRQ) z rozstępem kwartylnym i analizowane testem *H* Kruskala-Wallisa.

Tabela XXII. Zależność krotności ekspresji genów [guz/margines] od stopnia zaawansowania histologicznego (G)

Gen	Średnia krotność ekspresji [guz/margines]			P
	G1	G2	G3/4	
<i>PTGS2</i>	0,35; 16,4	0,82; 2,91	0,92; 10,84	0,714
<i>HPGD</i>	0,09; 0,06	0,17; 0,27	1,78; 1,25	0,084
<i>MRP4</i>	0,4; 0,32	0,54; 1,2	0,58; 0,56	0,872
<i>PGT</i>	0,13; 0,29	0,42; 1,31	0,22; 0,37	0,205
<i>PTGER2</i>	0,43; 0,62	0,6; 0,59	0,44; 0,99	0,902
<i>PTGER4</i>	0,33; 0,18	0,42; 0,77	0,56; 1,26	0,860

Dane prezentowane jako mediany z rozstępem kwartylnym i analizowane testem *H* Kruskala-Wallisa.

Ze względu na zaobserwowaną tendencję rosnącą w przypadku krotności ekspresji *HPGD* wraz z rosnącym stopniem odróżnicowania komórek nowotworowych (Tabela XXII), dodatkowo oceniono korelację między parametrami i wykazano znamiennej wprost proporcjonalną zależność (Wykres 9).



Wykres 9. Korelacja wprost proporcjonalna między krotnością ekspresji *HPGD* w guzie w stosunku do marginesu a stopniem zaawansowania histologicznego guza pierwotnego

Korelację analizowano testem rang Spearmana. Kolorem czerwonym wyróżniono linię trendu.

6.1.1.7 Zależność ekspresji genów białek szlaku *COX2/PGE2* od lokalizacji guza pierwotnego

Sublokalizacja guza pierwotnego nie miała związku z ekspresją w guzie żadnego z badanych genów (Tabela XXIII).

Tabela XXIII. Zależność ekspresji genów białek szlaku *COX2/PGE₂* w tkance guza od sublokalizacji guza pierwotnego w jelicie grubym

Gen	Średnia ekspresja w guzach [NRQ]			P
	Guzy lewostronne	Guzy odbytnicy	Guzy prawostronne	
<i>PTGS2</i>	0,91; 2,89	0,87; 0,77	0,78; 0,68	1,0 ^K
<i>HPGD</i>	0,55 (0,22-1,36)	0,44 (0,25-0,76)	0,27 (0,08-0,97)	0,540 ^A
<i>MRP4</i>	1,85; 1,23	1,13; 1,35	0,95; 1,08	0,677 ^K
<i>PGT</i>	0,75 (0,35-1,33)	0,54 (0,3-0,97)	0,57 (0,34-0,98)	0,703 ^A
<i>PTGER2</i>	0,85; 0,7	0,82; 1,25	0,93; 1,59	0,423 ^K
<i>PTGER4</i>	0,82 (0,47-1,44)	0,61 (0,38-0,99)	0,68 (0,4-1,15)	0,694 ^A

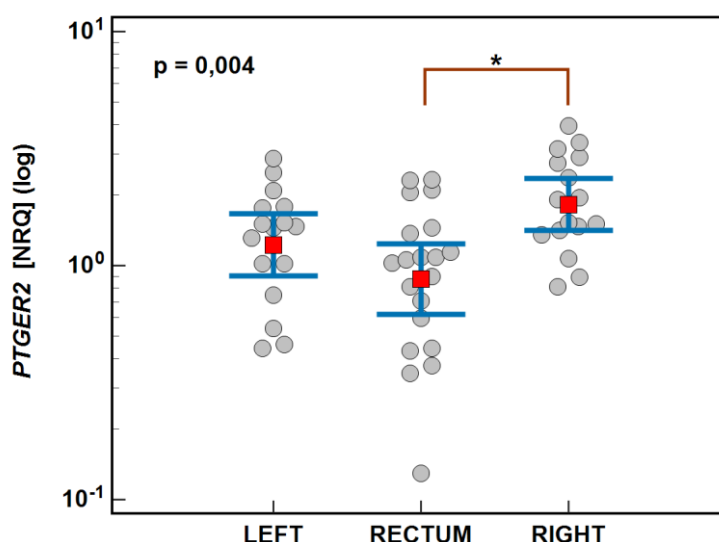
^A, dane analizowane jednoczynnikową ANOVA i przedstawione jako średnie geometryczne znormalizowanych wartości relatywnej ekspresji (NRQ) z 95%CI; ^K, dane analizowane testem *H* Kruskala-Wallisa i przedstawione jako mediany NRQ z IQR; CI, przedział ufności; IQR, rozstęp kwartylny.

Sublokalizacja guza pierwotnego nie miała związku z ekspresją w okolicach marginesu resekcji żadnego z badanych genów (Tabela XXIV), z wyjątkiem *PTGER2*, którego ekspresja w przypadku guzów prawostronnych była znamiennej wyższa niż w przypadku guzów odbytnicy (Wykres 10).

Tabela XXIV. Zależność ekspresji genów białek szlaku COX2/PGE₂ w okolicach marginesu resekcji od sublokalizacji guza pierwotnego w jelicie grubym

Gen	Średnia ekspresja w marginesach resekcji [NRQ]			P
	Guzy	Guzy	Guzy	
	lewostronne	odbytnicy	prawostronne	
<i>PTGS2</i>	1,38 (0,47-3,97)	1,65 (0,68-3,98)	0,68 (0,29-1,6)	0,338 ^A
<i>HPGD</i>	2,55; 1,01	1,97; 1,38	2,56; 1,12	0,333 ^K
<i>MRP4</i>	1,57; 1,61	1,59; 1,86	1,1; 1,21	0,386 ^K
<i>PGT</i>	1,68 (1,25-2,26)	1,5 (1,03-2,19)	1,67 (1,22-2,3)	0,846 ^A
<i>PTGER2</i>	1,23 (0,9-1,66)	0,87 (0,62-1,24)	1,82 (1,41-2,35)	0,004^A
<i>PTGER4</i>	1,39; 1,31	1,21; 1,24	1,83; 1,64	0,237 ^K

^A, dane analizowane jednoczynnikową ANOVA i przedstawione jako średnie geometryczne znormalizowanych wartości relatywnych ekspresji (NRQ) z 95%CI; ^K, dane analizowane testem *H* Kruskala-Wallisa i przedstawione jako mediany NRQ z IQR; CI, przedział ufności; IQR, rozstęp kwartylny. Kolorem czerwonym wyróżniono wynik statystycznie znamiennej ($p < 0,05$).



Wykres 10. Zależność między ekspresją PTGER2 w okolicach marginesu resekcji a sublokalizacją guza pierwotnego w jelicie grubym

Dane prezentowane jako średnie geometryczne (czerwony kwadrat) z 95% przedziałem ufności (niebieskie wąsy) i analizowane testem ANOVA. Znamienne różnice pomiędzy poszczególnymi sublokalizacjami wyróżniono konektorami z gwiazdką. NRQ, znormalizowane wartości relatywnych ekspresji.

Sublokalizacja guza pierwotnego nie miała związku z krotnością ekspresji badanych genów w guzie w stosunku do marginesu resekcji (Tabela XXV).

Tabela XXV. Zależność krotności ekspresji genów białek szlaku COX2/PGE₂ guz/margines resekcji od sublokalizacji guza pierwotnego w jelicie grubym

Gen	Średnia krotność ekspresji [guz/margines]			P
	Guzy lewostronne	Guzy odbytnicy	Guzy prawostronne	
<i>PTGS2</i>	0,54 (0,13-2,25)	0,54 (0,13-2,32)	1,15 (0,38-3,47)	0,621 ^A
<i>HPGD</i>	0,15; 0,21	0,22; 0,59	0,14; 0,44	0,689 ^K
<i>MRP4</i>	0,5 (0,21-1,18)	0,65 (0,34-1,22)	0,59 (0,34-1,02)	0,841 ^A
<i>PGT</i>	0,45 (0,19-1,02)	0,42 (0,23-0,75)	0,31 (0,15-0,61)	0,680 ^A
<i>PTGER2</i>	0,69 (0,45-1,07)	0,71 (0,38-1,34)	0,51 (0,3-0,86)	0,595 ^A
<i>PTGER4</i>	0,38; 1,27	0,56; 0,8	0,28; 0,39	0,489 ^K

^A, dane analizowane jednoczynnikową ANOVA i przedstawione jako średnie geometryczne z 95%CI; ^K, dane analizowane testem *H* Kruskala-Wallisa i przedstawione jako mediany z IQR; CI, przedział ufności; IQR, rozstęp kwartylny.

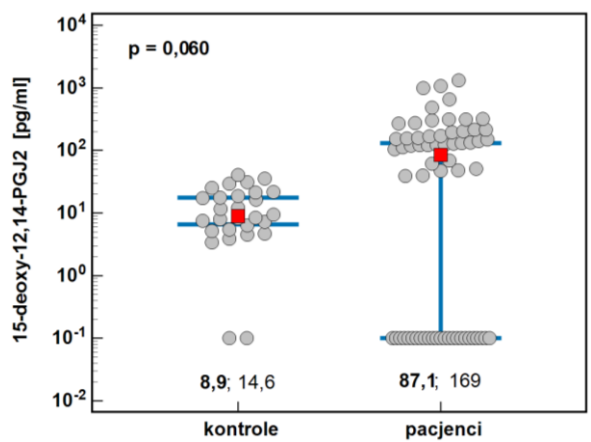
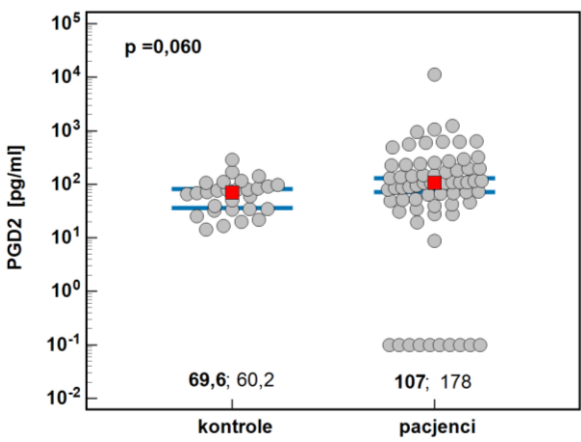
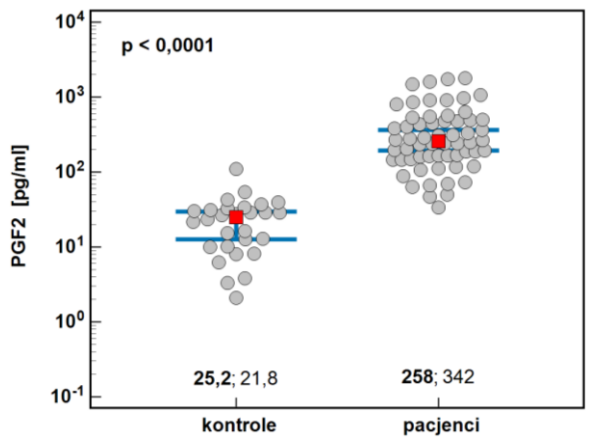
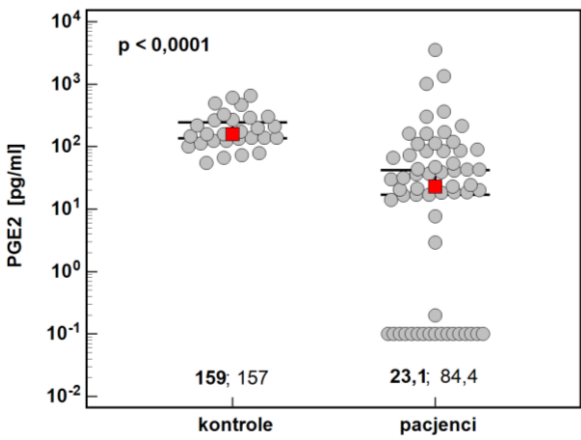
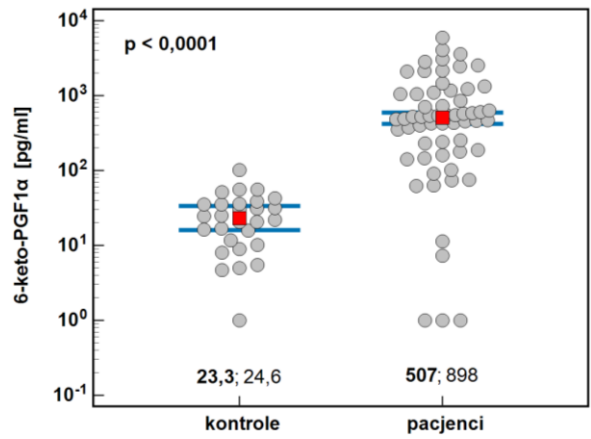
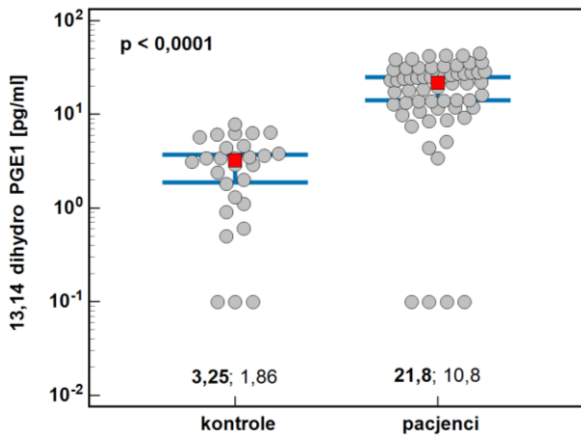
6.1.2 STĘŻENIE PGE₂ I INNYCH WYBRANYCH EIKOZANOIDÓW W KRĄŻENIU

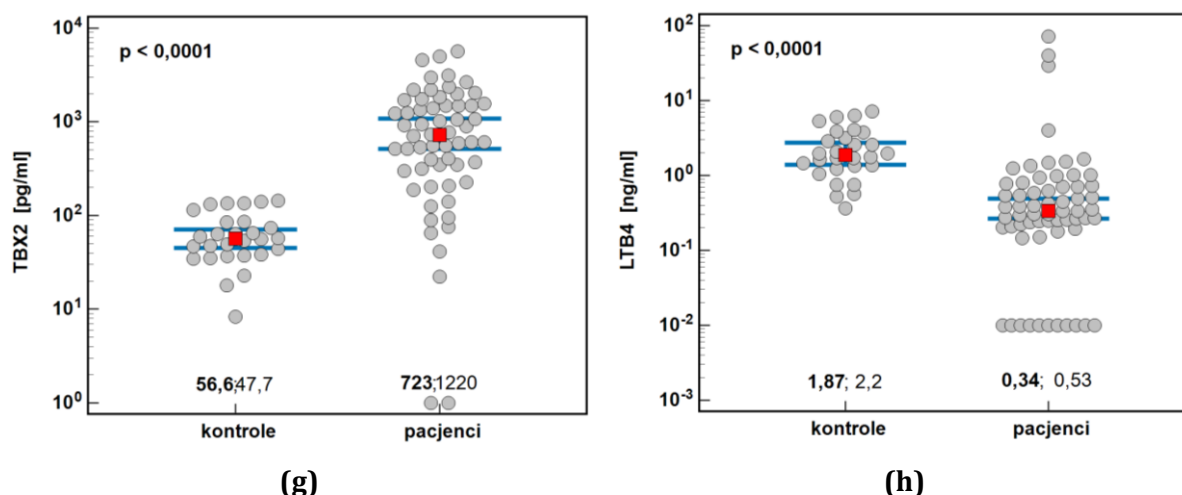
Ze względu na lokalny charakter działania oraz krótki czas życia hormonów tkankowych, do których należą eikozanoidy, a w związku z tym stosunkowo niskie ich stężenia w krążeniu ogólnoustrojowym, przy oznaczaniu niektórych z badanych związków posłużono się ich stabilnymi pochodnymi. I tak:

- PGE₁ jest reprezentowana przez 13,14-dihydro-PGE₁ (dla uproszczenia–PGE₁),
- PGI₂ jest reprezentowana przez 6-keto-PGF_{1α} (dla uproszczenia–PGF_{1α}),
- TXA₂ przez TXB₂,
- LTA₄ przez LTB₄.

Natomiast PGD₂ zmierzono zarówno jako aktywną prostaglandynę, jak i jej metabolit: 15-deoxy-12,14-PGJ₂ (dla uproszczenia–PGJ₂).

Stężenia PGE₁, PGF_{1α}, PGF₂ i TBX₂ były znamienne, a PGD₂ i PGJ₂ nieznamienne, wyższe u pacjentów z RJG niż u osób zdrowych z grupy kontrolnej. Z kolei stężenie LTB₄ było znamienne niższe (Wykres 11).





Wykres 11. Porównanie ogólnoustrojowych stężeń wybranych eikozanoidów u pacjentów z rakiem jelita grubego względem osób zdrowych: (a) 13,14-dihydro-PGE₁; (b) 6-keto-PGF_{1α}; (c) PGE₂; (d) PGF₂; (e) PGD₂; (f) 15-deoksy-12,14-PGJ₂; (g) TBX₂; (h) LTB₄

Dane prezentowane mediany (czerwony kwadrat) z zakresem kwartylowym (niebieski wąsy) i analizowane testem *U* Manna-Whitneya. Wartość mediany i zakresu kwartylowego podano pod wykresami dot-plot. Ze względu na duży rozrzut wyników, dane przedstawiono w skali logarytmicznej dla poprawy ich czytelności.

6.1.2.1 Zależność stężenia wybranych eikozanoidów we krwi od wieku

Z uwagi na nierównocенność grupy badanej i kontrolnej pod względem wieku (Tabela II), przeanalizowano korelację między wiekiem a badanymi eikozanoidami w grupie kontrolnej i badanej. Spośród wszystkich metabolitów, jedynie stężenie PGF_{1α} w grupie kontrolnej ujemnie korelowało z wiekiem (Tabela XVI).

Tabela XVI. Korelacja między wiekiem z stężeniem wybranych eikozanoidów w surowicy pacjentów z RJG oraz osób zdrowych (kontrolne)

Metabolit	Współczynnik korelacji Spearmana (ρ); p	
	Kontrolne	Pacjenci
PGE ₂	-0,22; $p = 0,259$	0,17; $p = 0,206$
13,14-dihydro-PGE ₁	-0,20; $p = 0,307$	-0,10; $p = 0,470$
15-deoksy-12,14-PGJ ₂	-0,21; $p = 0,274$	-0,19; $p = 0,144$
6-keto-PGF _{1α}	-0,39; $p = 0,042$	0,18; $p = 0,164$
PGD ₂	-0,22; $p = 0,272$	0,13; $p = 0,342$
PGF ₂	-0,15; $p = 0,443$	-0,05; $p = 0,704$
LTB ₄	-0,20; $p = 0,302$	0,09; $p = 0,504$
TBX ₂	-0,22; $p = 0,252$	0,10; $p = 0,465$

P, prawdopodobieństwo. Kolorem czerwonym wyróżniono zależności statystycznie znamienne ($p < 0,05$)

6.1.2.2 Zależność stężenia wybranych eikozanoidów we krwi od ryzyka zgonu podczas operacji

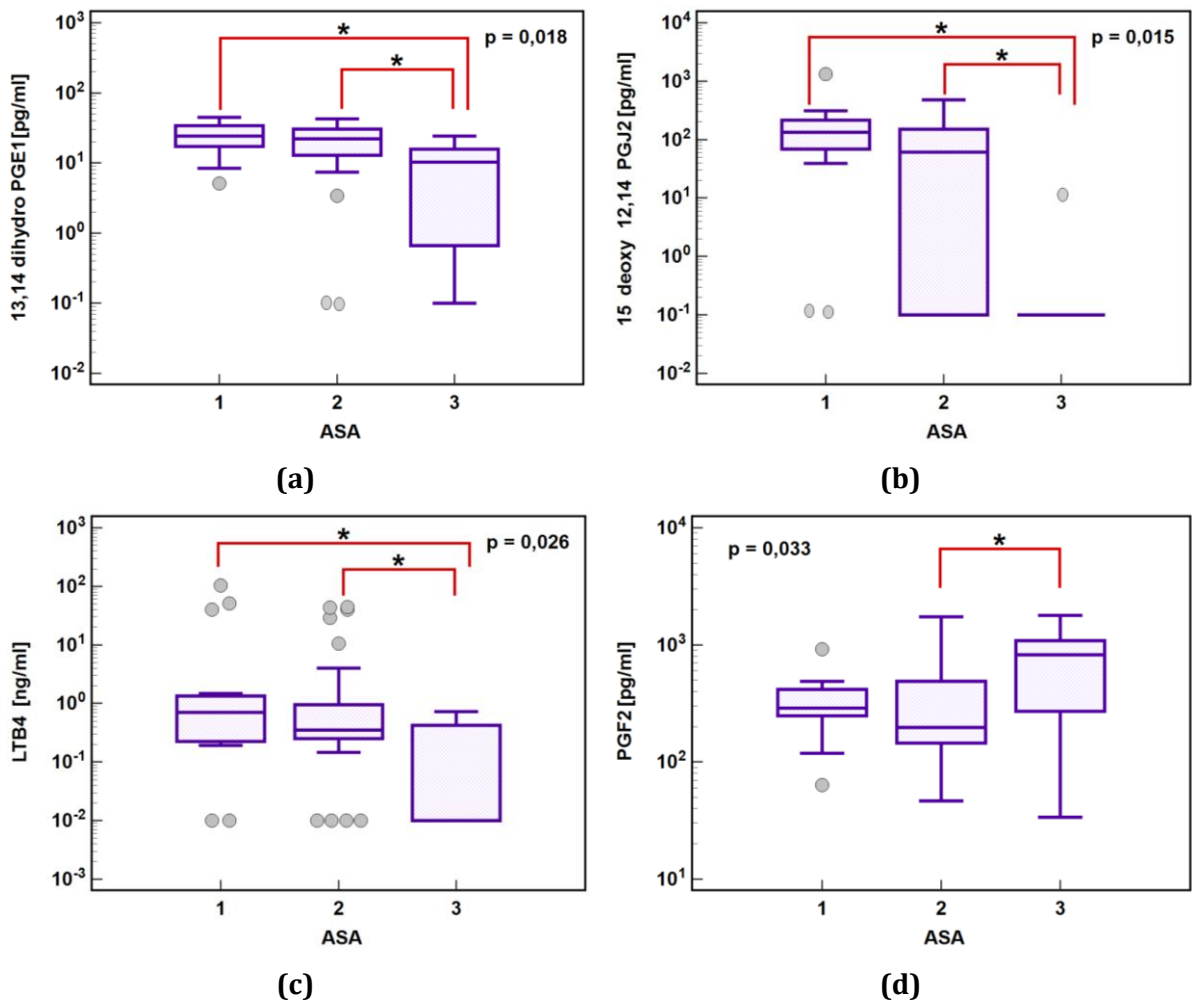
Stężenia PGE₂, PGF₁, PGD₂ i TBX₄ nie różniły się statystycznie między pacjentami o różnym stopniu ryzyka zgonu podczas planowanej operacji (Tabela XVII).

Tabela XVII. Stężenie wybranych eikozanoidów w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od ryzyka zgonu podczas operacji (skala ASA)

Metabolit	Średnie stężenie eikozanoidów w surowicy			P
	mediana [pg/ml]; IQR			
	ASA 1	ASA 2	ASA 3	
PGE ₂	18,3; 94,9	22,9; 56,6	36,9; 117	0,987
13,14-dihydro-PGE ₁	24,3; 16,7	22,1; 17,6	10,4; 13,7	0,018
15-deoxy-12,14-PGJ ₂	134; 142	61,2; 151	0,1; 0	0,015
6-keto-PGF _{1α}	535; 791	486; 877	536; 2084	0,501
PGD ₂	83,7; 137	106; 130	88; 116	0,715
PGF ₂	289; 170	197; 345	824; 819	0,033
LTB ₄ ¹	0,71; 1,13	0,35; 0,71	0,01; 0,42	0,026
TBX ₂	1159; 940	709; 1412	534; 1290	0,368

¹, stężenie LTB₄ wyrażone jest w [ng/ml]. Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa i przedstawiono jako mediany z zakresem kwartalnym (IQR). Kolorem czerwonym wyróżniono zależności statystycznie istotne (*p*<0.05). *P*, prawdopodobieństwo.

Natomiast stężenia PGE₁, PGJ₂ i LTB₄ były statystycznie niższe u pacjentów z wyższym ryzykiem zgonu (ASA=3) niż w przypadku pacjentów z niskim ryzykiem, sklasyfikowanym jako ASA=1 i ASA=2 (Wykres 12a-c). Z kolei stężenie PGF₂ było statystycznie wyższe u pacjentów z wyższym ryzykiem zgonu niż z niższym, statystycznie wobec grupy pacjentów z ASA=2 (Wykres 12d).



Wykres 12. Stężenie eikozanoidów w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od ryzyka zgonu podczas operacji (skala ASA): **(a)** 13,14-dihydro-PGE₁; **(b)** 15-deoksy-12,14-PGJ₂; **(c)** LBT₄; **(d)** PGF₂

Dane analizowano testem H Kruskala-Wallisa i przedstawiono jako mediany z zakresem kwartalnym (pudełko) oraz 95% przedziałem ufności (wąsy). Wartości odstające przedstawiono w postaci szarych kropek. Znamienne różnice między grupami przedstawiono za pomocą konektorów oznaczonych gwiazdką. P, prawdopodobieństwo; ASA, skala oceny ryzyka zgonu u pacjentów poddawanych operacjom pozasercowym.

6.1.2.3 Zależność stężenia eikozanoidów we krwi od głębokości nacieku guza pierwotnego

Stężenie PGE₂, PGE₁, PGJ₂, PGF₁, PGD₂ i LTB₄ nie korelowało z rozległością guza pierwotnego. Natomiast stężenie PGF₂ było odwrotnie proporcjonalne a TXB₂ wprost proporcjonalne do głębokości nacieku (Tabela XVIII).

Tabela XVIII. Korelacja między stężeniem wybranych eikozanoidów we krwi pacjentów z RJG a głębokością nacieku guza pierwotnego

Metabolit	Współczynnik korelacji	
	Spearmana (ρ)	P
PGE ₂	-0,04	0,777
13,14-dihydro-PGE ₁	0,13	0,338
15-deoxy-12,14-PGJ ₂	-0,18	0,179
6-keto-PGF _{1α}	-0,18	0,174
PGD ₂	-0,11	0,417
PGF ₂	-0,32	0,014
LTB ₄	-0,10	0,428
TBX ₂	0,28	0,031

P, prawdopodobieństwo; RJG, rak jelita grubego. Kolorem czerwonym wyróżniono zależności statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

6.1.2.4 Zależność stężenia eikozanoidów we krwi od obecności przerzutów w węzłach chłonnych

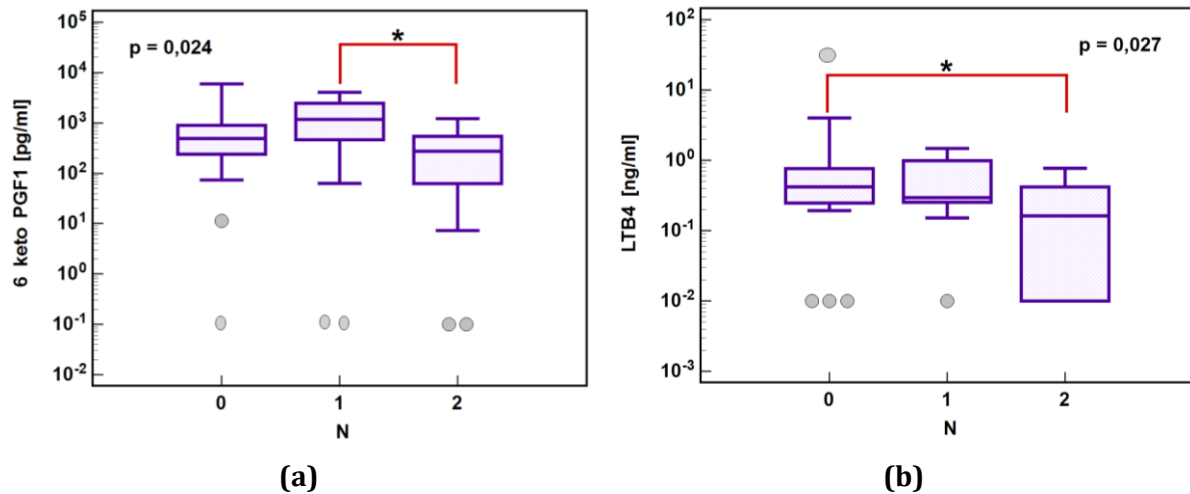
Stężenia PGE₂, PGE₁, PGJ₂, PGD₂ i TBX₄ u pacjentów z RJG nie zależały od obecności przerzutów w węzłach chłonnych (Tabela XIX).

Tabela XIX. Stężenie wybranych eikozanoidów w surowicy pacjentów z RJG w zależności od obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych

Metabolit	Średnie stężenie eikozanoidów w surowicy			P
	mediana [pg/ml]; IQR			
	N0	N1	N2	
PGE ₂	33,7; 70,5	13,2; 42,7	17,7; 85,8	0,465
13,14-dihydro-PGE ₁	17,7; 16,8	24; 22	13,2; 14,8	0,657
15-deoxy-12,14-PGJ ₂	82,9; 186	51,3; 133	85,5; 157	0,969
6-keto-PGF _{1α}	492; 662	1187; 2001	301; 482	0,024
PGD ₂	107; 166	85; 85,6	68; 116	0,600
PGF ₂	222; 235	363; 401	475; 1029	0,062
LTB ₄ ¹	0,42; 0,52	0,30; 0,74	0,16; 0,41	0,027
TBX ₂	659; 1178	1022; 1189	638; 1646	0,792

¹, stężenie LTB₄ wyrażone jest w [ng/ml]. Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa i przedstawiono jako mediany z zakresem kwartalnym (IQR). Kolorem czerwonym wyróżniono zależności statystycznie znamienne ($p < 0.05$). P, prawdopodobieństwo; RJG, rak jelita grubego.

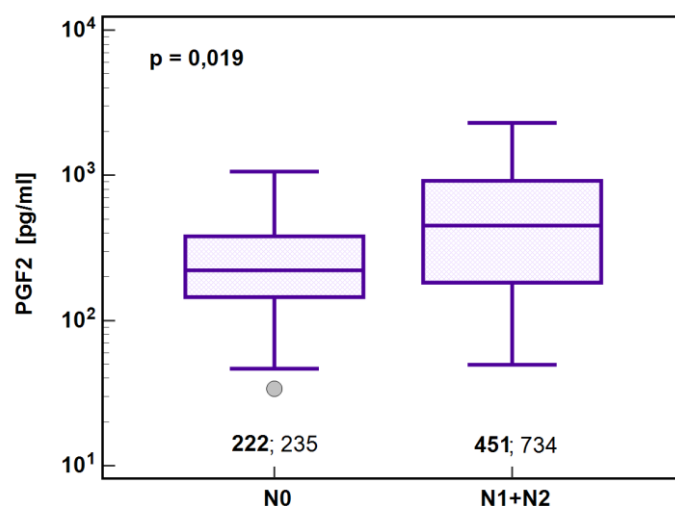
Stężenie $\text{PGF}_{1\alpha}$ było natomiast znacząco niższe u pacjentów z RJG i przerzutami do węzłów chłonnych klasyfikowanych jako N2, w porównaniu do pacjentów klasyfikowanych jako N1 (Wykres 13a). Z kolei stężenie LTB_4 było znacząco niższe u pacjentów z RJG i przerzutami do węzłów chłonnych klasyfikowanych jako N2, w porównaniu do pacjentów bez przerzutów (N0) (Wykres 13b).



Wykres 13. Stężenie eikozanoidów w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych: (a) 6-keto-PGF_{1α}; (b) LTB₄

Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa i przedstawiono jako mediany z zakresem kwartalnym (pudełko) oraz 95% przedziałem ufności (wąsy). Wartości odstające przedstawiono w postaci szarych kropek. Znaczące różnice między grupami przedstawiono za pomocą konektorów oznaczonych gwiazdką. *P*, prawdopodobieństwo.

W przypadku PGF_2 , stężenie u pacjentów bez przerzutów do węzłów chłonnych było nieznacząco niższe niż u pacjentów z przerzutami (Tabela XIX). Dla zwiększenia mocy testu, przeanalizowano stężenie PGF_2 u pacjentów bez przerzutów do węzłów chłonnych względem pacjentów z przerzutami, niezależnie od ich liczby (N1+N2). Jak przedstawiono na Wykresie 14, stężenie prostaglandyny było znacząco wyższe u pacjentów z przerzutami.



Wykres 14. Stężenie PGF₂ w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych

Dane analizowano testem *U* Manna-Whitneya i przedstawiono jako mediany z zakresem kwartalnym (pudełko oraz wartości poniżej pudełka) oraz 95% przedziałem ufności (wąsy). Wartości odstające przedstawiono w postaci szarych kropek. *P*, prawdopodobieństwo.

6.1.2.5 Zależność stężenia eikozanoidów od obecności przerzutów odległych

Stężenia PGE₂, PGE₁, PGD₂, PGF₂ i TXB₂ we krwi pacjentów z RJG nie były związane z obecnością przerzutów odległych, podczas gdy stężenia PGF₁ i LTB₄ były znacząco niższe, a PGJ₂ znacząco wyższe u pacjentów z przerzutami (Tabela XX).

Tabela XX. Stężenie wybranych eikozanoidów w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od obecności przerzutów odległych

Metabolit	Średnie stężenie eikozanoidów w surowicy		<i>P</i>
	mediana [pg/ml]; IQR		
	M0	M1	
PGE ₂	22,9; 63	16,6; 606,8	0,860
13,14-dihydro-PGE ₁	21,5; 17,5	23; 15,6	0,630
15-deoxy-12,14-PGJ ₂	48,4; 155	149; 194	0,030
6-keto-PGF _{1α}	538; 918	147; 448	0,030
PGD ₂	89,8; 141	71,5; 82	0,503
PGF ₂	250; 324	477; 1060	0,748
LTB ₄ ¹	0,34; 0,49	0,15; 0,23	0,038
TBX ₂	609; 1251	1490; 1074	0,186

¹, stężenie LTB₄ wyrażone jest w [ng/ml]. Dane analizowano testem *U* Manna-Whitneya i przedstawiono jako mediany z zakresem kwartalnym (IQR). Kolorem czerwonym wyróżniono zależności statystycznie istotne (*p*<0.05). *P*, prawdopodobieństwo.

6.1.2.6 Zależność stężenia eikozanoidów we krwi od stopnia zaawansowania RJG

Spośród analizowanych eikozanoidów i ich pochodnych, jedynie stężenie LTB₄ korelowało znamienne ze stopniem zaawansowania choroby, wykazując zależność odwrotnie proporcjonalną (Tabela XXI).

Tabela XXI. Korelacja między stężeniem wybranych eikozanoidów we krwi pacjentów a stopniem zaawansowania RJG (TNM)

Metabolit	Współczynnik korelacji Spearmana (ρ)	P
PGE ₂	-0,13	0,340
13,14-dihydro-PGE ₁	0,15	0,254
15-deoxy-12,14-PGJ ₂	-0,04	0,752
6-keto-PGF1 α	-0,05	0,710
PGD ₂	-0,16	0,211
PGF ₂	0,11	0,402
LTB ₄	-0,30	0,018
TXB ₂	0,09	0,515

P, prawdopodobieństwo; RJG, rak jelita grubego. Kolorem czerwonym wyróżniono zależności statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

6.1.2.7 Zależność stężenia eikozanoidów we krwi od stopnia zaawansowania histologicznego

Ze względu na niewielką ilość przypadków, guzy G3 i G4 w teście rang analizowano łącznie, natomiast analizę korelacji przeprowadzono dla wszystkich stopni.

Stężenia PGE₂, PGE₁, PGF₂ i TXB₂ nie różniły się znamienne u pacjentów z guzami o różnym stopniu zaawansowania histologicznego (Tabela XXII).

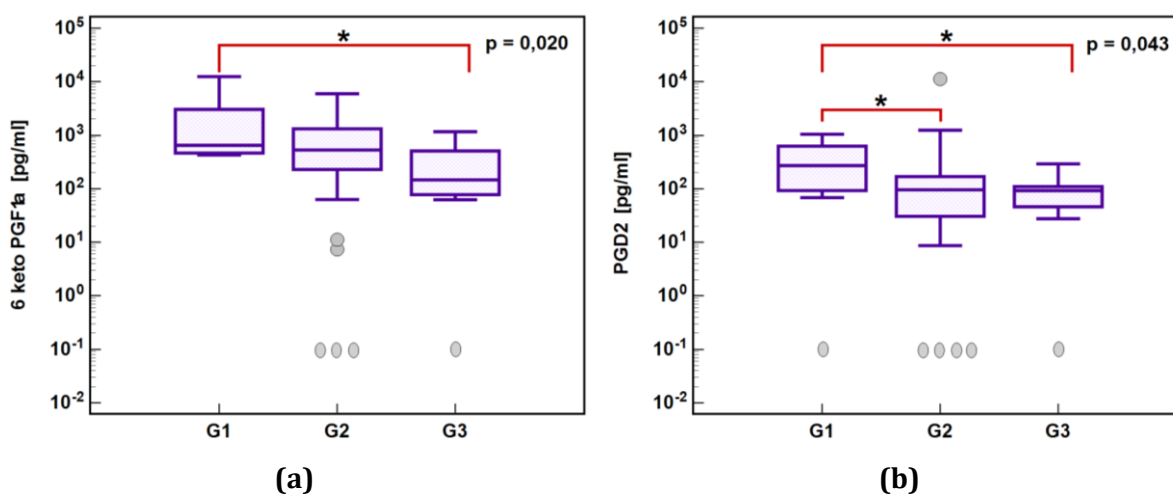
Tabela XXII. Stężenie wybranych eikozanoidów w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od zaawansowania histologicznego raka

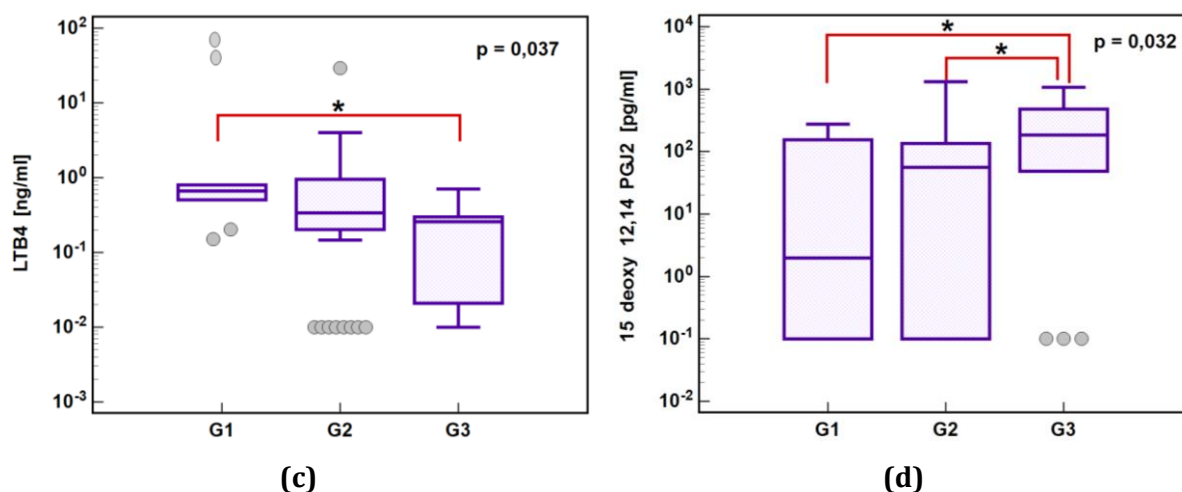
Metabolit	Średnie stężenie eikozanoidów w surowicy			P
	mediana [pg/ml]; IQR			
	G1	G2	G3+G4	
PGE ₂	38,1; 58	21,7; 79,1	25,1; 67,4	0,637
13,14-dihydro-PGE ₁	18,6; 13;9	22,1; 18,8	17,9; 15,3	0,853
15-deoxy-12,14-PGJ ₂	19,7; 155	56,3; 135	186; 432	0,032
6-keto-PGF _{1α}	654; 2585	530; 1091	147; 432	0,020
PGD ₂	271; 531	96,5; 139	92,7; 63,9	0,043
PGF ₂	284; 468	242; 347	299; 444	0,396
LTB ₄ ¹	0,67; 0,3	0,34; 0,75	0,26; 0,24	0,037
TBX ₂	765; 1211	625; 1272	1376; 1121	0,161

¹, stężenie LTB₄ wyrażone jest w [ng/ml]. Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa i przedstawiono jako mediany z zakresem kwartalnym (IQR). Kolorem czerwonym wyróżniono zależności statystycznie znamienne ($p < 0.05$). *P*, prawdopodobieństwo.

Natomiast stężenia PGF₁, PGD₂ i LTB₄ były znamienne niższe u pacjentów z wyższym stopniem odróżnicowania guzów (G3+G4) niż z najslabiej odróżnicowanymi guzami G1 (Wykres 15a-c). W przypadku PGD₂, pacjenci z histologicznie najbardziej zaawansowanymi guzami (G3+G4) mieli niższe stężenia prostaglandyny również względem pacjentów z guzami G2 (Wykres 15b).

Z kolei stężenie PGJ₂ było znamienne wyższe u pacjentów z guzami o dużym stopniu odróżnicowania w porównaniu do guzów klasyfikowanych jako G1 i G2 (Wykres 15d).





Wykres 15. Stężenie w surowicy pacjentów z RJG w zależności od zaawansowania histologicznego guza pierwotnego: (a) 6-keto- PGF_{1α}; (b) PGD₂; (c) LTB₄; (d) 15-deoksy-12,14-PGJ₂

Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa i przedstawiono jako mediany z zakresem kwartalnym (pudełko) oraz 95% przedziałem ufności (wąsy). Dla zwiększenia mocy testu, przypadki G3 i G4 analizowano łącznie. Wartości odstające przedstawiono w postaci szarych kropek. Znamienne różnice między grupami przedstawiono za pomocą konektorów oznaczonych gwiazdką. *P*, prawdopodobieństwo; RJG, rak jelita grubego.

Analiza korelacji Spearmana pozwoliła wykazać, że zależność stężenia eikozanoidów od zaawansowania histologicznego guza jest liniowa: wprost proporcjonalna w przypadku PGJ₂ (im większe odróżnicowanie guza, tym większe stężenie metabolitu) a odwrotnie proporcjonalna w przypadku PGF₁, PGD₂ i LTB₄ (im większe odróżnicowanie guza, tym niższe ich stężenie) (Tabela XXIII).

Tabela XXIII. Korelacja między stężeniem wybranych eikozanoidów we krwi pacjentów z RJG a stopniem zaawansowania histologicznego guza pierwotnego

Metabolit	Współczynnik korelacji	
	Spearmana (ρ)	<i>P</i>
PGE ₂	-0,03	0,831
13,14-dihydro-PGE ₁	-0,05	0,731
15-deoxy-12,14-PGJ ₂	0,30	0,016
6-keto-PGF _{1α}	-0,36	0,004
PGD ₂	-0,24	0,046
PGF ₂	-1,11	0,430
LTB ₄	-0,34	0,007
TBX ₂	0,17	0,174

Kolorem czerwonym wyróżniono zależności statystycznie znamienne ($p < 0.05$), *P*, prawdopodobieństwo; RJG, rak jelita grubego.

6.1.2.8 Zależność stężenia eikozanoidów we krwi od lokalizacji guza pierwotnego

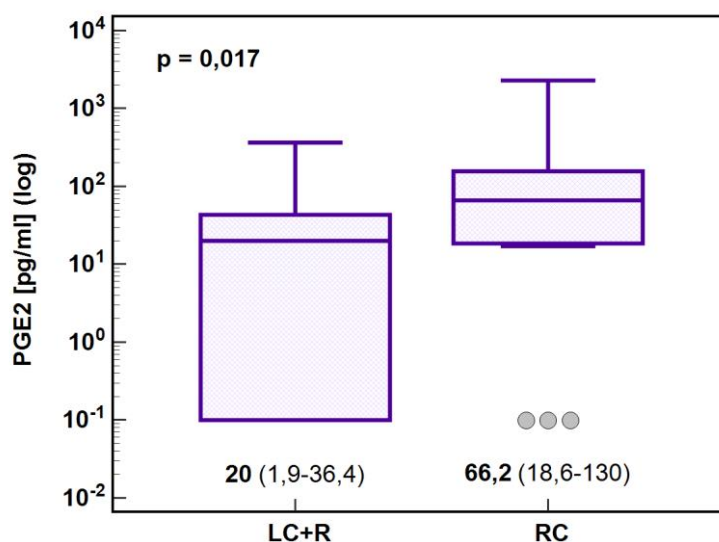
Stężenie żadnego z analizowanych eikozanoidów nie różniło się znacząco w zależności od lokalizacji guza pierwotnego, choć PGE₂ wykazywało tendencję do wyższych stężeń w przypadku pacjentów z guzami zlokalizowanymi w jelicie grubym prawostronnym (Tabela XXIV).

Tabela XXIV. Stężenie wybranych eikozanoidów we krwi pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od sublokalizacji guza pierwotnego

Metabolit	Średnie stężenie eikozanoidów w surowicy			P
	mediana [pg/ml]; IQR			
	Guzy lewostronne	Guzy odbytnicy	Guzy prawostronne	
PGE ₂	9,8; 45,1	20,5; 40,9	66,2; 140	0,056
13,14-dihydro-PGE ₁	24,7; 14,9	20,8; 12,3	21,5; 28,2	0,905
15-deoxy-12,14-PGJ ₂	120; 161	39,7; 142	123; 171	0,413
6-keto-PGF _{1α}	426; 856	564; 1091	492; 791	0,612
PGD ₂	110; 56,2	87,4; 216	63,6; 135	0,219
PGF ₂	294; 300	198; 285	333; 391	0,540
LTB ₄ ¹	0,52; 0,56	0,27; 0,51	0,30; 0,51	0,136
TBX ₂	1151; 1171	609; 1353	896; 1278	0,466

Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa i przedstawiono jako mediany z zakresem kwartalnym (IQR).
¹, stężenie LTB₄ wyrażone jest w [ng/ml]; *P*, prawdopodobieństwo.

Celem zwiększenia mocy testu, stężenie PGE₂ porównano między pacjentami z guzami w jelicie prawostronnym względem pacjentów z guzami w pozostałych lokalizacjach (łącznie guzy lewostronne i guzy odbytnicy). Stężenie PGE₂ było znacząco wyższe w przypadku pacjentów z guzami w jelicie prawostronnym niż z guzami jelita grubego o innych sublokalizacjach (Wykres 16).



Wykres 16. Stężenie PGE₂ w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od sublokalizacji guza pierwotnego.

Dane analizowano testem *U* Manna-Whitneya i przedstawiono jako mediany z zakresem kwartalnym (pudełko oraz wartości poniżej pudełka) oraz 95% przedziałem ufności (wąsy). Wartości odstające przedstawiono w postaci szarych kropek. *P*, prawdopodobieństwo; LC, guzy lewostronne; R, guzy odbytne; RC, guzy prawostronne.

6.1.3 ZNACZENIE DIAGNOSTYCZNE EIKOZANOIDÓW W RAKU JELITA GRUBEGO

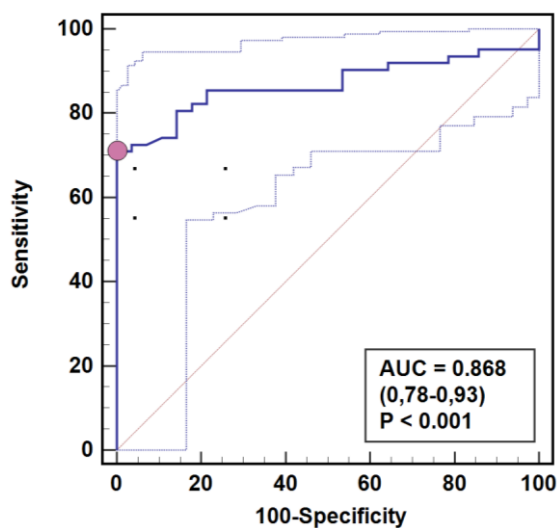
Eikozanoidy, których stężenie w surowicy różniło się znamienne między pacjentami z RJG a osobami zdrowymi z grupy kontrolnej, zostały poddane analizie ROC (ang. receiver operating characteristics) celem oceny ich potencjału diagnostycznego jako ewentualnych markerów wskazujących na obecność RJG w populacji ogólnej.

Spośród badanych metabolitów, PGE₂ miało najniższą, choć wciąż wysoką, moc diagnostyczną – 87% (Wykres 17a). Przy optymalnym punkcie odcięcia, czyli takim, przy którym wartość indeksu Youdena (*J*) jest największa, prostaglandynę charakteryzowała doskonała swoistość kosztem umiarkowanie dobrej czułości (Tabela XXV).

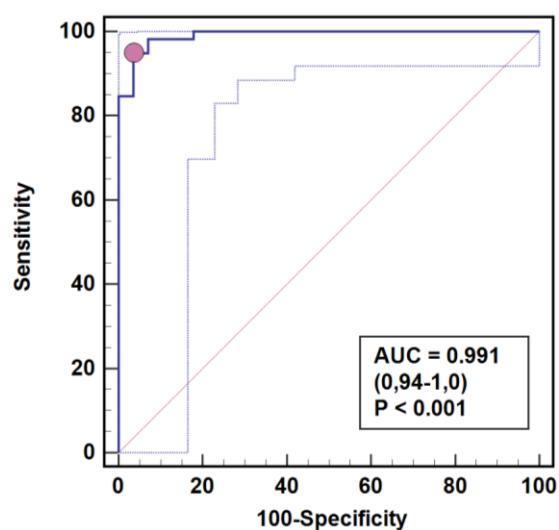
Natomiast PGF₂ miało moc niemal doskonałą – 99% (Wykres 17b), której towarzyszyły bardzo wysoka ($\geq 95\%$) i swoistość, i czułość (Tabela XXV).

Moc diagnostyczna PGE₁, PGF_{1 α} , LTB₄ i TXB₂ była również bardzo wysoka i przekraczała 90% (Wykres 17c-d). Spośród nich wyróżniała się PGF_{1 α} , której indeks *J* był równie wysoki jak PGF₂. Przy wybranym na jego podstawie punkcie odcięcia, czułość i swoistość były bardzo wysokie przekraczając, odpowiednio, 90 i 95%. W przypadku PGE₁

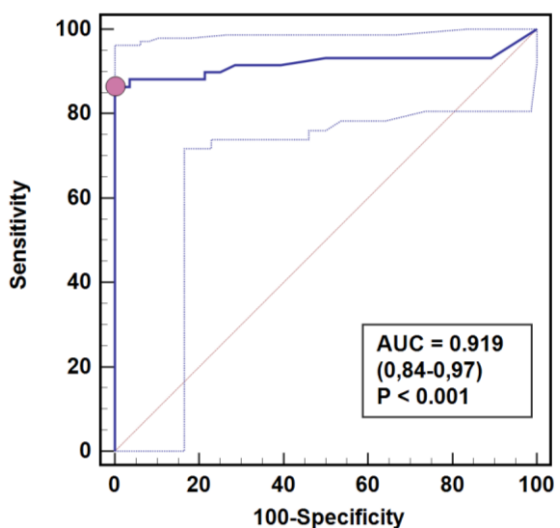
i TXB₂ doskonałej swoistości towarzyszyły, odpowiednio, bardzo dobre i dobre czułości, zaś LTB₄ – bardzo dobra czułość i dobra swoistość, choć indeks J dla LTB₂ był najniższy ze wszystkich analizowanych eikozanoidów (Tabela XXV).



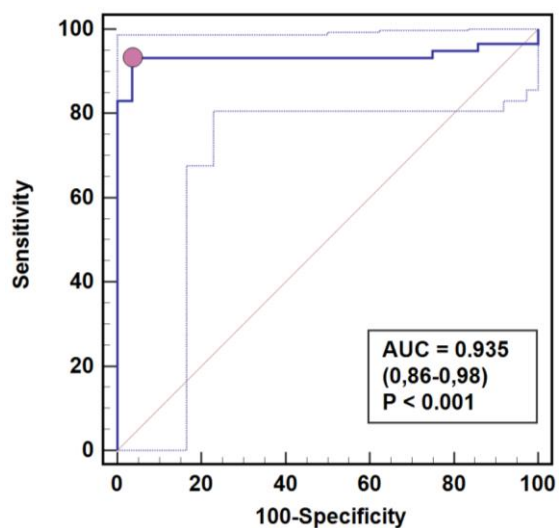
(a)



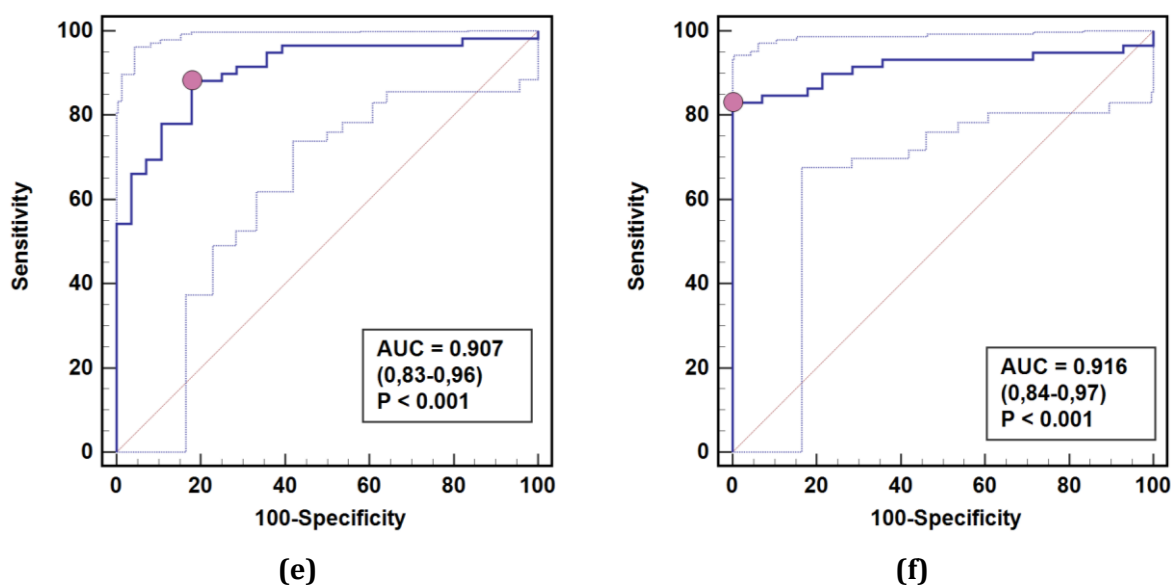
(b)



(c)



(d)



Wykres 17. Krzywe ROC badanych eikozanoidów jako markerów obecności RJG: **(a)** PGE₂; **(b)** PGF₂; **(c)** 13,14-dihydro-PGE₁; **(d)** 6-keto-PGF_{1 α} ; **(e)** LTB₄; **(f)** TXB₂

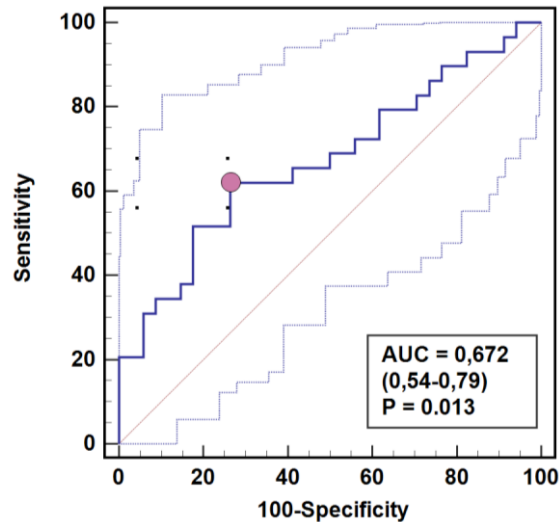
Dane poddano analizie ROC a wyniki zaprezentowano jako krzywe ROC (niebieska ciągła krzywa) z 95%CI (cienka niebieska przerywana krzywa). W insercie podano wartość AUC, reprezentującą ogólną moc diagnostyczną, wraz z 95%CI oraz wartością *p* dla statystyki *z*. Diagonalna czerwona linia reprezentuje marker bez własności dyskryminujących z AUC=0,5. Fioletowy punkt wskazuje optymalną wartość odcięcia. ROC, receiver operating characteristics; RJG, rak jelita grubego; CI, przedział ufności; AUC, pole pod krzywą; *p*, prawdopodobieństwo.

Tabela XXV. Porównanie czułości i swoistości wybranych eikozanoidów jako potencjalnych markerów obecności RJG

Metabolit	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość	Indeks J
PGE ₂	≤53,6 pg/ml	71%	100%	0,710
PGF ₂	>53,8 pg/ml	94,9%	96,4%	0,913
13,14-dihydro-PGE ₁	>7,8 pg/ml	86,4%	100%	0,864
6-keto-PGF _{1α}	>56 pg/ml	93,2%	96,4%	0,897
LTB ₄	≤1011 pg/ml	88,1%	82,1%	0,703
TBX ₂	>114,8 pg/ml	83,1%	100%	0,831

RJG, rak jelita grubego

Dodatkowo, oceniony został potencjał PGF₂ jako markera obecności przerzutów. Choć znamienne statystycznie, to moc diagnostyczna prostaglandyny była umiarkowana (Wykres 18). Wartości stężenia >308,6 pg/ml, jako optymalnego punktu odcięcia wybranego na podstawie najwyższego indeksu J (0,356), towarzyszyły umiarkowane wartości czułości (62,1%) i swoistości (73,5%).

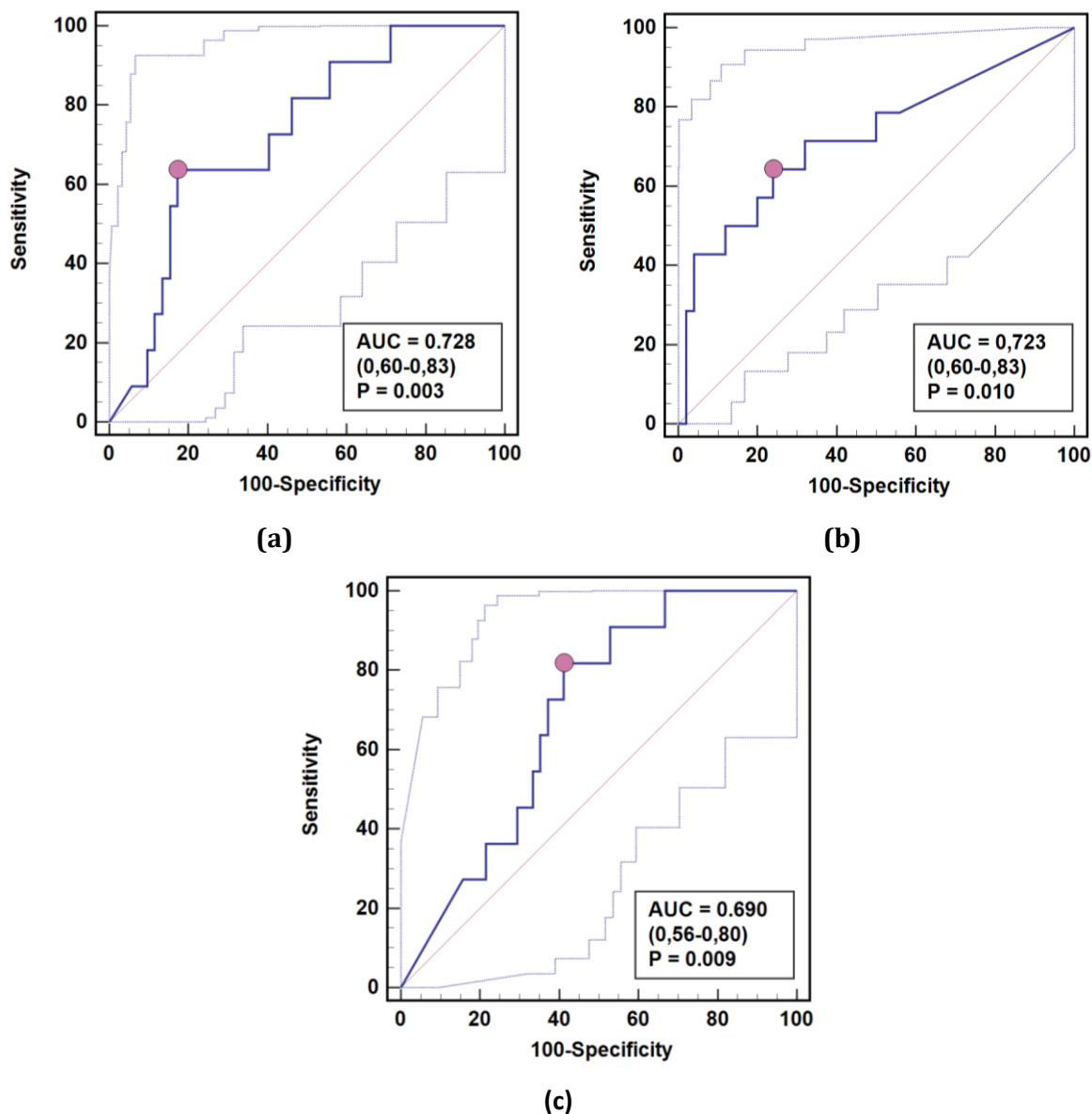


Wykres 18. Krzywa ROC dla PGF_2 jako markera obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych u pacjentów z RJG

Dane poddano analizie ROC a wyniki zaprezentowano jako krzywe ROC (niebieska ciągła krzywa) z 95%CI (cienka niebieska przerywana krzywa). W insercie podano wartość AUC, reprezentującą ogólną moc diagnostyczną, wraz z 95%CI oraz wartością p dla statystyki z . Diagonalna czerwona linia reprezentuje marker bez własności dyskryminujących z $AUC=0,5$. Fioletowy punkt wskazuje optymalną wartość odcięcia. ROC, receiver operating characteristics; RJG, rak jelita grubego; CI, przedział ufności; AUC, pole pod krzywą; p , prawdopodobieństwo.

Celem oceny siły związku między eikozanoidami a agresywnością guza, oceniono zdolność eikozanoidów, znamienne różniących się w zależności od zaawansowania histologicznego G, do dyskryminacji między pacjentami z guzami mniej (G1+G2) i bardziej (G3+G4) zaawansowanymi.

Jak przedstawiono na Wykresie 19, moc diagnostyczna/siła związku $PGF_{1\alpha}$, PGJ_2 i LTB_4 z agresywnością guza była umiarkowana.



Wykres 19. Krzywe ROC badanych eikozanoidów jako markerów agresywności RJG: **(a)** 6-keto-PGF_{1α}; **(b)** 15-deoxy-12,14-PGJ₂; **(c)** LTB₄

Dane poddano analizie ROC a wyniki zaprezentowano jako krzywe ROC (niebieska ciągła krzywa) z 95%CI (cienka niebieska przerywana krzywa). W insercie podano wartość AUC, reprezentującą ogólną moc diagnostyczną, wraz z 95%CI oraz wartością *p* dla statystyki z. Diagonalna czerwona linia reprezentuje marker bez własności dyskryminujących z AUC=0,5. Fioletowy punkt wskazuje optymalną wartość odcięcia. ROC, receiver operating characteristics; RJG, rak jelita grubego; CI, przedział ufności; AUC, pole pod krzywą; *p*, prawdopodobieństwo.

Bardziej agresywne guzy charakteryzowało wyższe stężenie PGJ₂ a niższe stężenie PGF_{1α} i LTB₄, przy czym PGJ₂ i PGF_{1α} cechowała większa swoistość (dobra) niż czułość (umiarkowana), zaś LTB₄ – większa czułość (dobra) niż swoistość (słaba) (Tabela XXVI).

Tabela XXVI. Porównanie czułości i swoistości wybranych eikozanoidów jako potencjalnych markerów agresywności raka jelita grubego

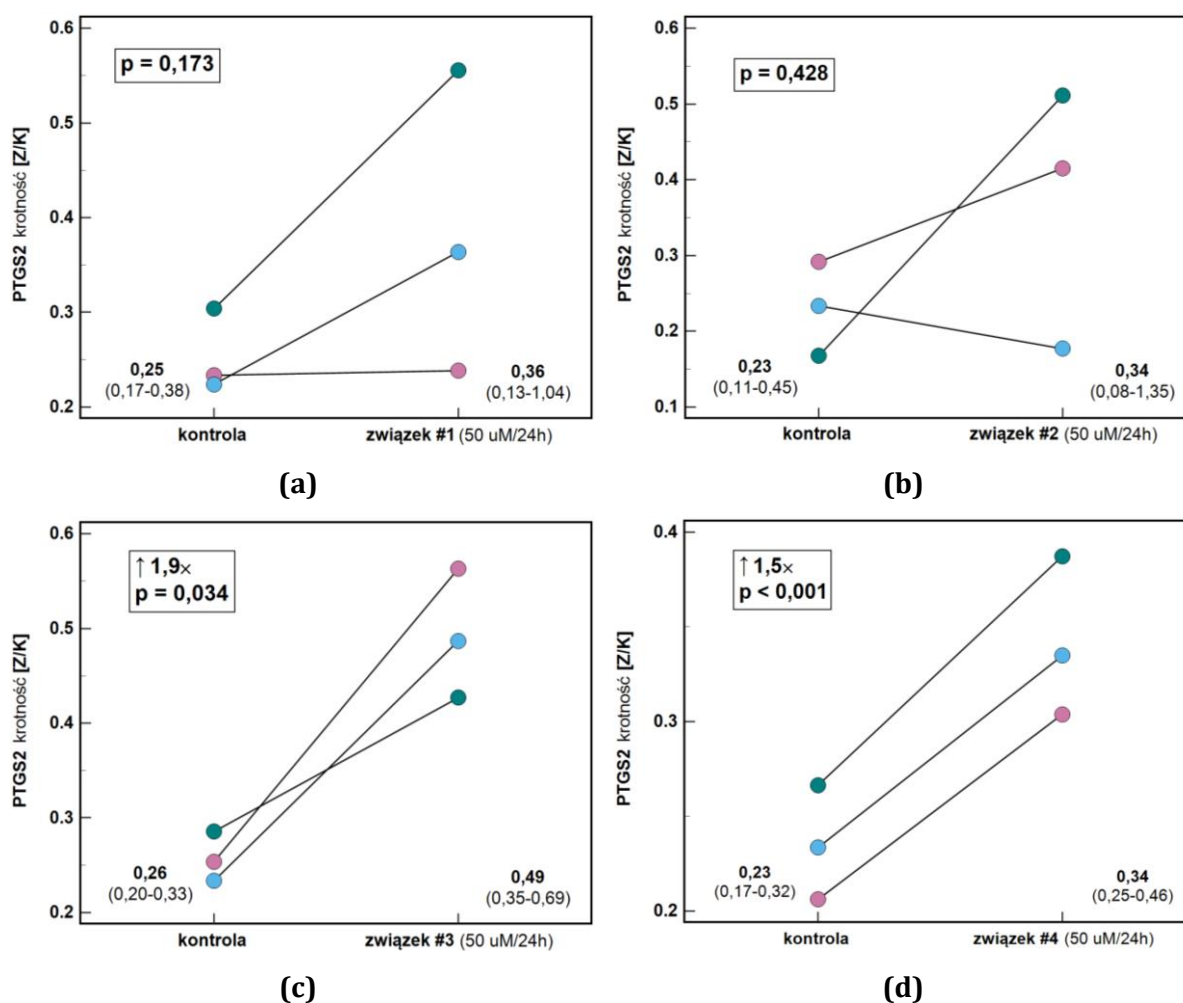
Metabolit	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość	Indeks J
6-keto-PGF _{1α}	≤178,4 pg/ml	63,6%	82,7%	0,463
15-deoxy-12,14-PGJ ₂	>141,9 pg/ml	64,3%	76%	0,403
LTB ₄	≤307,9 pg/ml	81,8%	58,8%	0,406

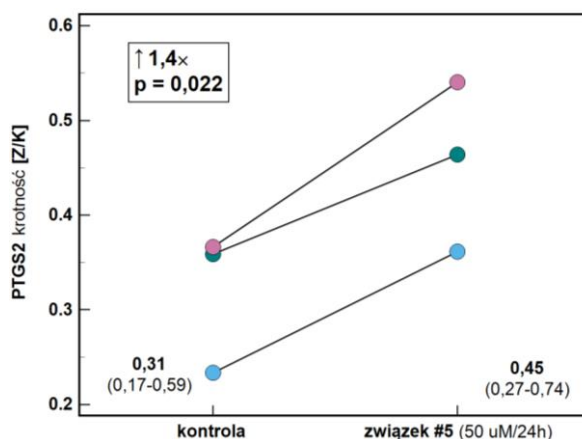
6.2 WPŁYW OKSYKAMÓW I ICH POCHODNYCH NA EKSPRESJĘ BIAŁEK SZLAKU COX2/PGE2 W KOMÓRKACH RAKA JELITA GRUBEGO

6.2.1 EKSPRESJA *PTGS2*/CYKLOOKSYGENAZY (COX)-2

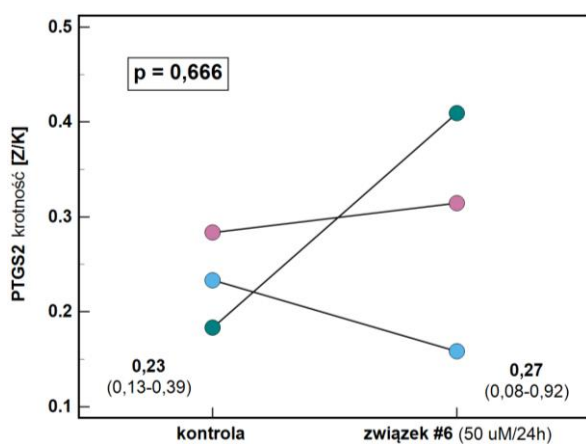
6.2.1.1 HCT 116

Ani piroksykam ani meloksykam nie wpływały na ekspresję *PTGS2* w komórkach linii HCT 116. Spośród testowanych analogów, związki #3 (1,9-krotnie), #4 (1,5-krotnie) i #5 (1,4-krotnie) zwiększały ekspresję *PTGS2* (Wykres 20).

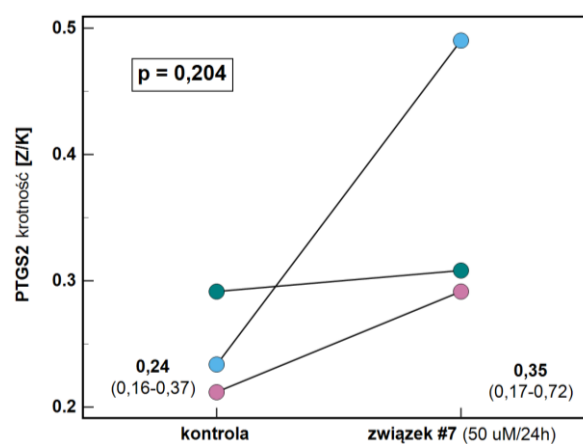




(e)



(f)

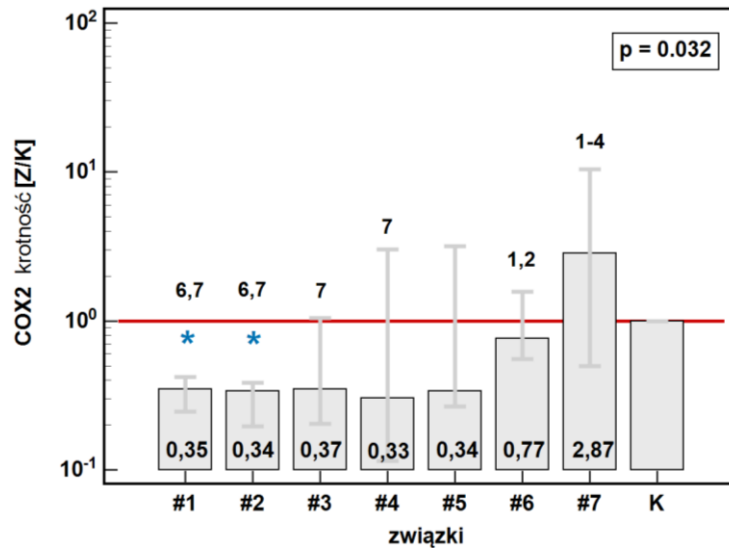


(g)

Wykres 20. Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *PTGS2* w komórkach HCT 116: (a) analog #1; (b) analog #2; (c) analog #3; (d) analog #4; (e) analog #5; (f) pirokсыkam; (g) melokсыkam

Dane przedstawiono jako średnie geometryczne ekspresji komórek stymulowanych związkami (50 μ M przez 24h) wobec niestymulowanych komórek kontrolnych uzyskane z trzech powtórzeń biologicznych. Dane analizowano testem *t*-Studenta dla prób powiązanych i – w przypadku znaczącego ($p < 0.05$) efektu – w ramce podano krotność ekspresji komórek stymulowanych związkami względem kontroli [Z/K].

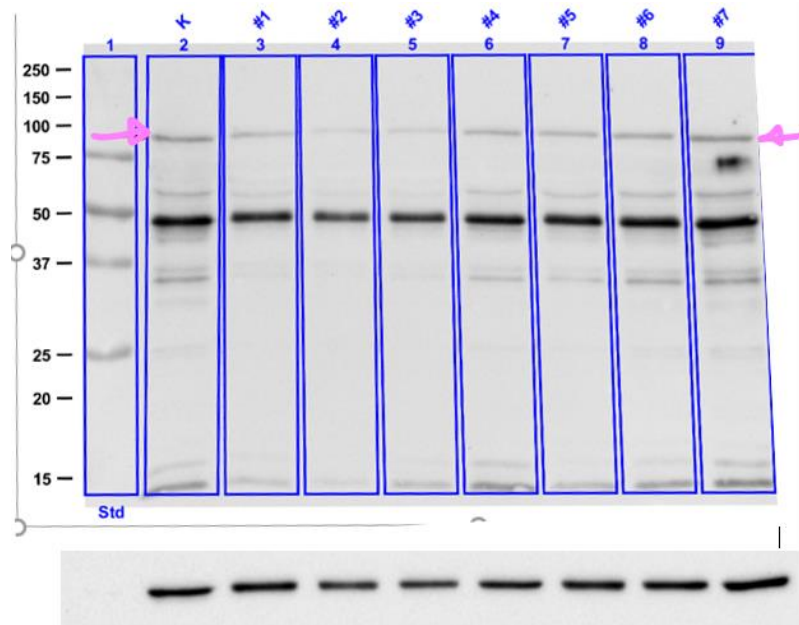
Wyniki uzyskane na poziomie białka – COX2 – wskazują na odwrotny trend, tj. hamujący efekt analogów #1-5, a nieznacznie stymulujący melokсыkam. Jedynie w przypadku związków #1 (2,9-krotny) i #2 (2,9-krotny) spadek syntezy COX2 był istotnie różny względem poziomu syntezy w niestymulowanych komórkach kontrolnych (Wykres 21).



Wykres 21. Wpływ referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka COX2 w komórkach HCT 116

Komórki inkubowano przez 48h z oksykamami i ich pochodnymi (50 μ M) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotność immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa. Gwiazdką wyróżniono związki, których efekt był statystycznie ($p < 0.05$) różny od kontroli. Cyfry nad słupkami wskazują związki, których efekt różni się statystycznie od danego związku. IQR, zakres kwartylowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksykamów; #6, piroksykam; #7, meloksykam; *p*, prawdopodobieństwo.

Na Zdjęciu 1 przedstawiono reprezentatywny blot.

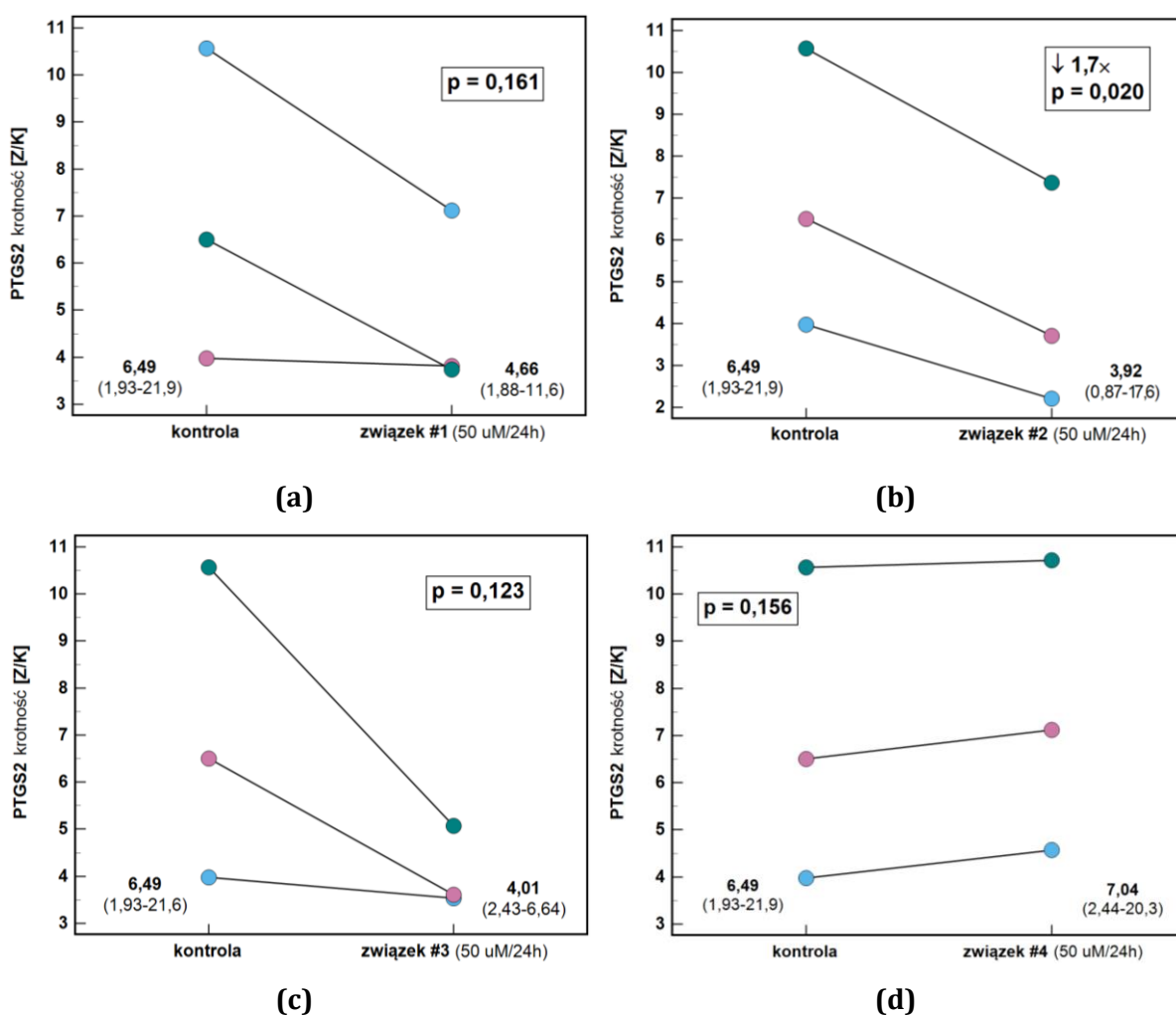


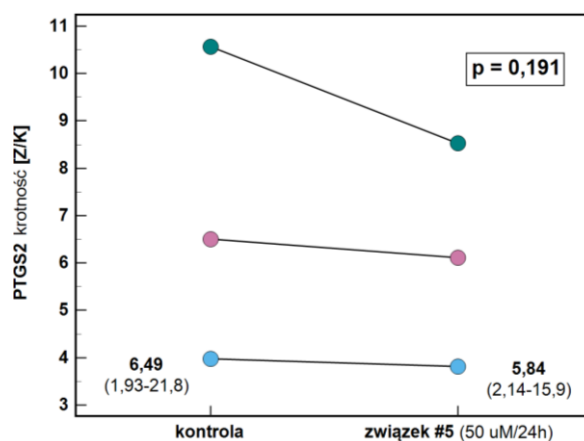
Zdjęcie 1. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka COX2 w komórkach HCT 116

Różową strzałką oznaczono położenie prążka COX2. Poniżej blotu umieszczono referencyjną β -aktynę. Std, standard mas; K, kontrola – komórki niestymulowane.

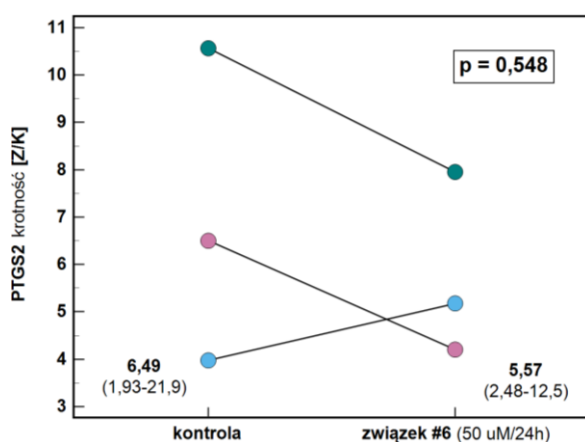
6.2.1.2 Caco-2

Spośród trzech powtórzeń biologicznych, dwa wskazywały na hamujący efekt leków referencyjnych oraz analogów, lecz w przypadku trzeciego z powtórzeń efekt był zbyt słaby (#1, #3 i #5) lub przeciwny (piroksykam i meloksykam). Analog #4 miał lekkie działanie symulujące, lecz bez istotności statystycznej. Jedynie efekt związku #2 konsekwentnie i znamienne wskazywał na redukcję ekspresji *PTGS2* (1,7-krotnie) (Wykres 22).

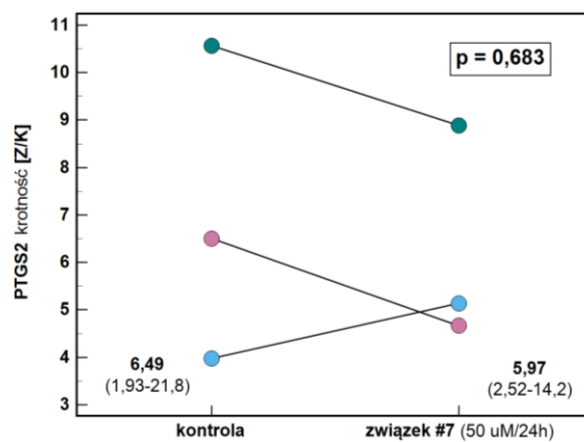




(e)



(f)

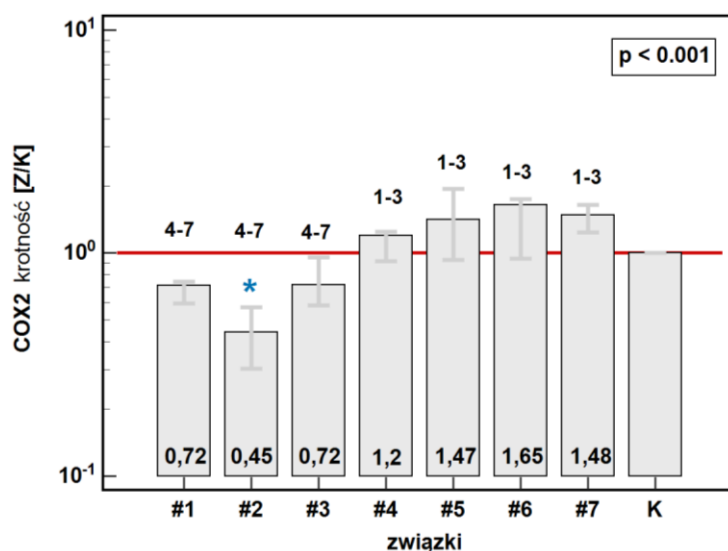


(g)

Wykres 22. Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *PTGS2* w komórkach Caco-2: (a) analog #1; (b) analog #2; (c) analog #3; (d) analog #4; (e) analog #5; (f) piroksykam; (g) meloksykam

Dane przedstawiono jako średnie geometryczne ekspresji komórek stymulowanych związkami (50 μ M przez 24h) wobec niestymulowanych komórek kontrolnych uzyskane z trzech powtórzeń biologicznych. Dane analizowano testem *t*-Studenta dla prób powiązanych i – w przypadku znaczącego ($p < 0.05$) efektu – w ramce podano krotność ekspresji komórek stymulowanych związkami względem kontroli [Z/K].

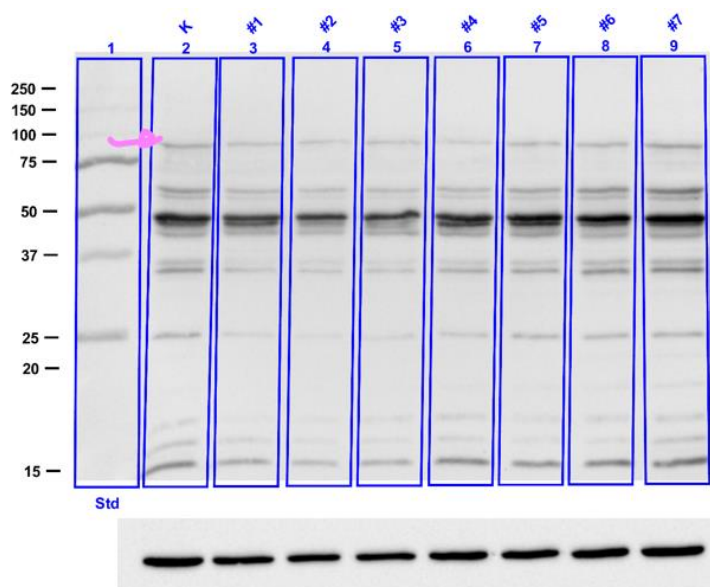
Wyniki ekspresji białka COX2 w komórkach Caco-2 wskazują na znamieny przeciwny efekt związków #1-3 oraz #4-5. Związki #1-3 hamują ekspresję enzymu, przy czym związek #2 2,2-krotnie i znamienie. Natomiast analogi #4 i #5, podobnie jak referencyjne oksykamy – piroksykam i meloksykam – mają efekt stymulujący, lecz nieznamieny (Wykres 23).



Wykres 23. Wpływ referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka COX2 w komórkach Caco-2

Komórki inkubowano przez 48h z oksykamami i ich pochodnymi (50 μ M) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotność immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa. Gwiazdką wyróżniono związki, których efekt był statystycznie ($p < 0.05$) różny od kontroli. Cyfry nad słupkami wskazują związki, których efekt różni się statystycznie od danego związku. IQR, zakres kwartylowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksykamów; #6, piroksykam; #7, meloksykam; *p*, prawdopodobieństwo.

Na Zdjęciu 2 przedstawiono reprezentatywny blot.



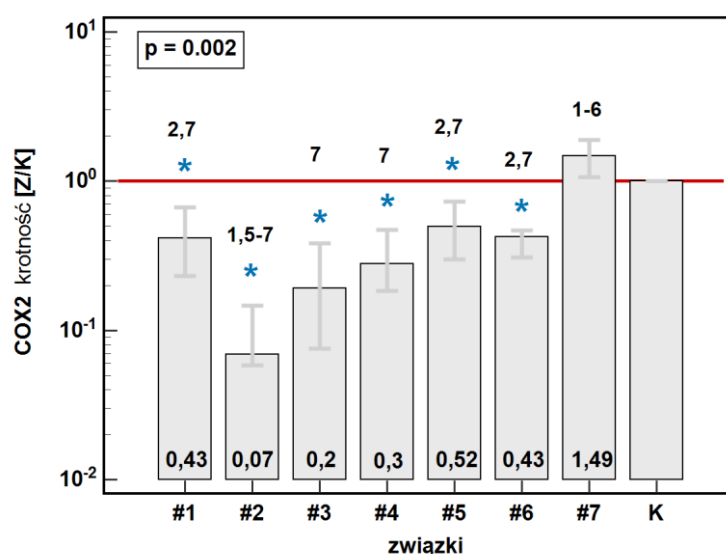
Zdjęcie 2. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka COX2 w komórkach Caco-2

Różową strzałką oznaczono położenie prążka COX2. Poniżej blotu umieszczono referencyjną β -aktynę. Std, standard mas; K, kontrola – komórki niestymulowane.

6.2.1.3 HT-29

W przypadku linii HT-29 przeprowadzono jedynie analizę na poziomie białka.

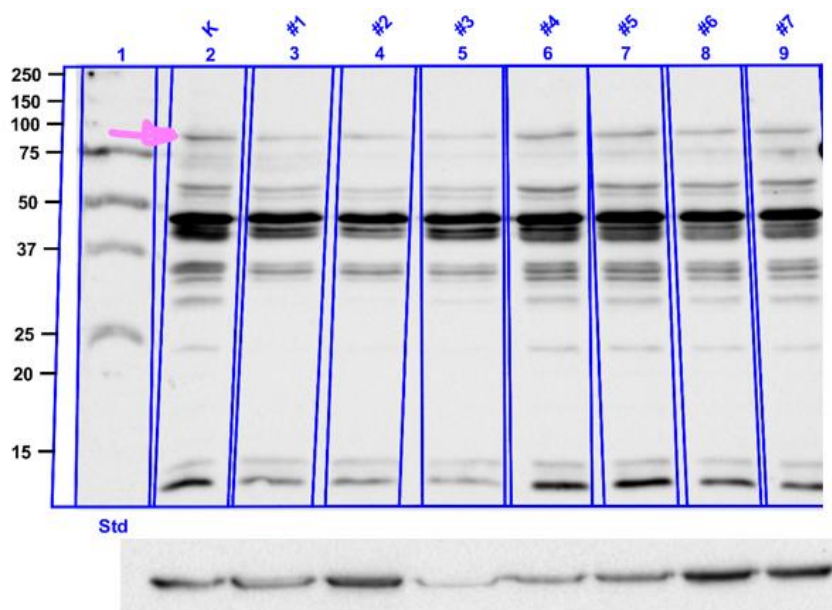
Z wyjątkiem meloksykamu, który działał nieznamiennie stymulująco, pozostałe związki działały znamienne hamująco na ekspresję COX2 w komórkach HT-29. Piroksykam i analog #1 redukowały ekspresję enzymu 2,3-krotnie, związek #5 – 1,9-krotnie, a #3 i #4, odpowiednio, 5-krotnie i 3,3-krotnie. Najsilniejszym inhibitorem okazał się związek #2, który zmniejszał syntezę COX2 aż 14,3-krotnie (Wykres 24).



Wykres 24. Wpływ referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka COX2 w komórkach HT-29

Komórki inkubowano przez 48h z oksykamami i ich pochodnymi (50 μ M) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotność immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa. Gwiazdką wyróżniono związki, których efekt był znamienne ($p < 0.05$) różny od kontroli. Cyfry nad słupkami wskazują związki, których efekt różni się znamienne od danego związku. IQR, zakres kwartyłowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksykamów; #6, piroksykam; #7, meloksykam; *p*, prawdopodobieństwo.

Na Zdjęciu 3 przedstawiono reprezentatywny blot.



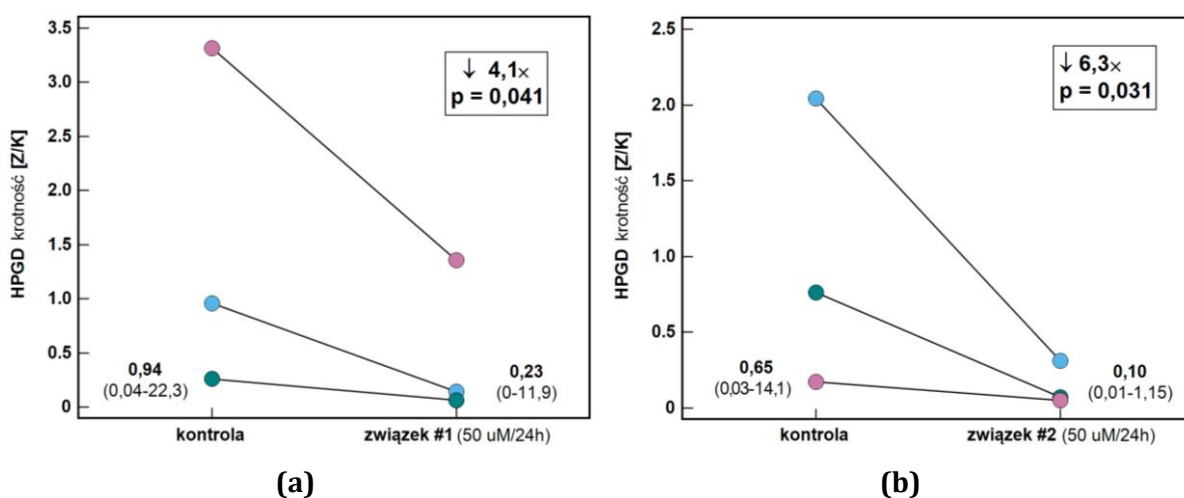
Zdjęcie 3. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka COX2 w komórkach HT-29

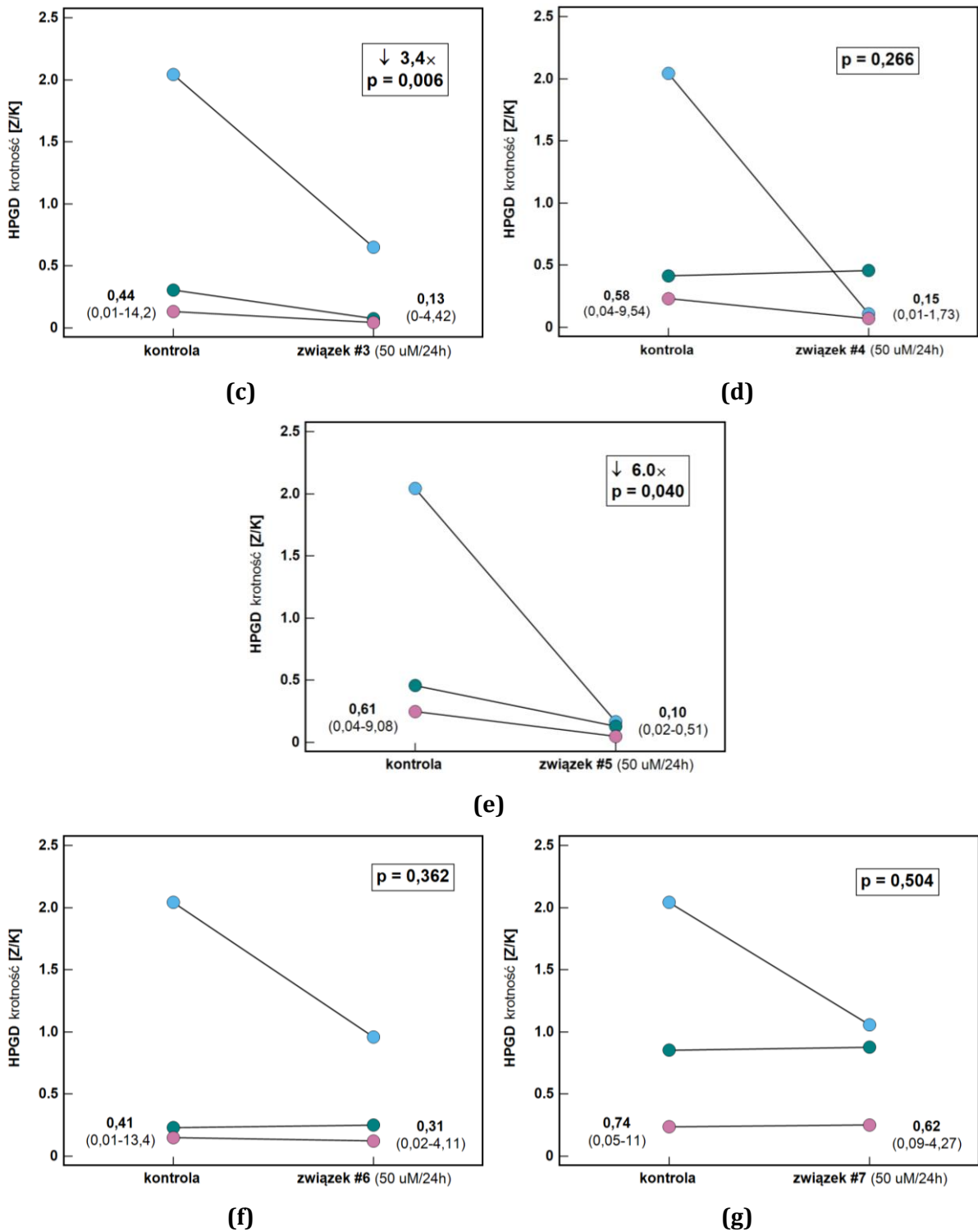
Różową strzałką oznaczono położenie prążka COX2. Poniżej blotu umieszczono referencyjną β -aktynę. Std, standard mas; K, kontrola – komórki niestymulowane.

6.2.2 EKSPRESJA *HPGD*/ DEHYDROGENAZA 15-HYDROKSYPROSTAGLANDYNY (*HPGD*)

6.2.2.1 *HCT 116*

Związki #1-3 oraz #5 znamienne, #4 nieznamienne, redukowały ekspresję *HPGD* w komórkach *HCT 116*, zaś piroksykam i meloksykam nie miały znamionnego efektu (Wykres 25).

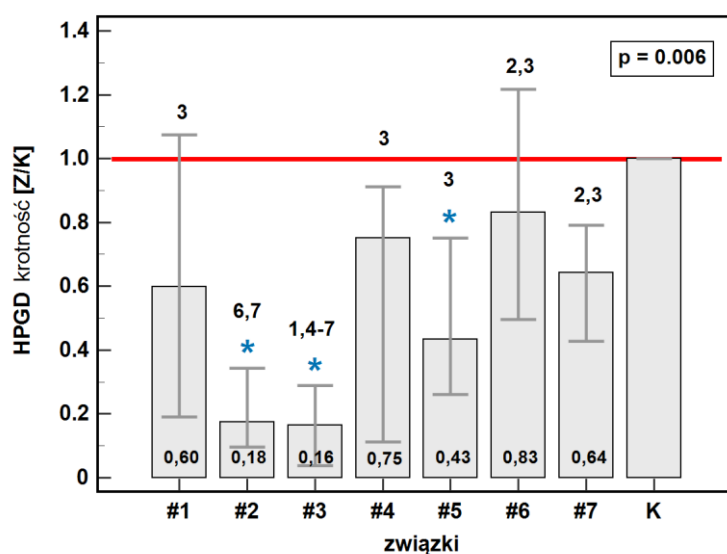




Wykres 25. Wpływ oksyamów i ich analogów na ekspresję *HPGD* w komórkach HCT 116: (a) analog #1; (b) analog #2; (c) analog #3; (d) analog #4; (e) analog #5; (f) piroksydam; (g) meloksydam

Dane przedstawiono jako średnie geometryczne ekspresji komórek stymulowanych związkami (50 μ M przez 24h) wobec niestymulowanych komórek kontrolnych uzyskane z trzech powtórzeń biologicznych. Dane analizowano testem *t*-Studenta dla prób powiązanych i – w przypadku znaczącego ($p < 0.05$) efektu – w ramce podano krotność ekspresji komórek stymulowanych związkami względem kontroli [Z/K].

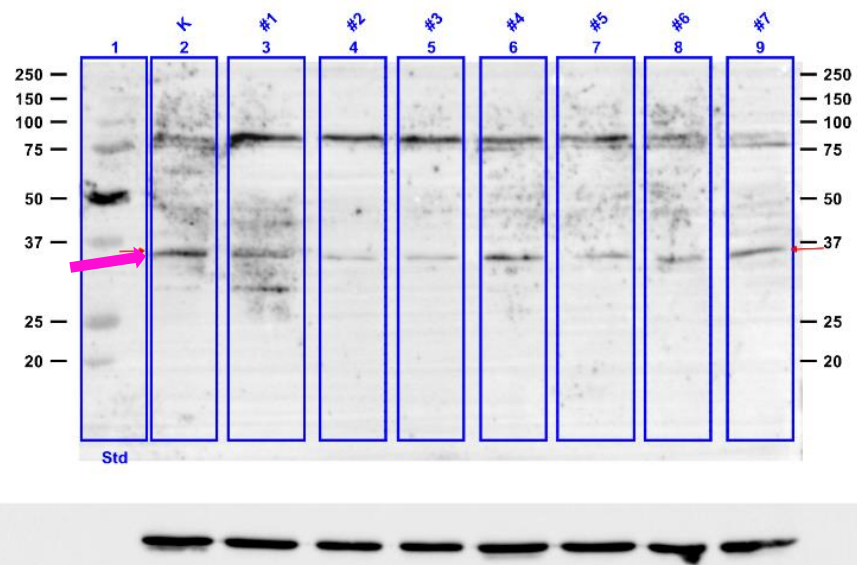
Standardy oksykamów, piroksykam (1,2-krotnie) i meloksykam (1,6-krotnie), nieznamienne obniżały syntezę HPGD w komórkach HCT 116. Nieznamienne hamujący efekt miały również związki #1 (1,7-krotnie) i #4 (1,3-krotnie). Natomiast związki #2, #3 i #5 znamienne hamowały syntezę HPGD, powodując obniżenie poziomu enzymu, odpowiednio, 5,6-, 6,3- i 2,3-krotnie. Hamujący efekt związków #2 i #3 był znamienne większy od obu leków referencyjnych, a związku #3 również od testowanych związków #1, #4 i #5 (Wykres 26).



Wykres 26. Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka HPGD w komórkach HCT 116

Komórki inkubowano przez 48h z oksykamami i ich pochodnymi (50 μ M) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotność immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa. Gwiazdką wyróżniono związki, których efekt był znamienne ($p < 0,05$) różny od kontroli. Cyfry nad słupkami wskazują związki, których efekt różni się znamienne od danego związku. IQR, zakres kwartyłowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksykamów; #6, piroksykam; #7, meloksykam; *p*, prawdopodobieństwo.

Na Zdjęciu 4 przedstawiono reprezentatywny blot.

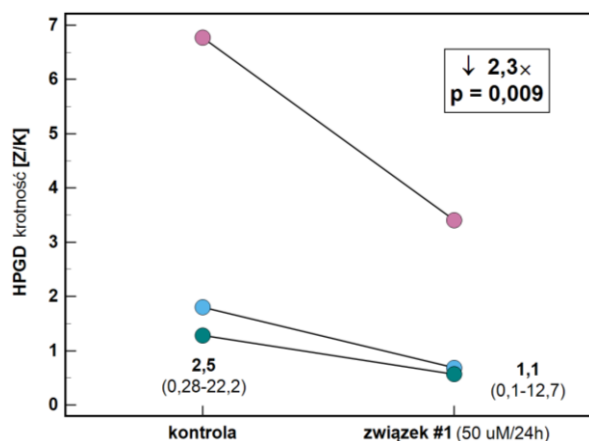


Zdjęcie 4. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka HPGD w komórkach HCT-116

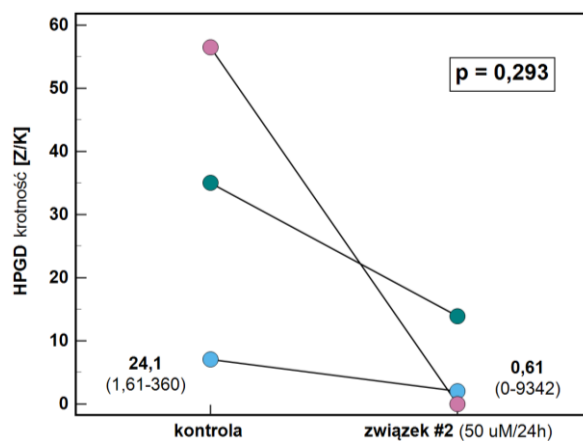
Różową strzałką oznaczono położenie prążka HPGD. Poniżej blotu umieszczono referencyjną β -aktynę. Std, standard mas; K, kontrola – komórki niestymulowane.

6.2.2.2 *Caco-2*

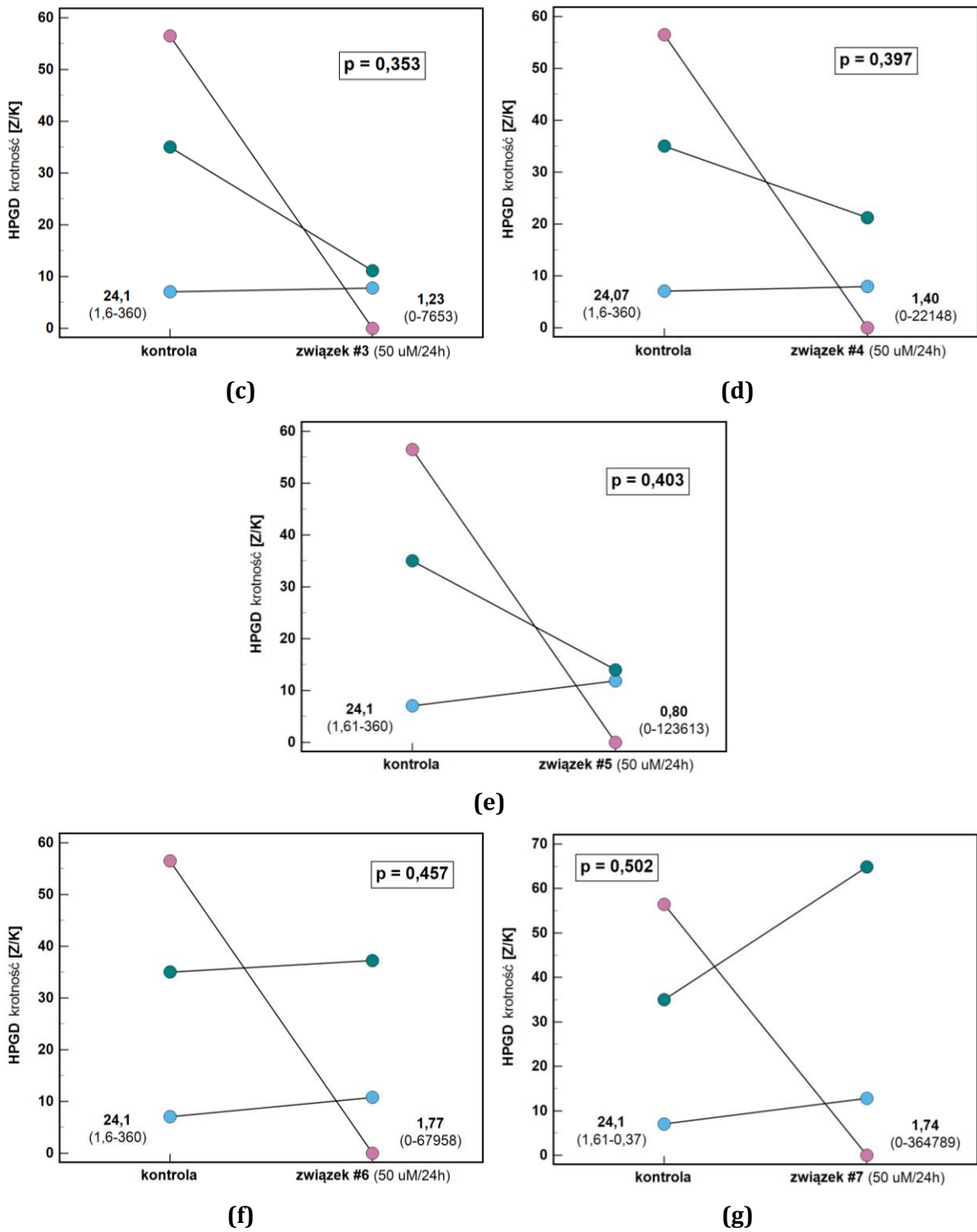
Związki #1 (znamiennie) i #2 (nieznamiennie) hamowały ekspresję *HPGD* w komórkach *Caco-2*. W przypadku pozostałych analogów, jedno z powtórzeń wskazywało na lekko stymulujący efekt, zaś w przypadku referencyjnych oksykamów, dwa powtórzenia wskazywały na stymulację, a jedno na inhibicję (Wykres 27).



(a)



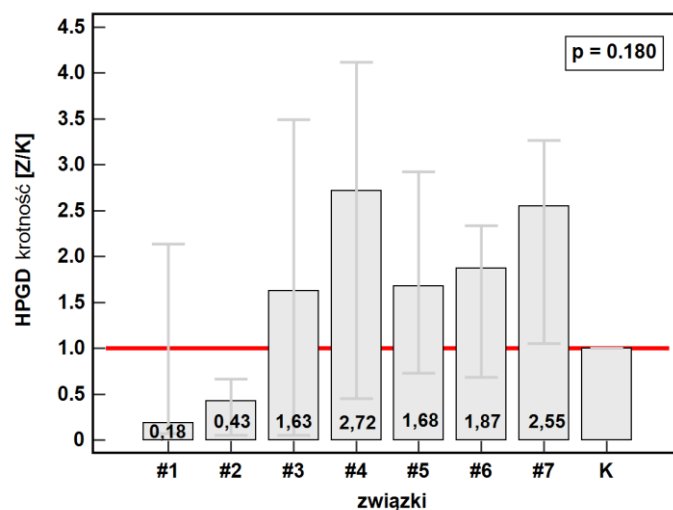
(b)



Wykres 27. Wpływ oksydamów i ich analogów na ekspresję *HPGD* w komórkach Caco-2: (a) analog #1; (b) analog #2; (c) analog #3; (d) analog #4; (e) analog #5; (f) piroksydam; (g) meloksydam

Dane przedstawiono jako średnie geometryczne ekspresji komórek stymulowanych związkami (50 μ M przez 24h) wobec niestymulowanych komórek kontrolnych uzyskane z trzech powtórzeń biologicznych. Dane analizowano testem *t*-Studenta dla prób powiązanych i – w przypadku znaczącego ($p < 0.05$) efektu – w ramce podano krotność ekspresji komórek stymulowanych związkami względem kontroli [Z/K].

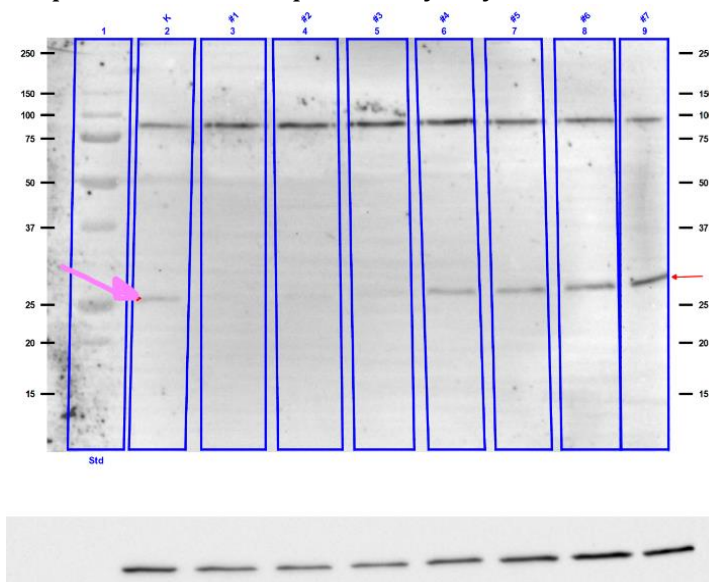
Związki #1 i #2 hamowały, a leki referencyjne oraz związki #3-5 stymulowały ekspresję białka HPGD w komórkach Caco-2. Jednakże, ze względu na duży rozrzut między powtórzeniami, żaden z opisanych efektów nie był znamieny (Wykres 28).



Wykres 28. Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka HPGD w komórkach Caco-2

Komórki inkubowano przez 48h z oksykamami i ich pochodnymi (50 μ M) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotność immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa. IQR, zakres kwartylowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksykamów; #6, piroksykam; #7, meloksykam; *p*, prawdopodobieństwo.

Na Zdjęciu 5 przedstawiono reprezentatywny blot.



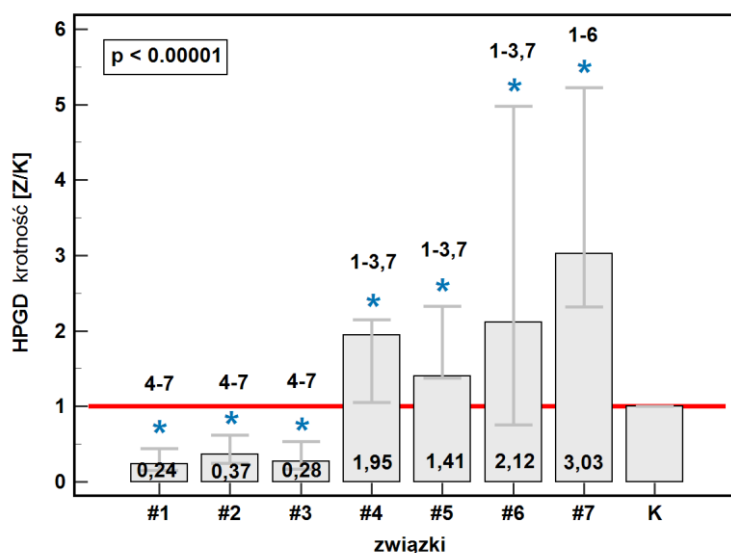
Zdjęcie 5. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka HPGD w komórkach Caco-2

Różową strzałką oznaczono położenie prążka HPGD. Poniżej blotu umieszczono referencyjną β -aktynę. Std, standard mas; K, kontrola – komórki niestymulowane.

6.2.2.1 HT-29

Badane związki miały bardzo różny efekt na syntezę HPGD przez komórki HT-29. Leki referencyjne znamienne zwiększały syntezę enzymu: piroksykam 2,1-krotnie a meloksykam 3-krotnie. Podobny stymulujący efekt na syntezę enzymu, choć słabszy, miały analogi #4 z 2-krotnym wzrostem względem kontroli oraz #5 z 1,4-krotnym wzrostem. Natomiast związki #1-3 znamienne hamowały syntezę HPGD w komórkach HT-29: #1 – 4,2-krotnie, #2 – 2,7-krotnie, a #3 – 3,6-krotnie (Wykres 29).

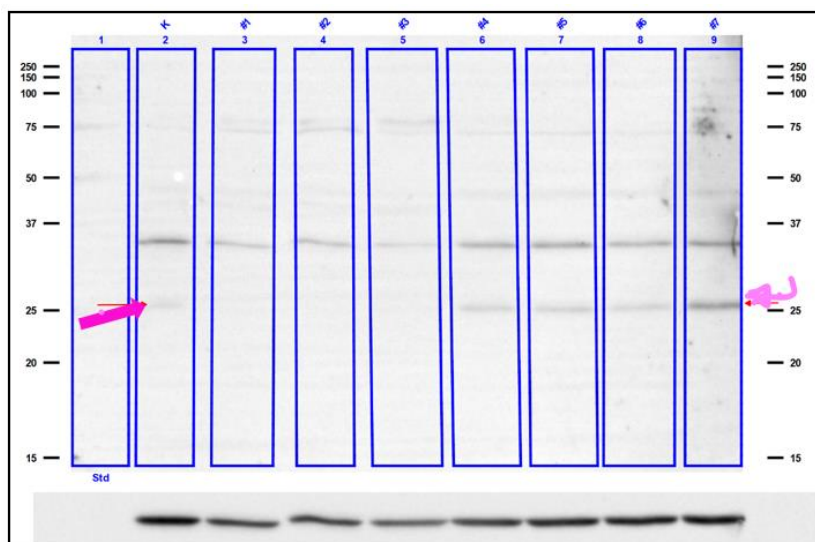
W wyniku przeciwstawnego działania, efekt związków #1-3 był znamienne różny od związków #4 i #5 oraz piroksykamu i meloksykamu. Meloksykam najsilniej stymulował syntezę HPGD, a jego efekt był znamienne większy niż efekt piroksykamu i związków #4 i #5 (Wykres 29).



Wykres 29. Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka HPGD w komórkach HT-29

Komórki inkubowano przez 48h z oksykamami i ich pochodnymi (50 μ M) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotność immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa. Gwiazdką wyróżniono związki, których efekt był znamienne ($p < 0,05$) różny od kontroli. Cyfry nad słupkami wskazują związki, których efekt różni się znamienne od danego związku. IQR, zakres kwartyłowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksykamów; #6, piroksykam; #7, meloksykam; *p*, prawdopodobieństwo.

Na Zdjęciu 6 przedstawiono reprezentatywny blot.



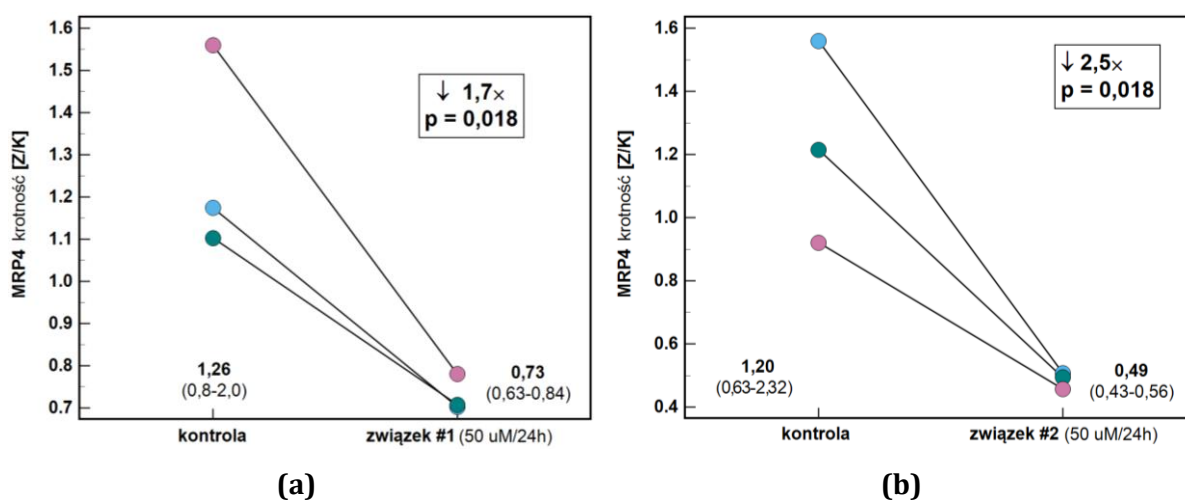
Zdjęcie 6. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka HPGD w komórkach HT-29

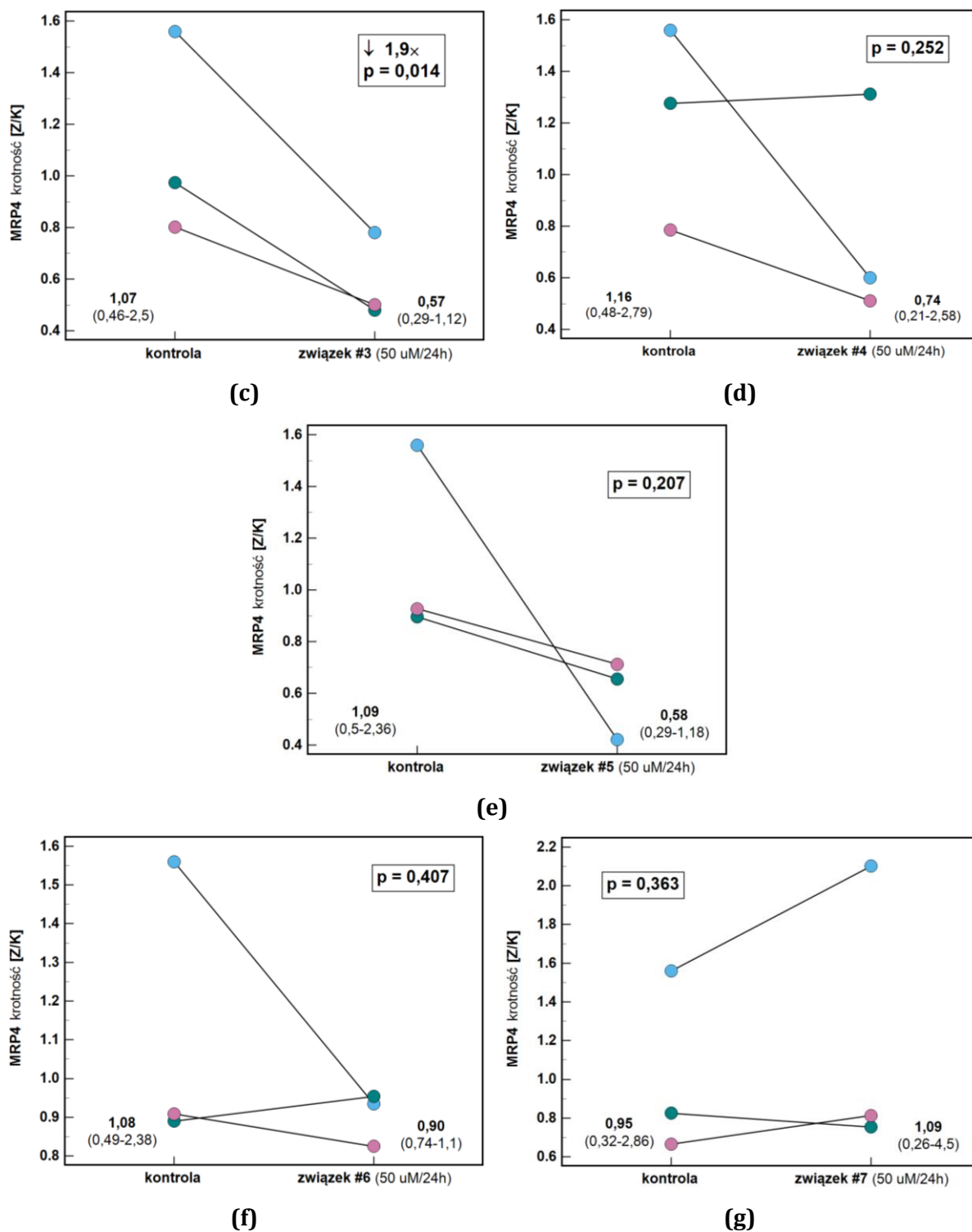
Różową strzałką oznaczono położenie prążka HPGD. Poniżej blotu umieszczono referencyjną β -aktynę. Std, standard mas; K, kontrola – komórki niestymulowane.

6.2.3 Białko 4 oporności wielolekowej (MRP4)

6.2.3.1 HCT 116

Analogi oksykamów #1-3 znamienne redukowały ekspresję *MRP4*, podczas gdy efekt pozostałych związków i oksykamów referencyjnych był statystycznie nieistotny (Wykres 30).

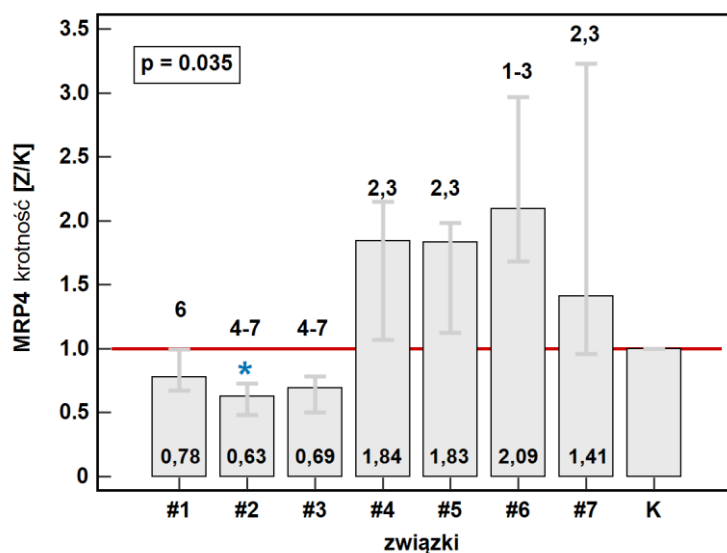




Wykres 30. Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *MRP4* w komórkach HCT 116: (a) analog #1; (b) analog #2; (c) analog #3; (d) analog #4; (e) analog #5; (f) piroksykam; (g) meloksykam

Dane przedstawiono jako średnie geometryczne ekspresje komórek stymulowanych związkami (50 μ M przez 24h) wobec niestymulowanych komórek kontrolnych uzyskane z trzech powtórzeń biologicznych. Dane analizowano testem *t*-Studenta dla prób powiązanych i – w przypadku znaczącego ($p < 0,05$) efektu – w ramce podano krotność ekspresji komórek stymulowanych związkami względem kontroli [Z/K].

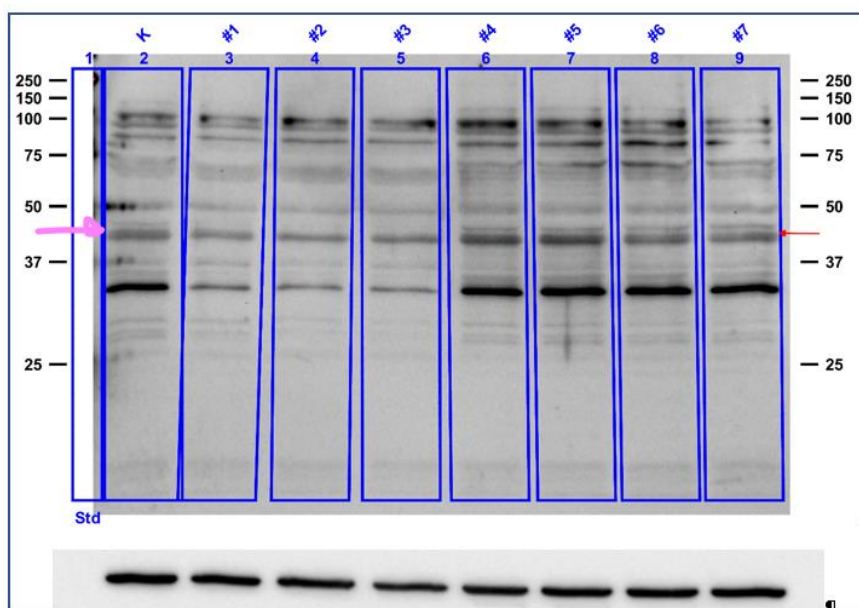
Piroksykam i meloksykam oraz analogi #4 i #5 nie miały istotnego statystycznie wpływu na syntezę transportera MRP4, choć ze swoim efektem stymulującym różniły się znamienne od analogów #1-3 o efekcie hamującym. Jedynie stymulacja komórek analogiem #2 znamienne redukowała syntezę MRP4 w porównaniu do komórek kontrolnych (Wykres 31).



Wykres 31. Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka MRP4 w komórkach HCT-116

Komórki inkubowano przez 48h z oksykamami i ich pochodnymi (50 μ M) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotkość immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa. Gwiazdką wyróżniono związki, których efekt był znamienne ($p < 0.05$) różny od kontroli. Cyfry nad słupkami wskazują związki, których efekt różni się znamienne od danego związku. IQR, zakres kwartyłowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksykamów; #6, piroksykam; #7, meloksykam; *p*, prawdopodobieństwo.

Na Zdjęciu 7 przedstawiono reprezentacyjny blot.

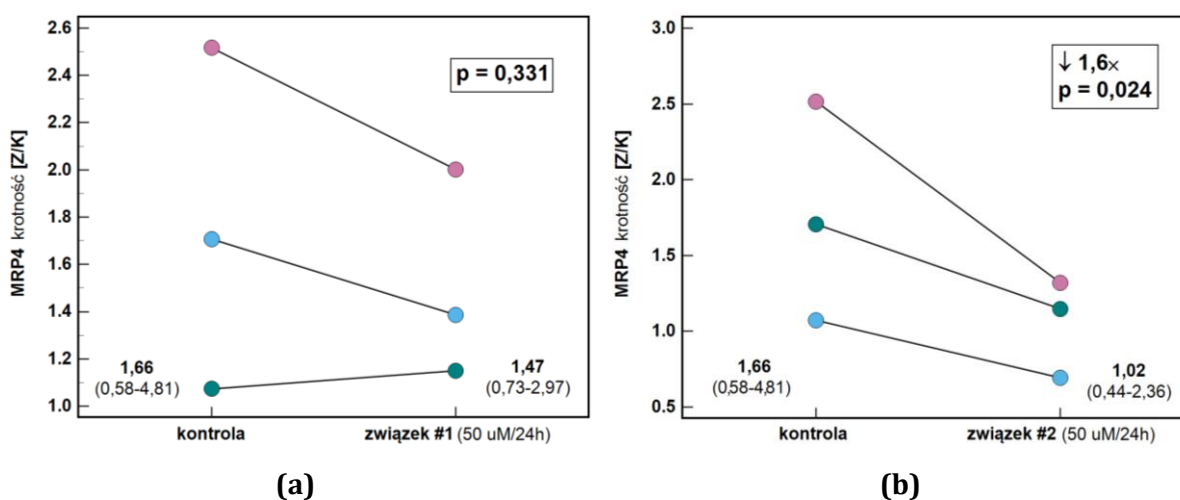


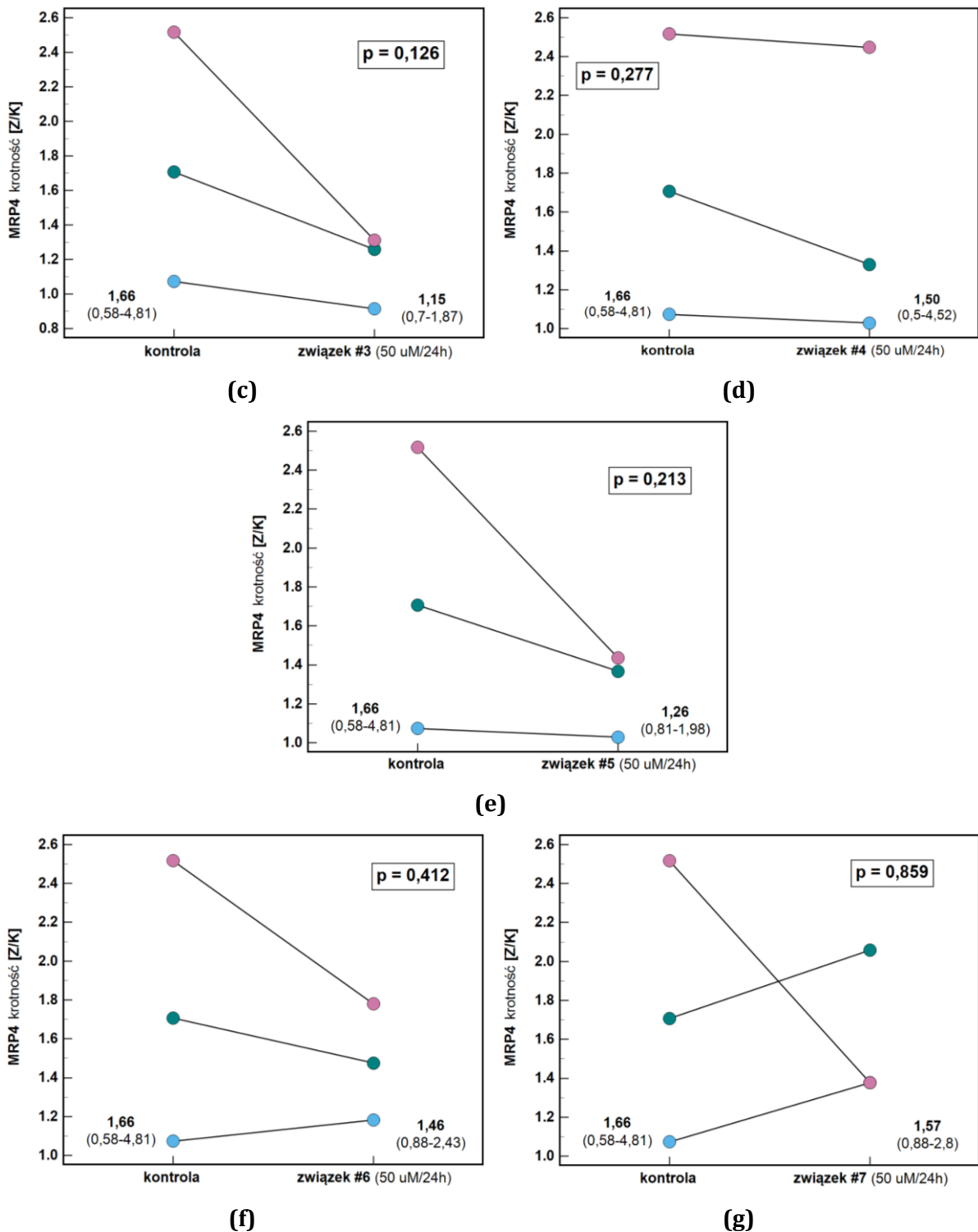
Zdjęcie 7. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka MRP4 w komórkach HCT-116

Różową strzałką oznaczono położenie prążka MRP4. Poniżej blotu umieszczono referencyjną β -aktynę. Std, standard mas; K, kontrola – komórki niestymulowane.

6.2.3.2 Caco-2

Testowane analogi miały nieznamiennie hamujący wpływ na ekspresję MRP4 w komórkach Caco-2, z wyjątkiem związku #2, którego efekt – 1,6-krotna redukcja ekspresji – był istotny statystycznie (Wykres 32).

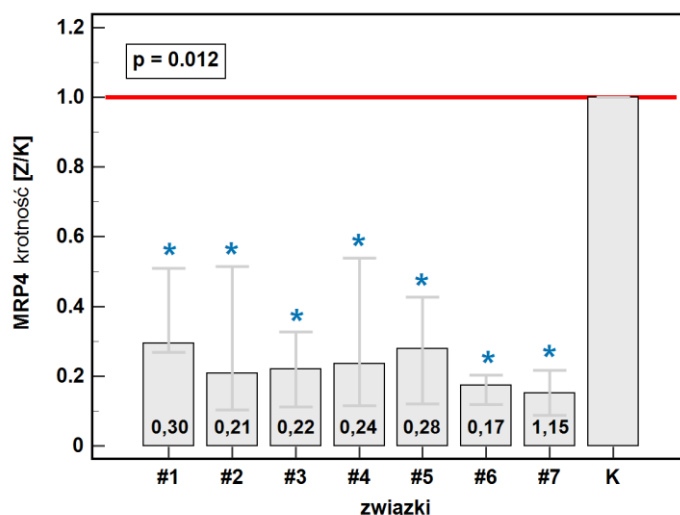




Wykres 32. Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *MRP4* w komórkach Caco-2: (a) analog #1; (b) analog #2; (c) analog #3; (d) analog #4; (e) analog #5; (f) piroksykam; (g) meloksykam

Dane przedstawiono jako średnie geometryczne ekspresji komórek stymulowanych związkami (50 μM przez 24h) wobec niestymulowanych komórek kontrolnych uzyskane z trzech powtórzeń biologicznych. Dane analizowano testem *t*-Studenta dla prób powiązanych i – w przypadku znaczącego ($p < 0.05$) efektu – w ramce podano krotność ekspresji komórek stymulowanych związkami względem kontroli [Z/K].

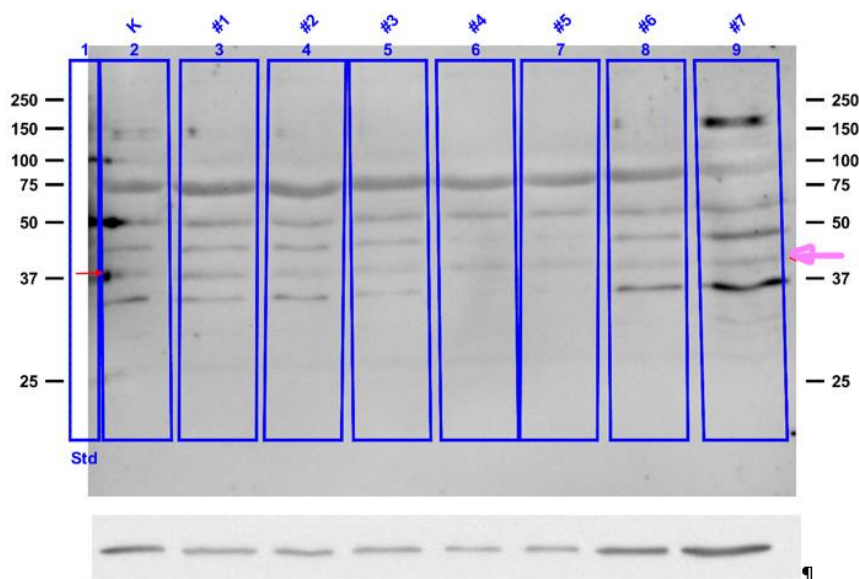
Na poziomie białka, zarówno referencyjne oksykamony – piroksydam (5,9-krotnie) i meloksydam (6,7-krotnie), jak i analogi #1 (3,3-krotnie), #2 (4,8-krotnie), #3 (4,5-krotnie), #4 (4,2-krotnie) i #5 (3,6-krotnie) znacząco redukowały ekspresję MRP4 w komórkach Caco-2 (Wykres 33).



Wykres 33. Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka MRP4 w komórkach Caco-2

Komórki inkubowano przez 48h z oksykamami i ich pochodnymi (50 μ M) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotność immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa. Gwiazdką wyróżniono związki, których efekt był znacząco ($p < 0.05$) różny od kontroli. IQR, zakres kwartylowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksykamów; #6, piroksydam; #7, meloksydam; *p*, prawdopodobieństwo.

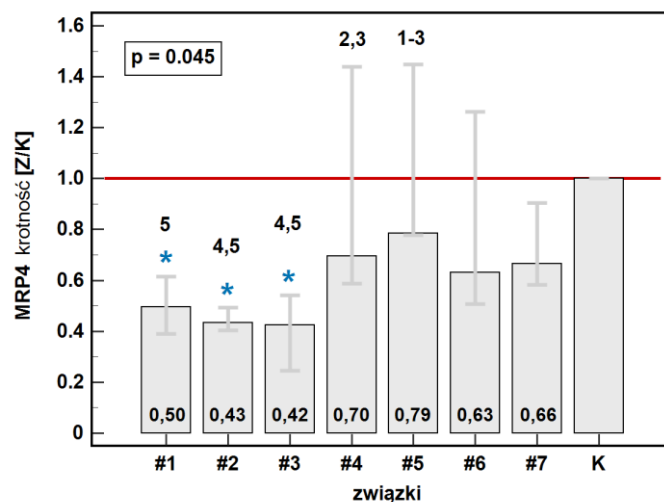
Na Zdjęciu 8 przedstawiono reprezentatywny blot.



Zdjęcie 8. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka MRP4 w komórkach Caco-2

6.2.3.3 HT29

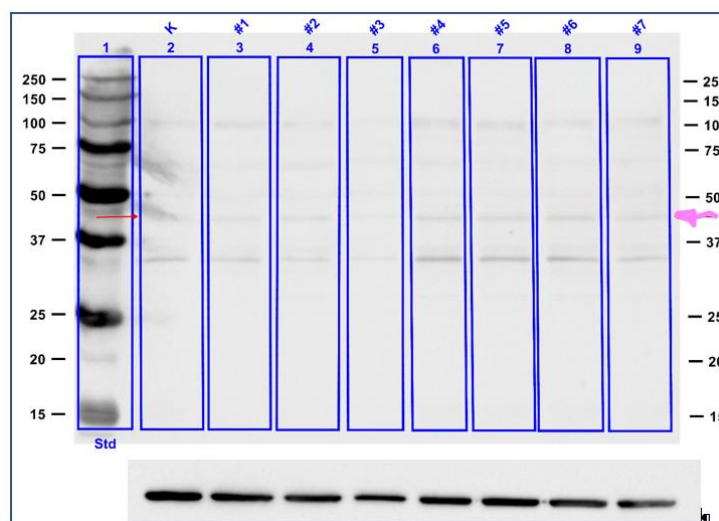
Wszystkie badane związki wykazywały efekt hamujący na syntezę MRP4 w komórkach HT-29, jednak jedynie w przypadku redukcji ekspresji przez analogi #1 (2-krotnej), #2 (2,3-krotnej) i #3 (2,4-krotnej), efekt był statystycznie istotny (Wykres 34).



Wykres 34. Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka MRP4 w komórkach HT-29

Komórki inkubowano przez 48h z oksykamami i ich pochodnymi (50 μ M) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotność immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa. Gwiazdką wyróżniono związki, których efekt był znamienne ($p < 0.05$) różny od kontroli. Cyfry nad słupkami wskazują związki, których efekt różni się znamienne od danego związku. IQR, zakres kwartylowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksykamów; #6, piroksykam; #7, meloksykam; *p*, prawdopodobieństwo.

Na Zdjęciu 9 przedstawiono reprezentatywny blot.



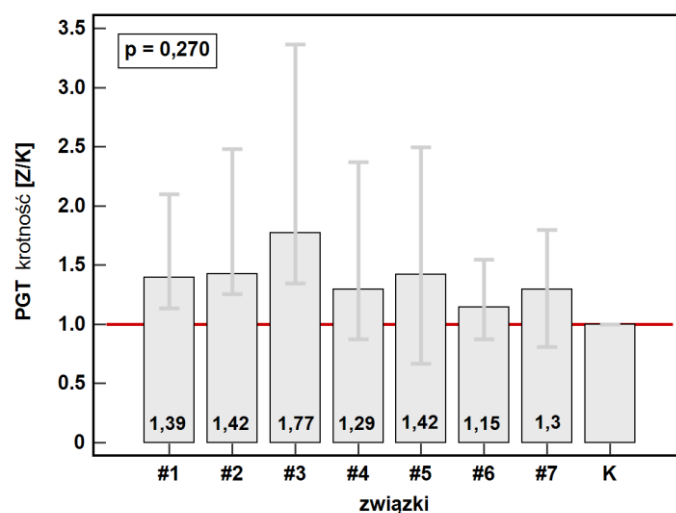
Zdjęcie 9. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka MRP4 w komórkach HT-29

6.2.4 PGT (*SLCO2A1*)/ transporter prostaglandyn PGT (*OATP2A1*)

Ze względu na bardzo niskie sygnały w reakcji qPCR, ekspresja PGT została oceniona wyłącznie na poziomie białka.

6.2.4.1 HCT 116

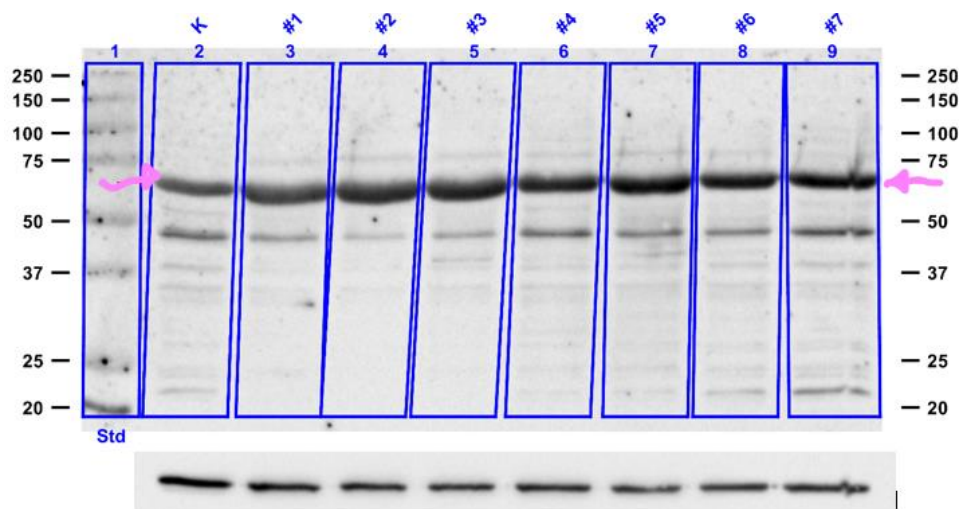
Wszystkie badane związki wywierały lekki, lecz nieznamienisty statystycznie, wpływ stymulujący na ekspresję PGT (Wykres 35).



Wykres 35. Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka PGT w komórkach HCT 116

Komórki inkubowano przez 48h z oksykamami i ich pochodnymi (50 μ M) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotność immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa. IQR, zakres kwartylowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksykamów; #6, piroksykam; #7, meloksykam; *p*, prawdopodobieństwo.

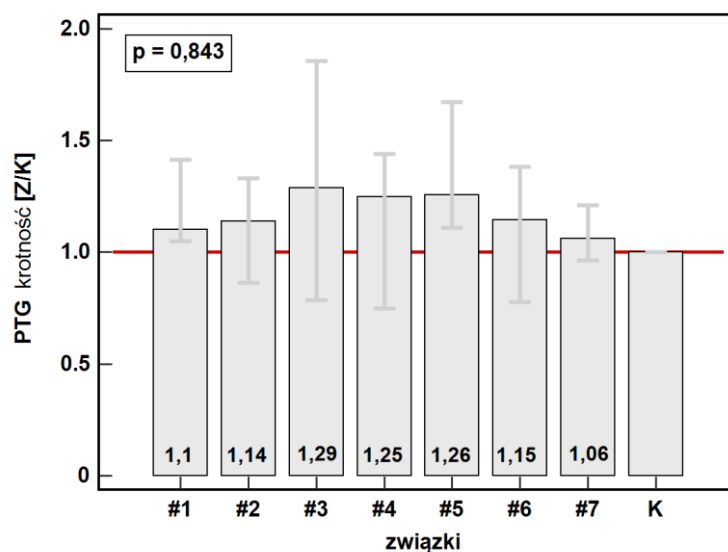
Na Zdjęciu 10 przedstawiono reprezentatywny blot.



Zdjęcie 10. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka PGT w komórkach HCT 116

6.2.4.2 Caco-2

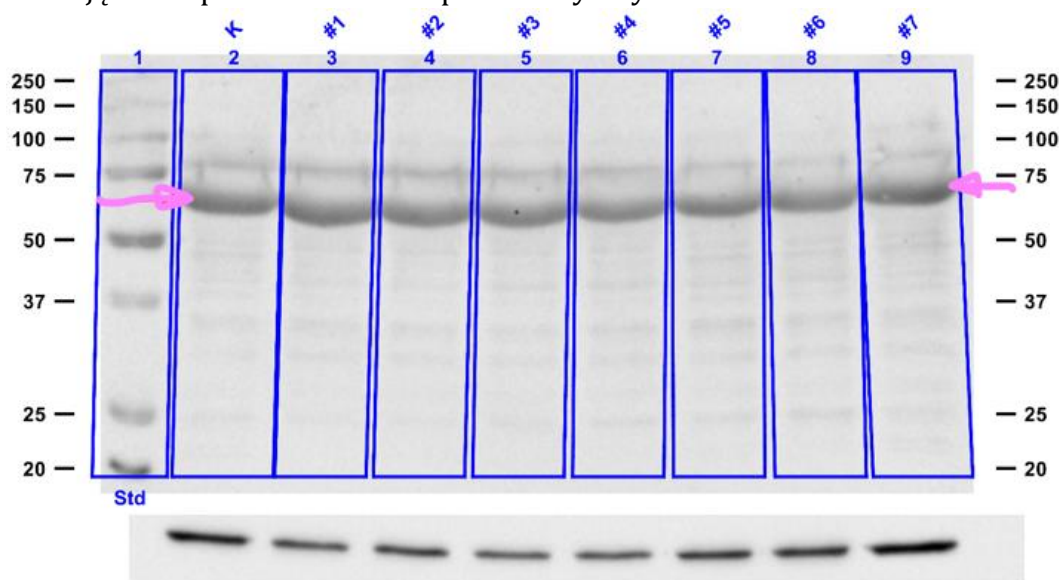
Związki #3-5 wywierały lekki, lecz nieznamienisty statystycznie, wpływ stymulujący na ekspresję PGT (Wykres 36).



Wykres 36. Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka PGT w komórkach Caco-2

Komórki inkubowano przez 48h z oksykamami i ich pochodnymi (50 μ M) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotność immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallis. IQR, zakres kwartylowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksykamów; #6, piroksykam; #7, meloksykam; *p*, prawdopodobieństwo.

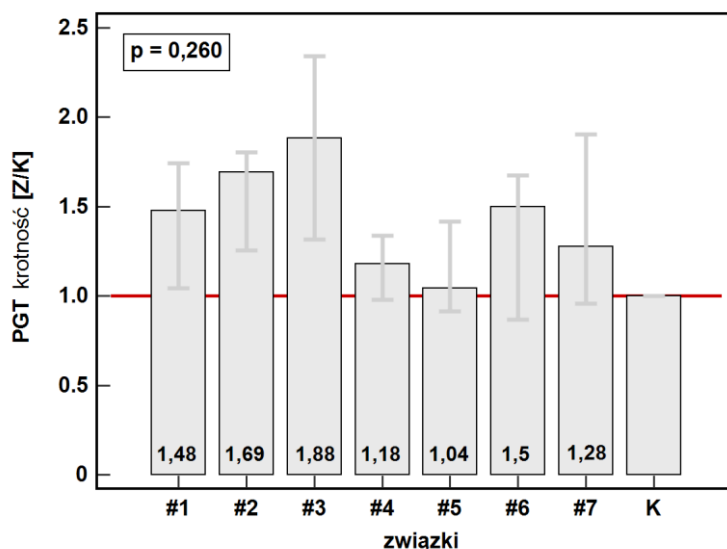
Na Zdjęciu 11 przedstawiono reprezentatywny blot.



Zdjęcie 11. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka PGT w komórkach Caco-2

6.2.4.3 HT-29

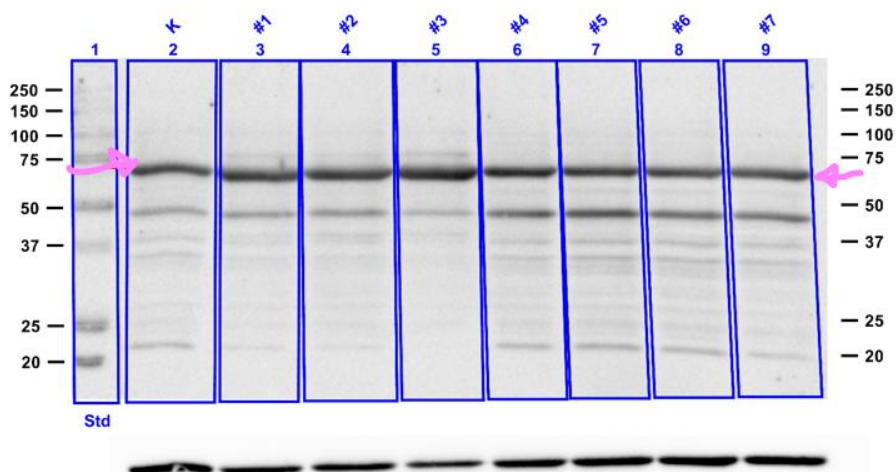
Związki #1-3 oraz peroksykam wywierały wpływ stymulujący na ekspresję PGT w HT-29, jednak, podobnie jak w przypadku poprzednich linii, obserwowany efekt nie był istotny statystycznie (Wykres 37).



Wykres 37. Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka PGT w komórkach HT-29

Komórki inkubowano przez 48h z oksykamami i ich pochodnymi (50 μ M) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotność immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa. IQR, zakres kwartylowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksykamów; #6, piroksykam; #7, meloksykam; *p*, prawdopodobieństwo.

Na Zdjęciu 12 przedstawiono reprezentatywny blot.

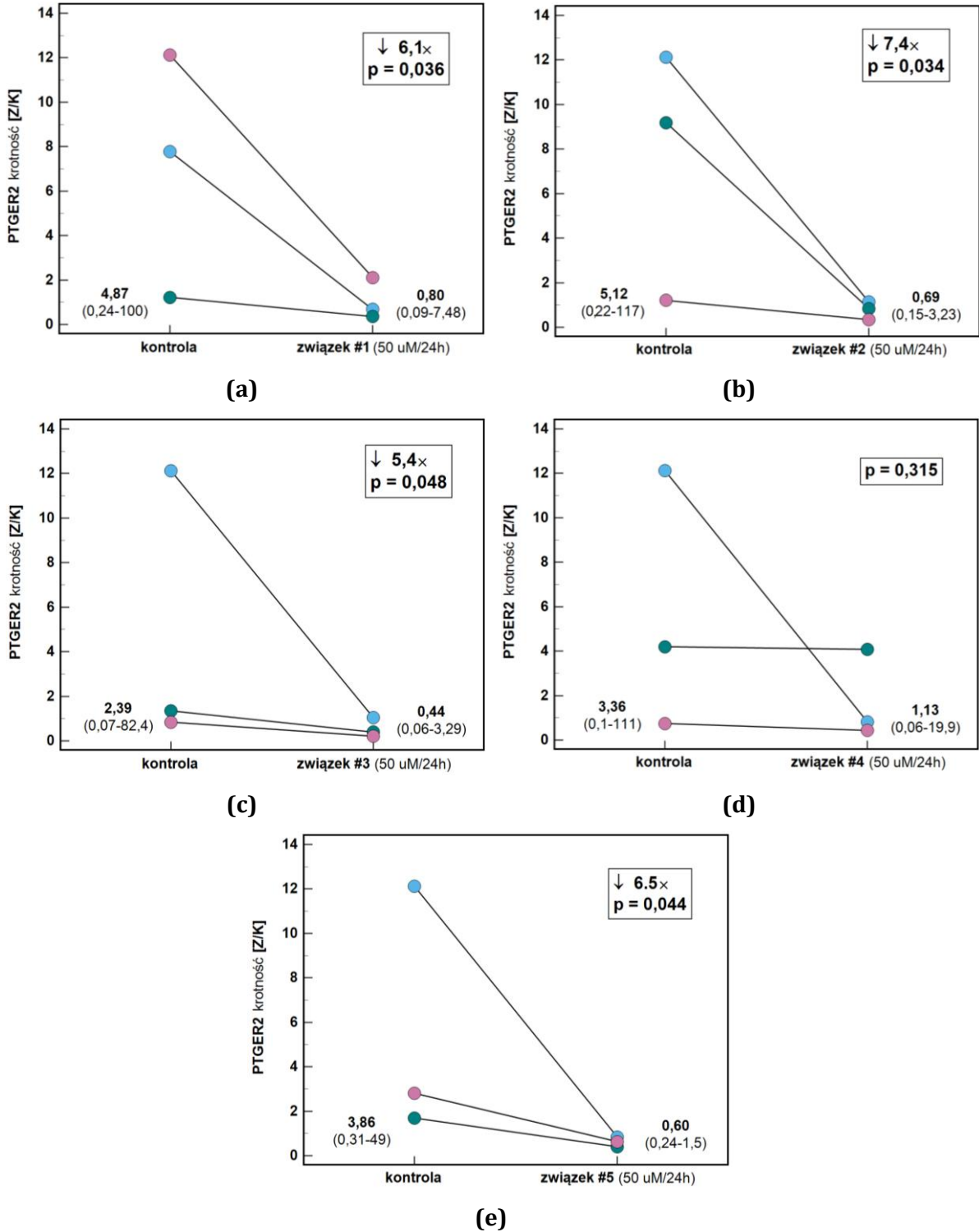


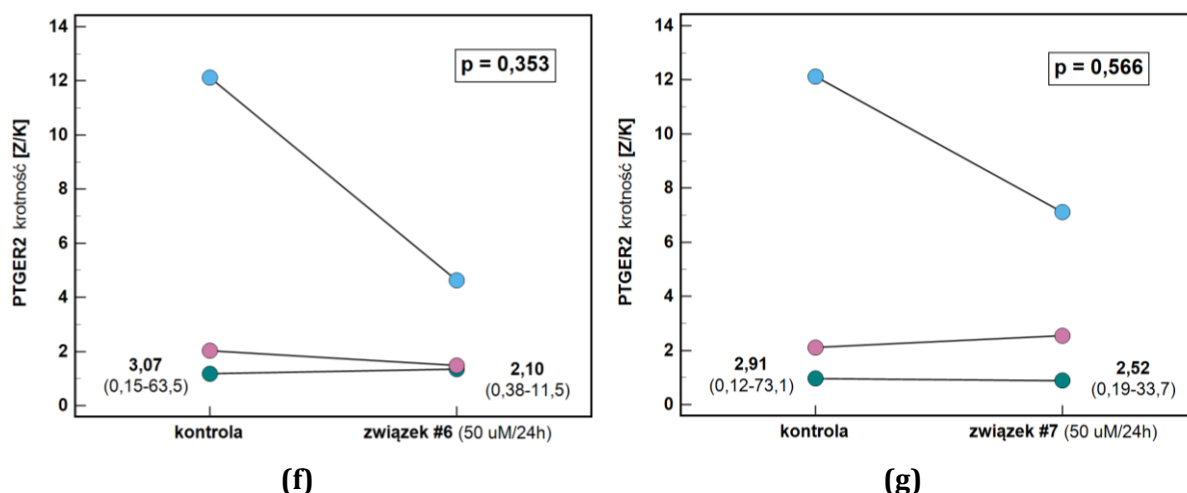
Zdjęcie 12. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka PGT w komórkach HT-29

6.2.5 PTGER2/receptor PGE2 (EP2)

6.2.5.1 HCT 116

Referencyjne oksykamy nie miały znaczącego wpływu na ekspresję PTGER2 w komórkach HCT116, natomiast ich analogi, z wyjątkiem związku #4, znacząco i zmiennie redukowały ekspresję receptora: związek #1 – 6,1-krotnie; związek #2 – 7,4-krotnie; związek #3 – 5,4-krotnie i związek #5 – 6,5-krotnie (Wykres 38).

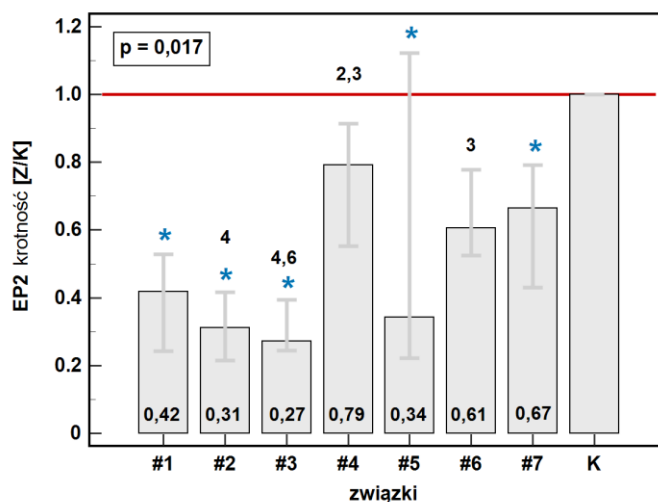




Wykres 38. Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *PTGER2* w komórkach HCT 116: (a) analog #1; (b) analog #2; (c) analog #3; (d) analog #4; (e) analog #5; (f) piroksykam; (g) meloksykam

Dane przedstawiono jako średnie geometryczne ekspresji komórek stymulowanych związkami (50 μM przez 24h) wobec niestymulowanych komórek kontrolnych uzyskane z trzech powtórzeń biologicznych. Dane analizowano testem *t*-Studenta dla prób powiązanych i – w przypadku znaczącego ($p < 0.05$) efektu – w ramce podano krotność ekspresji komórek stymulowanych związkami względem kontroli [Z/K].

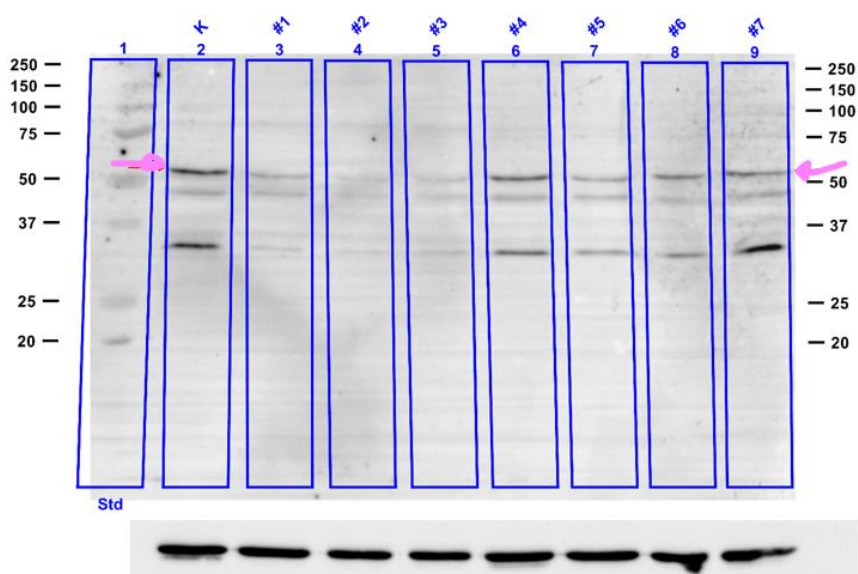
Również na poziomie białka, związki #1 (2,4-krotnie), #2 (3,2-krotnie), #3 (3,7-krotnie) i #5 (2,9-krotnie) oraz meloksykam (1,5-krotnie) znacząco ograniczyły syntezę EP2 w komórkach HCT 116 (Wykres 39).



Wykres 39. Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka EP2 w komórkach HCT 116

Komórki inkubowano przez 48h z oksykamami i ich pochodnymi (50 μM) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotność immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa. Gwiazdką wyróżniono związki, których efekt był znacząco ($p < 0.05$) różny od kontroli. Cyfry nad słupkami wskazują związki, których efekt różni się znacząco od danego związku. IQR, zakres kwartylowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksykamów; #6, piroksykam; #7, meloksykam; *p*, prawdopodobieństwo.

Na Zdjęciu 13 przedstawiono reprezentatywny blot.

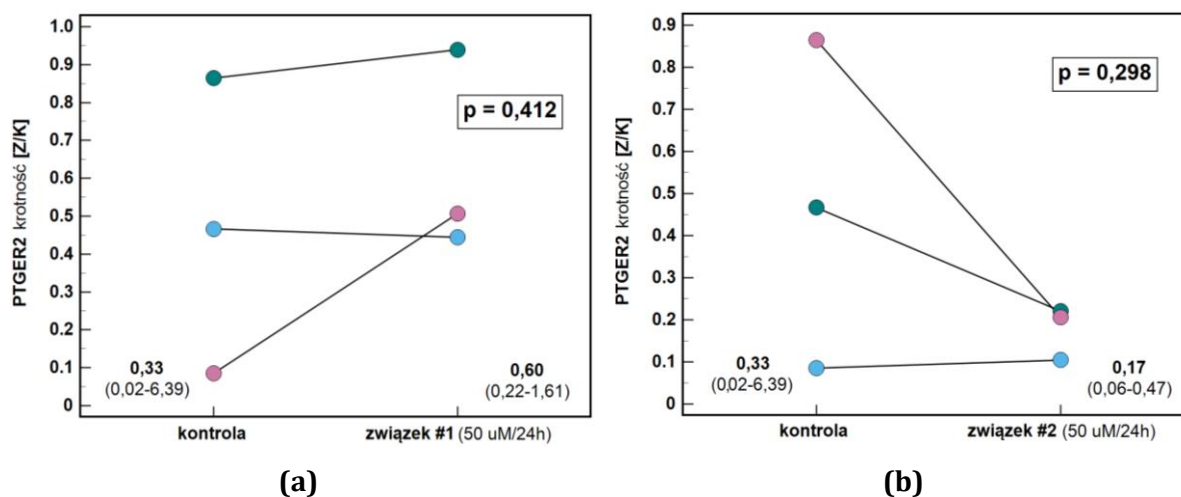


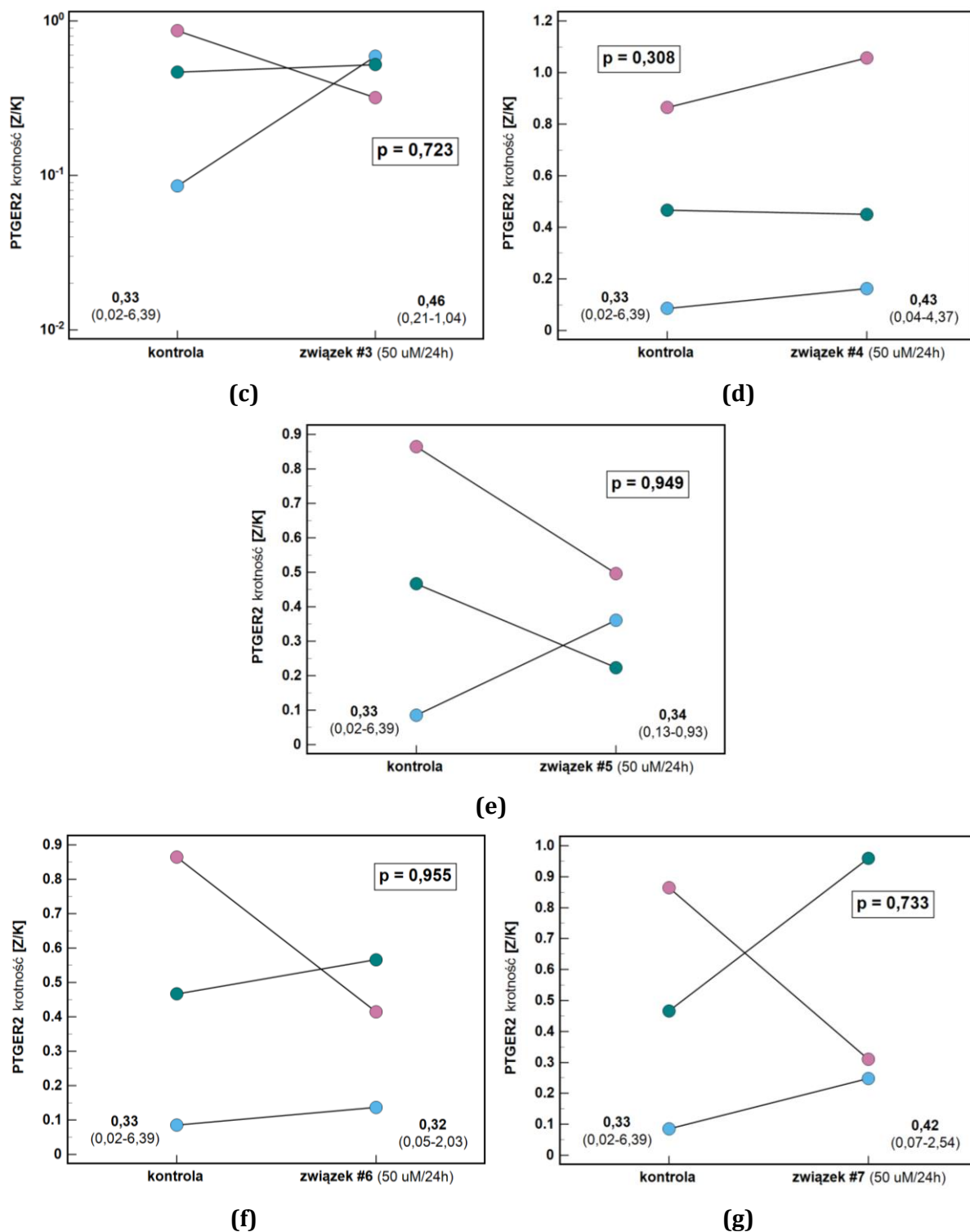
Zdjęcie 13. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka EP2 w komórkach HCT 116

Różową strzałką oznaczono położenie prążka EP2. Poniżej blotu umieszczono referencyjną β -aktynę. Std, standard mas; K, kontrola – komórki niestymulowane.

6.2.5.2 Caco-2

Żaden z analizowanych leków referencyjnych i ich analogów nie miał istotnego statystycznie wpływu na ekspresję *PTGER2* w komórkach Caco-2 (Wykres 40).

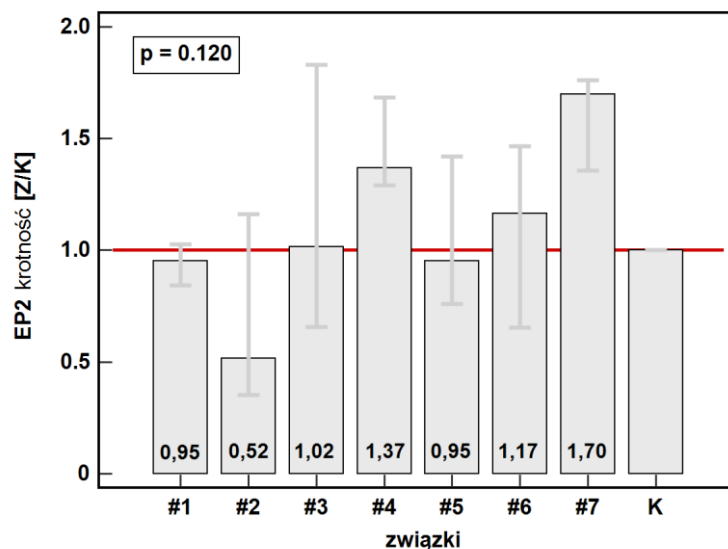




Wykres 40. Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *PTGER2* w komórkach Caco-2: (a) analog #1; (b) analog #2; (c) analog #3; (d) analog #4; (e) analog #5; (f) piroksykam; (g) meloksykam

Dane przedstawiono jako średnie geometryczne ekspresji komórek stymulowanych związkami (50 μM przez 24h) wobec niestymulowanych komórek kontrolnych uzyskane z trzech powtórzeń biologicznych. Dane analizowano testem *t*-Studenta dla prób powiązanych i – w przypadku znaczącego ($p < 0.05$) efektu – w ramce podano krotność ekspresji komórek stymulowanych związkami względem kontroli [Z/K].

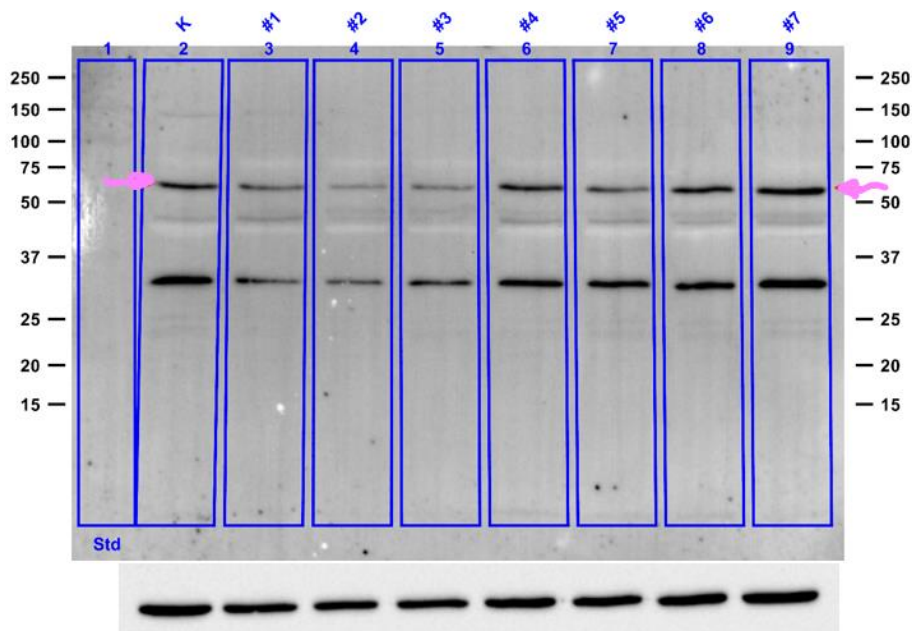
Również na poziomie białka, badane związki nie wpływały istotnie na ekspresję EP2 w komórkach Caco-2 (Wykres 41).



Wykres 41. Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka EP2 w komórkach Caco-2

Komórki inkubowano przez 48h z oksykamami i ich pochodnymi (50 μ M) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotność immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallis. IQR, zakres kwartylowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksykamów; #6, piroksykam; #7, meloksykam; *p*, prawdopodobieństwo.

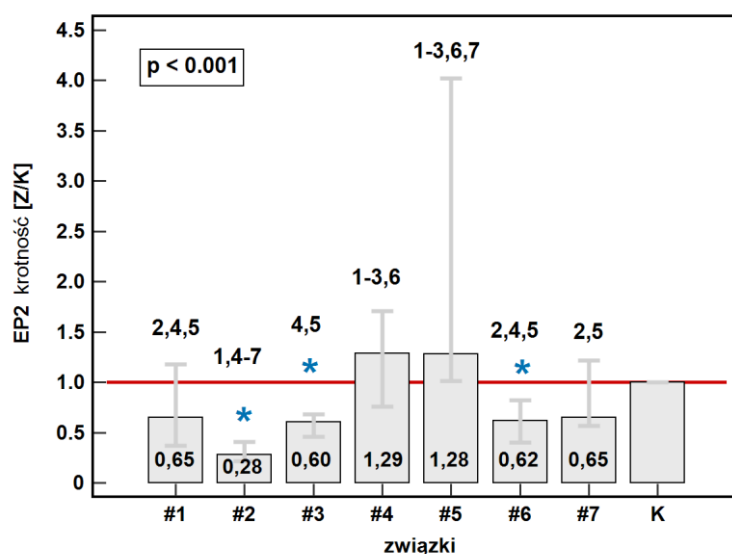
Na Zdjęciu 14 przedstawiono reprezentatywny blot.



Zdjęcie 14. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka EP2 w komórkach Caco-2

6.2.5.3 HT 29

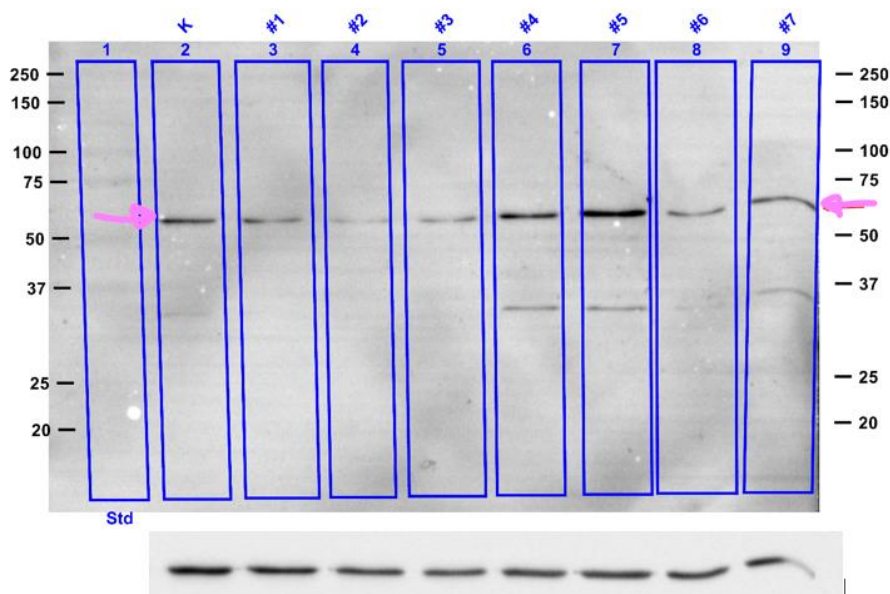
Piroksydam znacząco (1,6-krotnie) a meloksydam nieznacznie (1,5-krotnie) redukowały syntezę EP2 w komórkach HT-29. W podobnym stopniu, odpowiednio nieznacznie 1,5-krotnie i znacząco 1,7-krotnie, ekspresję receptora hamowały analogi #1 i #3. Najsilniej, bo 3,6-krotnie, obniżał ekspresję EP2 analog #2. Lekko stymulujący efekt związków #4 i #5 w porównaniu do komórek niestymulowanych nie był istotny statystycznie (Wykres 42).



Wykres 42. Wpływ oksydamów i ich pochodnych na ekspresję białka EP2 w komórkach HT-29

Komórki inkubowano przez 48h z oksydamami i ich pochodnymi (50 μ M) lub z rozpuszczalnikiem (DMSO) w przypadku kontroli. Dane przedstawiono jako średnia krotność immunoreaktywności w komórkach stymulowanych związkami względem niestymulowanych komórek kontrolnych [Z/K], reprezentowaną przez słupek (z wpisaną wartością liczbową) z IQR (wąsy). Dane analizowano testem *H* Kruskala-Wallisa. Gwiazdką wyróżniono związki, których efekt był znacząco ($p < 0,05$) różny od kontroli. Cyfry nad słupkami wskazują związki, których efekt różni się znacząco od danego związku. IQR, zakres kwartyłowy; K, kontrola; #1-5, testowane analogi oksydamów; #6, piroksydam; #7, meloksydam; *p*, prawdopodobieństwo.

Na Zdjęciu 15 przedstawiono reprezentatywny blot.



Zdjęcie 15. Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka EP2 w komórkach HT-29

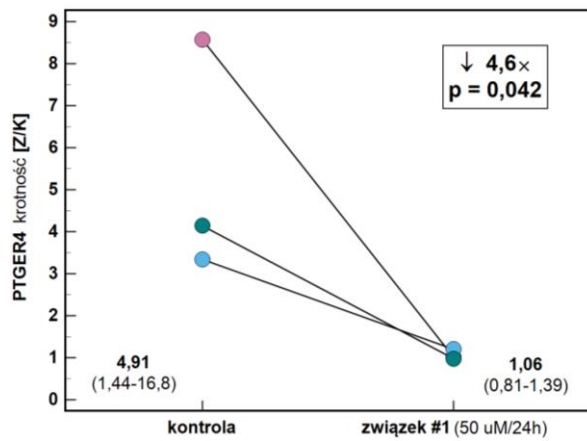
Różową strzałką oznaczono położenie prążka EP2. Poniżej blotu umieszczono referencyjną β -aktynę. Std, standard mas; K, kontrola – komórki niestymulowane.

6.2.6 *PTGER4*/receptor PGE2 (EP4)

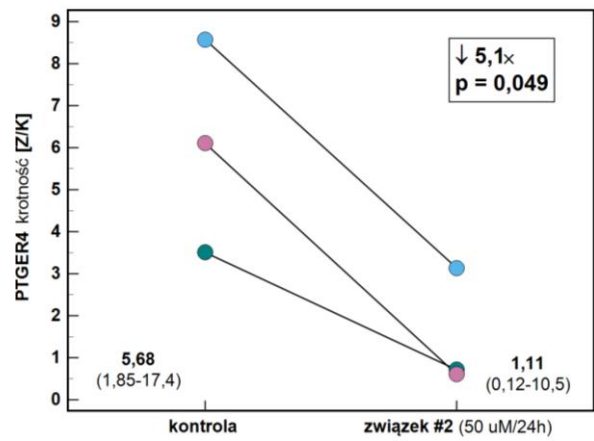
Ze względu na brak reaktywności zakupionych przeciwciał przeciwko EP4, ocenę wpływu oksykamów na ekspresję tego receptora PGE2, ograniczono do analizy ekspresji kodującego go genu (*PTGER4*).

6.2.6.1 HCT 116

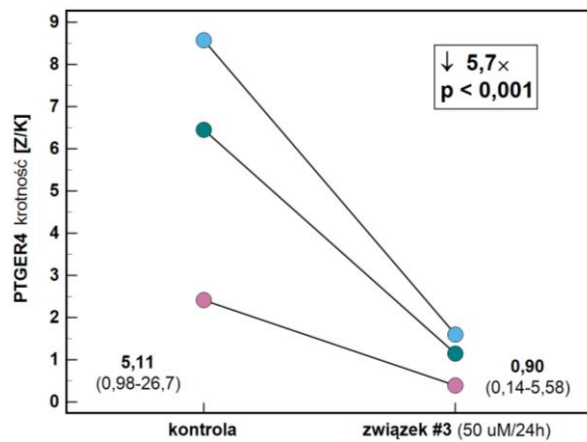
Leki referencyjne i testowane w niniejszej pracy nowosyntetyzowane analogi oksykamów miały negatywny wpływ na ekspresję *PTGER4* w komórkach HCT 116. W przypadku piroksykanu i meloksykanu oraz związku #4, obserwowanej supresji ekspresji *PTGER4* zabrakło istotności statystycznej. Natomiast efekt redukujący analogów #1 (4,6-krotny), #2 (5,1-krotny), #3 (5,7-krotny) oraz #5 (5,9-krotny) był znamieny statystycznie (Wykres 43).



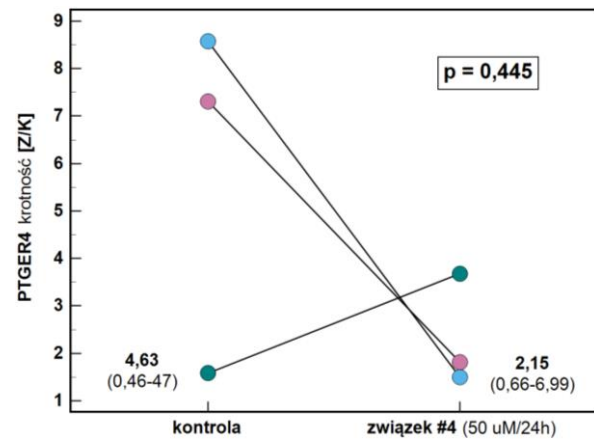
(a)



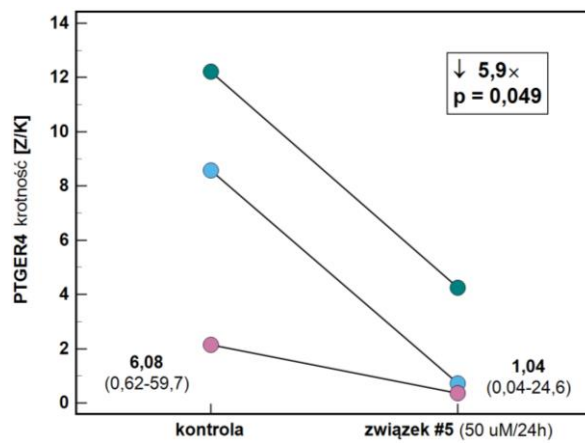
(b)



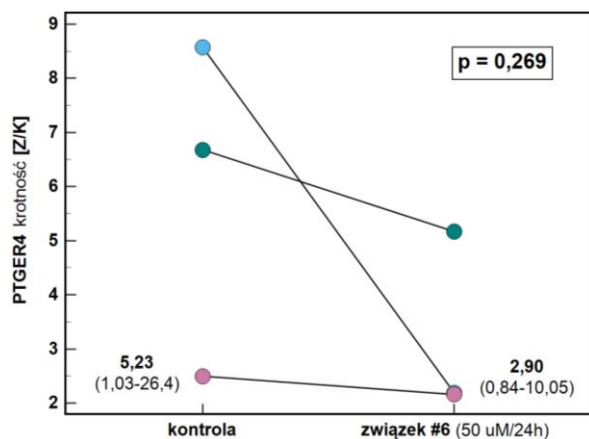
(c)



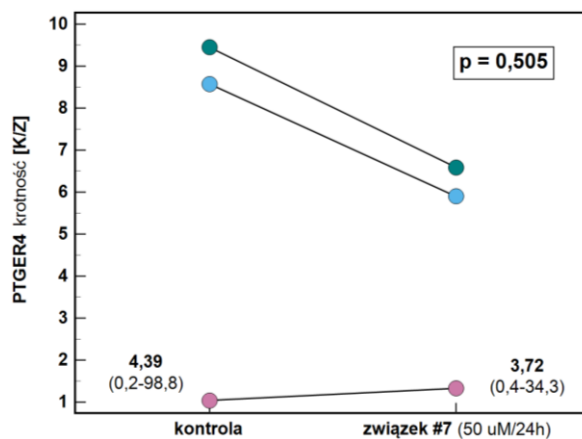
(d)



(e)



(f)



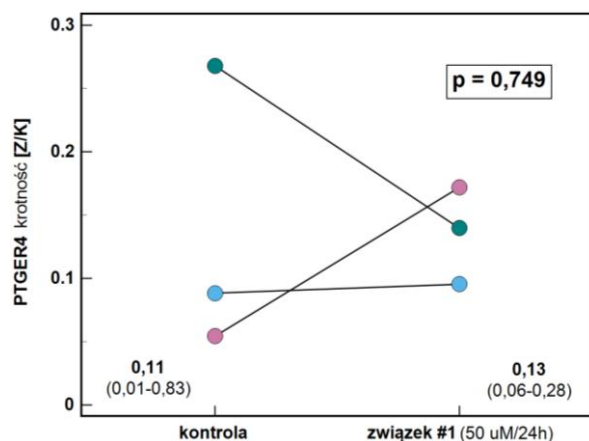
(g)

Wykres 43. Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *PTGER4* w komórkach HCT 116: (a) analog #1; (b) analog #2; (c) analog #3; (d) analog #4; (e) analog #5; (f) piroksykam; (g) meloksykam

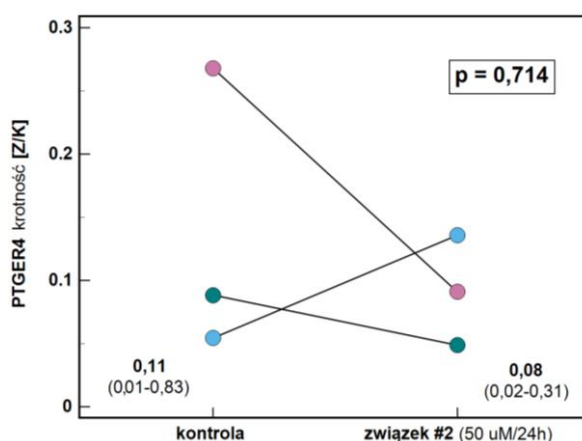
Dane przedstawiono jako średnie geometryczne ekspresji komórek stymulowanych związkami (50 μ M przez 24h) wobec niestymulowanych komórek kontrolnych uzyskane z trzech powtórzeń biologicznych. Dane analizowano testem *t*-Studenta dla prób powiązanych i – w przypadku znaczącego ($p < 0.05$) efektu – w ramce podano krotność ekspresji komórek stymulowanych związkami względem kontroli [Z/K].

6.2.6.2 Caco-2

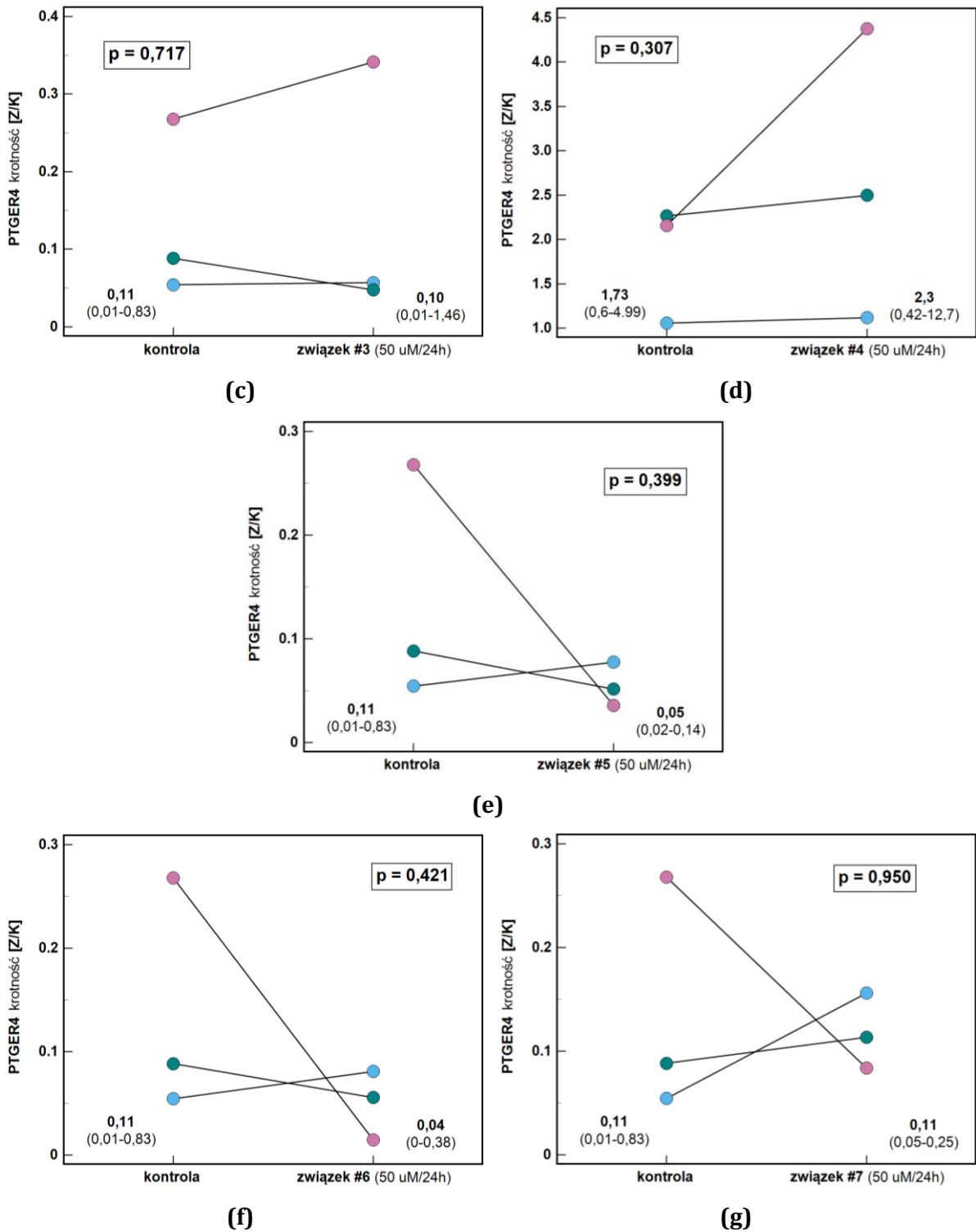
Inaczej niż w przypadku HCT 116, badane związki nie miały wpływu na ekspresję *PTGER4* w komórkach Caco-2 (Wykres 44).



(a)



(b)



Wykres 44. Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *PTGER4* w komórkach Caco-2: (a) analog #1; (b) analog #2; (c) analog #3; (d) analog #4; (e) analog #5; (f) piroksykam; (g) meloksykam

Dane przedstawiono jako średnie geometryczne ekspresji komórek stymulowanych związkami (50 μM przez 24h) wobec niestymulowanych komórek kontrolnych uzyskane z trzech powtórzeń biologicznych. Dane analizowano testem *t*-Studenta dla prób powiązanych i – w przypadku znaczącego ($p < 0.05$) efektu – w ramce podano krotność ekspresji komórek stymulowanych związkami względem kontroli [Z/K].

7 DYSKUSJA

Rak jelita grubego (RJG) pozostaje jednym z głównych nowotworów, zarówno w kwestii zachorowalności, jak i śmiertelności. Mimo znacznych postępów w zakresie diagnostyki i wykorzystania kolonoskopii nie tylko do identyfikacji, ale i usuwania zmian przedrakowych, przełożenie na odsetek całkowitych wyleczeń oraz odsetek przeżyć pięcioletnich jest wciąż niezadowalające. Dotyczy to szczególnie Polski, wypadającej pod tym względem gorzej niż pozostałe kraje Europy Zachodniej, do których poziomu aspirujemy [Jaroszyńska Z i in., 2021; Olędzki J, 2006]. W dobie rozwoju medycyny spersonalizowanej podkreśla się konieczność pełnego scharakteryzowania krajobrazu molekularnego raka, z uwzględnieniem jego międzyosobniczej heterogenności tak, by móc opracować skuteczne terapie przeciwnowotworowe oraz strategie prewencyjne nakierowane na cele molekularne. Jednocześnie, wykorzystanie molekularnych biomarkerów ma pomóc scharakteryzować pacjenta tak, by jak najtrafniej taką terapię dobrać do indywidualnego profilu aberracji [Porru M i in., 2020]. Indywidualizacja podejścia i uwzględnienie zmian molekularnych mają na celu nie tylko zwiększenie skuteczności leczenia, ale też zminimalizowanie jego potencjalnych skutków ubocznych [Henderson D i in., 2014]. Dotychczas charakterystyka molekularna opierała się niemal wyłącznie na badaniach genetycznych [Punt CJ i in., 2017]. Stosunkowo niedawno zwrócono uwagę na rolę innych elementów, m.in. białek (proteomu) i metabolitów (metabolomu), jako istotnych składowych zróżnicowania molekularnego komórki, umożliwiających natychmiastową reakcję na bodźce wewnętrzne i zewnętrzne oraz płynną adaptację do zmieniających się warunków środowiska. To właśnie analiza zmian spoza genomu, w tym głównie proteomu, metabolomu i interaktomu umożliwia molekularne fenotypowanie komórek, tkanek, narządów i organizmów [Duarte TT i in., 2016; Jacob M i in., 2019; Yin P i in., 2017; Carneiro G i in., 2019]. Prowadzone przeze mnie badania w ramach pracy doktorskiej wpisują się w ten nurt badawczy. W pierwszej części pracy podjęłam się scharakteryzowania zmian właśnie na poziomie transkryptomu z przełożeniem na metabolom, w zakresie szlaku zapalnego COX2/PGE₂ na tle ogólnego profilu eikozanoidów u pacjentów z RJG. Zainteresownie szlakiem zostało wzbudzone na nowo po niedawnych odkryciach dotyczących jego właściwości immunomodulujących i kształtujących immunosupresyjne mikrośrodowisko w otoczeniu guza [Jin K i in., 2023]

oraz indukowaniu przez PGE₂ nowotworowych komórek macierzystych poprzez aktywację NFκB przez szlaki EP4/MAPK i EP4/ PI3K [Wang D i in., 2015]. Co więcej, w świetle postępów w immunoterapii nowotworów i sukcesu leków będących inhibitorami punktów kontrolnych [Borelli B i in., 2022], których wykorzystanie w leczeniu przerzutuującego RJG z fenotypem MMR stało się faktem [Andre T i in., 2022], istotne jest odkrycie indukcji przez COX2/PGE₂ konstytutywnej ekspresji IDO1, przyczyniającej się do niepowodzenia tej formy immunoterapii [Hidalgo-Estévez AM i in., 2020].

Jak omówiono szczegółowo we wstępie do niniejszej dysertacji, nadekspresja COX2 i akumulacja PGE₂ są cechami charakterystycznymi dla RJG [Fujino H, 2016], umożliwiającymi transformację nowotworową i sprzyjającymi dalszym etapom rozwoju choroby w tym chorobie przerzutowej [Sheng i in., 2020; Finetti F i in, 2020]. Pewnym zaskoczeniem jest więc obserwacja, że w badanej kohorcie pacjentów z RJG poziom ekspresji PTGS2/COX2 był bardzo porównywalny między tkanką guza a makroskopowo i histologicznie prawidłową tkanką z okolic marginesu resekcji. Ponieważ COX2 może być regulowany nie tylko na poziomie transkrypcji, ale i translacji [Sheng J i in., 2020], nie wyklucza to większej ekspresji COX2 na poziomie białka w guzie, czego niestety nie mogłam zweryfikować ze względu na brak preparatów histologicznych. Jednakże przeczyć teorii o nadekspresji COX2 na poziomie białka zdaje się niskie stężenie PGE₂ zaobserwowane w surowicy pacjentów. W świetle uzyskanych przeze mnie wyników wydaje się, że za niskie stężenie pozakomórkowej PGE₂ odpowiada spadek syntezy, gdyż ekspresja enzymu degradującego PGE₂, który mógłby przyczyniać się do niskiego stężenia PGE₂, była najsilniej z badanych genów obniżona. Silniej obniżona była też ekspresja transportera wychwytyjącego PGE₂ – *PGT* niż transportera umożliwiającego sekrecję – *MRP4*, co wyklucza wewnątrzkomórkową akumulację prostaglandyny przez komórki nowotworowe.

Moje wyniki mogą natomiast potwierdzać obserwacje Shenga i in. [2020], którzy argumentują, że nadekspresja COX2 i PGE₂ w transformowanych komórkach nabłonkowych pojawia się w późniejszych stadiach rozwoju RJG. Zaś we wczesnych etapach karcynogenezy, COX2 i PGE₂ są nadekspresjonowane przez komórki mezenchymalne warstwy podnabłonkowej tkanki prawidłowej. Za prawdziwością hipotezy autorów przemawiają także inne poczynione przeze mnie obserwacje, tj. dominacja ekspresji *PTGS2* w tkance prawidłowej w nowotworach mniej

zaawansowanych wobec dominacji ekspresji *PTGS2* w tkance guza w nowotworach zaawansowanych. Prawidłowość ta wyraża się dodatnim współczynnikiem korelacji dla zależności stosunku guz/marginez of stopnia zaawansowania TNM. W szczególności, dominacja ekspresji w guzie wiąże się z dużym stopniem przerzutowania do regionalnych węzłów chłonnych.

Dane literaturowe wiążą transformację w jelicie z supresją ekspresji enzymu degradującego PGE_2 – *HPGD*, a zachowanie jej ekspresji uznają za dobry czynnik rokowniczy. Wynika to, m.in., ze zdolności enzymu do przywracania możliwości różnicowania się komórkom nowotworowym (ang. re-differentiation) [Satapathy SR i in., 2020]. Co więcej, sugeruje się, że wysoka ekspresja *HPGD* może być molekularnym markerem wyróżniającym osoby, dla których chemoprewencja aspiryną przyniosłaby największe korzyści [Fink SP i in., 2014]. Zgodnie z pozytywną rolą przypisywaną enzymowi, również w swojej pracy zaobserwowałam spadek ekspresji *HPGD* w tkance guza, który był najsilniej wyrażony ze wszystkich badanych genów. Jednakże, nieintuicyjnie choć bardzo konsekwentnie, niska ekspresja *HPGD* wiązała się z wczesnymi etapami raka a rosła wprost proporcjonalnie do stopnia zaawansowania guza TNM oraz złośliwości histologicznej guza pierwotnego oraz w guzach którym towarzyszyły przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych. Znaczenie wzrostu ekspresji *HPGD* wymaga więc wyjaśnienia w dalszych badaniach. Niektórzy autorzy wskazują na negatywną rolę *HPGD* w jelicie jako czynnika upośledzającego zdolności regeneracyjne komórek nabłonka i odpowiedzialnego za, związaną z wiekiem, utratę sprawności [Ho WJ i in., 2020].

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowałam również znczący spadek ekspresji *PGT*, o którym wspomina się w kontekście równie istotnej roli jak *HPGD* w promocji wysokiego pozakomórkowego stężenia PGE_2 i sugeruje możliwą koregulację obu genów. Jednakże, odwrotnie niż *HPG*, ale zgodnie z oczekiwaniami, spadek ekspresji *PGT* towarzyszył najbardziej zaawansowanym nowotworom (M1).

W swoich badaniach, oprócz PGE_2 , oznaczyłam również stężenie innych eikozanoidów lub ich stabilnych pochodnych. Co interesujące, stężenie PGE_2 nie wiązało się z żadnymi cechami histopatologicznymi a jedynie z sublokalizacją guza w jelicie, będąc znamienne wyższe u pacjentów z guzami prawostronnymi, którym tradycyjnie

przypisuje się większą agresywność i gorsze rokowanie [Hussain M i in., 2016]. PGF₂, druga z prostaglandyn syntetyzowanych przez COX2, której przypisuje się charakter prozapalny [Thyagarajan A i in., 2017], była znamienne wyższa u pacjentów z RJG a wzrost jej stężenia odzwierciedlał wyższe ryzyko zgonu w związku z operacją pozasercową oraz obecność przerzutów w węzłach chłonnych. Doniesienia o PGF₂ w raku są skąpe, ale przemawiają za jej akumulacją, np. w czerniaku [Thyagarajan A i in., 2017]. PGF₂ chroni komórki nowotworowe przed apoptozą a stymuluje ich proliferację, migrację oraz inwazyjność poprzez indukcję ekspresji MMP2 [Tsai CS i in., 2009].

5-deoksy- Δ 12,14-prostaglandyna J₂ jest agonistą receptora PPAR γ i zyskała miano „nowej nadziei na kontrolowanie wzrostu nowotworów”, co wynika z przeciwzapalnych, proapoptotycznych, antyangiogennych i antymetastatycznych własności tej prostaglandyny, choć mechanizmy jej działania nie są w pełni wyjaśnione [Bie Q i in., 2018]. Obserwowany wzrost jej stężenia u pacjentów z przerzutami odległymi oraz nowotworami o znacznej złośliwości histologicznej może, w kontekście przypisywanych jej cech, stanowić mechanizm obronny. Z kolei spadek stężenia towarzyszący pacjentom o wysokim ryzyku zgonu w związku z interwencją chirurgiczną, może przyczyniać się dodatkowo do gorszych rokowań.

Przedmiotem badań był również LBT₄, silny lipidowy mediator zapalny, który jednak nie jest produktem aktywności COX, tylko LOX. LBT₄ może sygnalizować przez dwa typy receptorów, Blt1 i Blt2, od których zależy efekt wywierany przez LBT₄ na komórki nowotworowe. Aktywacja ścieżki sygnałowej LTB₄/Blt1, w zależności od komórek układu odpornościowego ekspresjonujących receptor, może nasilać i podtrzymywać stan zapalny (Blt1 na makrofagach, neutrofilach, komórkach dendrytycznych, eozynofilach), a tym samym wspierać wzrost guza, lub wręcz przeciwnie, mieć działanie przeciwnowotworowe przez wspieranie nadzoru immunologicznego, jeśli receptory znajdują się na limfocytach T CD8+i mastocytach. Sygnalizowanie przez receptor mniejszego powinowactwa, Blt2, aktywuje ścieżki angiogenezy i metastazy oraz zapewnia komórkom nowotworowym przeżycie podczas chemioterapii [Jala VR i in., 2017]. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na niższe niż u osób zdrowych ogólnoustrojowe stężenia LTB₄ oraz konsekwentnie ilustrują jego dalszy spadek wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania w wymiarze regionalnym (obecność

przerzutów w węzłach chłonnych) i metastazy w odległych narządach oraz stopnia złośliwości histologicznej.

Choć w literaturze tematu wielokrotnie podkreślano sprzyjającą chemoprewencji naturalną historię RJG, tj. występowanie zdefiniowanych stanów przedrakowych i długi proces ich rozwoju zanim dojdzie do zezłośliwienia zmian, to wydaje się, że możliwości jakie ze sobą niesie, nie są w pełni wykorzystane. Biorąc pod uwagę kluczową rolę stanu zapalnego w etiopatogenezie RJG, prowadzone badania w zakresie chemoprewencji skupiły się na lekach przeciwzapalnych z grupy NLPZ, a w szczególności na aspirynie. Mimo licznych dowodów płynących z badań kliniczno-kontrolnych oraz dużych randomizowanych badań klinicznych z wykorzystaniem placebo o zdolności aspiryny do redukcji ilości i rozmiaru gruczolaków oraz zmniejszania ryzyka ich transformacji w raka inwazyjnego u osób długofalowo i konsekwentnie ją zażywających, wyniki są rozczarowujące wobec dużych nadziei w niej pokładanych. Aspiryna wydawała się idealnym kandydatem o, jak się wydawało, doskonale poznanym mechanizmie molekularnym działania i historią wykorzystania w leczeniu sięgającą starożytnego Egiptu. Ciesząca się zaufaniem pacjentów, skuteczna w zwalczaniu stanu zapalnego i jego manifestacji (gorączka, ból) a jednocześnie tania i niekłopotliwa w podaniu. Jednakże, oprócz kontrowersji, co do skutecznej dawki dobowej oraz optymalnego czasu leczenia, przeszkodą w jej implementacji okazały się skutki uboczne towarzyszące długotrwałemu leczeniu, przede wszystkim wysoka toksyczność żołądkowo-jelitowa, ale też zwiększone ryzyko krwawień wewnętrznych. Wynika to z faktu, że oprócz mediatorów zapalnych, głównie prostaglandyn E2 i F2, COX odpowiadają również za syntezę tromboksanów, indukujących agregację płytek krwi. Tak więc zahamowanie cyklooksygenazy skutkuje również zaburzeniami krzepliwości. Z kolei toksyczność żołądkowo-jelitową tłumaczy się fundamentalną rolą COX w protekcji komórek nabłonkowych przewodu pokarmowego przed uszkodzeniem spowodowanym wielorakimi czynnikami, m. in., uszkodzeniami chemicznymi, np. żołądkowym kwasem solnym, mechanicznymi czy translokacją patogenów i/lub ich toksyn czy szkodliwych produktu metabolizmu ze światła jelita. Ponieważ hemostatyczną rolę przypisywano izoenzymowi COX1, a za aktywność patogenną obwiniano COX2, ciężar zainteresowania NLPZ jako czynnikami przeciwnowotworowymi i chemoprewencyjnymi przeniesiono na

selektywne inhibitory swoiste wobec COX2, nazywane koksymbami (ang. coxibs). W zamierzeniu, miały one oszczędzić korzystną aktywność COX1 i produkowanych przez nią prostaglandyn i tromboksanów, a tym samym zapobiegać najpoważniejszym skutkom ubocznym podawania apiryny i innych nieswoistych NLPZ. Badania z wykorzystaniem celecoxibu potwierdziły jego skuteczność w redukcji przypadków gruczolaków, szczególnie gruczolaków nawracających u pacjentów po polipektomii, u których ryzyko pojawienia się kolejnych polipów jest większe niż w populacji osób nie poddanych wcześniej polipektomii [Veettil SK i in., 2019].

Meloksykam, ze względu na zaniedbywalne powinowactwo do COX1, uważany jest za niemal selektywny inhibitor COX2, o dłuższym niż standardowe NZLP okresie półtrwania i deklarowanej mniejszej gastrotoksyczności, co jednak jest przedmiotem kontrowersji [<https://go.drugbank.com/drugs/DB00814>; dostęp 20.09.2023]. Meloksykam oraz piroksykam są lekami o udokumentowanym działaniu przeciwnowotworowym, mimo iż nie takie jest ich oryginalne wskazanie. Co więcej, mechanizmy aktywności przeciwnowotworowej są słabo poznane, choć piroksykam dowiódł swojej skuteczności w redukcji ryzyka rozwoju RJG [Saini MK i in., 2012; Pantziarka P i in., 2018; Calaluce R i in., 2000]. W Zakładzie Biochemii Leku Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu pracuje się nad nowymi pochodnymi oksykamów. Testowane w niniejszej pracy związki wyróżnia, w stosunku do leków referencyjnych, obecność reszty arylopiiperazyny oraz substytucja resztą benzoilową pierścienia tiazyny. Arylopiiperazyna ma silne własności „ściąające elektrony”, co wzmacnia efekt przeciwzapalny [Hatnapure GD i in., 2012]. Testowane związki dowiodły już swojej skuteczności w modulowaniu ścieżki arginina/tlenek azotu [Krzystek-Korpacka M., 2020] czy ekspresji białek szoku termicznego [Szczuka I i in., 2021] oraz chemokin związanych z monocytami/makrofagami [Lewandowska P i in., 2021], w przeciwieństwie do leków referencyjnych.

Badania własne, których wyniki podsumowuje niniejsza rozprawa, wskazały na dość niespójny efekt działania klasycznych oksykamów, w szczególności brak powtarzalności między różnymi liniami i brak znamienności obserwowanych efektów ze względu na duży rozrzut wyników między powtórzeniami biologicznymi. Spośród nowych pochodnych, związki #1-3 były najefektywniejsze i stosunkowo spójne w swoim

hamującym wpływie na ekspresję *HPGD* i *MRP4*. Cechą wspólną tych pochodnych jest obecność łącznika propylenowego między zrębem oksykamu (azotem tiazyny) a azotem farmakoforu arylo-piperazyny, którego nie posiadają związki #4 i #5. Dodatkowo, związki #1-3 wraz ze związkiem #5, negatywnie regulowały ekspresję *PTGER2/EP2* i *PTGER4/EP4*. Niewątpliwie najskuteczniejszym inhibitorem był związek #2, a efekty jego działania były najbardziej powtarzalne na poziomie transkryptu i białka, między różnymi liniami oraz powtórzeniami biologicznymi. Cechą wyróżniającą #2 jest obecność pojedynczego atomu fluoru. Nieco gorzej działający związek #3 ma dwa fluorkowe podstawniki, a związek #1 jest ich całkiem pozbawiony.

8 WNIOSKI

- I. W raku jelita grubego dochodzi do deregulacji szlaku COX2/PGE2 na poziomie lokalnym i ogólnoustrojowym, w powiązaniu z cechami histopatologicznymi RJG oraz w sposób odzwierciedlający dobrostan pacjenta.
- Deregulacja na poziomie lokalnym polega na znamiennej redukcji ekspresji *HPGD*, *MRP4*, *PGT*, *PTGER2* i *PTGER4* w guzie nowotworowym względem makroskopowo i histologicznie prawidłowej tkanki otaczającej.
 - Ekspresja *PTGS2/COX2* w tkance guza zależy od głębokości nacieku guza pierwotnego i jest najniższa w guzach *in situ*, a najwyższa w guzach T4 oraz polipach z utkaniem gruczolakoraka.
 - Różnica ekspresji *PTGS2/COX2* między guzem a jego otoczeniem, wyrażona stosunkiem guz/margines, zależy od stopnia zajęcia regionalnych węzłów chłonnych. Tylko w nowotworach silnie przerzutujących (N2) stosunek ekspresji wskazuje na większą ekspresję *PTGS2/COX2* w tkance guza, podczas gdy w nowotworach nieprzerzutujących i z ograniczoną liczbą zajętych węzłów, ekspresja *PTGS2/COX2* jest w guzie obniżona.
 - Obecność przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych wiąże się z niemal trzykrotnym zmniejszeniem różnicy ekspresji *HPGD* między guzem a otoczeniem na korzyść guza.
 - Obecność przerzutów odległych wiąże się ze zwiększeniem różnicy ekspresji *PGT* między guzem a otoczeniem na korzyść otoczenia
 - Różnica w ekspresji *PTGS2/COX2* i *HPGD* między guzem a otoczeniem zmienia się wprost proporcjonalnie do stopnia zaawansowania choroby; nie wiadomo jednak, czy wynika to ze wzrostu ekspresji w guzie, czy spadku ekspresji w jego otoczeniu
 - Różnica ekspresji guz/margines *HPGD* odzwierciedla agresywność RJG, zmniejszając się proporcjonalnie do stopnia zaawansowania histologicznego.
 - Otoczenie guzów prawostronnych silniej ekspresjonuje receptor EP2 niż otoczenie guzów odbytnicy. Prawostronna lokalizacja guza pierwotnego wiąże się też z wyższym stężeniem PGE₂ w krążeniu ogólnoustrojowym.

- Deregulacja szlaku na poziomie ogólnoustrojowym manifestuje się wyższymi niż u osób zdrowych stężeniami PGE₁, PGF_{1α}, PGF₂ i TBX₂ a niższymi stężeniami LTB₄.
- ogólnoustrojowe stężenie PGE₁, PGJ₂ i LTB₄ oraz PGF₂ odzwierciedla ogólny dobrostan pacjenta w klasyfikacji ASA.
- Pacjentów z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych cechuje wyższe stężenie PGF₂, zaś wysoki stopień ich zajęcia charakteryzuje dodatkowo niższe stężenie ogólnoustrojowe PGF₁ oraz LBT₄.
- Pacjentów z obecnością przerzutów odległych cechuje wyższe stężenie PGJ₂ a niższe PGF_{1α} oraz LTB₄.
- Rosnącemu zezłośliwieniu histologicznemu towarzyszy wzrost stężenia PGJ₂ a spadek PGF_{1α}, LBT₄ i PGD

II. PGF₂ jest doskonałym markerem RJG, lecz umiarkowanym 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.

III. Oksykamy modułują szlak COX2/PGE₂ 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.

- związek #2 hamuje syntezę COX2 we wszystkich testowanych liniach, najsilniej w komórkach HT-29 (>14-krotnie), a słabiej w HCT 116 i Caco-2 (2-3-krotnie), czemu towarzyszy spadek ekspresji PTGS2 w Caco-2 (HT-29 nie było dostępne do analizy transkryptomicznej)
- związki #1-3 hamują ekspresję HPGD na poziomie transkryptu i białka, ale znamienność zależy od linii

- związki #1-3 hamują ekspresję MRP4, przy czym #2 konsekwentnie na poziomie mRNA i białka i we wszystkich liniach
- #1-3 i #5 hamują ekspresję *PTGER4* w HCT 116 oraz *PTGER2/EP2* w HCT 116 i w HT-29,
- piroksykam i meloksykam hamują EP2 w HT-29 i HCT 116, choć nie zawsze osiągnięta jest znamienność statystyczna zależności; z kolei w komórkach Caco-2 hamują MRP4 a w HT29 aktywują HPGD, lecz efekt nie jest powtarzalny na pozostałych liniach.

9 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 wodrębionymi 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)-E₂, 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/PGE₂ w odniesieniu do cech histopatologicznych gruczolakoraków wraz z oceną mocy diagnostycznej badanych eikozanoidów (13,14-dihydro-PGE₁, 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, LTB₄, PGD₂, 15-deoxy-12,14-PGJ₂, PGE₂, PGF₂). 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/PGE₂ na poziomie lokalnym i ogólnoustrojowym, w powiązaniu z cechami histopatologicznymi RJG oraz w sposób odzwierciedlający dobrostan pacjenta;
- (2) PGF₂ 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/PGE₂ 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.

10 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)-E₂ 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. Oxicams 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-PGE₁, 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, LTB₄, PGD₂, 15-deoxy-12,14-PGJ₂, PGE₂, PGF₂) 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) PGF₂ 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 oxycams. 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.

11 WYKAZ TABEL

Tabela I	Charakterystyka pacjentów – analiza ekspresji w tkankach
Tabela II	Charakterystyka pacjentów – analiza stężenia eikozanoidów w surowicy
Tabela III	Skala ASA oceny ryzyka zgonu podczas operacji pozasercowej
Tabela IV	Stopień zaawansowania raka jelita grubego wg klasyfikacji pTNM 7. wydania klasyfikacji TNM AJCC/UICC
Tabela V	Wzory strukturalne badanych związków i ich oznaczenia wykorzystywane w pracy
Tabela VI	Primery wykorzystane w badaniach
Tabela VII	Porównanie ekspresji genów białek szlaku COX2/PGE ₂ w guzach i marginesach resekcji (próby sparowane) u pacjentów z rakiem jelita grubego
Tabela VIII	Zależność ekspresji genów w guzach od głębokości nacieku guza pierwotnego.
Tabela IX	Zależność ekspresji genów białek szlaku COX2/PGE ₂ w marginesach resekcji od głębokości nacieku guza pierwotnego
Tabela X	Zależność krotności ekspresji [guz/margines] genów białek szlaku COX2/PGE ₂ od głębokości nacieku guza pierwotnego
Tabela XI	Zależność ekspresji genów w guzach od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych
Tabela XII	Zależność ekspresji genów w marginesach od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych
Tabela XIII	Zależność krotności ekspresji genów [guz/margines] od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych
Tabela IX	Zależność ekspresji genów białek szlaku COX2/PGE ₂ w marginesach resekcji od głębokości nacieku guza pierwotnego
Tabela X	Zależność krotności ekspresji [guz/margines] genów białek szlaku COX2/PGE ₂ od głębokości nacieku guza pierwotnego
Tabela XI	Zależność ekspresji genów w guzach od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych
Tabela XII	Zależność ekspresji genów w marginesach od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych
Tabela XIII	Zależność krotności ekspresji genów [guz/margines] od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych
Tabela XIV	Zależność ekspresji genów w guzach od obecności przerzutów odległych
Tabela XV	Zależność ekspresji genów w marginesie od obecności przerzutów odległych
Tabela XVI	Zależność krotności ekspresji genów [guz/margines] od obecności przerzutów odległych
Tabela XVII	Korelacja między poziomem ekspresji genów kodujących białka szlaku COX2/PGE ₂ w guzie a ogólnym stopniem zaawansowania choroby (TNM)
Tabela XVIII	Korelacja między poziomem ekspresji genów kodujących białka szlaku COX2/PGE ₂ w marginesie a ogólnym stopniem zaawansowania choroby (TNM)
Tabela XIX	Korelacja między krotnością ekspresji genów kodujących białka szlaku COX2/PGE ₂ w guzie względem marginesu a ogólnym stopniem zaawansowania choroby (TNM)
Tabela XX	Zależność ekspresji genów w guzie od stopnia zaawansowania histologicznego (G)

Tabela XXI	Zależność ekspresji genów w marginesie od stopnia zaawansowania histologicznego (G)
Tabela XXII	Zależność krotności ekspresji genów [guz/margines] od stopnia zaawansowania histologicznego (G)
Tabela XXIII	Zależność ekspresji genów białek szlaku COX2/PGE ₂ w tkance guza od sublokalizacji guza pierwotnego w jelicie grubym
Tabela XXIV	Zależność ekspresji genów białek szlaku COX2/PGE ₂ w okolicach marginesu resekcji od sublokalizacji guza pierwotnego w jelicie grubym
Tabela XXV	Zależność krotności ekspresji genów białek szlaku COX2/PGE ₂ guz/margines resekcji od sublokalizacji guza pierwotnego w jelicie grubym
Tabela XVI	Korelacja między wiekiem z stężeniem wybranych eikozanoidów w surowicy pacjentów z RJG oraz osób zdrowych (kontrola)
Tabela XVII	Stężenie wybranych eikozanoidów w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od ryzyka zgonu podczas operacji (skala ASA)
Tabela XVIII	Korelacja między stężeniem wybranych eikozanoidów we krwi pacjentów z RJG a głębokością nacieku guza pierwotnego
Tabela XIX	Stężenie wybranych eikozanoidów w surowicy pacjentów z RJG w zależności od obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych
Tabela XX	Stężenie wybranych eikozanoidów w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od obecności przerzutów odległych
Tabela XXI	Korelacja między stężeniem wybranych eikozanoidów we krwi pacjentów a stopniem zaawansowania RJG (TNM)
Tabela XXII	Stężenie wybranych eikozanoidów w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od zaawansowania histologicznego raka
Tabela XXIII	Korelacja między stężeniem wybranych eikozanoidów we krwi pacjentów z RJG a stopniem zaawansowania histologicznego guza pierwotnego
Tabela XXIV	Stężenie wybranych eikozanoidów we krwi pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od sublokalizacji guza pierwotnego
Tabela XXV	Porównanie czułości i swoistości wybranych eikozanoidów jako potencjalnych markerów obecności RJG
Tabela XXVI	Porównanie czułości i swoistości wybranych eikozanoidów jako potencjalnych markerów agresywności RJG

12 WYKAZ WYKRESÓW

- Wykres 1** Analiza porównawcza ekspresji genów w guzach i, odpowiadających im, marginesach resekcji
- Wykres 2** Wpływ głębokości nacieku guza pierwotnego (cecha T) na ekspresję *PTGS2* w guzach nowotworowych pacjentów z rakiem jelita grubego
- Wykres 3** Różnice krotności ekspresji *PTGS2* w guzie w stosunku do marginesu resekcji u pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od obecności i ilości przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.
- Wykres 4** Różnice krotności ekspresji *HPGD* w guzie w stosunku do marginesu resekcji u pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.
- Wykres 5** Różnice krotności ekspresji *PGT* w guzie w stosunku do okolic marginesu resekcji w zależności od obecności przerzutów odległych.
- Wykres 6** Korelacja między krotnością ekspresji *PTGS2* w guzie w stosunku do marginesu a stopniem zaawansowania raka jelita grubego
- Wykres 7** Korelacja wprost proporcjonalna między krotnością ekspresji *HPGD* w guzie w stosunku do marginesu a stopniem zaawansowania raka jelita grubego
- Wykres 8.** Zależność między krotnością ekspresji *HPGD* w guzie w stosunku do marginesu w zależności od stopnia zaawansowania raka
- Wykres 9** Korelacja wprost proporcjonalna między krotnością ekspresji *HPGD* w guzie w stosunku do marginesu a stopniem zaawansowania histologicznego guza pierwotnego
- Wykres 11** Porównanie ogólnoustrojowych stężeń wybranych eikozanoidów u pacjentów z rakiem jelita grubego względem osób zdrowych
- Wykres 12** Stężenie eikozanoidów w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od ryzyka zgonu podczas operacji (skala ASA)
- Wykres 13** Stężenie eikozanoidów w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych
- Wykres 14** Stężenie PGF_2 w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych
- Wykres 15** Stężenie w surowicy pacjentów z RJG w zależności od zaawansowania histologicznego guza pierwotnego
- Wykres 16** Stężenie PGE_2 w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od sublokalizacji guza pierwotnego.
- Wykres 17** Krzywe ROC badanych eikozanoidów jako markerów obecności RJG
- Wykres 18** Krzywa ROC dla PGF_2 jako markera obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych u pacjentów z RJG
- Wykres 19** Krzywe ROC badanych eikozanoidów jako markerów agresywności RJG
- Wykres 20** Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *PTGS2* w komórkach HCT 116
- Wykres 21** Wpływ referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka COX2 w komórkach HCT 116
- Wykres 22** Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *PTGS2* w komórkach Caco-2
- Wykres 23.** Wpływ referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka COX2 w komórkach Caco-2

- Wykres 24.** Wpływ referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka COX2 w komórkach HT-29
- Wykres 25.** Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *HPGD* w komórkach HCT 116
- Wykres 26.** Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka *HPGD* w komórkach HCT 116
- Wykres 27.** Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *HPGD* w komórkach Caco-2
- Wykres 28.** Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka *HPGD* w komórkach Caco-2
- Wykres 29.** Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka *HPGD* w komórkach HT-29
- Wykres 30.** Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *MRP4* w komórkach HCT 116
- Wykres 31.** Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka *MRP4* w komórkach HCT-116
- Wykres 32.** Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *MRP4* w komórkach Caco-2
- Wykres 33.** Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka *MRP4* w komórkach Caco-2
- Wykres 34.** Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka *MRP4* w komórkach HT-29
- Wykres 35.** Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka *PGT* w komórkach HCT 116
- Wykres 36.** Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka *PGT* w komórkach Caco-2
- Wykres 37.** Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka *PGT* w komórkach HT-29
- Wykres 38.** Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *PTGER2* w komórkach HCT 116
- Wykres 39.** Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka *EP2* w komórkach HCT 116
- Wykres 40.** Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *PTGER2* w komórkach Caco-2
- Wykres 41.** Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka *EP2* w komórkach Caco-2
- Wykres 42.** Wpływ oksykamów i ich pochodnych na ekspresję białka *EP2* w komórkach HT-29
- Wykres 43.** Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *PTGER4* w komórkach HCT 116
- Wykres 44.** Wpływ oksykamów i ich analogów na ekspresję *PTGER4* w komórkach Caco-2:

13 WYKAZ RYSUNKÓW I ZDJĘĆ

- Rysunek 1.** Uproszczony schemat syntezy eikozanoidów
- Rysunek 2.** Uproszczony schemat szlaku COX2/PGE2
- Rysunek 3.** Ogólny schemat struktury oksykamów z miejscami modyfikacji
- Zdjęcie 1.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka COX2 w komórkach HCT 116
- Zdjęcie 2.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka COX2 w komórkach Caco-2
- Zdjęcie 3.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka COX2 w komórkach HT-29
- Zdjęcie 4.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka HPGD w komórkach HCT-116
- Zdjęcie 5.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka HPGD w komórkach Caco-2
- Zdjęcie 6.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka HPGD w komórkach HT-29
- Zdjęcie 7.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka MRP4 w komórkach HCT-116
- Zdjęcie 8.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka MRP4 w komórkach Caco-2
- Zdjęcie 9.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka MRP4 w komórkach HT-29
- Zdjęcie 10.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka PGT w komórkach HCT 116
- Zdjęcie 11.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka PGT w komórkach Caco-2
- Zdjęcie 12.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka PGT w komórkach HT-29
- Zdjęcie 13.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka EP2 w komórkach HCT 116
- Zdjęcie 14.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka EP2 w komórkach Caco-2
- Zdjęcie 15.** Reprezentatywny blot ilustrujący efekt referencyjnych oksykamów oraz testowanych analogów na ekspresję białka EP2 w komórkach HT-29

14 LITERATURA

- Ait Ouakrim D**, Pizot C, Boniol M, Malvezzi M, Boniol M, Negri E, Bota M, Jenkins MA, Bleiberg H, Autier P. Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. *BMJ*. **2015** Oct 6;351:h4970. doi: 10.1136/bmj.h4970.
- André T**, Cohen R. Immune checkpoint inhibitors in colorectal cancer: dream and reality. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. **2022** Jan;7(1):4-6. doi: 10.1016/S2468-1253(21)00375-7.
- Arnold M**, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. **2017** Apr;66(4):683-691. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
- Bie Q**, Dong H, Jin C, Zhang H, Zhang B. 15d-PGJ2 is a new hope for controlling tumor growth. *Am J Transl Res*. 2018 Mar 15;10(3):648-658.
- Borelli B**, Antoniotti C, Carullo M, Germani MM, Conca V, Masi G. Immune-Checkpoint Inhibitors (ICIs) in Metastatic Colorectal Cancer (mCRC) Patients beyond Microsatellite Instability. *Cancers (Basel)*. **2022** Oct 11;14(20):4974. doi: 10.3390/cancers14204974.
- Botteri E**, Borroni E, Sloan EK, Bagnardi V, Bosetti C, Peveri G, Santucci C, Specchia C, van den Brandt P, Gallus S, Lugo A. Smoking and Colorectal Cancer Risk, Overall and by Molecular Subtypes: A Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol*. **2020** Dec;115(12):1940-1949. doi: 10.14309/ajg.0000000000000803.
- Calaluce R**, Earnest DL, Heddens D, Einspahr JG, Roe D, Bogert CL, Marshall JR, Alberts DS. Effects of piroxicam on prostaglandin E2 levels in rectal mucosa of adenomatous polyp patients: a randomized phase IIb trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **2000** Dec;9(12):1287-92
- Carneiro G**, Radcenco AL, Evaristo J, Monnerat G. Novel strategies for clinical investigation and biomarker discovery: a guide to applied metabolomics. *Horm Mol Biol Clin Investig*. **2019** Jan 17;38(3):/j/hmbci.2019.38.issue-3/hmbci-2018-0045/hmbci-2018-0045.xml. doi: 10.1515/hmbci-2018-0045.
- Chen K**, Xia G, Zhang C, Sun Y. Correlation between smoking history and molecular pathways in sporadic colorectal cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. **2015** Mar 15;8(3):3241-57.
- Choi YJ**, Myung SK, Lee JH. Light Alcohol Drinking and Risk of Cancer: A Meta-Analysis of Cohort Studies. *Cancer Res Treat*. **2018** Apr;50(2):474-487. doi: 10.4143/crt.2017.094.
- Degowska M**, Rydzewska G. Chemoprewencja raka jelita grubego – rola mesalazyny. *Przegląd Gastroenterol*. **2008**; 3 (5): 247–254
- Duarte TT**, Spencer CT. Personalized Proteomics: The Future of Precision Medicine. *Proteomes*. **2016**;4(4):29. doi: 10.3390/proteomes4040029.

- Dyba T**, Randi G, Bray F, Martos C, Giusti F, Nicholson N, Gavin A, Flego M, Neamtiu L, Dimitrova N, Negrão Carvalho R, Ferlay J, Bettio M. The European cancer burden in 2020: Incidence and mortality estimates for 40 countries and 25 major cancers. *Eur J Cancer*. **2021** Nov;157:308-347. doi: 10.1016/j.ejca.2021.07.039.
- Fang Y**, Yan C, Zhao Q, Xu J, Liu Z, Gao J, Zhu H, Dai Z, Wang D, Tang D. The roles of microbial products in the development of colorectal cancer: a review. *Bioengineered*. **2021** Dec;12(1):720-735. doi: 10.1080/21655979.2021.1889109.
- Finetti F**, Travelli C, Ercoli J, Colombo G, Buoso E, Trabalzini L. Prostaglandin E2 and Cancer: Insight into Tumor Progression and Immunity. *Biology (Basel)*. **2020** Dec 1;9(12):434. doi: 10.3390/biology9120434.
- Fink SP**, Yamauchi M, Nishihara R, Jung S, Kuchiba A, Wu K, Cho E, Giovannucci E, Fuchs CS, Ogino S, Markowitz SD, Chan AT. Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD). *Sci Transl Med*. **2014** Apr 23;6(233):233re2. doi: 10.1126/scitranslmed.3008481.
- Fleszar MG**, Fortuna P, Zawadzki M, Hodurek P, Bednarz-Misa I, Witkiewicz W, Krzystek-Korpaczka M. Sex, Type of Surgery, and Surgical Site Infections Are Associated with Perioperative Cortisol in Colorectal Cancer Patients. *J Clin Med*. **2021** Feb 4;10(4):589. doi: 10.3390/jcm10040589.
- Fleszar MG**, Fortuna P, Zawadzki M, Kosyk B, Krzystek-Korpaczka M. Simultaneous LC-MS/MS-Based Quantification of Free 3-Nitro-l-tyrosine, 3-Chloro-l-tyrosine, and 3-Bromo-l-tyrosine in Plasma of Colorectal Cancer Patients during Early Postoperative Period. *Molecules*. **2020** Nov 5;25(21):5158. doi: 10.3390/molecules25215158.
- Francuz T**, Czajka-Francuz P, Cisoń-Jurek S, Wojnar J. The role of inflammation in colon cancer pathogenesis. *Postepy Hig Med Dosw* **2016**; 70: 360-366
- Fujino H**. The Roles of EP4 Prostanoid Receptors in Cancer Malignancy Signaling. *Biol Pharm Bull*. **2016**;39(2):149-55. doi: 10.1248/bpb.b15-00840.
- Gros B**, Kaplan GG. Ulcerative Colitis in Adults: A Review. *JAMA*. 2023 Sep 12;330(10):951-965. doi: 10.1001/jama.2023.15389.
- Hanahan D**, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the new generation. *Cell* **2011**;144:646-74.
- Hanahan D**, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**;100:57-70.
- Hassan C**, Antonelli G, Dumonceau JM, Regula J, Bretthauer M, Chaussade S, Dekker E, Ferlitsch M, Gimeno-Garcia A, Jover R, Kalager M, Pellisé M, Pox C, Ricciardiello L, Rutter M, Helsing LM, Bleijenberg A, Senore C, van Hooft JE, Dinis-Ribeiro M, Quintero E. Post-polypectomy colonoscopy surveillance: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline - Update 2020. *Endoscopy*. **2020** Aug;52(8):687-700. doi: 10.1055/a-1185-3109.

- Hatnapure GD**, Keche AP, Rodge AH, Birajdar SS, Tale RH, Kamble VM. Synthesis and biological evaluation of novel piperazine derivatives of flavone as potent anti-inflammatory and antimicrobial agent. *Bioorg Med Chem Lett.* **2012** Oct 15;22(20):6385-90. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.08.071
- Henderson D**, Ogilvie LA, Hoyle N, Keilholz U, Lange B, Lehrach H; OncoTrack Consortium. Personalized medicine approaches for colon cancer driven by genomics and systems biology: OncoTrack. *Biotechnol J.* **2014** Sep;9(9):1104-14. doi: 10.1002/biot.201400109.
- Hidalgo-Estévez AM**, Stamatakis K, Jiménez-Martínez M, López-Pérez R, Fresno M. Cyclooxygenase 2-Regulated Genes an Alternative Avenue to the Development of New Therapeutic Drugs for Colorectal Cancer. *Front Pharmacol.* 2020 Apr 29;11:533. doi: 10.3389/fphar.2020.00533.
- Ho WJ**, Smith JNP, Park YS, Hadiono M, Christo K, Jogasuria A, Zhang Y, Broncano AV, Kasturi L, Dawson DM, Gerson SL, Markowitz SD, Desai AB. 15-PGDH regulates hematopoietic and gastrointestinal fitness during aging. *PLoS One.* **2022** May 19;17(5):e0268787. doi: 10.1371/journal.pone.0268787.
- Huck MB**, Bohl JL. Colonic Polyps: Diagnosis and Surveillance. *Clin Colon Rectal Surg.* **2016** Dec;29(4):296-305. doi: 10.1055/s-0036-1584091.
- Hussain M**, Waqas O, Hassan U, Loya A, Akhtar N, Mushtaq S, Yusuf MA, Syed AA. Right-Sided and Left-Sided Colon Cancers are Two Distinct Disease Entities: an Analysis of 200 Cases in Pakistan. *Asian Pac J Cancer Prev.* **2016**;17(5):2545-8.
- Jacob M**, Lopata AL, Dasouki M, Abdel Rahman AM. Metabolomics toward personalized medicine. *Mass Spectrom Rev.* **2019** May;38(3):221-238. doi: 10.1002/mas.21548.
- Jaroszyńska Z**, Wiśniewska K. Epidemiology of colorectal cancer (C18-C21) in Poland. *J. Educ. Health Sport.* **2021**;11(10):143-156. eISSN 2391-8306. doi: <http://doi.org/10.12775/JEHS.2021.11.10.013>.
- Jala VR**, Bodduluri SR, Satpathy SR, Chheda Z, Sharma RK, Haribabu B. The yin and yang of leukotriene B4 mediated inflammation in cancer. *Semin Immunol.* **2017** Oct;33:58-64. doi: 10.1016/j.smim.2017.09.005.
- Jin K**, Qian C, Lin J, Liu B. Cyclooxygenase-2-Prostaglandin E2 pathway: A key player in tumor-associated immune cells. *Front Oncol.* **2023** Jan 27;13:1099811. doi: 10.3389/fonc.2023.1099811.
- Kasi A**, Handa S, Bhatti S, Umar S, Bansal A, Sun W. Molecular Pathogenesis and Classification of Colorectal Carcinoma. *Curr Colorectal Cancer Rep.* **2020** Sep;16(5):97-106. doi: 10.1007/s11888-020-00458-z.
- Katona BW**, Weiss JM. Chemoprevention of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **2020**; 158: 368–388.
- Kawahara K**, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta.* **2015** Apr;1851(4):414-21. doi: 10.1016/j.bbali.2014.07.008.

- Kirtonia A**, Sethi G, Garg M. The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci.* **2020** Nov;77(22):4459-4483. doi: 10.1007/s00018-020-03536-5.
- Kodela R**, Chattopadhyay M, Velázquez-Martínez CA, Kashfi K. NOSH-aspirin (NBS-1120), a novel nitric oxide-and hydrogen sulfide releasing hybrid has enhanced chemopreventive properties compared to aspirin, is gastrointestinal safe with all the classic therapeutic indications. *Biochem. Pharmacol.* **2015**; 98:564–572. doi: 10.1016/j.bcp.2015.09.014.
- Krzystek-Korpacka M**, Diakowska D, Bania J, Gamian A. Expression stability of common housekeeping genes is differently affected by bowel inflammation and cancer: implications for finding suitable normalizers for inflammatory bowel disease studies. *Inflamm Bowel Dis.* **2014** Jul;20(7):1147-56. doi: 10.1097/MIB.0000000000000067.
- Krzystek-Korpacka M**, Hotowy K, Czapinska E, Podkowik M, Bania J, Gamian A, Bednarz-Misa I. Serum availability affects expression of common house-keeping genes in colon adenocarcinoma cell lines: implications for quantitative real-time PCR studies. *Cytotechnology.* **2016** Dec;68(6):2503-2517. doi: 10.1007/s10616-016-9971-4.
- Krzystek-Korpacka M**, Mierzchała-Pasierb M, Zawadzki M, Diakowska D, Witkiewicz W. Serum and Erythrocyte Antioxidant Defense in Colorectal Cancer Patients during Early Postoperative Period: Potential Modifiers and Impact on Clinical Outcomes. *Antioxidants (Basel).* **2021** Jun 23;10(7):999. doi: 10.3390/antiox10070999.
- Krzystek-Korpacka M**, Szcześniak-Sięga B, Szczuka I, Fortuna P, Zawadzki M, Kubiak A, Mierzchała-Pasierb M, Fleszar MG, Lewandowski Ł, Serek P, Jamrozik N, Neubauer K, Wiśniewski J, Kempieński R, Witkiewicz W, Bednarz-Misa I. L-Arginine/Nitric Oxide Pathway Is Altered in Colorectal Cancer and Can Be Modulated by Novel Derivatives from Oxicam Class of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Cancers (Basel).* **2020** Sep 11;12(9):2594. doi: 10.3390/cancers12092594.
- Lacey T**, Lacey H. Linking Hsp90's role as an evolutionary capacitor to the development of cancer. *Cancer Treat. Res. Commun.* **2021**;28:100400. doi: 10.1016/j.ctarc.2021.100400.
- Lewandowska P**, Szczuka I, Bednarz-Misa I, Szcześniak-Sięga BM, Neubauer K, Mierzchała-Pasierb M, Zawadzki M, Witkiewicz W, Krzystek-Korpacka M. Modulating Properties of Piroxicam, Meloxicam and Oxicam Analogues against Macrophage-Associated Chemokines in Colorectal Cancer. *Molecules.* **2021** Dec 5;26(23):7375. doi: 10.3390/molecules26237375.
- Lin S**, Li Y, Zamyatnin AA Jr, Werner J, Bazhin AV. Reactive oxygen species and colorectal cancer. *J Cell Physiol.* **2018** Jul;233(7):5119-5132. doi: 10.1002/jcp.26356.
- Liu Y**, Borchert GL, Surazynski A, Phang JM. Proline oxidase, a p53-induced gene, targets COX-2/PGE2 signaling to induce apoptosis and inhibit tumor growth in colorectal cancers. *Oncogene.* **2008** Dec 4;27(53):6729-37. doi: 10.1038/onc.2008.322.
- Liu Y**, Dai M. Trimethylamine N-Oxide Generated by the Gut Microbiota Is Associated with Vascular Inflammation: New Insights into Atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* **2020** Feb 17;2020:4634172. doi: 10.1155/2020/4634172.

- López DE**, Ballaz SJ. The Role of Brain Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Beyond Neuroinflammation: Neuronal Homeostasis in Memory and Anxiety. *Mol Neurobiol*. **2020** Dec;57(12):5167-5176. doi: 10.1007/s12035-020-02087-x.
- Majumder S**, Shivaji UN, Kasturi R, Sigamani A, Ghosh S, Iacucci M. Inflammatory bowel disease-related colorectal cancer: Past, present and future perspectives. *World J Gastrointest Oncol*. **2022** Mar 15;14(3):547-567. doi: 10.4251/wjgo.v14.i3.547.
- McDowell C**, Farooq U, Haseeb M. Inflammatory Bowel Disease. 2022 Jun 27. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; **2022** Jan-
- Mohammed A**, Yarla NS, Madka V, Rao CV. Clinically Relevant Anti-Inflammatory Agents for Chemoprevention of Colorectal Cancer: New Perspectives. *Int J Mol Sci*. **2018** Aug 8;19(8):2332. doi: 10.3390/ijms19082332.
- Murphy CC**, Zaki TA. Changing epidemiology of colorectal cancer - birth cohort effects and emerging risk factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. **2023** Sep 18. doi: 10.1038/s41575-023-00841-9.
- Muthusami S**, Ramachandran IK, Babu KN, Krishnamoorthy S, Guruswamy A, Queimado L, Chaudhuri G, Ramachandran I. Role of Inflammation in the Development of Colorectal Cancer. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. **2021**;21(1):77-90. doi: 10.2174/1871530320666200909092908.
- Nasierowska-Guttmejer A**. Zasady postępowania z materiałem operacyjnym u chorych na raka jelita grubego – standardowe i wysokospecjalistyczne badania dodatkowe w raku jelita grubego. *Pol J Pathol* **2014**; 65 (4) (suplement 1): S40-S50.
- Nebbia M**, Yassin NA, Spinelli A. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Colon Rectal Surg*. 2020 Sep;33(5):305-317. doi: 10.1055/s-0040-1713748.
- Ohtsuka J**, Oshima H, Ezawa I, Abe R, Oshima M, Ohki R. Functional loss of p53 cooperates with the in vivo microenvironment to promote malignant progression of gastric cancers. *Sci Rep*. **2018** Feb 2;8(1):2291. doi: 10.1038/s41598-018-20572-1.
- Olędzki J**. Chirurgiczne leczenie nowotworów jelita grubego. *Współczesna Onkologia* **2006**, 10 (3): 137-138.
- Olén O**, Erichsen R, Sachs MC, Pedersen L, Halfvarson J, Askling J, Ekblom A, Sørensen HT, Ludvigsson JF. Colorectal cancer in ulcerative colitis: a Scandinavian population-based cohort study. *Lancet*. **2020** Jan 11;395(10218):123-131. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32545-0.
- Ornelas A**, Zacharias-Millward N, Menter DG, Davis JS, Lichtenberger L, Hawke D, Hawk E, Vilar E, Bhattacharya P, Millward S. Beyond COX-1: the effects of aspirin on platelet biology and potential mechanisms of chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev*. **2017** Jun;36(2):289-303. doi: 10.1007/s10555-017-9675-z.
- Pantziarka P**, Verbaanderd C, Sukhatme V, Rica Capistrano I, Crispino S, Gyawali B, Rooman I, Van Nuffel AM, Meheus L, Sukhatme VP, Bouche G. ReDO_DB: the repurposing drugs in oncology database. *Ecancermedicalscience*. **2018** Dec 6;12:886. doi: 10.3332/ecancer.2018.88

- Parol G**, Ścibosz A, Cacko A. Przedoperacyjna ocena kardiologiczna pacjentów poddawanych operacjom pozasercowym. *Folia Cardiologica* **2016**; 11, 1: 66–74; DOI: 10.5603/FC.2016.0009.
- Peng X**, Li J, Tan S, Xu M, Tao J, Jiang J, Liu H, Wu B. COX-1/PGE2/EP4 alleviates mucosal injury by upregulating β -arr1-mediated Akt signaling in colitis. *Sci Rep.* **2017** Apr 21;7(1):1055. doi: 10.1038/s41598-017-01169-6.
- Porru M**, Zizza P, Panera N, Alisi A, Biroccio A, Leonetti C. Harnessing Omics Approaches on Advanced Preclinical Models to Discovery Novel Therapeutic Targets for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* **2020** Jul 8;12(7):1830. doi: 10.3390/cancers12071830.
- Potrykus M**, Czaja-Stolc S, Stankiewicz M, Kaska Ł, Małgorzewicz S. Intestinal Microbiota as a Contributor to Chronic Inflammation and Its Potential Modifications. *Nutrients.* **2021** Oct 28;13(11):3839. doi: 10.3390/nu13113839
- Punt CJ**, Koopman M, Vermeulen L. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017 Apr;14(4):235-246. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.171.
- Rawa T**. Doustne preparaty kwasu 5-aminosalicylowego w leczeniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. *Gastroenterologia Kliniczna* 2012, tom 4, nr 3, 98–104
- Rawla P**, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol.* **2019**;14(2):89-103. doi: 10.5114/pg.2018.81072.
- Saini MK**, Vaiphei K, Sanyal SN. Chemoprevention of DMH-induced rat colon carcinoma initiation by combination administration of piroxicam and C-phycoyanin. *Mol Cell Biochem.* **2012** Feb;361(1-2):217-28. doi: 10.1007/s11010-011-1106-9
- Satapathy SR**, Topi G, Osman J, Hellman K, Ek F, Olsson R, Sime W, Mehdawi LM, Sjölander A. Tumour suppressor 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase induces differentiation in colon cancer via GLI1 inhibition. *Oncogenesis.* **2020** Aug 19;9(8):74. doi: 10.1038/s41389-020-00256-0.
- Sheng J**, Sun H, Yu FB, Li B, Zhang Y, Zhu YT. The Role of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Cancer. *Int J Med Sci.* **2020** Apr 27;17(8):1095-1101. doi: 10.7150/ijms.44439.
- Simmons DL**, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* **2004** Sep;56(3):387-437. doi: 10.1124/pr.56.3.3.
- Simon K**. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging.* **2016** Jul 19;11:967-76. doi: 10.2147/CIA.S109285.
- Sood R**, Flint-Ashtamker G, Borenstein D, Barki-Harrington L. Upregulation of prostaglandin receptor EP1 expression involves its association with cyclooxygenase-2. *PLoS One.* **2014** Mar 10;9(3):e91018. doi: 10.1371/journal.pone.0091018.
- Subbaramaiah K**, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem.* **1999** Apr 16;274(16):10911-5. doi: 10.1074/jbc.274.16.10911.

- Sung H**, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* **2021** May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
- Szczuka I**, Wierzbicki J, Serek P, Szczeńsiak-Sięga BM, Krzystek-Korpaczka M. Heat Shock Proteins HSPA1 and HSP90AA1 Are Upregulated in Colorectal Polyps and Can Be Targeted in Cancer Cells by Anti-Inflammatory Oxicams with Arylpiperazine Pharmacophore and Benzoyl Moiety Substitutions at Thiazine Ring. *Biomolecules.* **2021** Oct 27;11(11):1588. doi: 10.3390/biom11111588.
- Take Y**, Koizumi S, Nagahisa A. Prostaglandin E Receptor 4 Antagonist in Cancer Immunotherapy: Mechanisms of Action. *Front Immunol.* **2020** Mar 10;11:324. doi: 10.3389/fimmu.2020.00324.
- Takeuchi K**, Amagase K. Roles of Cyclooxygenase, Prostaglandin E2 and EP Receptors in Mucosal Protection and Ulcer Healing in the Gastrointestinal Tract. *Curr Pharm Des.* **2018**;24(18):2002-2011. doi: 10.2174/1381612824666180629111227.
- Tasaki Y**, Yamamoto J, Omura T, Noda T, Kamiyama N, Yoshida K, Satomi M, Sakaguchi T, Asari M, Ohkubo T, Shimizu K, Matsubara K. Oxicam structure in non-steroidal anti-inflammatory drugs is essential to exhibit Akt-mediated neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced cytotoxicity. *Eur J Pharmacol.* **2012** Feb 15;676(1-3):57-63. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.11.046
- Thélin C**, Sikka S. Epidemiology of Colorectal Cancer — Incidence, Lifetime Risk Factors Statistics and Temporal Trends. W R. Ettarh (Red.), *Screening for Colorectal Cancer with Colonoscopy.* IntechOpen **2015**. <https://doi.org/10.5772/61945>.
- Thyagarajan A**, Saylae J, Sahu RP. Acetylsalicylic acid inhibits the growth of melanoma tumors via SOX2-dependent-PAF-R-independent signaling pathway. *Oncotarget.* **2017** Jul 25;8(30):49959-49972. doi: 10.18632/oncotarget.18326.
- Tsai CS**, Luo SF, Ning CC, Lin CL, Jiang MC, Liao CF. Acetylsalicylic acid regulates MMP-2 activity and inhibits colorectal invasion of murine B16F0 melanoma cells in C57BL/6J mice: effects of prostaglandin F(2)alpha. *Biomed Pharmacother.* **2009**(63):522-7.
- Valle L**, Vilar E, Tavtigian SV, Stoffel EM. Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *J Pathol.* **2019** Apr;247(5):574-588. doi: 10.1002/path.5229.
- Vartiainen N**, Huang CY, Salminen A, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. Piroxicam and NS-398 rescue neurones from hypoxia/reoxygenation damage by a mechanism independent of cyclo-oxygenase inhibition. *J Neurochem.* **2001** Jan;76(2):480-9. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00065.x.
- Veettil SK**, Nathisuwan S, Ching SM, Jinatongthai P, Lim KG, Kew ST, Chaiyakunapruk N. Efficacy and safety of celecoxib on the incidence of recurrent colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Manag Res.* **2019** Jan 9;11:561-571. doi: 10.2147/CMAR.S180261.
- Vuik FE**, Nieuwenburg SA, Bardou M, Lansdorp-Vogelaar I, Dinis-Ribeiro M, Bento MJ, Zadnik V, Pellisé M, Esteban L, Kaminski MF, Suchanek S, Ngo O, Májek O, Leja M, Kuipers EJ, Spaander MC. Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut.* **2019** Oct;68(10):1820-1826. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317592.

- Wang B**, Wu L, Chen J, Dong L, Chen C, Wen Z, Hu J, Fleming I, Wang DW. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. **2021** Feb 26;6(1):94. doi: 10.1038/s41392-020-00443-w.
- Wang D**, Fu L, Sun H, Guo L, DuBois RN. Prostaglandin E2 Promotes Colorectal Cancer Stem Cell Expansion and Metastasis in Mice. *Gastroenterology*. **2015** Dec;149(7):1884-1895.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.064.
- Wang J**, Limburg D, Carter J, Mbalaviele G, Gierse J, Vazquez M. Selective inducible microsomal prostaglandin E(2) synthase-1 (mPGES-1) inhibitors derived from an oxicam template. *Bioorg Med Chem Lett*. **2010** Mar 1;20(5):1604-9. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.01.060
- Yin P**, Xu G. Metabolomics Toward Biomarker Discovery. *Methods Mol Biol*. **2017**;1619:467-475. doi: 10.1007/978-1-4939-7057-5_32.
- Zawacka-Pankau JE**. The Role of p53 Family in Cancer. *Cancers (Basel)*. **2022** Feb 6;14(3):823. doi: 10.3390/cancers14030823.
- Zhan X**, Long Y, Lu M. Exploration of variations in proteome and metabolome for predictive diagnostics and personalized treatment algorithms: Innovative approach and examples for potential clinical application. *J Proteomics*. **2018** Sep 30;188:30-40. doi: 10.1016/j.jprot.2017.08.020.
- Zhang Y**, Liu Y, Sun J, Zhang W, Guo Z, Ma Q. Arachidonic acid metabolism in health and disease. *MedComm (2020)*. **2023** Sep 20;4(5):e363. doi: 10.1002/mco2.363.
- Zhao Z**, Feng Q, Yin Z, Shuang J, Bai B, Yu P, Guo M, Zhao Q. Red and processed meat consumption and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. **2017** Sep 6;8(47):83306-83314. doi: 10.18632/oncotarget.20667.

15 ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 1. Zgoda Komisji Bioetycznej na zebranie oryginalnego materiału biologicznego, tj. krwi oraz fragmentów tkanek, od pacjentów z rakiem jelita grubego z Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego, z których uzyskano, odpowiednio, surowicę i cDNA wykorzystane w pracy doktorskiej.

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu
Ośrodka Badawczo – Rozwojowym
51 – 124 Wrocław ul. Kamieńskiego 73A tel. 71 32 70 125

KB/nr 1/rok 2012

Działając na podstawie art. 29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 wraz ze zm.), Zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1990 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i funkcjonowania oraz trybu działania Komisji Bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz. 480) oraz zgodnie z zasadami zawartymi w GCP (Good Clinical Practice) oraz w deklaracji Helsińskiej, Komisja Bioetyczna przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu Ośrodka Badawczo – Rozwojowym na posiedzeniu w dniu 26.06.2012 r. przeanalizowała wniosek, który złożył: *prof. dr hab. n. med. Wojciech Witkiewicz* w sprawie badania: **„Ocena i porównanie odpowiedzi zapalnej, immunologicznej i angiogennej u pacjentów z rakiem jelita grubego operowanych metodą robotową oraz tradycyjną metodą otwartą”**. Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz tajnego głosowania Komisja Bioetyczna podjęła uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku.

W oparciu o zasady prowadzenia badań zawarte w GCP Komisja Bioetyczna przypomina o zamieszczeniu w formularzu informacji dla pacjenta danych osobowych głównego badacza (Imię i Nazwisko) oraz członka zespołu badawczego, który uzyskał zgodę pacjenta na udział w badaniu. Podpis badacza winien być umieszczony obok podpisu pacjenta z datą uzyskania zgody. Dane osobowe członka zespołu badawczego i jego podpis powinny być również zawarte na każdym formularzu świadomej zgody badanego na poszczególne procedury związane z wykonaniem badań. Ponadto w informacji dla pacjenta należy podać sposób kontaktowania się z badaczem i ośrodkiem po okresie pobytu w Klinice.

Od niniejszej uchwały można się odwołać do odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu Ośrodka Badawczo – Rozwojowym, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej opinii.

Przewodniczący Komisji Bioetycznej
Prof. dr hab. Roman Jaworski

Otrzymują:

1. Wnioskodawca Projektu
2. Kierownik jednostki w której projekt będzie realizowany