



**UNIwersYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2023 r.



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Marlena Budek

Ocena zależności między melatoniną, sekrecją wybranych adipokin, a wykładnikami stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w przebiegu nowotworów neuroendokrynych.

Nowe, potencjalne markery diagnostyczne.

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

Dr hab. n. med. Karolina Szewczyk-Golec, prof. UMK

Bydgoszcz rok 2023

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowanie
Pani dr hab. n. med. Karolinie Szewczyk-Golec, prof. UMK
za nieocenioną pomoc w trakcie przygotowywania pracy doktorskiej,
za cierpliwość, wyrozumiałość oraz merytoryczne wsparcie,
na które zawsze mogłam liczyć.*

Marlena Budek

Spis treści

I. Wstęp	13
1. Charakterystyka nowotworów neuroendokrynnych	13
1.1. Epidemiologia i etiologia	13
1.2. Klasyfikacja NENs.....	17
1.3. Diagnostyka	19
1.3.1. Diagnostyka biochemiczna	20
1.3.2. Diagnostyka obrazowa	26
1.3.3. Diagnostyka patomorfologiczna.....	28
1.4. Leczenie	30
2. Stan zapalny.....	32
2.1. Stan zapalny w kancerogenezie	34
2.2. Rola stanu zapalnego w NENs	44
3. Stres oksydacyjny	45
3.1. Stres oksydacyjny a stan zapalny i nowotworzenie	47
3.2. Mechanizmy antyoksydacyjne	49
3.2.1. Enzymatyczne mechanizmy antyoksydacyjne.....	49
3.2.2. Nieenzymatyczne mechanizmy antyoksydacyjne	50
3.3. Melatonina	50
4. Endokrynną funkcją tkanki tłuszczowej.....	53
4.1. Tkanka tłuszczowa.....	53
4.2. Otyłość.....	54
4.3. Stan zapalny w otyłości	55
4.4. Adipokiny.....	56
4.4.1. Wybrane adipokiny prozapalne	56
4.4.2. Wybrane adipokiny przeciwzapalne	59
4.5. Endokrynną funkcją tkanki tłuszczowej w otyłości a stres oksydacyjny.....	61
4.6. Otyłość a procesy nowotworzenia	62

II. Cel pracy.....	64
III. Materiał i metody.....	66
1. Charakterystyka grupy badanej.....	66
2. Materiał do badań	68
2.1. Pozyskiwanie osocza krwi i masy erythrocytarnej	68
2.2. Pozyskiwanie surowicy krwi	69
3. Metody badań	71
3.1. Oznaczenie stężenia hemoglobiny w erythrocytach.....	71
3.2. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD-1, E.C.1.15.1.1) w erythrocytach	72
3.3. Oznaczenie aktywności katalazy (CAT, E.C. 1.11.1.6) w erythrocytach	73
3.4. Oznaczenie aktywności cytozolowej peroksydazy glutationowej (GPx, E.C. 1.11.1.9) w erythrocytach	73
3.5. Oznaczenie stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w osoczu i w erythrocytach.....	75
3.6. Ilościowe oznaczenie chromograniny A.....	76
3.7. Ilościowe oznaczenie melatoniny.....	77
3.8. Ilościowe oznaczenie omentyny-1	78
3.9. Ilościowe oznaczenie adipokin, parametrów związanych z metabolizmem węglowodanowym oraz parametrów stanu zapalnego przy użyciu zestawów Bio-Plex Pro Human Diabetes 10-plex Panel oraz Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel	79
4. Analiza statystyczna.....	82
IV. Wyniki.....	83
1. Analiza parametrów antropometrycznych u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi oraz w grupie osób zdrowych.....	83
2. Analiza parametrów stresu oksydacyjnego u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi oraz w grupie osób zdrowych.....	85

3. Analiza parametrów diabetologicznych u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi oraz w grupie osób zdrowych.....	88
4. Analiza stężeń wybranych adipokin oraz chromograniny A u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi oraz w grupie osób zdrowych.....	91
5. Analiza parametrów stanu zapalnego pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi oraz w grupie osób zdrowych.....	94
6. Analiza ANOVA	107
7. Korelacje	111
8. Analiza krzywych ROC.....	112
9. Wzór logiczny modelu regresji	126
V. Dyskusja.....	128
1. Analiza stresu oksydacyjnego w nowotworach neuroendokrynnych o różnej lokalizacji	130
1.1. Analiza procesu peroksydacji lipidów oraz enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej w nowotworach neuroendokrynnych o różnej lokalizacji	130
1.2. Analiza stężenia melatoniny w nowotworów neuroendokrynnych o różnej lokalizacji	135
2. Analiza wybranych parametrów diabetologicznych w nowotworach neuroendokrynnych o różnej lokalizacji.....	138
3. Analiza BMI oraz stężenia wybranych adipokin w nowotworach neuroendokrynnych o różnej lokalizacji	144
4. Analiza parametrów stanu zapalnego w nowotworach neuroendokrynnych o różnej lokalizacji	148
5. Analiza stężenia CgA w nowotworach neuroendokrynnych o różnej lokalizacji	151
6. Analiza krzywych ROC.....	154
7. Wzór predykcji nowotworów neuroendokrynnych	155
8. Podsumowanie	157
VI. Wnioski.....	158

VII. Streszczenie.....	160
VIII. Summary	164
IX. Spis Tabel.....	168
X. Spis Rycin.....	170
XI. Piśmiennictwo	172
XII. Zgoda Komisji Bioetycznej.....	239

Wykaz skrótów użytych w pracy

- [18F]FDG - 18F-fluorodeoksyglukoza, (ang. *18F-fluorodeoxyglucose*)
- 4-HNE - 4-hydroksynonenal, (ang. *4-hydroxynonenal*)
- 5-HIAA - kwas 5-hydroksyindolooctowy, (ang. *5-hydroxyindoleacetic acid*)
- 8-OhdG - 8-hydroksy-2-deoksyguanozyna, (ang. *8-hydroxy-2-deoxyguanosine*)
- 8-oksodG – 8-okso-7,8-dihydrodeoksyguanozyna, (ang. *8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine*)
- AC – atypowy rakowiak, (ang. *atypical carcinoid*)
- ACTH - hormon adrenokortykotropowy, (ang. *adrenocorticotropic hormone*)
- ADH - hormon antydiuretyczny, (ang. *antidiuretic hormone*)
- AFMK - N1-acetylo-N2-formylo-5-metoksykynuramina, (ang. *N(1)-acetyl-N(1)-formyl-5-methoxykynuramine*)
- ALI - wskaźnik stanu zapalnego zaawansowanego raka płuca, (ang. *advanced lung cancer inflammation index*)
- AMK - N-acetylo-5-metoksykynuramina, (ang. *N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine*)
- AMPK – kinaza białkowa aktywowana przez AMP, (ang. *5'AMP-activated protein kinase*)
- APUD – wychwyt i dekarboksylacja prekursorów amin, (ang. *amine precursore uptake and decarboxylation*)
- AUC - pole pod krzywą, (ang. *area under curve*)
- BAT – brązowa tkanka tłuszczowa, (ang. *brown adipose tissue*)
- Bcl-2 – białko chłoniaka z komórek B, (ang. *B-cell lymphoma 2*)
- bFGF - podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów, (ang. *basic fibroblast growth factor*)
- BHT - butylowany hydroksytoluen, (ang. *butylated hydroxytoluene*)
- BMI - wskaźnik masy ciała, (ang. *body mass index*)
- BPDE - epoksyd benzo(a)pirenodiolu
- CaM - kalmodulina, (ang. *calmodulin*)
- cAMP - cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan, (ang. *3'5'-cyclic adenosine monophosphate*)
- CAT – katalaza, (ang. *catalase*)
- CDX2 - homeobox typu ogonowego 2, (ang. *caudal type homeobox 2*)
- CEA – antygen karcynoembrionalny, (ang. *carcinoembryonic antigen*)
- CgA – chromogranina A, (ang. *chromogranin A*)

cGAS- cykliczna syntaza GMP-AMP, (ang. *cyclic GMP-AMP synthase*)

CgB - chromogranina B, (ang. *chromogranin B*)

COX2 – cyklooksyzgenaza, (ang. *cyclooxygenase*)

CRP - białko C-reaktywne, (ang. *C-reactive protein*)

CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii, (ang. *colony-stimulating factor*)

CT - tomografia komputerowa, (ang. *computed tomography*)

CTACK/CCL27 - skórna chemokina przyciągająca limfocyty T, (ang. *cutaneous T-cell-attracting chemokine*)

DNES – rozproszony układ neuroendokryny, (ang. *diffuse neuroendocrine systems*)

DZM – dobowa zbiórka moczu

EGFR – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu, (EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor*)

ELISA - test immunoenzymatyczny, (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ELR - motyw aminokwasowy Glu-Leu-Arg w chemokinach (kwas glutaminowy-leucyna-arginiana)

EMT - przejście nabłonkowo-mezenchymalne, (ang. *epithelial-to-mesenchymal transition*)

ENETS - Europejskie Towarzystwo ds. Nowotworów Neuroendokrynych, (ang. *European Neuroendocrine Tumor Society*)

ER - receptor estrogenowy, (ang. *estrogen receptor*)

Erk – kinaza regulowana szlakiem zewnątrzkomórkowym, (ang. *extracellular signal-regulated kinases*)

EUS – ultrasonografia endoskopowa, (ang. *endoscopic ultrasonography*)

fAd – adiponektyna pełnej długości, (ang. *full-length adiponectin*)

FDA - Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków, (ang. *Food and Drug Administration*)

FGP – wartości glukozy na czczo, (ang. *fasting plasma glucose*)

G-CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów, (ang. *granulocyte colony-stimulating factor*)

GEP-NET – guz neuroendokryny żołądkowo-jelitowo-trzustkowy, (ang. *gastroenteropancreatic tumor*)

GIP - glukozeozależny peptyd insulinotropowy, (ang. *glucose-dependent insulinotropic peptide*)

GLP-1 - glukagonopodobny peptyd 1, (ang. *glucagon-like peptide-1*)

GM-CSF - czynnik stymulujący tworzenie granulocytów i makrofagów, (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GPx - peroksydaza glutationowa, (ang. *glutathione peroxidases*)

GR - reduktaza glutationowa, (ang. *glutathione reductase*)

GRO- α - onkogen regulowany wzrostem, (ang. *growth regulated oncogene*)

GSH – zredukowany glutation, (ang. *reduced glutathione*)

GSSG – utleniony disulfid glutationu, (ang. *glutathione disulfide*)

HbA1c – hemoglobina glikowana

hCG – ludzka gonadotropina kosmówkowa, (ang. *human chorionic gonadotropin*)

HDL – lipoproteina o wysokiej gęstości, (ang. *high-density lipoprotein*)

HGF - czynnik wzrostu hepatocytów, (ang. *hepatocyte growth factor*)

HIF-1 - czynnik indukowany hipoksją, (ang. *hypoxia-inducible factor-1*)

HMW – wysoka masa cząsteczkowa, (ang. *high molecular weight*)

HPV - wirus brodawczaka ludzkiego, (ang. *human papillomavirus*)

HRP - peroksydaza chrzanowa, (ang. *horseradish peroxidase*)

IARC - Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem, (ang. *International Agency for Research on Cancer*)

ICAM-1 - cząsteczka adhezji międzykomórkowej, (ang. *intercellular adhesion molecule*)

IFN – interferon, (ang. *interferon*)

IGF-I – insulinopodobny czynnik wzrostu, (ang. *insulin-like growth factor I*)

IL – interleukina, (ang. *interleukin*)

IL-1ra – antagonist receptor IL-1, (*interleukin-1 receptor antagonist*)

IOUS - ultrasonografia śródoperacyjna, (ang. *intraoperative ultrasound*)

IP-10 - indukowane interferonem γ białko 10kDa, (ang. *interferon γ -induced protein 10 kDa*)

IR – insulinooporność, (ang. *insulin resistance*)

IRMA - test immunoradiometryczny, (ang. *immunoradiometric assay*)

Isl-1 – białko wzmacniające gen insuliny Isl-1, (ang. *insulin gene enhancer protein islet 1*)

Jak - kinaza Janusa, (ang. *Janus kinase*)

JNK – kinaza białkowa c-Jun, (ang. *c-Jun N-terminal kinase*)

K₂EDTA - wersenian dipotasowy, sól dipotasowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego

Keap1 – cząsteczka cytoplazmatyczna, białko związane z ECH (ang. *Kelch-like ECH-associated protein*)

K-RAS – wirus mięsaka szczurów Kirsten, (ang. *Kirsten rat sarcoma virus*)

LADA – późno ujawniająca się cukrzyca typu 1 u dorosłych, (ang. *latent autoimmune diabetes in adults*)

LANA – antygen jądrowy związany z latencją, (ang. *latency-associated nuclear antigen*)

LCNEC - rak neuroendokryny wielkokomórkowy, (ang. *large cell neuroendocrine carcinoma*)

LDH - dehydrogenaza mleczanowa, (ang. *lactate dehydrogenase*)

LDL - lipoproteina o niskiej gęstości, (ang. *low-density lipoprotein*)

Lgr5 – receptor sprzężony z białkiem G bogaty w leucynę, (ang. *leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*)

LIF - czynnik hamujący białaczkę, (ang. *leukemia inhibitory factor*)

LIPI - immunologiczny wskaźnik prognostyczny płuc, (LIPI, ang. *lung immune prognostic index*)

LMP1 - utajone białko błonowe wirusa Eppsteina-Barr, (ang. *Epstein-Barr virus latent membranę protein 1*)

LMW - niska masa cząsteczkowa, (ang. *low molecular weight*)

LNEN – nowotwór neuroendokryny płuca, (ang. *lung neuroendocrine neoplasm*)

LPO - peroksydacja lipidów, (ang. *lipid peroxidation*)

LX – lipoksyny, (ang. *lipoxins*)

M1G - pirymido[1,2-a]puryn-10(3H)-on, (ang. *pirymido[1,2-a]purin-10(3H)-one*)

MAPK - kinaza białkowa aktywowana mitogenem, (ang. *mitogen-activated protein kinase*)

MaR - marezyny (ang. *maresins*)

MCP-1 - białko chemotaktyczne monocytów 1, (ang. *monocyte chemotactic protein 1*)

M-CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów, (ang. *macrophage colony stimulating factor*)

MDA - dialdehyd malonowy, (ang. *malondialdehyde*)

MEL – melatonina, (ang. *melatonin*)

MEN - mnoga gruczolakowatość wewnątrzwydzielnicza, (ang. *multiple endocrine neoplasia*)

MetS - zespół metaboliczny, (ang. *metabolic syndrome*)

MFI - mediana intensywności fluoroscencyjnej, (ang. *median fluorescence intensity*)

MIB - przeciwciało mysie anty-ludzkie

MIF - czynnik hamujący migrację makrofagów, (ang. *macrophage migration inhibitory factor*)

MIG - monokina indukowana przez interferon γ , (ang. *monokine induced by interferon- γ*)

MiNENs - mieszane nowotwory neuroendokrynno-nieneuroendokrynne,, (ang. *mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine neoplasms*)

MIP-1 α - makrofagowe białko zapalne 1 α , (ang. *macrophage inflammatory protein 1 alpha*)

MMW – średnia masa cząsteczkowa, (ang. *middle molecular weight*)

MODY – cukrzyca wieku dojrzałego u młodych, (ang. *maturity onset diabetes of the young*)

MRI - rezonans magnetyczny, (ang. *magnetic resonance imaging*)

mTOR - ssaczy cel rapamycyny, (ang. *mammalian target of rapamycin*)

NAD - dinukleotyd nikotynamidoadeninowy, (ang. *nicotinamide dinucleotides*)

NADPH - zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NAMPT - fosforybozylotransferaza nikotynamidu (ang. *nicotinamide phosphoribosyltransferase*)

NEC - rak neuroendokryny, (ang. *neuroendocrine carcinoma*)

NEN – nowotwór neuroendokryny, (ang. *neuroendocrine neoplasm*)

NESP-55 - neuroendokryne białko sekrecyjne, (ang. *neuroendocrine secretory protein 55*)

NET – guz neuroendokryny, (ang. *neuroendocrine tumor*)

NF-pNET – niefunkcyjalny nowotwór neuroendokryny trzustki, (ang. *non-functional pancreatic neuroendocrine tumors*)

NF- κ B - czynnik jądrowy kappa B, (ang. *nuclear factor kappa B*)

NK – naturalni „zabójcy”, (ang. *natural killer*)

NLR - stosunek liczby neutrofilów do limfocytów, (ang. *neutrophil-lymphocyte ratio*)

NME - nekrolityczny rumień wędrujący, (ang. *necrolytic migratory erythema*)

NOS - syntaza tlenku azotu, (ang. *nitric oxide synthase*)

NRC – Norweski Rejestr Nowotworów, (ang. *Norwegian Registry of Cancer*)

Nrf2 - jądrowy czynnik erytroidowy, (ang. *nuclearerythroid2-related factor*)

NSCLC – niedrobnokomórkowy rak płuca, (ang. *non-small cell lung cancer*)

NSE - enolaza swoista dla neuronów, (ang. *neuron-specific enolase*)

OIS - starzenie indukowane onkogenem, (OIS, ang. *oncogene-induced senescence*)

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PAI-1 - inhibitor aktywatora plazminogenu, (ang. *plasminogen activator inhibitor*)

PAX 6/8 - sparowane geny pudełkowe 6/8, (ang. *paired box genes 6/8*)

PBEF - czynnik stymulujący kolonie komórek pre-B, (ang. *pre-B-cell colony-enhancing factor*)

PBS - zbuforowany roztwór soli fizjologicznej, (ang. *phosphate buffered saline*)

PCTR - koniugaty protektyny w regeneracji tkanek, (ang. *protectin conjugates in tissue regeneration*)

PD1 - protektyny D1, (ang. *protectin D1*)

PDGF - płytkopochodny czynnik wzrostu, (ang. *platelet-derived growth factor*)

PD-L1 - ligand zaprogramowanej śmierci 1, (ang. *programmed death ligand-1*)

PDX-1 - homeobox specyficzny dla trzustki i komórek β , (ang. *pancreatic and duodenal homeobox 1*)

PET - pozytonowa tomografia emisyjna, (ang. *positron emission tomography*)

PI3K – 3-kinaza fosfoinozytolu, (ang. *phosphoinositide 3-kinase*)

PLR – stosunek liczby płytek krwi do limfocytów, (ang. *platelet-lymphocyte ratio*)

pNEN – nowotwór neuroendokryny trzustki, (ang. *pancreatic neuroendocrine tumors*)

PP - polipeptyd trzustkowy, (ang. *pancreatic polypeptide*)

PPIs- inhibitor pompy protonowej, (ang. *proton pump inhibitor*)

PRR – receptor rozpoznawania wzorców, (ang. *pattern-recognition receptors*)

PRRT - terapia radionuklidami receptorów peptydowych, (ang. *peptide receptor radionuclide therapy*)

PSQI – kwestionariusz jakości snu Pittsburgh, (ang. *Pittsburgh Sleep Quality Index*)

PVAT - okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa, (ang. *perivascular adipose tissue*)

RALBP1 - wieloswoiste białko transportowe, (ang. *Ral-binding protein1*)

RANTES – czynnik regulowany przez aktywację, ekspresja i wydzielanie przez prawidłowe limfocyty T, (ang. *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*)

RIA – test radioimmunologiczny, (ang. *radioimmunoassay*)

RNS – reaktywne formy azotu (ang. *reactive nitrogen species*)

ROC – krzywe charakterystyki działania odbiornika, (ang. *receiver operating characteristic*)

ROR - retinoidowy receptor sierocy (ang. *retinoid orphan receptors*)

ROS – reaktywne formy tlenu, (ang. *reactive oxygen species*)

RSS - reaktywne formy siarki, (ang. *reactive sulphur species*)

RVS – rezolwiny, (ang. *resolvins*)

RZR - retinoidowy receptor z (ang. *retinoid z receptor*)

SA - analogi somatostatyny, (ang. *somatostatin analogues*)

SA-PE - streptawidyna-fikoerytryna

SASP - fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem się, (ang. *senescence-associated secretory phenotype*)

SCF - czynnik komórek macierzystych, (ang. *stem cell factor*)

SCGF- β - czynnik wzrostu komórek macierzystych), (ang. *stem cell growth factor*)

SCLC - rak drobnokomórkowy, (ang. *small cell carcinoma*)

SCN - jądro nadskrzyżowaniowe w podwzgórzu, (ang. *suprachiasmatic nucleus*)

SCNEC – rak neuroendokrynnny drobnokomórkowy, (ang. *small cell neuroendocrine carcinoma*)

SDF-1 α - czynnik pochodzący z komórek zrębu, (ang. *stromal cell-derived factor*)

SEER - Program Nadzoru, Epidemiologii i Wyników Końcowych, (ang. *Surveillance Epidemiology End Results Programme*)

SFRP5 - rozpuszczalne białko hamujące drogę przekazu sygnału Wnt, (ang. *soluble frizzled-related protein 5*)

SI-NET – guz neuroendokrynnny jelita cienkiego, (ang. *small intestinal neuroendocrine tumors*)

SOD - dysmutaza ponadtlenkowa, (ang. *superoxide dismutases*)

SPECT – tomografia emisyjna pojedynczych fotonów, (ang. *single photon emission computed tomography*)

SPM – wyspecjalizowany mediator pro-rozdzielczy, (ang. *specialized pro-resolving mediator*)

SPY – synaptofizyna, (ang. *synaptophysin*)

SRI - obrazowanie receptora somatostatyny, (ang. *somatostatin receptor imaging*)

SRS - scyntygrafia receptora somatostatynowego, (SRS, ang. *somatostatin receptor scintigraphy*)

SSTR - receptor somatostatynowy, (ang. *somatostatin receptor*)

STAT - przetwornik i aktywator transkrypcji, (ang. *signal transducer and activator of transcription*)

STING - stymulator genów interferonu, (STING, ang. *stymulator of interferon genes*)

SUV - standaryzowane wartości wychwyty, (ang. *standarized uptake values*)

TAM – makrofag związany z nowotworem, (ang. *tumor-associated macrophage*)

TBA – kwas tiobarbiturowy, (ang. *2-thiobarbituric acid*)

TBARS – substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym, (ang. *thiobarbituric acid reactive substances*)

TC – typowy rakowiak, (ang. *typical carcinoid*)

TCA – kwas trójchlorooctowy, (ang. *trichloroacetic acid*)

TGF - transformujący czynnik wzrostu, (ang. *transforming growth factors*)

Th – komórka T pomocnicza, (ang. *T-helper cell*)

TLR – receptory Toll-podobne, (ang. *Toll-like receptor*)

TMB – 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna, (ang. *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*)

TME - mikrośrodowisko guza, (ang. *microenvironment tumor*)

TNF - czynnik martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor*)

TRACE – test czasowo rozdzielczej amplifikowanej emisji transkryptu, (ang. *time-resolved amplified cryptate emission*)

TRAIL - ligand indukujący apoptozę związany z TNF, (ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*)

Treg - limfocyty T regulatorowe, (ang. *regulatory T cells*)

TTF-1 - czynnik transkrypcyjny tarczycy 1, (ang. *thyroid transcription factor 1*)

UCP-1 – białko rozprzegające 1, (ang. *uncoupling protein 1*)

USG – ultrasonografia, (ang. *ultrasonography*)

UV – ultrafiolet, (ang. *ultraviolet*)

VCAM - cząsteczka adhezji komórkowej naczyń, (ang. *vascular cel adhesion molecule 1*)

VEGF - czynnik wzrostu śródbłónka naczyń, (ang. *vascular endothelial growth factor*)

VHL - zespół von Hippel-Lindau, (ang. *von Hippel Linadu syndrome*)

VIP – wazoaktywny peptyd jelitowy, (ang. *vasoactive intestinal peptide*)

WAT - biała tkanka tłuszczowa, (ang. *white adipose tissue*)

WCRF - Światowy Funduszu Badań nad Rakiem, (ang. *World Cancer Research Fund*)

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

β -NGF - czynnik wzrostu nerwów β , (ang. *nerve growth factor β*)

I. Wstęp

1. Charakterystyka nowotworów neuroendokrynych

1.1. Epidemiologia i etiologia

Nowotwory neuroendokryne (NENs, ang. *neuroendocrine neoplasms*.) stanowią heterogenną grupę nowotworów wywodzących się z komórek rozproszonego w całym organizmie układu neuroendokrynego (DNES, ang. *diffuse neuroendocrine system*) [1]. Nowotwory te zostały po raz pierwszy opisane przez Siegfrieda Oberndorfera w 1907 roku jako rakowiaki [2]. W 1953 roku Fred Lembeck ustalił, iż komórki rakowiaka uwalniają serotoninę [2]. NENs charakteryzują się zdolnością do wytwarzania, przechowywania i wydzielania bioaktywnych peptydów i amin biogennych w odpowiedzi na bodźce nerwowe, chemiczne i inne [3]. Nowotwory te zostały uznane za rzadkie przypadki, jednak baza danych dotycząca nowotworów w USA – Program Nadzoru, Epidemiologii i Wyników Końcowych (SEER, ang. *Surveillance Epidemiology End Results Programme*) wskazuje na wzrost częstości występowania guzów neuroendokrynych o 37-40% w latach 2000-2004 w porównaniu z 1993-1997, natomiast w tym samym czasie Norweski Rejestr Nowotworów (NRC, ang. *Norwegian Registry of Cancer*) odnotował wzrost liczby tych nowotworów o 72% [4]. Dane epidemiologiczne USA podają, iż roczna zachorowalność na NENs skorygowana względem wieku wynosiła 1,09 przypadków/100000/rok w 1973 roku i wzrosła do 6,98 przypadków/100000/rok do roku 2012 [5]. Według rejestrów SEER (2000-2012) najwyższe wskaźniki zapadalności na NENs wynosiły 3,56/100000 dla guzów żołądkowo-jelitowo-trzustkowych (GEP-NETs, ang. *gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*), 1,49/100000/rok dla lokalizacji w płucu oraz 0,84/100000/rok dla NENs o nieznanym ognisku pierwotnym [5]. Na przykładzie Anglii można wykazać tendencję wzrostową zapadalności na NENs, ponieważ standaryzowany względem wieku współczynnik zapadalności na te nowotwory w 2001 roku w tym kraju wynosił 3,9/100000/rok, a w 2015 wzrósł do 8,84/100000/rok [6]. W ramach badania populacyjnego na podstawie programu SEER (2000-2014) w USA dostrzeżono również zależność występowania NENs od różnic rasowych [7,8]. Badania te wykazały, iż rasa czarna ma wyższe wskaźniki zapadalności na NENs w porównaniu

z innymi rasami, przy czym najczęstszą lokalizacją jest odbytnica, a rasa biała najczęściej zapada na NENs płuca [8]. Z danych epidemiologicznych wynika, iż najczęściej guzy pierwotne umiejscowione są w narządach układu pokarmowego i trzustce (62-67%) oraz w układzie oskrzelowo-płucnym (22-27%), a NENs z chorobą przerzutową to 12-22% [9]. Rzadziej NENs mogą rozwinąć się również w innych narządach, tj. w piersi, sterczu, grasicy, skórze, jajniku, sromie, nerce, ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), tarczycy, czy w pozawątrobowych drogach żółciowych [10,11]. Pięcioletnie przeżycie, które związane jest przede wszystkim ze stopniem zaawansowania choroby, wynosi 93% w chorobie miejscowej, 74% w chorobie regionalnej oraz 19% w chorobie przerzutowej [9]. Na podstawie krajowych baz danych dotyczących nowotworów widoczny jest wzrost wskaźników zachorowalności na GEP-NETs, przy czym ich rozmieszczenie różni się regionalnie [12]. Najbardziej rozpowszechnionymi NETs w Ameryce Północnej są guzy jelita cienkiego i odbytnicy, w Azji NETs odbytnicy i trzustki, a w Europie NETs jelita cienkiego i trzustki [12].

Guzy neuroendokrynne oskrzelowo-płucne wywodzą się z komórek nabłonka oskrzeli zwanych komórkami Kulchitsky'ego (komórki argentafinowe) i klasyfikowane są według cech morfologicznych, immunohistochemicznych i molekularnych [13]. Charakteryzują się aktywnością wydzielniczą oraz zdolnością do wychwytywania i dekarboksylacji prekursorów amin (komórki układu APUD, ang. *amine precursore uptake and decarboxylation*) [14]. Klasyfikacja nowotworów neuroendokrynnych płuca Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) z 2004 roku charakteryzuje 4 podtypy tego rodzaju nowotworów, od mało aktywnych rakowiaków do agresywnych guzów o wysokim stopniu złośliwości. Wśród nich wyróżnia się: typowy rakowiak (TC, ang. *typical carcinoid*), atypowy rakowiak (AC, ang. *atypical carcinoid*), rak neuroendokryny wielkokomórkowy (LCNEC, ang. *large cell neuroendocrine carcinoma*) i rak drobnokomórkowy (SCLC, ang. *small cell carcinoma*) [15]. Rakowiaki oskrzeli stanowią 10% wszystkich rakowiaków i ok. 4% wszystkich nowotworów płuca [16]. LCNEC występuje w 3% przypadków raka płuca, natomiast SCLC w ok. 15-20% przypadków [13,17].

NENs uważane są za nowotwory występujące rzadko, jednakże w ostatnich dziesięcioleciach nastąpił znaczny wzrost ich występowania, który dotyczył głównie nowotworów neuroendokrynnych żołądka i odbytnicy [5]. Przyczyny wzrostu częstości występowania NENs są wieloczynnikowe [18]. Wśród nich można wyróżnić wpływ środowiska zewnętrznego, zmiany w diecie, ale również zwiększony dostęp do badań przesiewowych

i endoskopowych, użycie czulszych metod diagnostycznych, postępy w ocenie histologicznej guzów neuroendokrynych, czy wzrost świadomości lekarzy [18,19]. Pomimo niewątpliwego postępu w zakresie wykrywalności tego typu nowotworów, nie można wykluczyć rzeczywistego wzrostu zachorowalności. Guzy pierwotne zwykle są niewielkie i nie dają objawów do czasu wystąpienia przerzutów, co opóźnia diagnozę i podjęcie skutecznej terapii nawet o 5-7 lat [19]. Zdecydowana większość NENs wykrywana jest z powodu niedrożności jelita, objawów płucnych, miejscowego wzrostu, czy w wyniku przerzutów odległych do wątroby i węzłów chłonnych, przy czym ok. 50% GEP-NETs wykrywa się przypadkowo podczas zabiegów chirurgicznych [20,21]. Zarówno amerykańskie, jak i europejskie rejestry nowotworów podają, iż 30-7% pacjentów ma przerzuty w momencie rozpoznania [22].

Etiologia guzów neuroendokrynych nie jest do końca poznana, ale niektóre zespoły genetyczne predysponują do ich występowania, mianowicie: mnoga gruczolakowatość wewnątrzwydzielnicza typu 1 (MEN1, ang. *multiple endocrine neoplasia type 1*), mnoga gruczolakowatość wewnątrzwydzielnicza typu 2 (MEN2, ang. *multiple endocrine neoplasia type 2*), zespół von Hippel-Lindau (VHL, ang. *von Hippel-Lindau syndrome*), neurofibromatoza typu 1 oraz stwardnienie guzowate [23]. Występowanie NETs w przypadku podłoża genetycznego jest często wielogniskowe, a początek choroby ujawnia się nawet 20 lat wcześniej niż w przypadku pojedynczego guza [24]. Obraz kliniczny choroby zależy od lokalizacji i charakteru guza neuroendokrynego, gdyż występują guzy funkcjonalne oraz niefunkcjonalne, czyli nieczynne hormonalnie [25]. Najczęściej występujące NENs, które manifestują objawy kliniczne i uwalniają charakterystyczne substancje hormonalne, to gastrinoma (12%), insulinoma (15%), glukagonoma (1,2%), VIPoma (1,4%), somatostatinoma (0,5%), natomiast najbardziej charakterystyczne zespoły kliniczne w przypadku NENs to zespół rakowiaka, zespół Zollingera-Elisona i zespół Venera-Morrisona [26–28]. NENs uwalniają do krążenia ok. 40 rodzajów biologicznie czynnych amin i peptydów, wśród których wyróżnia się histaminę, kalikreinę, prostaglandyny, tachykininy, a za większość cech klinicznych odpowiada serotonina, będąca metabolitem tryptofanu [29]. Podłoże patofizjologiczne zespołu rakowiaka dotyczy wysokozróżnicowanych guzów neuroendokrynych (głównie NETs jelita środkowego, ok. 4-10% przypadków) i opiera się na uwalnianiu wyżej wymienionych amin biogennych bezpośrednio do krążenia [30]. Ze względu na obecność przerzutów w wątrobie lub nieprawidłową jej czynność substancje te nie mogą być tam inaktywowane i trafiają do krążenia ogólnego [22]. Klasyczne objawy zespołu rakowiaka, na które najczęściej skarżą się

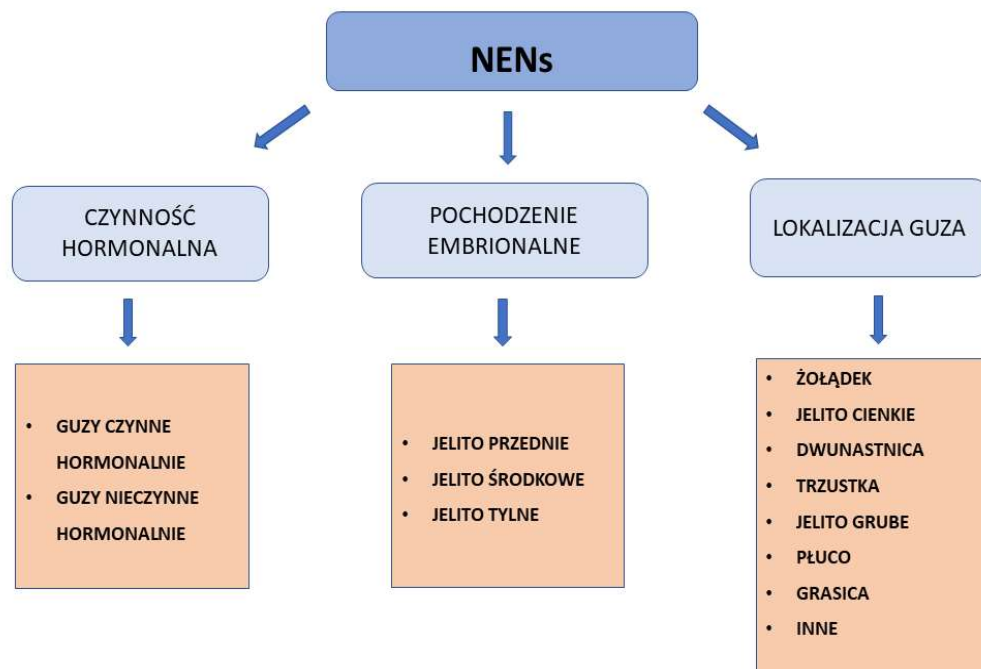
pacjenci, to zaczerwienienie z niedociśnieniem i tachykardią, biegunka i świszczący oddech, związany ze skurczem oskrzeli [31,32]. Zaczerwienienie spowodowane jest uwalnianiem serotoniny, substancji P, katecholamin i histaminy, które mają działanie rozszerzające naczynia krwionośne [33,34]. Zaczerwienienie może obejmować twarz, szyję, górną część tułowia i przybierać odcień fioletowy lub od bladoróżowego do czerwonego, w zależności od lokalizacji guza [35]. W początkowych etapach choroby zaczerwienienie i uderzenia gorąca wywoływane są spożyciem alkoholu lub produktami zawierającymi tyraminę (np. ser pleśniowy, czekolada, czerwona kiełbasa) i po kilku minutach ustępują, natomiast z czasem występują spontanicznie [35,36]. W przebiegu NENs metabolizm tryptofanu do serotoniny zwiększa się nawet o 70%, co prowadzi do niedoboru tryptofanu, niacyny i rozwoju pelagry [37,38]. Zwiększone stężenie serotoniny powoduje pobudzenie motoryki i funkcji sekrecyjnej jelita, dlatego biegunki występujące u chorych są określane jako wydzielnicze i występują sporadycznie, jednak nieleczone mogą stanowić problem przewlekły [37,39]. Skurcz oskrzeli w przebiegu NENs najprawdopodobniej jest wynikiem działania histaminy, serotoniny lub bradykinin, dlatego istotne jest, by na podstawie wyłącznie tego objawu nie ograniczać diagnostyki do astmy i przewlekłej obturacyjnej choroby płuc [40,41].

Poważnym zagrożeniem wynikającym z wystąpienia zespołu rakowiaka jest rakowiak serca, pojawiający się u 40-50% pacjentów [39]. Rakowiak serca charakteryzuje się odkładaniem tkanek włóknistych we wsierdziu i w zastawce trójdzielnej, co prowadzi do kardiomiopatii restrykcyjnej oraz niedomykalności zastawek prawej części serca, ostatecznie skutkując niewydolnością serca [42,43]. Stanem zagrażającym życiu jest wystąpienie przełomu rakowiaka, które ma miejsce zwykle w wyniku manipulacji guzem podczas operacji, biopsji, czy w trakcie znieczulenia [30]. Charakteryzuje się nagłym uwolnieniem serotoniny i innych amin do krwiobiegu, co skutkuje nadciśnieniem lub niedociśnieniem, zaburzeniami rytmu serca, biegunką, skurczem oskrzeli, uderzeniami gorąca i kwasicą [44,45]. Inne zespoły kliniczne występujące u pacjentów z NENs to zespół Zollingera-Ellisona oraz Vernera-Morrisona [26,27]. Zespół Zollingera-Ellisona występuje w wyniku nadmiernego wydzielania kwasu żołądkowego w przebiegu gastrinoma i zwykle prowadzi do choroby refluksowej przełyku, nawracających wrzodów trawiennych oraz przewlekłej biegunki [27]. Zespołowi Vernera-Morrisona towarzyszy VIPoma (VIP, ang. *vasoactive intestinal peptide*), co objawia się wodnistymi biegunkami, hipokaliemią, odwodnieniem, kwasicą i rzadziej zaczerwienieniem skóry, czy hiperkalcemią [46,47]. Niefunkcjonalne NENs nie są do końca nieczynne

hormonalnie, gdyż uwalniają m.in. polipeptyd trzustkowy (PP, ang. *pancreatic polypeptide*), neurotensynę, grelinę, enolazę swoistą dla neuronów (NSE, ang. *neuron-specific enolase*), chromograninę a (CgA, ang. *chromogranin A*) lub podjednostki ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG, ang. *human chorionic gonadotropin*), przy czym żadna z w/w wydzielanych substancji nie powoduje specyficznych objawów [28,46,48].

1.2. Klasyfikacja NENs

Guzy neuroendokryne mogą być klasyfikowane wg ich pochodzenia embrionalnego, lokalizacji guza, a także czynności hormonalnej, co przedstawia Rycina 1.



Ryc. 1. Schemat podziału nowotworów neuroendokrynych (NENs) za względu na czynność hormonalną, pochodzenie embrionalne oraz lokalizację guza, opracowanie własne na podstawie [3,9,49].

NENs w odniesieniu do pochodzenia embrionalnego klasyfikowane są jako wywodzące się z:

- a) jelita przedniego (foregut): grasica, płuco, oskrzela, przełyk, żołądek, dwunastnica, trzustka,
- b) jelita środkowego (midgut): wyrostek robaczkowy, jelito cienkie, kątnica, okrężnica wstępująca,
- c) jelita tylnego (hindgut): okrężnica poprzeczna, okrężnica zstępująca, esica, odbytnica [9,47].

Prawidłowa ocena histopatologiczna powinna odgrywać kluczową rolę w diagnozie, czyli potwierdzeniu charakteru neuroendokrynnego guza, wskazując również stopień zaawansowania i zróżnicowania nowotworu, głębokość inwazji, zajęcie węzłów chłonnych, a także stan marginesu resekcji [50,51]. W 2019 roku Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC, ang. *International Agency for Research on Cancer*) WHO zaakceptowała poprawiony (w stosunku do klasyfikacji z 2010 oraz 2017 roku), jednolity system klasyfikacji GEP-NETs według liczby mitotycznej i wskaźnika proliferacji Ki-67 [52]. Indeks mitotyczny to liczba figur podziału liczona na 2 mm², którą określa się poprzez zliczenie liczby mitoz w 50 polach po 0,2 mm² (czyli na łącznej powierzchni 10mm²) [52]. Natomiast wskaźnik proliferacji określany jest metodą immunohistochemiczną na obszarach najbardziej intensywnego znakowania (tzw. „gorące pola”) przy użyciu przeciwciał np. klonu MIB1 (przeciwciała mysie anty-ludzkie) [53,54]. Klasyfikacja ta definiuje trzy stopnie guzów dobrze zróżnicowanych: G1 (Ki-67 < 3%), G2 (Ki-67: 3–20%) i G3 (Ki-67 > 20%) oraz raki słabo zróżnicowane wielko- lub drobnokomórkowe (SCNEC, ang. *small cell neuroendocrine carcinoma*) [52,55]. NENs dzieli się na guzy (NETs) i raki neuroendokrynnne (NECs, ang. *neuroendocrine carcinomas*) na podstawie różnic molekularnych, mianowicie mutacje występujące w genach *MEN1*, *DAXX* i *ATRX* są charakterystyczne dla NETs, natomiast w NECs często spotyka się mutacje w genach *TP53* oraz *RB1* [52]. Guzy mieszane, w których każdy z komponentów (neuro- i nieneuroendokrynnnych) stanowi ponad 30% komórek nowotworowych są zaliczane do grupy mieszanych nowotworów neuroendokrynnno-nieneuroendokrynnnych (MiNENs, ang. *mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine neoplasms*) [56]. Klasyfikację GEP-NETs przedstawiono w Tabeli 1.

Tab. 1. Klasyfikacja guzów żołądkowo-jelitowo-trzustkowych (GEP-NETs) na podstawie stopnia złośliwości według IARC WHO z 2019 roku [52,53,56].

Typ guza	Stopień złośliwości	Zróżnicowanie	Aktywność mitotyczna (liczba mitoz/2mm ²)	Indeks proliferacji Ki-67
NET G1	niski	dobrze zróżnicowane	<2	<20%
NET G2	średni	dobrze zróżnicowane	2-20	3-20%
NET G3	wysoki	dobrze zróżnicowane	>20	>20%
- SCNEC - LCNEC	zawsze wysoki (klasyfikacja nie jest zalecana)	słabo zróżnicowane	>20	>20%
MiNEN	zmienny	dobrze lub słabo zróżnicowane	zmienna	zmienny

G – stopień złośliwości, LCNEC – rak neuroendokryny wielkokomórkowy, MiNEN – mieszany nowotwór neuroendokryny-nieneuroendokryny, SCNEC - rak neuroendokryny drobnokomórkowy, NET – guz neuroendokryny.

1.3. Diagnostyka

Diagnostyka NENs jest złożona i często niejednoznaczna ze względu na heterogenną manifestację kliniczną nowotworów, a stosowane metody diagnostyczne obejmują wywiad lekarski, badania fizykalne oraz analizę biochemiczną, analizę patomorfologiczną, diagnostykę obrazową i radioizotopową [57]. Wczesna diagnoza ma kluczowe znaczenie dla pacjentów, ze względu na krótsze przeżycie chorych z chorobą przerzutową [58]. Objawy są często niecharakterystyczne i sugerują obecność innych chorób, również nienowotworowych [59]. Dlatego ważne jest indywidualne, a zarazem multidyscyplinarne podejście specjalistów w stosunku do pacjenta, by podjąć prawidłową decyzję o wyborze kierunku i rodzaju badań oraz wybrać odpowiednie markery neuroendokryne w odniesieniu do obrazu klinicznego, by

skrócić czas od pojawienia się objawów do diagnozy oraz poprawić ogólny czas przeżycia pacjentów [59,60].

1.3.1. Diagnostyka biochemiczna

Komórki NENs mają zdolność syntezy, magazynowania i wydzielania aktywnych biologicznie peptydów, hormonów i amin, które są wykorzystywane w diagnostyce biochemicznej NENs, w monitorowaniu radykalnej chirurgii lub leczenia farmakologicznego oraz w rokowaniu [61]. Czynne hormonalnie GEP-NETs, które stanowią mniejszość, charakteryzują się uwalnianiem hormonów i substancji biologicznie czynnych, które odpowiadają za określoną manifestację kliniczną guza [60,61]. Należą do nich m.in. serotonina, insulina (wydzielana przez insulinoma), glukagon (glukagonoma), gastryna (gastrinoma), VIP (VIPoma), czy somatostatyna (somatostatinoma) [60]. Serotonina, główna substancja uwalniana przez rakowiaki i kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA, ang. *5-hydroxyindoleacetic acid*) stanowiły pierwsze markery biochemiczne stosowane w NETs i odnosiły się do diagnostyki zespołu rakowiaka [62]. 5-HIAA jest głównym metabolitem serotoniny, powstającym głównie w nerkach i wątrobie, a wydalany z moczem ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie [62,63]. Preferowanym materiałem diagnostycznym jest dobowy zbiórka moczu (DZM) ze względu na zbyt dużą zmienność stężenia 5-HIAA w przygodnej próbce moczu [64]. Przygotowanie do badania wymaga od pacjenta szczególnej uwagi z powodu ograniczenia przyjmowania określonych pokarmów na 48 godzin przed rozpoczęciem DZM, wpływu leków oraz konieczności użycia środka konserwującego [62]. Niektóre pokarmy zawierające duże ilości tryptofanu zwiększają wydalanie 5-HIAA pomimo braku guza neuroendokrynnego [65]. Do pokarmów tych zalicza się m.in. banany, pomidory, śliwki, awokado, bakłażan, orzechy włoskie i pekan, orzechy brazylijskie oraz makadamia, ananasy, szpinak, kalafior, podczas gdy do leków, które zmieniają stężenie 5-HIAA, należą chlorpromazyna, cisplatyna, imipramina, czy dezypramina [62,66–68]. Test oznaczenia 5-HIAA w DZM charakteryzuje się czułością bliską 100%, ale niską swoistością, ok. 35% [69]. Procedura 24-godzinnej zbiórki moczu związana jest z pewnym dyskomfortem i stresem dla pacjenta, a przeprowadzone dotąd badania sugerują, iż oznaczenie 5-HIAA w surowicy lub osoczu krwi ma podobną wartość diagnostyczną, przy czym wymagana abstynencja pokarmowa w tym przypadku to tylko 8-12 godzin przed pobraniem próbki krwi [70,71]. Przez wiele lat pomiar

metabolitów serotoniny w DZM był uważany za wystarczający i najbardziej swoisty dla NETs z zespołem rakowiaka, jednakże nieprzydatny u pacjentów z NETs wywodzących się z przedniej części jelita (oskrzela, żołądek), tylnej części (odbytnica), czy u większości pacjentów z NENs trzustki (pNENs, ang. *pancreatic neuroendocrine tumors*), które nie wydzielają serotoniny [72,73]. Ze względu na ograniczenia związane z wpływem wielu czynników na oznaczenie 5-HIAA w DZM oraz na brak zmian stężenia 5-HIAA w przypadku niewielkich guzów bez przerzutów do wątroby i węzłów chłonnych, poszukuje się nowych markerów diagnostycznych dla GEP-NETs [74]. W rzadszych przypadkach guzy mogą być przyczyną wydzielania kortykotropiny, hormonu uwalniającego hormon wzrostu, wazopresyny, czy białka podobnego do parathormonu, a ich diagnostyka jest uzależniona od rodzaju objawów klinicznych [75]. Czynne hormonalnie NENs płuca (LNENs, ang. *lung neuroendocrine neoplasms*) mogą wydzielać ektopowo hormon adrenokortykotropowy (ACTH, ang. *adrenocorticotropic hormone*), hormon antydiuretyczny (ADH, ang. *antidiuretic hormone*), czy serotoninę [76].

Z kolei nieczynne hormonalnie NETs nie wydzielają nadmiaru substancji bioaktywnych, ale wykazują objawy, które są spowodowane uciskiem lub inwazją okolicznych narządów lub tkanek [77]. Ogólne markery stosowane do diagnostyki przesiewowej GEP-NETs bez charakterystycznych objawów nadprodukcji hormonów to CgA, NSE, PP oraz podjednostki hormonu glikoproteinowego [57]. Najważniejszym ogólnym markerem dla wszystkich NENs jest CgA, pierwsza zidentyfikowana granina, której nazwa pochodzi od pierwotnego miejsca wykrycia, a miejscem tym były pęcherzyki chromafinowe rdzenia nadnerczy zawierające katecholaminy [78]. CgA to hydrofilowy, kwasowy 439-aminokwasowy łańcuch peptydowy, który jest poprzedzony 18-aminokwasowym peptydem sygnałowym, dlatego cała cząsteczka pre-chromograniny A składa się z 457 reszt aminokwasowych (48kDa) [79]. Ludzki gen *CgA* znajduje się na chromosomie 14q32.12, obejmuje 12 192 pz i jest zorganizowany w osiem eksonów i siedem intronów [80]. CgA ulega ekspresji w prawidłowych i nowotworowych komórkach endokrynych i neuroendokrynych różnych narządów, zaliczanych do systemu APUD, a największa ilość tego białka występuje w ziarnistościach chromochłonnych rdzenia nadnerczy oraz w pęcherzykach części współczulnej układu nerwowego [81,82]. CgA jest współprzechowywana oraz wydzielana na drodze egzocytozy wraz z rezydującymi katecholaminami, hormonami peptydowymi lub neuroprzebieżnikami specyficznymi dla danych komórek, np. uwalniana jest z komórek enterochromafinowych wspólnie z serotoniną

[83]. Z tego powodu ekspresja CgA koreluje z aktywnością komórek neuroendokrynych. CgA stanowi prekursor dla negatywnych regulatorów funkcji endokrynej komórek neuroendokrynych, takich jak pankreostatyna, hamująca wydzielanie insuliny indukowane silnym wzrostem stężenia glukozy, wazostatyna o działaniu przeciwadrenergicznym, czy katestatyna, hamująca wydzielanie katecholamin z komórek chromafinowych [78,84]. Poziom CgA w surowicy uważa się za najbardziej przydatny w diagnostyce i monitorowaniu pacjentów z NETs przewodu pokarmowego, w tym również części tylnej i przedniej jelita, w przypadku których stężenie 5-HIAA oraz serotoniny mogą przyjmować wartości prawidłowe [83]. Czulość zależy od specyfiki stosowanego testu i waha się między 67-93%, natomiast swoistość wynosi 85-96% [85,86]. Wiele danych literaturowych wskazuje, że rozregulowane uwalnianie CgA przez komórki neuroendokryne może wpływać na komponenty podścieliska guza, przyczyniając się do regulacji jego wzrostu lub progresji [87]. Oznaczenie CgA jest również przydatne do określenia stopnia zaawansowania, prognozowania oraz monitorowania wzrostu guza, ponieważ jej stężenie w surowicy jest skorelowane z masą guza [3]. Podwyższony poziom CgA koreluje z obciążeniem chorobą i złym rokowaniem, a w przypadku pNETs wczesny spadek podczas leczenia wiąże się z poprawą rokowania [80]. Szczególnie wysokie poziomy CgA obserwowane są w zespole rakowiaka, w którym stężenie białka może być podwyższone nawet kilkaset razy, natomiast najwyższe stężenie CgA stwierdzano w przypadkach NENs z przerzutami do wątroby [88,89]. CgA jest wiarygodnym markerem dla NENs z kilku powodów, m.in. ze względu na zadowalającą czulość i swoistość, korelację stężenia CgA z masą guza w niektórych typach NETs (głównie jelito środkowe), wzrost poziomu CgA w NETs funkcjonalnych, jak i niefunkcjonalnych oraz podczas procesu metastazy bez względu na lokalizację przerzutów oraz możliwość przewidywania gorszego rokowania na podstawie wysokiego poziomu CgA (niezależny predyktor przeżycia) [79]. CgA stanowi użyteczny marker do określania skuteczności procedur zmniejszenia guza, nawrotu choroby, czy progresji [86,90,91]. Dzięki korelacji stężenia CgA z rozmiarem i rozległością guza, parametr ten oznaczany okresowo może być pomocny w wykrywaniu nawrotu choroby [90]. Według badań Welin i wsp. [90], w przypadku monitorowania NENs po leczeniu chirurgicznym, CgA jest pierwszym markerem stanowiącym o nawrocie choroby, uprzedzając zmiany 5-HIAA w moczu, a nawet badania obrazowe. Stężenie CgA jest znamienne wyższe w przypadku choroby rozsianej niż ograniczonej, ale wyjątek może stanowić gastrinoma, w przebiegu której poziom CgA jest wysoki przy braku przerzutów w wątrobie [92].

Doniesiono, że CgA w osoczu jest biomarkerem prognostycznym w GEP-NETs, skorelowanym z obciążeniem guzem wątroby i krótszym czasem przeżycia [90,93]. CgA ma wiele zalet, takich jak prostota i dostępność metody, niski koszt oznaczenia, czy małoinwazyjne pobieranie materiału biologicznego (próbka krwi żyłnej), co sprawia, że możliwe jest częstsze monitorowanie stężenia CgA w surowicy krwi pacjentów z NETs [94,95]. Istnieje jednak kilka ograniczeń w stosowaniu CgA jako biomarkera w GEP-NETs, ze względu na fakt, że jej stężenie jest zwiększone w przypadku stosowania analogów somatostatyny (SA, ang. *somatostatin analogues*), inhibitorów pompy protonowej (PPIs, ang. *proton pump inhibitors*) oraz innych leków hamujących wydzielanie kwasu solnego, w wyniku przebiegu zanikowego zapalenia żołądka, niedokrwistości Addisona-Biermera, a także niewydolności nerek (zmniejszony klirens nerkowy), związanej z gromadzeniem się peptydu [86]. Leczenie z użyciem PPIs może powodować wtórny wzrost poziomu CgA w wyniku zwiększonego wytwarzania gastryny, co stanowi o tym, że lek należy odstawić co najmniej 7 dni przed oznaczaniem CgA [78]. Im dłużej trwa terapia PPIs, tym bardziej wydłuża się czas normalizacji markera CgA [78]. Również w przypadku upośledzenia czynności nerek istnieje zależność: im wyższy stopień niewydolności nerek, tym wyższe stężenie CgA, które może dorównać wartościom charakterystycznym dla NENs, dlatego przy schyłkowej niewydolności nerek oznaczanie CgA nie jest diagnostyczne [96]. Rakowiak jelita środkowego może być początkowo nieprawidłowo diagnozowany, jako zespół jelita drażliwego, czasem nawet na kilka lat przed postawieniem prawidłowej diagnozy. Dlatego też, podczas interpretacji wyników CgA, należy brać pod uwagę zarówno obciążenie nowotworem, aktywność wydzielniczą komórek, jak i przyczyny nienowotworowe zwiększonego poziomu CgA (niewydolność nerek, hipergastrynemia, przewlekłe zapalenie wątroby, marskość wątroby, reumatyzm, choroba Parkinsona) [78,97]. Poziom CgA zarówno w przypadku osób zdrowych, jak i pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi wzrasta po posiłku oraz po wysiłku fizycznym, dlatego zaleca się, by oznaczać ten parametr na czczo i po odpoczynku [98]. Obecnie nie ma uniwersalnej metody diagnostycznej, a oznaczanie poziomu CgA w surowicy krwi można przeprowadzić przy pomocy kilku metod, w tym testu radioimmunologicznego (RIA, ang. *radioimmunoassay*), testu immunoenzymatycznego (ELISA, ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*), testu immunoradiometrycznego (IRMA, ang. *immunoradiometric assay*), metody Western blott, mikroskopii immunofluorescencyjnej, immunohistochemii, oraz najnowszego immunofluorescencyjnego testu TRACE (ang. *time-resolved amplified cryptate emission*) [99].

Należy jednak pamiętać, że monitorując postępy leczenia i oznaczając stężenie CgA, trzeba stosować tę samą metodykę badania, gdyż czułość i swoistość pomiaru markera różni się między stosowanymi zestawami komercyjnymi [85]. Według Matar i wsp. [100] wyższe stężenie CgA zarówno w nowotworowych, jak i nienowotworowych chorobach płuc wskazują na jego ograniczoną skuteczność w monitorowaniu LNENs. Dane literaturowe pokazują, iż CgA jest istotnym markerem w diagnostyce GEP-NETs, jednakże o wiele bardziej obiecujące wydaje się być połączenie chromograniny z innymi parametrami [101]. Jednoczesne oznaczanie CgA oraz NSE wykazuje wyższą czułość oraz większą dokładność w przewidywaniu rokowania i progresji choroby niż oznaczenie każdego z tych parametrów osobno [101,102]. Obok CgA występuje również chromogranina B (CgB, ang. *chromogranin B*), należąca do tej samej grupy granin, lecz jej funkcja nie jest do końca poznana [103]. Niektóre źródła podają, iż może stanowić potencjalny marker dla NENs, alternatywnie do CgA, np. w przypadku rakowiaków odbytnicy, w których białko to ulega silnej ekspresji [104,105]. Pomiar CgB może być korzystny również w przypadku leczenia z zastosowaniem PPIs lub w zaburzeniach czynności nerek, na które to czynniki parametr ten jest mniej wrażliwy niż CgA [106].

NSE jest cytoplazmatycznym enzymem glikolitycznym, który występuje głównie w neuronach, tkankach pochodzenia neuroektodermalnego, erytrocytach i płytkach krwi [107,108]. Podwyższone stężenie NSE obserwuje się najczęściej u pacjentów z drobnokomórkowym rakiem płuca (74%), w rakowiakach (nawet 30-70%), w guzach wysp trzustkowych, guzie chromochłonny i rdzeniastym raku tarczycy [101,109]. Jej wartość diagnostyczna ma znaczenie w guzach nisko- i wysokozróżnicowanych, ale tylko w przybliżeniu koreluje z masą guza i stadium choroby (swoistość niższa niż w przypadku CgA) [101]. Wysokie stężenie NSE wskazuje na bardziej agresywny przebieg choroby i szybszą progresję guza oraz wiąże się z dużą śmiertelnością komórek o zróżnicowaniu neuroendokrynnym [95,109]. Dane literaturowe wskazują na fakt, iż tempo wzrostu stężenia NSE lub czas potrzebny do jego podwojenia zależy od stopnia złośliwości, przebiegu choroby oraz od procesu leczenia [109]. Wyższy poziom NSE w surowicy ma wpływ na krótsze całkowite przeżycie oraz krótsze przeżycie wolne od progresji [110]. Nobels i wsp. [111] wykazali, że poziom NSE jest podwyższony u 31-44% pacjentów z GEP-NETs. Ograniczona skuteczność diagnostyczna krążącej NSE wynika ze wzrostu jej stężenia nie tylko w przypadku guzów neuroendokrynnych, ale również w nerwiaku niedojrzałym, czerniaku złośliwym, gruczolakorakach, guzach mózgu lub zapaleniu OUN [112,113]. NSE jest jednym

z ważniejszych markerów diagnostycznych, użytecznych w monitorowaniu leczenia GEP-NETs, jednak jego wartość istotnie wzrasta w połączeniu z innymi markerami, jak CgA, 5-HIAA, czy synaptofizyna (SPY, ang. *synaptophysin*) [109]. Wczesny spadek stosunku stężeń CgA/NSE w surowicy jest potencjalnym markerem prognostycznym wyników leczenia u pacjentów z zaawansowanym pNET, którzy otrzymywali terapię inhibitorem mTOR (ssaczy cel rapamycyny, ang. *mammalian target of rapamycin*) i ewerolimusem [114].

PP to hormon peptydowy wydzielany przez komórki wysp trzustkowych zlokalizowanych w głowie trzustki i wyrostku haczykowatym [115]. Posiada pewne możliwości diagnostyczne i oceniające rokowanie, przydatny jako ogólny marker w diagnostyce niesfunkcjonalnych pNETs (NF-pNET, ang. *non-functional pancreatic neuroendocrine tumors*) [116]. PP można również wykorzystać do przewidywania progresji choroby, a znacznie obniżony poziom PP w surowicy może wskazywać na stabilną chorobę [116].

W surowicy pacjentów ze złośliwymi guzami GEP-NETs stwierdzono podwyższone stężenie zarówno podjednostki α -hCG, wspólnej dla wszystkich hormonów glikoproteinowych, jak i wolnej podjednostki β -hCG [117]. Dane literaturowe wskazują, że podjednostki hCG są cennymi markerami nowotworowymi w guzach GEP-NETs, przy czym złośliwe pNETs wydzielają głównie podjednostki β -hCG, natomiast rakowiaki α -hCG [118]. Wyniki badania Dirnhofera i wsp. [119] wskazują, że wolna podjednostka α -hCG może być użytecznym markerem różnicowania neuroendokrynnego w pierwotnych nowotworach płuca. Mimo, iż ostatnie odkrycia sugerują, że hormony glikoproteinowe i białkowe działają jako lokalne auto- i parakryne czynniki wzrostu i różnicowania w tkance prawidłowej i nowotworowej (dotyczy to również selektywnej produkcji α -hCG przez guzy neuroendokryne w różnych narządach), to rola tych markerów nie jest do końca jasna i potrzeba dalszych badań, by ocenić ich wartość diagnostyczną i prognostyczną [119,120].

W ostatnich latach zainteresowanie wzbudziły wskaźniki określone na podstawie krążących we krwi markerów stanu zapalnego, mianowicie: stosunek liczby neutrofilów do limfocytów (NLR, ang. *neutrophil-lymphocyte ratio*) oraz stosunek liczby płytek krwi do limfocytów (PLR, ang. *platelet-lymphocyte ratio*) [121]. Wykazano związek między wysokim NLR, a rozmiarem guza, stopniem zaawansowania, wysokim stopniem złośliwości i krótszym czasem przeżycia pacjentów z NENs, ponadto wskazano, że NLR może stanowić potencjalny niezależny marker przerzutów do węzłów chłonnych i przeżycia bez nawrotów choroby [122,123]. U pacjentów z NET jelita środkowego NLR był związany z obecnością przerzutów

odległych, szczególnie do otrzewnej [124]. Kulahci i wsp. [121] na podstawie badań retrospektywnych pacjentów z NENs obserwowanych w latach 2014-2020 stwierdzili korelację między wyższą wartością NLR (wartość odcięcia powyżej 3.01) a lokalizacją guza, wyższym stopniem histologicznym, zwiększoną mitozą, wyższym wskaźnikiem proliferacji Ki-67, przerzutami i zajęciem naczyń limfatycznych, w przeciwieństwie do PLR, w przypadku którego nie zaobserwowano takich korelacji. Jednak Gaitianidis i wsp. [125], badając przypadki pNENs dowiódł, że PLR może być niezależnym predyktorem progresji choroby i może być związany z przerzutami odległymi, natomiast NLR są związane z wielkością guza. Badania Dikman i wsp. [126] wykazały, iż podwyższone wartości NLR oraz PLR są związane z zaawansowanymi stadiami pNETs. Do 2021 roku pojawiło się wiele badań retrospektywnych wskazujących na wartość prognostyczną wskaźników NLR oraz PLR, jednak by móc je wykorzystać jako silne predyktory NETs, ich skuteczność powinna zostać potwierdzona w badaniach prospektywnych na liczniejszej grupie badanej [127].

1.3.2. Diagnostyka obrazowa

Diagnostyka obrazowa odgrywa jedną z kluczowych ról w rozpoznaniu, zlokalizowaniu guza pierwotnego, ocenie zaawansowania, wyborze leczenia oraz planowaniu leczenia operacyjnego, w obserwacji guzów neuroendokrynnych przy ocenie ich odpowiedzi na leczenie oraz w kwalifikacji do terapii radioizotopowej [128,129]. W obrazowaniu guzów neuroendokrynnych wykorzystuje się metody anatomiczne oraz czynnościowe (funkcjonalne) [130]. Połączenie tych obu metod poprawiło czułość zastosowania technik obrazowych w diagnostyce NENs [129]. Do metod anatomicznych zalicza się badanie ultrasonograficzne (USG, ang. *ultrasonography*), USG endoskopowe (EUS, ang. *endoscopic ultrasonography*), tomografię komputerową (CT, ang. *computed tomography*) oraz rezonans magnetyczny (MRI, ang. *magnetic resonance imaging*) [130,131]. Badanie EUS pozostaje w dużej mierze zależne od operatora, jednak rozwój EUS, ultrasonografii śródoperacyjnej (IOUS, ang. *intraoperative ultrasound*) oraz ultrasonografii laparoskopowej poprawił skuteczność tej metody [132]. Dodatkowymi atutami EUS są brak ekspozycji na promieniowanie, a także powtarzalność i dynamika metody dzięki czemu wykorzystuje się je do oceny naczyń krwionośnych w odpowiedzi na terapię [132]. USG dobrze koreluje z biopsjami gruboigłowymi przerzutów do wątroby, a EUS pozwala na wykrycie 45-60% zmian w dwunastnicy i nawet do 100% zmian

w trzustce [133,134]. Metody funkcjonalnej diagnostyki obrazowej (techniki medycyny nuklearnej) wykorzystują nadekspresję receptorów somatostatynowych (SSTR, ang. *somatostatin receptor*), których obecność powszechnie obserwuje się w NETs [135]. Podawane dożylnie znakowane radioizotopowo SA (technika obrazowania molekularnego) koncentrują się w NETs, a emisja promieniowania odczytywana jest jako obecność zmian nowotworowych [10,135]. Obrazowanie receptora somatostatyny (SRI, ang. *somatostatin receptor imaging*) przeprowadzane jest za pomocą scyntygrafii receptorów somatostatynowych (SRS, ang. *somatostatin receptor scintigraphy*) z wykorzystaniem tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów (SPECT, ang. *single photon emission computed tomography*) z użyciem np. ^{111}In -pentetreotydu lub pozytonowej tomografii emisyjnej (PET, ang. *positron emission tomography*) z analogami somatostatyny znakowanymi izotopowo, np. ^{68}Ga (68-gal), ^{18}F -DOPA (F18-dopamina) i ^{11}C -5-htp (C11-5-hydroksytryptamina) [128,135,136]. Jednym z podstawowych radiofarmaceutyków jest ^{68}Ga -DOTATATE, który został zatwierdzony w 2016 roku przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) [137]. Wykazano, iż metoda PET/CT wykorzystująca analogi somatostatyny znakowane izotopem emitującym pozytony ^{68}Ga (peptyd 68-Ga-DOTA) zrewolucjonizowała obrazowanie SSTR dzięki doskonałej rozdzielczości przestrzennej, skróceniu czasu skanowania, a także dzięki wysokiej czułości i swoistości w zakresie określania stopnia zaawansowania i wykrywania pierwotnych GEP-NETs w porównaniu z obrazowaniem ^{111}In -pentetreotydem [137,138]. Obrazowanie SRI metodą PET/CT jest uważane za najbardziej czułą i specyficzną metodę wykrywania NENS i przerzutów o czułości 54-100% [129,139]. Metoda ta dostarcza ilościowych i jakościowych informacji o SSTR guza w postaci standaryzowanych wartości wychwytu (SUV, ang. *standardized uptake values*), które korelują z poziomem ekspresji SSTR [140]. ^{68}Ga -DOTATATE PET/CT wraz z analogami ^{68}Ga -DOTATOC i ^{68}Ga -DOTANOC stało się aktualnym złotym standardem obrazowania czynnościowego w dobrze zróżnicowanych NETs, głównie ze względu na szybki klirens, szybką penetrację tkanek oraz niską antygenowość [141]. ^{68}Ga -DOTATATE PET/CT wykorzystywany jest również w monitorowaniu terapii radionuklidami receptorów peptydowych (PRRT, ang. *peptide receptor radionuclide therapy*) [137]. Techniki obrazowe oparte na SA nie sprawdzają się w słabo zróżnicowanym raku ze względu na częstą nieobecność receptorów somatostatyny [142]. W przypadku podejrzenia bardziej agresywnych typów NETs zaleca się PET/CT z radioznakowaną 18F-fluorodeoksyglukozą ([18F]FDG, ang. *18F-fluorodeoxyglucose*), która

ujawnia zmiany ze zwiększonym metabolizmem glikolitycznym (wychwyt radioznakowanych cząsteczek glukozy) o czułości 60% dla NET G2 oraz 80% dla NEC [129,143,144]. Dane literaturowe wskazują, iż zastosowanie obrazowania hybrydowego, czyli połączenie metod SPECT/CT lub PET/CT, zwiększa czułość badania oraz umożliwia wykrycie nawet niewielkich zmian [136]. Połączenie metod anatomicznych (zwykle CT i MRI) i czynnościowych (zwykle PET/CT lub SPECT/CT) pozwala na dokładną ocenę stopnia zaawansowania i leczenia [145]. CT i MRI dostarczają informacji anatomicznych o lokalizacji guza pierwotnego, o lokalizacji przerzutów regionalnych i odległych, informacji niezbędnych do wyboru metody leczenia i podjęcia decyzji o ewentualnej interwencji chirurgicznej oraz umożliwiają rozpoznanie choroby przetrwałej lub nawrotu [145,146]. Funkcjonalne techniki obrazowania, które wykorzystują zdolne do zobrazowania związku, wiążące się z komórkami nowotworowymi lub przez nie metabolizowane pozwalają określić stopień zaawansowania choroby przed operacją, lokalizację NET w sytuacji podejrzenia występowania GEP-NET na podstawie obrazu klinicznego oraz markerów biochemicznych, a także umożliwiają identyfikację guza pierwotnego w przypadku choroby przerzutowej [141,146]. Ponadto takie obrazowanie jest niezbędne w leczeniu pacjentów z GEP-NETs, pozwala na nieinwazyjną charakterystykę stanu funkcjonalnego i heterogeniczności guza oraz może zapewnić lepszą stratyfikację prognostyczną i udoskonalenie strategii terapeutycznych [145,147].

1.3.3. Diagnostyka patomorfologiczna

Pobranie fragmentów tkanek do badań histologicznych jest niezbędne w diagnostyce NETs [148]. Gdy nie jest możliwa resekcja chirurgiczna, zamiast aspiracji cienkoigłowej zaleca się biopsję gruboigłową, aby umożliwić pełną ocenę architektury guza [10]. Według Europejskiego Towarzystwa ds. Nowotworów Neuroendokrynnych (ENETS, ang. *European Neuroendocrine Tumor Society*) najważniejszą cechą histopatologiczną o znaczeniu klinicznym jest stopień zróżnicowania histopatologicznego oceniany na podstawie wskaźnika Ki-67 oraz indeksu mitotycznego [129]. Cecha G stanowi o wartości prognostycznej i predykcyjnej w leczeniu pacjentów z NENs [129]. Wskaźnik Ki-67 powinien być określany przez badanie 2000 komórek nowotworowych w obszarach o największym znakowaniu immunohistochemicznym, jeżeli jednak nie jest dostępna taka ilość komórek, liczy się ich jak najwięcej [148,149]. Typowe przeszkody w ocenie wskaźnika Ki-67 obejmują niejednorodność

barwienia międzyguzowego i wewnątrzguzowego w pierwotnym miejscu guza lub wśród miejsc przerzutowych we wczesnym stadium lub w chorobie zaawansowanej oraz metody zliczania, nawet przy użyciu ulepszonych automatycznych maszyn do barwienia [150]. Inne cechy wpływające na wiarygodność Ki-67 związane są z heterogenicznością guza, wynikają z różnic w obróbce tkanek, a zwłaszcza w metodach utrwalania, co może wiązać się z utratą antygenowości, szczególnie w bloczkach zatopionych w parafinie i utrwalonych w formalinie, a także ocena blado zabarwionych jąder komórkowych [151].

W zakresie diagnostyki histopatologicznej stosowane jest barwienie immunohistochemiczne [152]. Jest ono badaniem niezbędnym do ustalenia jednoznacznej diagnozy NEN, oceny prognostycznej i wyboru odpowiedniej terapii [153]. Przeprowadza się je dla keratyn o niskiej masie cząsteczkowej, dla CgA, SPY oraz niehistonowego białka Ki-67 z mysim przeciwciałem anti-ludzkim (klon MIB1) [152,154,155]. SPY stanowi glikoproteinę błonową w presynaptycznych pęcherzykach komórek nerwowych, które uwalniają również klasyczne przekąźniki, takie jak acetylocholina [156]. Wraz z CgA stanowią one dwa najczęściej oznaczane markery immunohistochemiczne [156]. SPY jest rozpoznawana przez przeciwciało monoklonalne SY38 w różnych nowotworach neuroendokrynnych, mając wyższą czułość ale niższą swoistość niż przeciwciało przeciwko chromograninie, zwłaszcza w guzach o wysokim stopniu złośliwości [157]. Glikoproteina ta występuje w guzach chromochłonnych i przyzwojakach, a także w komórkach raka rdzeniastego tarczycy i komórkach guzów wysp trzustkowych, w większości rakowiaków przewodu pokarmowego i klatki piersiowej [155,158]. W przypadkach, gdy pierwotna lokalizacja NETs nie jest znana, guz jest ujemny dla keratyn lub by odróżnić dobrze zróżnicowane guzy neuroendokrynne od słabo zróżnicowanych raków neuroendokrynnych prowadzi się dalszą diagnostykę immunochemiczną z użyciem kolejnych markerów. Wśród tych markerów wyróżnia się białko homeobox typu ogonowego 2 (CDX2, ang. *caudal type homeobox 2*), będące czynnikiem transkrypcyjnym różnicowania jelitowego, czynnik transkrypcyjny tarczycy 1 (TTF-1, ang. *thyroid transcription factor 1*) dla guzów pochodzenia płucnego, sparowane geny pudełkowe 6/8 (PAX 6/8, ang. *paired box genes 6/8*) zaangażowane w rozwój raka tarczycy, jajnika i nerek, czynnik transkrypcyjny definiujący komórki endokrynne trzustki (Isl-1, ang. *insulin gene enhancer binding protein islet 1*), charakterystyczny również dla dwunastnicy i odbyticy, a także inne markery wykorzystywane w barwieniu immunohistochemicznym, jak receptor progesteronu, czynnik transkrypcyjny specyficzny dla trzustki i komórek β (PDX-1, ang.

pancreatic and duodenal homeobox 1) oraz neuroendokrynne białko sekrecyjne (NESP-55, ang. *neuroendocrine secretory protein 55*) [150,159–162]. Wyżej wymienione markery immunohistochemiczne wykorzystuje się do diagnozowania i prognozowania guzów, jednak interpretację barwień immunohistochemicznych należy przeprowadzać również w kontekście klinicznym pacjenta, a szczególnie u osób z toczącym się procesem metastazy o nieznannej pierwotnej lokalizacji [132]. W przypadku dobrze zróżnicowanych NETs znakowanie TTF-1 faworyzuje pochodzenie płucne, CDX2 jest typowe dla pierwotnych komórek jelitowych lub trzustkowych, a PDX1 lub Isl1 dla pNETs [163,164].

1.4. Leczenie

Leczenie pacjentów ze zlokalizowanymi guzami neuroendokrynnymi obejmuje przede wszystkim radykalną resekcję chirurgiczną [165]. Chirurgia pozostaje leczeniem z wyboru z zamiarem całkowitego wyleczenia, chociaż może być również zalecana w niektórych przypadkach choroby przerzutowej i trudnych do opanowania zespołów wydzielniczych [166]. Leczenie inne niż chirurgiczne powinno stanowić leczenie uzupełniające, chyba że ogólny stan pacjenta i inne przeciwwskazania uniemożliwiają zabieg [167,168]. W przypadku przerzutów zabieg chirurgiczny stosuje się w celu złagodzenia objawów hormonozależnych, zmniejszenia masy guza, poprawy ogólnego przeżycia pacjentów, czy wydłużenia okresu wolnego od choroby [167]. Kontrolę przerzutów do wątroby u pacjentów niekwalifikujących się do leczenia chirurgicznego przeprowadza się przy pomocy technik ablacyjnych, jak ablacja falami radiowymi, ablacja laserowa lub krioterapia [57]. Inne terapie tzw. lokoregionalne to selektywna embolizacja tętnicy wątrobowej, chemoembolizacja z użyciem doksorubicyny, streptozycyny, mitomycyny i fluorouracylu oraz transplantacja wątroby [3,169]. Embolizacje wykorzystywane są w celach paliatywnych w funkcjonalnych guzach wolno rosnących opornych na leczenie, w zmniejszeniu masy guza oraz w kontroli progresji guzów nieczynnych hormonalnie [3]. Transplantację wątroby rozważa się w przypadku pacjentów z przerzutami do wątroby bez choroby pozawątrobowej, przy czym najwyższą skuteczność odnoszą pacjenci poniżej 50 roku życia z niską ekspresją Ki-67 i E-kadheryny [170,171]. W ostatnich dziesięcioleciach nastąpił znaczny progres w zakresie leczenia guzów neuroendokrynnych, który poszerzył możliwości terapeutyczne [166]. Ważną rolę w leczeniu NENs odgrywa somatostatyna i jej analogi ze względu na szeroki zakres funkcji hamujących uwalnianie

hormonów, co przyczynia się do łagodzenia objawów klinicznych, stabilizacji guza oraz poprawy jakości życia [3,172]. Somatostatyna to cykliczny peptyd o działaniu silnie regulacyjnym w całym organizmie [173]. Wytwarzana jest przez podwzgórze, w OUN, w narządach dokrewnych, w przewodzie pokarmowym i trzustce [174]. Hamuje uwalnianie wielu hormonów i substancji czynnych hormonalnie, mianowicie zatrzymuje wydzielanie żółci, kwasu żołądkowego, gastryny, cholecystokininy, sekretyny w przewodzie pokarmowym, wpływa na uwalnianie amylazy trzustkowej, insuliny i glukagonu, a także hamuje wydzielania hormonu wzrostu, ACTH oraz modyfikuje przekąźnictwo i tworzenie pamięci w OUN [173,175]. Istotne jest, iż somatostatyna zapobiega angiogenezie i ma działanie antyproliferacyjne na zdrowe i rakowe komórki w badaniach na ludziach i modelach zwierzęcych [173]. Znane są dwie aktywne formy hormonu, różniące się długością łańcucha polipeptydowego, mianowicie krótsza izoforma 14-aminokwasowa, która funkcjonuje głównie w mózgu oraz dłuższa 28-aminokwasowa, która spełnia swoją rolę w przewodzie pokarmowym [173]. W działaniu somatostatyny pośredniczy pięć typów SSTR (SSTR1-SSTR5) sprzężonych z białkiem G, które są szeroko rozpowszechnione w ludzkim układzie nerwowym, w nadnerczach, nerkach, trzustce i sterczu [176,177]. Nadekspresję receptorów zaobserwowano również w większości przypadków GEP-NETs, a rozkład SSTR w NETs różni się w zależności od rodzaju guza i stopnia jego zróżnicowania i stanowi podstawę do obrazowania molekularnego NETs oraz może stanowić cel terapeutyczny [136,178]. Najczęściej ekspresji ulega receptor SSTR2, kolejno SSTR1, SSTR5, SSTR3 i SSTR4 (najślabza ekspresja) [179]. Okres półtrwania somatostatyny jest zbyt krótki (według różnych źródeł <2 minut lub 1-3 minuty) do jej zastosowania w diagnostyce lub w procesie terapeutycznym [130,180]. Rozwiązaniem było opracowanie analogów somatostatyny, które wiążą się z wysokim powinowactwem do SSTR2 oraz SSTR5, o okresie półtrwania wystarczającym dla procesu diagnostycznego i terapeutycznego [130,179]. Pierwszym analogiem stosowanym w terapii NENs był oktreotyd, a następnie z biegiem lat do puli terapeutycznej SA dołączyły lanreotyd, wapreotyd, seglityd i pasyreotyd, których okres półtrwania wynosił 1,5-2 godziny [181,182]. Z czasem pacjenci z zespołem rakowiaka stają się oporni na leczenie SA, przez co klinicyści zwiększają dawki leku lub częstość jego podawania [72].

Leczenie pacjentów z NENs obejmuje również interferon- α (IFN- α , ang. *interferon- α*), chemioterapię, leki celowane, jak mTOR – ewerolimus, czy inhibitory kinazy tyrozynowej i angiogenezy, jak sunitynib [183–185]. Terapia PRRT natomiast to rodzaj ukierunkowanej

terapii przeciwnowotworowej umożliwiającej dostarczenie promieniowania bezpośrednio do komórek NETs wykazujących wysoki poziom ekspresji SSTR [186]. Najczęściej stosowanymi radiopeptydami w PRRT są ^{90}Y -DOTATOC i ^{177}Lu -DOTATATE, składające się z nuklidu o wysokiej aktywności (^{177}Lu lub ^{90}Y), połączonego przez chelator (DTPA lub DOTA) z ligandem wiążącym SSTR, którym zazwyczaj jest SA [187]. Obrazowanie SRI przy użyciu scyntygrafii ^{111}In -Octreotyd lub bardziej czułego ^{68}Ga -DOTATATE PET/CT wykrywa obecność SSTR na komórkach nowotworowych i na podstawie stopnia wychwytu pozwala na selekcję pacjentów do PRRT [188]. Terapia ta została opracowana przede wszystkim do leczenia nieoperacyjnych i przerzutowych dobrze zróżnicowanych NETs [187]. U pacjentów z zaawansowaną chorobą, u których zabieg chirurgiczny nie przyniósłby korzyści terapeutycznej, opcje leczenia obejmują wyżej wymienione terapie lokoregionalne, długo działające SA, leki ukierunkowane molekularnie, radionuklidy, chemioterapię, a także immunoterapię, stosowane samodzielnie lub w połączeniu [166,189]. Jednak decyzja o czasie rozpoczęcia leczenia, kolejności podawania różnych terapii i identyfikacji wiarygodnych markerów prognostycznych w celu wybrania najbardziej odpowiedniego leczenia powinna być podejmowana dla każdego pacjenta indywidualnie w celu zwiększenia skuteczności i złagodzenia skutków ubocznych [166,190].

2. Stan zapalny

Zapalenie to biologiczna odpowiedź układu odpornościowego na działanie czynników zarówno infekcyjnych, jak i niezakaźnych (urazów, związków toksycznych, czy promieniowania), którego celem jest usunięcie szkodliwych bodźców, rozpoczęcie procesu gojenia i przywrócenie homeostazy bez względu na przyczynę [191,192]. Na poziomie tkankowym stan zapalny objawia się obrzękiem, zaczerwienieniem, podwyższoną temperaturą w miejscu toczącego się procesu, bólem oraz utratą funkcji tkanki [192]. W mikrokrążeniu w obrębie uszkodzenia dochodzi do zmian przepuszczalności naczyń, rekrutacji i akumulacji leukocytów (neutrofilii, monocytów i eozynofili) pochodzących z krążenia ogólnego oraz wzmożonego uwalniania mediatorów stanu zapalnego [193]. Stan zapalny dzieli się na trzy rodzaje w zależności od czasu jego trwania: (1) ostry, który pojawia się bezpośrednio po urazie i trwa kilka dni, (2) przewlekły trwający miesiącami lub latami, gdy

ostry stan nie ustępuje i (3) okres przejściowy, tzw. stan zapalny podostry, trwający od 2 do 6 tygodni [194,195]. Procesy odpowiedzi zapalnej zależą od bodźca początkowego i jego lokalizacji w organizmie, ale wszystkie mają wspólny mechanizm: rozpoznanie szkodliwych bodźców przez receptory na powierzchni komórki, aktywacja szlaków zapalnych, uwolnienie markerów stanu zapalnego oraz rekrutacja komórek zapalnych [192]. Proces zapalenia rozpoczyna się w obecności induktorów, którymi mogą być organizmy zakaźne, ciała obce i sygnały endogenne z komórek martwiczych lub uszkodzonych tkanek, które wyzwalają odpowiedź zapalną poprzez aktywację receptorów rozpoznania wzorców kodowanych w linii zarodkowej (PRR, ang. *pattern-recognition receptors*) zarówno w komórkach odpornościowych, jak i nieimmunologicznych [192,195]. Rodzina ssaczy PRR obejmuje receptory TOLL-podobne (TLR, ang. *Toll-like receptors*), które uczestniczą w rozpoznawaniu patogenów i w inicjowaniu odpowiedzi zapalnej, a znajdują się na powierzchni komórek wrodzonego układu odpornościowego, czyli np. makrofagów lub komórek dendrytycznych [195,196]. Szkodliwe bodźce aktywują kaskadę szlaków sygnałowych, które z kolei aktywują wytwarzanie i uwalnianie mediatorów stanu zapalnego, w tym cytokin takich jak interleukina 1 β (IL-1 β , ang. *interleukin 1 β*), interleukina 6 (IL-6, ang. *interleukin 6*), czy czynnik martwicy nowotworu- α (TNF- α , ang. *tumor necrosis factor α*) [192,197]. Uwalniane cytokiny pośredniczą w zapaleniu poprzez interakcję z receptorami TLR, a także z receptorem dla IL-1, IL-6 oraz TNF- α [198]. Aktywacja receptorów wyzwała główne szlaki sygnalizacyjne, takie jak szlak kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinase*), szlak aktywacji czynnika jądrowego kappa B (NF- κ B, ang. *nuclear factor kappa B*) i szlak kinaz Janusa (Jak, ang. *Janus kinase*) oraz przetwornika i aktywatora transkrypcji (STAT, ang. *signal transducer and activator of transcription*), powodując aktywację czynników transkrypcyjnych [192,197,198]. Ta koordynująca aktywacja cząsteczek sygnałowych reguluje poziom mediatorów stanu zapalnego w rezydentnych komórkach tkankowych i rekrutuje komórki zapalne z krwi do miejsca uszkodzenia [197]. Większość naciekających komórek zapalnych w ostrym zapaleniu to granulocyty, a w miejscach przewlekłego zapalenia makrofagi i limfocyty [199]. Jeśli bodziec prozapalny nie zostanie wyeliminowany z miejsca uszkodzenia, niekontrolowane ostre zapalenie może stać się przewlekłe, co prowadzi do autoimmunizacji, zwłóknienia tkanek i martwicy [200]. Utrzymywanie się czynników zapalnych i uszkodzenie tkanek są kluczowymi czynnikami przewlekłego stanu zapalnego, który predysponuje do wielu chorób przewlekłych, m.in. chorób układu krążenia i jelita,

cukrzyca, zapalenia stawów, niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby, chorób autoimmunologicznych i neurodegeneracyjnych oraz nowotworów [192,193].

2.1. Stan zapalny w kancerogenezie

Coraz więcej danych wskazuje na fakt, że stan zapalny predysponuje do rozwoju nowotworów, a także promuje wszystkie etapy nowotworzenia [201]. Około 15-20% wszystkich przypadków raka poprzedzonych jest infekcją, długotrwałym przewlekłym stanem zapalnym lub procesem autoimmunizacyjnym w tej samej tkance lub narządzie. Do najczęstszych przykładów należą przewlekłe zapalenie wątroby wywołane wirusem zapalenia wątroby typu B lub C, zapalenie błony śluzowej żołądka wywołane przez *Helicobacter pylori* i zapalenie pęcherza moczowego wywołane *Schistosoma haematobium*, które zwiększają odpowiednio ryzyko raka wątroby, żołądka oraz pęcherza moczowego [202]. Do innych czynników zakaźnych biorących udział w kancerogenezie należy wirus Epstein-Barr, który prowadzi do rozwoju raka jamy nosowo-gardłowej i niektórych chłoniaków (w tym chłoniaka Burkitta), a czynnikiem sprawczym jest onkoproteina LMP1 (ang. *Epstein-Barr virus latent membranę protein 1*), której rola opiera się na aktywacji genów kodujących białka zaangażowane w promocję proliferacji (np. receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu, EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor*) lub na hamowaniu apoptozy (np. Bcl 2, ang. *B-cell lymphoma 2*), a także aktywacji czynnika NF-κB [203]. Na uwagę zasługuje również wirus brodawczaka ludzkiego (HPV, ang. *human papillomavirus*) indukujący raka szyjki macicy, gardła, odbytu i narządów płciowych, za co odpowiedzialne są produkty genów E6 i E7 uszkodzające DNA [204]. Rodzina HPV obejmuje ok 170 różnych podtypów wirusa, a te znajdujące się w grupie wysokiego ryzyka odpowiadają za 5% wszystkich nowotworów u ludzi, co stanowi jedną trzecią wszystkich nowotworów o etiologii wirusowej [204]. Inne wirusy odpowiedzialne za inicjację kancerogenezy to wirus mięsaka Kaposiego (białko wirusowe - antygen jądrowy związany z latencją LANA, ang. *latency-associated nuclear antigen*), czy ludzki wirus białaczki z komórek T (białko Tax) [205,206]. Jednak nie tylko zakażenie, ale również czynniki nieinfekcyjne, takie jak dym tytoniowy, choroby autoimmunologiczne, ekspozycja na azbest, choroba refluksowa przełyku, zapalenie wątroby, otyłość, czy nadmierne spożycie alkoholu indukują proces kancerogenezy wywołany zapaleniem [207,208].

Jako pierwszy o istnieniu związku między stanem zapalnym a procesem nowotworzenia wspominał w XIX wieku niemiecki patolog Rudolf Virchow, który odkrył naciekające krwinki białe w tkance nowotworowej [209]. W 2011 roku Hanahan i Weinberg wymienili „promowanie stanu zapalnego guza” jako jedną z cech raka i zaproponowali, że stan zapalny może propagować różne funkcje guza poprzez dostarczenie cząsteczek bioaktywnych do mikrośrodowiska guza (TME, ang. *microenvironment tumor*) [210]. TME tworzą nie tylko komórki nowotworowe, ale również komórki zrębowe i zapalne, fibroblasty, komórki śródbłonna, czynniki wzrostu, czynniki proangiogenne, cytokiny oraz chemokiny [202,211]. Komórki w TME są wysoce plastyczne, ciągle zmieniają swoje cechy fenotypowe i funkcjonalne, odgrywając znaczącą rolę w naprawie i regeneracji tkanek po uszkodzeniu albo wykazując działanie prozapalne i biorąc udział w ewolucji i progresji wielu chorób, w tym raka [212]. Komórki zapalne, cząsteczki sygnalizacyjne wrodzonego układu odpornościowego, czyli selektyny, chemokiny i ich receptory, czynniki wzrostu i inne elementy promujące uszkodzenia DNA obecne w TME sprzyjają proliferacji, przeżyciu, oraz migracji komórek w odległe miejsca przerzutowania [213]. Składowe występujące w obrębie guza mogą predysponować do neutralizacji złośliwych komórek nowotworowych, ale w wyniku ewolucji onkogennej transformowane komórki mogą uciekać spod kontroli układu odpornościowego (aktywność przeciwnowotworowa jest wyciszona) [211,214]. Jeżeli eliminacja komórek nowotworowych przez układ odpornościowy nie jest już możliwa, komórki i czynniki należące do TME mogą powodować wzmożone przeżycie i unikanie apoptozy przez komórki guza, a także indukować angiogenezę, stymulować inwazję i proces metastazy [210,211]. Mechanizmy zapalne uczestniczące we wszystkich etapach nowotworzenia nie są do końca poznane, ale proponowane hipotezy wskazują na współuczestniczenie endogennej ścieżki inicjowanej zmianami genetycznymi (spowodowana mutacjami aktywacja protoonkogenów i inaktywacja genów supresorowych), które prowadzą do nowotworów i zapalenia oraz ścieżki egzogennej, stymulowanej przez zapalenie i również inicjującej nowotwór w narządach zagrożonych, jak gruczoł krokowy, trzustka, okrężnica, czy płuco [215]. Indukcja ostrych stanów zapalnych stymuluje dojrzewanie komórek dendrytycznych i prezentację antygeny, prowadząc do przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej i w konsekwencji do śmierci komórek nowotworowych, natomiast przewlekłe zapalenie uczestniczy w immunosupresji zapewniając środowisko predysponujące do powstawania nowotworu, progresji i przerzutów oraz

sprzyjając oporności na leczenie [199]. Dowodzi to, iż stan zapalny odgrywa podwójną rolę w nowotworach, mianowicie może je promować lub hamować ich rozwój [202].

Cytokiny zostały podzielone na podstawie budowy i funkcji na kilka nadrodzin, do których należą interferony (INF, ang. *interferons*), czynniki martwicy nowotworu (TNF, ang. *tumor necrosis factors*), interleukiny (ILs, ang. *interleukins*), transformujące czynniki wzrostu (TGFs, ang. *transforming growth factors*), cytokiny chemotaktyczne (chemokiny) oraz czynniki stymulujące tworzenie kolonii (CSFs, ang. *colony-stimulating factor*) [216–218]. Cytokiny spełniają swoje specyficzne funkcje poprzez mechanizmy auto- lub parakryne. Komórki nowotworowe uwalniają cytokiny, które w sposób autokryny mogą dodatkowo generować pętlę sprzężenia zwrotnego, doprowadzając do indukcji samoproliferacji, ekspansji i lekooporności, natomiast w sposób parakryny stymulują rekrutację, aktywację i różnicowanie innych komórek TME, mogą zwiększać wzrost guza i angiogenezę [219]. Do kluczowych regulatorów inicjacji stanu zapalnego należy wiele szlaków sygnałowych, takich jak NF- κ B, Jak (kinaza Janusa, ang. *Janus kinase*)/STAT, szlaki receptorowe TLR, szlak obejmujący cykliczną syntazę GMP-AMP (cGAS, ang. *cyclic GMP-AMP synthase*, znaną również jako MB21D1), która działa przez stymulator genów interferonu (STING, ang. *stimulator of interferon genes*), czy MAPK [199]. Natomiast czynniki zapalne ważne dla inicjacji zapalenia to m.in. szereg cytokin (np. IL1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, IFN- γ , TNF- α) oraz chemokiny niezbędne do rekrutacji komórek zapalnych w obszarze uszkodzenia (ligandy z motywem C-C, np. CCL2 oraz ligandy z motywem C-X-C, np. CXCL12) [199,200,209,220]. Do ustąpienia zapalenia przyczyniają się komórki przeciwzapalne (np. makrofagi M2, czy limfocyty T regulatorowe – Treg, ang. *regulatory T cells*), niektóre cytokiny, jak IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , INF- α i IFN- β , oraz endogenne regulatory stanu zapalnego (SPMs, ang. *specialized pro-resolving mediators*), sprzyjające wyciszeniu zapalenia, takie jak protektyny (PD1, ang. *protectin D1*), rezolwiny (RVS, ang. *resolvins*, np. RvE, RvD), marezyny (ang. *maresins*, np. MaR1, MaR2), lipoksyny (LX, ang. *lipoxins*, np. LTA4, LXA4, LXB4) oraz koniugaty protektyny w regeneracji tkanek (PCTR, ang. *protectin conjugates in tissue regeneration*) [199,221,222]. Poszczególne czynniki stanu zapalnego pełnią różne funkcje na kolejnych etapach rozwoju guza nowotworowego, a mianowicie w inicjacji, promocji oraz progresji i przerzutowaniu [202]. Szlaki endogenne i egzogenne łączące stan zapalny z rakiem aktywują czynniki transkrypcyjne, takie jak NF- κ B, STAT3, czynnik indukowany hipoksją (HIF-1, ang. *hypoxia-inducible factor-1*), które oddziałując na wielu poziomach zwiększają stan zapalny związany

z nowotworem, tłumią przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną oraz kumulują czynniki rakotwórcze w TME [223]. Najistotniejsza relacja między rakiem a stanem zapalnym wiąże się z działaniem NF-κB oraz szlaku STAT3 [220]. Szczególne znaczenie ma NF-κB, który manipuluje TME kontrolując ekspresję cytokin prozapalnych oraz regulując wzrost i migrację komórek [224]. NF-κB jest głównym regulatorem cytokin (IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, TNF, IFN-γ, CCL-5), które sprzyjają wzrostowi guza poprzez stymulowanie proliferacji komórek, zarówno w sposób autokryny, jak i parakryny [225]. Aktywacja szlaku NF-κB nie tylko indukuje ekspresję cytokin zapalnych, ale również cząsteczek adhezyjnych (jak cząsteczka adhezji międzykomórkowej ICAM-1, ang. *intercellular adhesion molecule 1*, a także cząsteczka adhezji komórkowej naczyń VCAM-1, ang. *vascular cell adhesion molecule 1*), enzymów szlaku syntezy prostaglandyn (takich jak cyklooksygenaza indukowana COX2, ang. *cyclooxygenase-2*), syntazy tlenku azotu (NOS, ang. *nitric oxide synthase*), czynników angiogennych i genów antyapoptotycznych (jak Bcl-2) [226–228]. Odpowiada za ograniczoną skuteczność terapii ze względu na promowanie rozwoju raka i hamowanie odporności przeciwnowotworowej, sprzyja zmianom genetycznym i epigenetycznym oraz przejściu nabłonkowo-mezenchymalnemu (EMT, ang. *epithelial-to-mesenchymal transition*), które stanowi kluczowy proces w inwazyjności guza [229,230]. Badania Greten i wsp. [231] były jednym z pierwszych dowodów wpływu zapalenia na promowanie nowotworu, co udowodniono poprzez inaktywację NF-κB w komórkach szpiku, gdzie ablacja inhibitora kinazy czynnika jądrowego κB doprowadziła do zmniejszenia wzrostu guza w modelu raka związanego z zapaleniem jelita grubego. Ciągła aktywacja STAT3 natomiast jest niezbędna do inicjacji i progresji litych złośliwych nowotworów poprzez proliferację i przeżycie komórek, angiogenezę, inwazję i zapalenie promujące nowotwór. Nieustępująca aktywacja STAT3 wzmacnia wytwarzanie chemokin zdolnych do przyciągania komórek odpornościowych i zapalnych, które dalej propagują aktywność STAT3 poprzez uwalnianie głównie IL-6 i IL-1β [232]. Zestaw cytokin zaangażowanych w pronowotworowe zapalenie TME w danym momencie rozwoju raka może być specyficzny, ponieważ różne komórki mogą uwalniać inne patogenne cytokiny w określonym czasie na danym etapie progresji choroby [225]. W TME w znacznej ilości występują makrofagi, tzw. makrofagi związane z nowotworem (TAMs, ang. *tumor-associated macrophages*), które wraz z innymi leukocytami wytwarzają duże ilości reaktywnych form tlenu i azotu i które w warunkach ciągłego uszkodzenia wpływają negatywnie na DNA, powodując mutacje w namnażających się komórkach nabłonka i zrębu [208]. CSFs uwalniane

przez komórki nowotworowe podtrzymują funkcje TAM, a te odpowiednio aktywowane mogą zabijać komórki nowotworowe [233]. Jednak TAMs wytwarzają również czynniki wzrostu, czynniki angiogenne, a także enzymy proteolityczne, które degradują macierz zewnątrzkomórkową i mogą stymulować proliferację komórek nowotworowych, promować angiogenezę oraz sprzyjać inwazji i przerzutom [208,233]. Makrofagi i limfocyty T mogą uwalniać TNF- α i czynnik hamujący migrację makrofagów w celu nasilenia uszkodzeń DNA [234]. Obecność w TME makrofagów i neutrofilii związanych z nowotworem, komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego oraz Tregs wiąże się ze złym rokowaniem ze względu na produkcję IL-10, TGF- β oraz prostaglandyn, które są silnymi immunosupresorami odpowiedzialnymi za hamowanie działanie przeciwnowotworowego komórek NK (ang. *natural killer*), T oraz B [235,236]. Jednym z najczęściej mutowanych supresorów nowotworowych jest gen *TP53* kodujące białko p53, które charakteryzuje antagonizm transkrypcyjny z czynnikiem NF- κ B (pozytywny regulator stanu zapalnego) [202,237]. Czynniki hamujący migrację makrofagów upośledza ochronę zależną od białka p53 kumulując w ten sposób mutacje onkogenne, a także powoduje zwiększoną ekspresję genów zapalnych zależnych od NF- κ B, co np. w raku jelita grubego przyczynia się do progresji guza i przerzutów [202,208]. Innym przykładem zaangażowania cytokin w proces wzrostu guza jest aktywacja *K-RAS* (ang. *Kirsten rat sarcoma virus*), który jest najczęściej ulegającym mutacjom protoonkogenem w ludzkich nowotworach jelita grubego, trzustki i płuca (20-25%) [238,239]. Białko K-ras konstytutywnie aktywuje NF- κ B, co prowadzi do uwalniania cytokin, wśród których największe znaczenie wydaje się mieć IL-6, która oddziałując z receptorem Jak aktywuje STAT3, a szlak ten aktywując onkogeny i zwiększając ekspresję genów zaangażowanych w proliferację (np. cykliny D1) powoduje zwiększone namnażanie się komórek nowotworowych i indukuje wzrost guza [225,240,241]. Dowodem na udział stanu zapalnego w indukowaniu mutacji i uszkodzeń DNA jest również działanie takich cytokin, jak IL-22, która stymuluje ekspresję genów związanych z odpowiedzią na uszkodzenia DNA przeciwdziałając możliwemu urazowi genotoksycznemu, czy cytokiny IL-6, TNF- α i IL-1 β , które wpływając na ekspresję genów w komórkach nabłonka, w tym składniki modyfikacji DNA i histonów, microRNA, czy niekodujące RNA, modulują poziomy ekspresji genów i supresorów nowotworów [242,243]. Wydzielanie cząsteczek zapalnych związane jest również ze starzeniem się komórek, proces indukowany przez skracanie telomerów, stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA, aktywację onkogenów lub chemioterapię czy radioterapię jonizującą [244].

Lokalne komórki starcze, które wykształciły fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem się (SASP, ang. *senescence-associated secretory phenotype*) wydzielają wiele cytokin prozapalnych, w tym IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CXCL-1 i CXCL-2, które są zdolne do indukowania nowotworzenia w sposób parakryny [225]. Kuilman i wsp. [245] wykazali, iż IL-6, która może być wydzielana przez starzejące się komórki, odgrywa ważną rolę w zahamowaniu cyklu komórkowego i aktywacji starzenia indukowanego onkogenem (OIS, ang. *oncogene-induced senescence*). Wysunięto hipotezę co do podwójnej roli IL-6, mianowicie cytokina ta może działać protoonkogennie np. w pobudzeniu zaawansowanego czerniaka, natomiast w innych sytuacjach działa przeciwonkogennie poprzez indukcję OIS we wczesnych stadiach komórek nowotworowych [245]. Stan zapalny uczestniczy w procesie nowotworzenia na każdym etapie. Podczas inicjacji procesu nowotworzenia w warunkach toczącego się zapalenia mediatory zapalne, reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) i reaktywne formy azotu (RNS, ang. *reactive nitrogen species*), pochodzące z komórek odpornościowych infiltrujących nowotwór, wywołują zmiany epigenetyczne w komórkach przednowotworowych oraz wyciszają geny supresorowe [246]. Podczas promocji nowotworu komórki odpornościowe uwalniają cytokiny i chemokiny stwarzające warunki do przeżycia i proliferacji komórek nowotworowych (zaopatrywanie w tlen, składniki odżywcze, czynniki wzrostu i przeżycia) [247]. Na etapie progresji i metastazy natomiast zarówno komórki odpornościowe, jak i złośliwe wydzielają cytokiny i chemokiny, co zwiększa przeżywalność, ruchliwość oraz inwazyjność komórek oraz inicjuje EMT, które wiąże się z utratą fenotypu nabłonkowego i nabyciem przez komórki możliwości ruchliwości i migracji [248–250]. Dla procesu metastazy kluczowe jest właśnie EMT, kiedy to komórki nowotworowe tracą adhezję między sobą poprzez zmniejszoną ekspresję E-kadheryny, przez co są zdolne do przedostania się poza obszar guza do krwiobiegu, atakują tkanki otaczające oraz drogą naczyń krwionośnych i limfatycznych tworzą przerzuty odległe [251]. EMT jest silnie promowane przez TGF- β , ale wzmacniane może być również przez IL-6, TNF czy IL-1 β [225]. Tworzenie nowych naczyń krwionośnych jest uzależnione głównie od czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) oraz podstawowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF, ang. *basic fibroblast growth factor*) [244,252]. Wśród innych proangiogennych czynników zapalenia wyróżnia się czynnik wzrostu hepatocytów (HGF, ang. *hepatocyte growth factor*), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF, ang. *platelet-derived growth factor*), TGF- β , a także chemokiny CXC, zawierające motyw ELR (motyw Glu-Leu-Arg), jak IL-8, podczas gdy chemokiny

pozbawione tego motywu (np. czynnik płytkowy 4) wykazują właściwości antyangiogenne [252,253]. W Tabeli 2 zestawiono wybrane czynniki stanu zapalnego oraz przedstawiono ich rolę w procesie nowotworzenia.

Tab. 2. Rola wybranych czynników stanu zapalnego w procesie nowotworzenia.

Czynnik zapalny	Rola w rozwoju guza	Źródło
TNF- α	<ul style="list-style-type: none"> • Jeden z najważniejszych i najwcześniejszych mediatorów stanu zapalnego o plejotropowej funkcji; • uwalniany głównie przez makrofagi i komórki tuczne; • jako cytokina prozapalna bierze udział w indukcji raka związanego z zapaleniem, przyczynia się do apoptozy, EMT, zwiększenia tempa proliferacji, inwazji i przyspieszenia angiogenezy; • może wykazywać również działanie przeciwnowotworowe, co czyni go potencjalnym celem terapeutycznym; • poprzez indukcję genów kodujących cząsteczki antyapoptotyczne zależne od NF-κB promuje przeżycie komórek nowotworowych natomiast poprzez trwałą aktywację szlaku sygnałowego zależnego od kinazy N-końcowej c-JUN (JNK) na drodze pobudzenia kompleksu kinaz fosforylujących JNK, kinazy MAPK przyczynia się do śmierci komórki; • nieprawidłową ekspresję TNF-α stwierdzono w różnych chorobach nowotworowych, w tym w raku stercza, jajnika, wątroby i piersi. 	[244,254, 255]
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • Plejotropowa cytokina pronowotworowa uwalniana, m.in. przez monocyty i makrofagi ale ulega ekspresji również w tkankach nowotworowych (rak płuca, piersi, jelita grubego); • za pośrednictwem STAT3 zaangażowana w stymulację angiogenezy, promocję, proliferację i zwiększoną przeżywalność komórek nowotworowych; • wysoki poziom IL-6 koreluje ze złym rokowaniem u pacjentów z chorobą zaawansowaną; • cytokina związana z hamowaniem programów apoptotycznych oraz uwalnianiem reaktywnych form tlenu i azotu; • stanowi obiecujący cel terapii. 	[244,256–258]

IL-1	<ul style="list-style-type: none"> • IL-1α • IL-1β • IL-1ra 	<ul style="list-style-type: none"> • Rodzina IL-1 obejmuje wewnątrzkomórkowego agonistę IL-1α, pozakomórkowego agonistę IL-1β oraz antagonistę receptora IL-1 (IL-1ra); • główny mediator alarmowy stanu zapalnego; • działa w sposób autokryny, stymulując komórkę nowotworową do inwazji i proliferacji lub w sposób parakryny wpływając na działanie komórek mikrośrodowiska guza, indukując ekspresję genów przerzutowych, takich jak metaloproteinazy macierzy i stymulując uwalnianie białek angiogennych oraz czynników wzrostu (VEGF, IL-8, IL-6, TNFα, TGFβ); • sugeruje się wykorzystanie IL-1 jako celu terapeutycznego lub profilaktycznego w wybranych ludzkich nowotworach; • IL-1 dodatnio skorelowana w kilku typach nowotworów; • pacjenci z wysokim poziomem IL-1 mają złe rokowanie; • IL-1β i jej receptor są ważnymi czynnikami symulującymi przejście EMT oraz umożliwiającymi inhibicję ekspresji p53; • W przypadku IL-1ra wykazano możliwość blokowania produkcji CSF przez fibroblasty, limfocyty i monocyty w ostrych i przewlekłych białaczkach szpikowych, ponadto sugeruje się możliwość blokowania indukowanej przez IL-1 angiogenezy, progresji i metastazy. 	[208,259–261]
TGF-β		<ul style="list-style-type: none"> • Wytwarzany przez neutrofile, makrofagi; • odgrywa istotną rolę w inicjacji i progresji nowotworu, w EMT, wspomaga ucieczkę immunologiczną, angiogenezę, hamowanie apoptozy; • działa jako silny supresor nowotworu w prawidłowych i przednowotworowych komórkach poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, indukję apoptozy we wczesnym etapie nowotworzenia lub autofagię w niektórych komórkach nowotworowych; • w późniejszych stadiach, gdy komórki nowotworowe nabyły mutacje onkogenne i/lub utraciły funkcję genu supresorowego i stały się odporne na zatrzymanie wzrostu wywołane przez TGF-β, cytokina ta prowadzi do promocji guza. 	[225,262–265]
IL-10		<ul style="list-style-type: none"> • Plejotropowa cytokina o działaniu przeciwzapalnym i immunostymulującym; • wytwarzana przez prawie wszystkie leukocyty oraz liczne ludzkie komórki nowotworowe, w tym komórki raka piersi, nerki, okrężnicy, trzustki, czerniaka złośliwego i nerwiaka niedojrzałego; • w raku może wywierać działanie pro- lub przeciwnowotworowe; 	[208,261,266,267]

	<ul style="list-style-type: none"> • zaangażowana w powstrzymanie rozwoju nowotworu, jednak w zależności od sytuacji w mikrośrodowisku guza może tłumić przeciwnowotworowe działanie Th1 albo pronowotworową aktywność Th17; • niezbędna do tłumienia mediatorów zapalnych promujących nowotwór, ułatwiając w ten sposób wzrost guza i przerzuty; • liczne badania dotyczą zwiększenia stężenia IL-10 w mikrośrodowisku guza, aby pośredniczyć w regresji nowotworu, ponieważ zależna od IL-10 stymulacja limfocytów T CD8+ indukuje specyficzną dla nowotworu odporność. 	
IL-12	<ul style="list-style-type: none"> • Syntetyzowana przez makrofagi i komórki dendrytyczne; • spełnia rolę ochronną przed nowotworem, zapobiega inicjacji, progresji i procesowi metastazy nowotworu; • zaangażowana w odporność przeciwnowotworową poprzez aktywację efektorowej odpowiedzi Th1; • aktywuje cytotoksyczne komórki NK oraz limfocyty T CD8 do produkcji IFN-γ i TNF-α kontrolując wzrost guza i przyczyniając się do śmierci komórek nowotworowych; • IL-12 ze szlakiem zależnym od IFN-γ może być skuteczna w leczeniu raka płuca oraz kontrolować układ naczyniowy w czerniaku; • ogólnoustrojowe podawanie IL-12 jest toksyczne dlatego poszukuje się innych dróg dostarczenia tej cytokiny lub aktywacji komórek T przez IL-12. 	[268–270]
Chemokiny	<ul style="list-style-type: none"> • Chemokiny i ich receptory odgrywają istotną rolę w zapaleniu związanym z procesem nowotworzenia (migracja leukocytów do miejsca zapalenia i mikrośrodowiska guza); • bezpośrednio regulują wzrost guzów poprzez indukowanie proliferacji komórek nowotworowych i zapobieganie ich apoptozie: stymulują szlak MAPK/Erk, co prowadzi do ekspresji genów stymulujących wzrost; • wpływają na ruch komórek nowotworowych wymagany do przerzutów, pośrednio modulują uwalnianie czynników wzrostu i angiogennych z komórek nowotworowych w mikrośrodowisku guza; • promocja przeżycia również poprzez obniżenie ekspresji Bcl-2. 	[262,271–273]
Chemokiny CC	<ul style="list-style-type: none"> • Działają na kilka podgrup leukocytów: monocyty, eozynofile, komórki dendrytyczne, limfocyty, komórki NK, ale nie działają na neutrofile. 	[208]

Chemokiny CXC	<ul style="list-style-type: none"> • Działają na neutrofile i limfocyty; • często wydzielane przez nowotwory ludzkie i mysie; • obecność motywu ELR na N-końcu chemokiny stanowi zwykle o jej właściwościach angiogennych, mianowicie ELR (+) są proangiogenne, a ELR (-) hamują angiogenezę. • ELR (+): CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 i CXCL8 • ELR (-): CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11 i CXCL14 	[208,272]
CXCL12	<ul style="list-style-type: none"> • CXCL12 jest chemokiną ELR (-), ale stanowi najsilniejszą angiogenną chemokinę; • wraz z CXCL8 wzmacnia ekspresję VEGF, uruchamiając kaskadę dodatniego sprzężenia zwrotnego, w konsekwencji czego VEGF zwiększa produkcję angiogennych chemokin. 	[274,275]
CXCL4, CXCL10	<ul style="list-style-type: none"> • Odpowiedzialne za hamowanie angiogenezy pobudzonej przez VEGF lub bFGF, hamują chemotaksję i proliferację komórek śródbłonna. 	[272]
CCL21	<ul style="list-style-type: none"> • Proponuje się wiele podejść przeciwnowotworowych, aby chemokiny były celem hamowania przerzutów i angiogenezy, czego przykładem jest wprowadzenie genu ligandu chemokiny CCL21 do komórek dendrytycznych, które mogą stanowić szczepionkę przeciwnowotworową wzmacniającą odpowiedź immunologiczną (np. w raku płuca). 	[262,276]

IFN	<ul style="list-style-type: none"> • Interferony regulują procesy molekularne, komórkowe i fizjologiczne odpowiadające za reakcje zapalne; • mogą wpływać na metabolizm i proliferację komórek nowotworowych lub indukować apoptozę; • odkryto trzy typy INF: I, II i III; • INFy odgrywa kluczową rolę w aktywacji odporności skierowanej na nowotwór (funkcja cytostatyczna, proapoptotyczna, antyproliferacyjna), jednak niektóre doniesienia wskazują na jego podwójną rolę w nowotworzeniu. 	[262,277, 278]
------------	--	----------------

bFGF – podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów, CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii, EMT - przejście nabłonkowo-mezenchymalne, Erk - kinaza regulowana szlakiem zewnątrzkomórkowym, IL – interleukina, IL-1ra – antagonist receptoru IL-1, IFN – interferon, JNK - kinaza białkowa c-Jun, MAPK - kinaza białkowa aktywowana mitogenem, NF-κB – czynnik jądrowy kappa B, STAT3 – przetwornik i aktywator transkrypcji, TGF – czynnik wzrostu guza, TNF – czynnik martwicy nowotworu, Th – komórka T pomocnicza

2.2. Rola stanu zapalnego w NENs

Przewlekłe zapalenie będące czynnikiem predysponującym do rozwoju wielu cech raka, okazuje się krytyczne również w przypadku nowotworów neuroendokrynych [127]. Ogólnoustrojowy stan zapalny może powodować nadmierną stymulację komórek neuroendokrynych doprowadzając do hiperplazji i transformacji nowotworowej, jednak odpowiednia modulacja układu odpornościowego może stanowić cel terapeutyczny, a markery zapalne - obiecujące narzędzie do zastosowania w diagnostyce, przewidywaniu odpowiedzi na leczenie, a także jako biomarkery prognostyczne w NENs [127,232]. W tej kwestii w przypadku LNENs na uwagę zasługuje ligand zaprogramowanej śmierci 1 (PD-L1, ang. *programmed death ligand-1*) [279]. PD-L1 jest białkiem transbłonowym regulującym aktywność komórek odpornościowych, wiążąc się na ich powierzchni z białkiem PD-1. Interakcja PD-L1 i PD-1 hamuje przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną poprzez negatywną regulację komórek T, poprzez zahamowanie ich proliferacji, aktywacji, produkcji cytokin, zmianę metabolizmu i funkcji zabójczych cytotoksycznych limfocytów T, prowadząc ostatecznie do śmierci aktywowanych limfocytów T [280]. W związku z tym blokada szlaku PD-L1/PD-1 stała się obiecującą terapią antynowotworową w różnych nowotworach złośliwych, również w raku płuca [279]. Tsuruoka i wsp. [281] badali częstość ekspresji PD-L1 w każdym typie guza neuroendokrynnego płuca, co pozwoliło stwierdzić jego obecność w 10,4% przypadków LCNEC oraz w 5,8% SCNEC, natomiast nie stwierdzono go w rakowiaku oskrzeli. Galvano i wsp. [282] oceniali natomiast rolę ogólnoustrojowych markerów stanu zapalnego, NLR, dehydrogenazy mleczanowej (LDH, ang. *lactate dehydrogenase*), wskaźnika stanu zapalnego zaawansowanego raka płuca (ALI, ang. *advanced lung cancer inflammation index*) oraz immunologicznego wskaźnika prognostycznego płuc (LIPI, ang. *lung immune prognostic index*), które w momencie diagnozy LNENs mogą mieć istotne znaczenie. Wskazano na dodatnią korelację NLR, LIPI oraz LDH ze złym rokowaniem, natomiast niski wskaźnik ALI wskazywał na poprawę i lepsze rokowanie [282]. Niektóre badania wskazują na ekspresję receptora CXCR4 w LNENs, szczególnie w SCLC, co kojarzone jest ze wzrostem złośliwości nowotworu [283]. Inną chemokinę prawdopodobnie istotną w przypadku LNENs jest CXCL12, zwłaszcza w AC [76]. Przewód pokarmowy człowieka stanowi obszar organizmu, w którym występuje najwyższe stężenie drobnoustrojów [284]. Zaburzona flora bakteryjna gospodarza jest również czynnikiem w patogenezie i progresji ogólnoustrojowego stanu zapalnego, a ten

z kolei nie jest obojętny w stosunku do komórek neuroendokrynych licznie występujących w przewodzie pokarmowym [284,285]. Również utrata funkcji białka p53 w przypadku raka okrężnicy stymuluje stan zapalny zależny od szlaku NF- κ B. Mechanizmy te składają się na hiperstymulację lub dysplazję komórek rozproszonego układu wydzielania wewnętrznego w błonie śluzowej przewodu pokarmowego predysponując do NENs [286,287]. Badania w ostatnich latach wykazały, iż GEP-NETs występują częściej w warunkach przewlekłego zapalenia, a szczególne znaczenie mają dla ich rozwoju TNF- α , IL-6, IL-2, IL-1 β oraz TGF- β [288,289]. Wiele badań dotyczy również polimorfizmów pojedynczych nukleotydów dla poszczególnych cytokin, które mają znaczenie dla rozwoju, różnicowania określonych typów NETs oraz mogą wskazywać na rokowanie [232].

3. Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny definiuje się jako zaburzoną równowagę pomiędzy produkcją i akumulacją ROS w komórkach i tkankach, a zdolnością mechanizmów obronnych do ich neutralizacji [290]. Wolne rodniki fizjologicznie stanowią produkty uboczne metabolizmu tlenu, ale w wyniku działania wielu czynników środowiskowych, takich jak promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe (UV, ang. *ultraviolet*), zanieczyszczenia, metale ciężkie i ksenobiotyki dochodzi do nasilonej produkcji ROS, co może prowadzić do uszkodzenia komórek i tkanek [290,291]. Głównymi celami stresu oksydacyjnego są łańcuchy boczne aminokwasów w białkach, podwójne wiązania w nienasyconych kwasach tłuszczowych (lipidy) oraz zasady w kwasach nukleinowych (DNA/RNA), a zmiany modyfikacyjne tych cząsteczek mogą predysponować do mutagenyzy i zwiększać ryzyko chorób krążenia, raka, cukrzycy, czy chorób metabolicznych [292,293]. Wolne rodniki są z natury niestabilnymi cząsteczkami ze względu na obecność niesparowanych elektronów i pochodzą najczęściej z cząsteczek tlenu, azotu i siarki [291,293]. ROS obejmują anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$), rodnik hydroksylowy ($\bullet OH$), rodnik wodoronadtlenkowy (HO_2^{\bullet}), nadtlenuk wodoru (H_2O_2), tlen singletowy (1O_2), tlenek azotu (NO), natomiast RNS powstają w wyniku reakcji NO z $O_2^{\bullet-}$ z wytworzeniem nadtlenoazotynu ($ONOO^-$), a reaktywne formy siarki (RSS, ang. *reactive sulphur species*) powstają z tioli w reakcji z ROS [294,295]. ROS są zwykle uwalniane jako produkty uboczne przez mitochondrialny transport elektronów podczas oddychania

komórkowego (90%) lub przez enzymy z klasy oksydoreduktaz (jak oksydaza glukozowa i ksantynowa) i jako półprodukty reakcji utleniania katalizowanych przez metale [290,296]. $O_2^{\bullet-}$ wytwarzany jest w wielu miejscach w mitochondriach na skutek tzw. wycieku elektronów z łańcucha transportu elektronów, głównie w miejscach wiązania ubichinonu, w tym np. w kompleksie I i III, z których kompleks I (zredukowany dinukleotyd nikotynamidoadeninowy:oksydoreduktaza ubichinonu) generuje rodnik tylko do macierzy mitochondrialnej, natomiast kompleks III (ubichinol:oksydoreduktaza cytochromu c) generuje rodnik ponadtlenkowy zarówno do macierzy, jak i do przestrzeni międzybłonowej, skutkując jednoelektronową redukcją tlenu [297–299]. Około 0,2-2,0% tlenu cząsteczkowego zużywane jest przez mitochondria do redukcji anionów ponadtlenkowych, które są z kolei wykorzystywane do wytwarzania innych ROS, np. H_2O_2 [300]. H_2O_2 natomiast rozkładany jest przy udziale jonów metali, takich jak jony żelaza (II) w reakcji Fentona, jony miedzi, cynku, czy glinu, co prowadzi do powstania rodnika i anionu hydroksylowego [296]. Innymi źródłami endogennej produkcji ROS jest retikulum endoplazmatyczne, peroksosomy i błona plazmatyczna [301]. Rodnik hydroksylowy jest najbardziej reaktywny spośród wszystkich rodników, wysoce mobilny i rozpuszczalny w wodzie, ma krótki okres półtrwania, a w każdej sekundzie komórka może wytwarzać 50 takich rodników w metabolizmie komórkowym i w warunkach stresowych [291,302]. Co ciekawe, w ciągu dnia każda komórka mogłaby wytworzyć 4 miliony rodników hydroksylowych, które powodują uszkodzenia oksydacyjne składników komórkowych znajdujących się mniej niż kilka nanometrów od miejsca ich powstania [302]. Wytwarzanie wolnych rodników spełnia wiele fizjologicznych i korzystnych funkcji w organizmie, uczestnicząc w sygnalizacji komórkowej, apoptozie, ekspresji genów i transporcie jonów [295]. Wykorzystywane są do syntezy niektórych struktur komórkowych oraz w obronie organizmu przed patogenami [290]. Produkcja i przechowywanie nadtlenu i tlenu azotu przez fagocyty (neutrofile i makrofagi) wspomaga fagocytozę uczestnicząc w niszczeniu drobnoustrojów chorobotwórczych atakujących organizm [290,303]. Wolne rodniki regulują wewnętrzne kaskady sygnałowe w niektórych komórkach (jak fibroblasty, komórki śródbłonna, komórki mięśni gładkich naczyń, miocyty serca) i indukują odpowiedź mitogenną [290,304,305]. Jednym z najpopularniejszych wolnych rodników, które działają jako cząsteczka sygnałowa jest NO, który w warunkach fizjologicznych poprzez interakcję z metalami i innymi wolnymi rodnikami oraz modulowanie aktywności biologicznej licznych białek działa jako kluczowy przekaznik komórkowy i antyoksydant [306]. NO jest wymagany

do prawidłowej modulacji przepływu krwi, jest zaangażowany w procesy krzepnięcia, ma kluczowe znaczenie dla prawidłowej aktywności neuronów oraz bierze udział w niespecyficzej obronie gospodarza, wymaganej do eliminacji wewnątrzkomórkowych patogenów i komórek nowotworowych [304–306]. Rodnik NO \cdot jest zależnym od śródbłona mediatorem w wazorelaksacji naczyń krwionośnych, w warunkach normalnych wytwarzanym przez enzym NOS, natomiast w warunkach stresu oksydacyjnego reaguje z rodniakiem O $_2^{\cdot-}$ tworząc ONOO $^-$, co prowadzi do uszkodzenia śródbłona [307,308]. Fizjologicznie NO jest regulatorem wielu funkcji w układzie sercowo-naczyniowym, nerwowo-mięśniowym, neurologicznym, moczowo-płciowym, żołądkowo-jelitowym i nerkowym, ma działanie przeciwmiażdżycowe i hamuje aktywację, agregację płytek krwi, chemotaksję leukocytów oraz adhezję śródbłona [309,310]. Ze względu na ważne funkcje fizjologiczne utrzymywanie wolnych rodniaków na umiarkowanym poziomie ma kluczowe znaczenie dla podtrzymania zdrowia człowieka [290]. Nadmierne ilości ROS prowadzą do generacji nadmiernego stresu oksydacyjnego i m.in. do peroksydacji lipidów (LPO, ang. *lipid peroxidation*), czyli do utleniania lipidów zawierających podwójne wiązania węgiel-węgiel, zwłaszcza wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [302]. Głównymi produktami tego procesu są wodoradtlenki: propanal, heksanal, najbardziej toksyczny 4-hydroksynonenal (4-HNE, ang. *4-hydroxynonenal*) oraz dialdehyd malonowy (MDA, ang. *malondialdehyde*), który jest najbardziej mutagennym produktem peroksydacji lipidów [302]. Ponadto ROS uszkadzają strukturę DNA, reagując z zasadami azotowymi, głównie guaniną, w konsekwencji tworząc 8-hydrokso-2-deoksyguanozynę (8-OHdG, ang. *8-hydroxy-2-deoxyguanosine*) lub 8-okso-7,8-dihydro-2-deoksyguanozynę (8-oxodG, ang. *8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine*) [311]. ROS przyczyniają się ponadto do modyfikacji białek poprzez nitrowanie lub chlorowanie aminokwasów, co często skutkuje zmianą funkcji lub struktury molekuł i zazwyczaj zahamowaniem aktywności enzymów [293].

3.1. Stres oksydacyjny a stan zapalny i nowotworzenie

Podczas stanu zapalnego komórki tuczne i leukocyty są rekrutowane do miejsca uszkodzenia i dochodzi do tzw. wybuchu oddechowego w skutek zwiększonego zużycia tlenu, co doprowadza do uwalniania i gromadzenia ROS w miejscu uszkodzenia [312]. Dodatkowo komórki zapalne uwalniają pochodne kwasu arachidonowego, cytokiny i chemokiny, które

działają poprzez dalszą rekrutację komórek zapalnych do miejsca urazu oraz produkcję bardziej reaktywnych form tlenu [312,313]. Mediatorzy zmieniają sygnalizację komórkową, indukują zmiany czynników transkrypcyjnych (np. NF- κ B, STAT3, HIF1- α), dochodzi do indukcji COX2 indukowanej przez NOS oraz do nieprawidłowej ekspresji cytokin i chemokin zapalnych (np. TNF, IL-1, IL-6, IL-8, CXCR4), co dowodzi ich roli w stanie zapalnym indukowanym stresem oksydacyjnym [312,314]. ROS uszkodzając DNA uczestniczą również w rozwoju raka [315]. Endogenne uszkodzenia DNA są genotoksyczne i indukują mutacje [316]. Główną formą ROS atakującą mitochondrialne i jądrowe DNA jest \bullet OH, tworzący hydrolizowane produkty zasadowe: 8-OHdG i 8-oxodG, szeroko stosowane jako biomarkery stresu oksydacyjnego i karcynogenezy [317,318]. Wskazane modyfikacje indukują mutacje typu transwersja GC \rightarrow AT, a ich nagromadzenie prowadzi do rozwoju raka [317]. Organizm może bronić się przed uszkodzeniami DNA np. poprzez wycięcie określonej zasady lub wykorzystanie antyoksydantów [290]. Mimo iż wszystkie żywe komórki mają szeroki zakres mechanizmów naprawy DNA, to ich enzymatyczny system naprawy nie zawsze jest wystarczająco wydajny, by doprowadzić do całkowitego usunięcia wszystkich modyfikacji DNA [315,319]. Ryzyko złej naprawy DNA wzrasta wraz z liczbą uszkodzeń oksydacyjnych występujących w DNA, a te z kolei wzrastają wraz ze starzeniem się komórki [320]. Konsekwencje oksydacyjnego uszkodzenia DNA obejmują nieprawidłowości chromosomalne, hamowanie replikacji DNA oraz cytotoksyczność, a nienaprawiony prawidłowo DNA również stanowi ryzyko dla komórek, ze względu na zmianę informacji genetycznej prowadzącą do mutagenozy i apoptozy [318,321,322]. Oprócz oksydacyjnych uszkodzeń spowodowanych bezpośrednim atakiem wolnych rodników na DNA, można spodziewać się również pośredniego wpływu wolnych rodników na materiał genetyczny poprzez ich reakcję z innymi biomolekułami komórkowymi, np. lipidami [315]. Produkty LPO również mają charakter rakotwórczy i cytotoksyczny, np. MDA reaguje z zasadami guaniny tworząc addukty [323]. Palenie tytoniu, zanieczyszczenie środowiska, przewlekły stan zapalny, ale również stres oksydacyjny wynikający ze stylu życia (np. zwiększona podaż tłuszczów w diecie indukuje nasilenie LPO) odgrywają ważną rolę w rozwoju raka, a także w wyższej śmiertelności z powodu nowotworów [290].

3.2. Mechanizmy antyoksydacyjne

3.2.1. Enzymatyczne mechanizmy antyoksydacyjne

W celu ochrony przed uszkodzeniami oksydacyjnymi komórki wykorzystują endogenne system antyoksydacyjny oparty przede wszystkim na składnikach enzymatycznych, takich jak dysmutazy ponadtlenkowe (SODs, ang. *superoxide dismutases*), katalaza (CAT, ang. *catalase*) i peroksydazy glutationowe (GPxs, ang. *glutathione peroxidases*) [290].

SODs są metaloenzymami, które stanowią pierwszą linię obrony przed ROS [324]. Można je podzielić na cztery grupy, mianowicie: miedziowo-cynkowa SOD (Cu/Zn-SOD), żelazowa SOD (Fe-SOD), manganowa SOD (Mn-SOD) oraz niklowa SOD (Ni-SOD) [325]. Są one nierównomiernie rozmieszczone we wszystkich organizmach żywych i występują w różnych przedziałach subkomórkowych [326]. Organizmy eukariotyczne syntetyzują Cu/Zn-SOD w cytoplazmie (SOD-1) i zewnątrzkomórkowo (SOD-3) oraz Mn-SOD (SOD-2) w mitochondriach [327]. SODs wydajnie katalizują reakcję dysmutacji $O_2^{\cdot-}$ do nadtlenu wodoru i tlenu cząsteczkowego, tym samym obniżając poziom ponadtlenku, który przy nadmiernym stężeniu uszkadza komórki [328]. Reakcji dysmutacji towarzyszy naprzemienna reakcja utleniania-redukcji jonów metali obecnych w miejscu aktywnym SOD [325]. W komórkach nowotworowych zauważono zmniejszoną aktywność Cu/Zn-SOD oraz Mn-SOD, a normalizacja ich poziomu prowadziła nawet do odwrócenia fenotypu komórki nowotworowej [325].

CAT jest enzymem występującym m.in. w peroksysomach, w cytozolu erytrocytów, w mitochondriach, czy hepatocytach. Enzym ten wykorzystuje żelazo lub mangan jako kofaktor i katalizuje reakcję eliminacji H_2O_2 [329,330]. Szybkość obrotu CAT jest najwyższa spośród wszystkich innych enzymów antyoksydacyjnych, jest ona w stanie rozłożyć miliony cząsteczek H_2O_2 w ciągu sekundy [303,330].

GPxs należą do selenobiałek, a ich główna funkcja obejmuje redukcję H_2O_2 do wody oraz redukcję nadtlenczków lipidów do odpowiadających im alkoholi [330,331]. U kręgowców wyróżnia się 8 podtypów GPx: 1-8, z czego wszechobecnie występującym jest GPx1 znajdujący się w cytozolu większości komórek, również krwinek czerwonych [331]. Uważa się go za główny enzym przeciwutleniający, hamujący również LPO, a jego niska aktywność prowadzi do uszkodzeń oksydacyjnych białek funkcjonalnych i kwasów tłuszczowych błony komórkowej

[332]. Co ważne, GPx katalizuje redukcję H₂O₂ i nadtlenków organicznych z udziałem zredukowanego glutationu (GSH, ang. *reduced glutathione*) i w ten sposób chroni lipidy błonowe i hemoglobinę przed utlenianiem oraz bierze udział w detoksykacji ksenobiotyków [333].

3.2.2. Nieenzymatyczne mechanizmy antyoksydacyjne

Nadmiar ROS jest równoważony również działaniem przeciwutleniającym nieenzymatycznych antyoksydantów egzogennych, do których należą witamina C, A oraz E, karotenoidy, czy flawonoidy, oraz antyoksydanty endogenne, jak melatonina, glutation, kwas moczowy, czy albumina [316,334]. Rolą przeciwutleniaczy jest neutralizacja wolnych rodników przez przekazanie elektronów, przez co antyoksydanty stają się nowymi wolnymi rodnikami, ale mniej reaktywnymi niż pierwotne ROS. Mogą one oddziaływać bezpośrednio z ROS tworząc stabilne kompleksy lub kompleksy o mniejszej inwazyjności lub pełnią funkcje kosubstratu w katalitycznym działaniu niektórych enzymów [335].

3.3. Melatonina

Liczne badania *in vivo* oraz *in vitro* wykazały zdolność zarówno fizjologicznych, jak i farmakologicznych stężeń melatoniny w ochronie biomolekuł przed uszkodzeniami wywołanymi przez wolne rodniki [336]. Melatonina (MEL, ang. *melatonin*), inaczej N-acetylo-5-metoksytryptamina, jest pochodną tryptofanu wytwarzaną u kręgowców głównie w szyszynce w odpowiedzi na brak światła niebieskiego (długość fali 458-484 nm) [336,337]. Niezależnie od trybu życia danego gatunku jest uwalniana rytmicznie przez pinealocyty szyszynki i bierze udział w regulacji rytmów okołodobowych i sezonowych [338]. Obecnie synteza MEL została zidentyfikowana także w tkankach pozaszyszynkowych, m.in. w siatkówce oka, błonie śluzowej jelita, nabłonku dróg oddechowych, wątrobie, nerkach, nadnerczach, grasicy, tarczycy, trzustce, jajniku, łożysku i endometrium, a także w komórkach innych niż neuroendokrynne, jak komórki tuczne, komórki NK, eozynofile, płytki krwi i komórki śródbłonna [339]. Synteza i wydzielanie MEL są kontrolowane przez „nadrzędny zegar biologiczny” zlokalizowany w jądrze nadskrzyżowaniowym (SCN, ang. *suprachiasmatic nucleus*) w podwzgórzu, a poziom tego hormonu spada w ciągu dnia, a wzrasta w nocy [340].

Podwyższony nocny poziom melatoniny we krwi uczestniczy w szlakach sygnałowych wpływających na funkcjonowanie komórek i narządów organizmu. Wykazano, że zaburzenia naturalnego rytmu dobowego, jak używanie sztucznego światła, monitorów ekranów w nocy, a także praca zmianowa mogą zaburzyć rytmy dobowe i produkcję melatoniny, przyczyniając się do rozwoju, promocji i progresji nowotworów [341,342]. MEL należy do grupy indoloamin, której bogaty w elektrony układ aromatyczny oraz grupy funkcyjne nie tylko stanowią o swoistości wiązania receptora, ale także decydują o jej właściwościach przeciwutleniających oraz nadają cząsteczce charakter amfifilowy pozwalając jej na przedostawanie się do wnętrza komórki, do różnych przedziałów komórkowych i płynów ustrojowych [343]. Funkcja antyoksydacyjna MEL obejmuje bezpośrednią neutralizację wolnych rodników, w tym zarówno ROS, jak i RNS, pośrednią stymulację enzymów antyoksydacyjnych, zwiększanie wydajności mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów i zmniejszanie w ten sposób wycieku elektronów, a także zwiększanie skuteczności innych antyoksydantów, np. poprzez stymulację syntezy GSH [336]. MEL jest silniejszym antyoksydantem niż witamina E czy C i posiada zdolność do neutralizacji wysoce toksycznego rodnika hydroksylowego [336,344]. W warunkach silnego stresu oksydacyjnego jest metabolizowana przez degradację enzymatyczną lub reakcję z wolnymi rodnikami tworząc wiele metabolitów, takich jak 6-hydroksymelatonina, 2-hydroksymelatonina, 4-hydroksymelatonina, N1-acetylo-N2-formylo-5-metoksykynuramina (AFMK), N-acetylo-5-metoksykynuramina (AMK) oraz cykliczna 3-hydroksymelatonina [345]. Dowiedziono, że metabolity MEL mają również działanie przeciwutleniające, co pozwala na zapewnienie długoterminowej ochrony przed konsekwencjami stresu oksydacyjnego [346]. Według doniesień, szlak przekształcenia MEL w AFMK wiąże się z inaktywacją nawet 10 cząsteczek ROS lub RNS [346]. Niektóre metabolity mają nawet silniejsze działanie antyoksydacyjne niż MEL, wykazując silniejsze zdolności wychwytu ROS i zapobiegania utlenianiu białek [347]. Wszystkie te działania składające się na funkcje przeciwutleniające melatoniny wskazują, iż może ona być dobrym kandydatem do zapobiegania i leczenia różnych typów nowotworów, m.in. raka piersi, stercza, żołądka, trzustki, jelita grubego czy płuca [348]. Właściwości onkostatyczne MEL wiążą się nie tylko z jej działaniem antyoksydacyjnym, ale również z hamującą funkcją na wewnątrzkomórkowe białko regulatorowe – kalmodulinę (CaM, ang. *calmodulin/calcium modulated protein*), a także z wpływem MEL na komórki docelowe przez receptory jądrowe oraz błonowe receptory melatoninowe M1 i M2 [338]. Receptory M1 i M2 należą do rodziny receptorów

sprzężonych z białkiem G, po przyłączeniu liganda dochodzi do zahamowania aktywności cyklazy adenylanowej, a co za tym idzie do obniżenia poziomu cyklicznego adenozylo-3',5'-monofosforanu (cAMP), a także do zmniejszenia wychwytu kwasu linolowego, co uważane jest za mechanizm działania antyproliferacyjnego MEL [341,348]. Melatonina może wywierać swoje funkcje również poprzez grupę receptorów jądrowych: retinoidowe receptory sieroce (RORs, ang. *retinoid orphan receptors*) oraz retinoidowe receptory z (RZR, ang. *retinoid z receptors*) [349]. Wyjaśniono biologiczne mechanizmy działania MEL w powiązaniu ze szlakiem RZR/RORy w ludzkich komórkach raka żołądka SGC-7901 w warunkach niedotlenienia [350]. Badania Wang i wsp. [351] sugerują, że MEL zmniejsza akumulację HIF-1 α i wytwarzanie VEGF poprzez hamowanie jądrowego receptora melatoniny RZR/RORy w komórkach SGC-7901 raka żołądka w warunkach niedotlenienia, co może mieć ogromne znaczenie w antyangiogenezie i działaniu hamującym wzrost komórek raka żołądka za pośrednictwem MEL. W toku badań wykazano, że MEL wiąże się również z receptorem CaM, zmniejszając wrażliwość cyklazy adenylanowej i obniżając poziom cAMP, czego efektem jest osłabienie fosforylacji i transaktywacji czynników transkrypcyjnych, np. receptora estrogenowego (ER- α , ang. *estrogen receptor*) [352]. Wykazano bowiem, iż MEL hamuje proliferację ludzkich komórek raka piersi z ekspresją ER- α [353]. MEL indukuje również apoptozę w komórkach nowotworowych poprzez hamowanie szlaku sygnałowego kinazy białkowej zależnej od wapnia i CaM [354]. Ponadto MEL wywiera działanie przeciwzapalne, zmniejszając poziom TNF- α , IL-2 i IFN- γ oraz zwiększając stężenie IL-4, IL-10 i IL-27 [355]. Ze względu na regulacyjny wpływ MEL na mechanizmy kontrolujące nowotwór w różnych jego stadiach, zaczęto rozważać jej wykorzystanie jako środka wspomagającego w terapiach przeciwnowotworowych, wzmacniającego efekty terapeutyczne i zmniejszającego skutki uboczne chemioterapii lub radioterapii [345,356].

4. Endokrynną funkcja tkanki tłuszczowej

4.1. Tkanka tłuszczowa

Tkanka tłuszczowa to tkanka łączna stanowiąca przede wszystkim rezerwuuar energii magazynowanej w postaci triacylogliceroli [357]. Obecnie wiadomo, że nie stanowi ona wyłącznie magazynu energetycznego, ale pełni również funkcję endokrynną syntetyzując i uwalniając szereg aktywnych związków zwanych adipokinami, uczestniczących w przemianach metabolicznych oraz reakcjach odpornościowych organizmu [357,358]. Tkanka tłuszczowa składa się z macierzystych komórek tłuszczowych (komórek prekursorowych – preadipocytów), adipocytów (komórek magazynujących tłuszcz), a także z innych typów komórek określanych jako zrąb łącznotkankowy (komórki ścienne, śródbłonna, perycyty, neurony) [357,359]. U człowieka występuje przede wszystkim biała (WAT, ang. *white adipose tissue*) i brązowa (BAT, ang. *brown adipose tissue*) tkanka tłuszczowa, które różnią się morfologią oraz funkcją adipocytów [360]. Wyróżnia się również tkankę tłuszczową beżową, jako formę pośrednią między WAT i BAT oraz różową, której rolą jest produkcja i wydzielanie mleka [360,361]. WAT odpowiada głównie za magazynowanie energii, natomiast BAT za termogenezę, czyli wytwarzanie ciepła dzięki rozpraszaniu energii [362]. BAT występuje w okresie noworodkowym, ale ostatnie doniesienia wskazują również na jej występowanie w wieku dorosłym i zasugerowano nawet, że jest zmniejszona pod względem masy i aktywności u pacjentów otyłych i chorych na cukrzycę [363–365]. Stanowi wysoce oksydacyjną tkankę zawierającą komórki z licznymi mitochondriami, które odpowiadają za utlenianie kwasów tłuszczowych i wytwarzanie ciepła poprzez działanie rozprzegające białka termogeniny (UCP1, ang. *uncoupling protein 1*) [358]. WAT zlokalizowana jest podskórną, dzięki czemu odgrywa ważną rolę w utrzymaniu odpowiedniej temperatury ciała oraz okołotrzewnie, zapewniając ochronę mechaniczną, jak łagodzenie wpływu wstrząsów i urazów [357,366]. Dzięki zdolności gromadzenia energii i jej dostarczania organizmowi w razie potrzeby pełni najważniejszy układ buforujący bilans lipidów [367]. Tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa (PVAT, ang. *perivascular adipose tissue*) wydzielająca substancje auto- lub parakryne wpływa na układ naczyniowy [368]. Dwukierunkowe działanie uwalnianych

adipokin (pro- lub przeciwzapalne), czy funkcje regulatorów napięcia modulują właściwości wazoaktywne.

4.2. Otyłość

W ciągu ostatnich 40 lat otyłość stała się poważnym problemem zdrowotnym i globalną epidemią [369]. WHO definiuje nadwagę i otyłość jako nadmierne i nieprawidłowe nagromadzenie tkanki tłuszczowej, które wiąże się z niekorzystnym wpływem na stan zdrowia człowieka [370]. Jest to heterogenny stan, związany z interakcjami genetycznymi, środowiskowymi, metabolicznymi, i behawioralnymi, wynikającymi ze stylu życia, które przyczyniają się do chronicznego braku równowagi pomiędzy poborem, a wydatkowaniem energii [371,372]. Stan ten wywołuje poważne obciążenie chorobami przewlekłymi oraz niepełnosprawnością, co również stwarza problemy natury społecznej i psychologicznej, które dotyczą każdej grupy wiekowej [373]. Do metod pomiaru stopnia otyłości zalicza się metody antropometryczne (pomiar fałdów skórno-tłuszczowych, stosunek obwodu talii do bioder), metody densytometryczne, metody wykorzystujące CT, MRI lub dwuwiązkową absorpcjometrię rentgenowską, a także analizę pomiarów impedancji bioelektrycznej ciała, jednak najłatwiejszym do obliczeń, niedrogim oraz powszechnie stosowanym w badaniach epidemiologicznych jest wskaźnik masy ciała (BMI, ang. *body mass index*) [374,375]. BMI jest prostym wskaźnikiem wykorzystującym masę ciała i wzrost osoby dorosłej w celu oszacowania zawartości tkanki tłuszczowej u kobiet i mężczyzn w każdym wieku [376]. Oblicza się go na podstawie wzoru matematycznego na Rycinie 2 [377].

$$BMI = \frac{\text{masa ciała (kg)}}{\text{wzrost}^2 \text{ (m)}^2}$$

Ryc. 2. Wzór do wyznaczenia wskaźnika masy ciała BMI

Na podstawie BMI wyróżnia się następujące kategorie: znaczna niedowaga <16,5 kg/m², niedowaga 16,5-18,4 kg/m², prawidłowa waga 18,5-24,9 kg/m², nadwaga 25,0-29,9 kg/m², otyłość 30,0-39,9 kg/m² oraz otyłość olbrzymia ≥40 kg/m² [377]. BMI definiuje nadwagę i otyłość w oparciu o dane statystyczne, jest powszechnie stosowany jako czynnik ryzyka rozwoju lub występowania wielu problemów zdrowotnych, szczególnie cukrzycy, chorób serca

i zespołu metabolicznego (MetS, ang. *metabolic syndrome*) [378]. Jest przydatny w badaniach populacyjnych, ale nie sprawdza się jako wskaźnik procentowej zawartości tkanki tłuszczowej oraz jej rozmieszczenia w różnych miejscach ciała [376]. Podczas wyznaczania BMI nie uwzględnia się takich czynników jak wiek, płeć, struktura kości oraz nie różnicuje się masy ciała związanej z ilością tkanki tłuszczowej lub z ilością masy mięśniowej, co czyni go niedokładnym [379,380]. Na podstawie BMI nie można określić występowania tzw. otyłości brzusznej, czyli nadmiernej ilości okołotrzewnej tkanki tłuszczowej, której występowanie jest korelowane z wysokim ryzykiem rozwoju wielu chorób metabolicznych [381]. Otyłość brzuszna u Europejczyków definiowana jest jako obwód pasa ≥ 94 cm u mężczyzn oraz ≥ 80 cm u kobiet [382]. Osoba z prawidłowym BMI może mieć otyłość brzuszną i wysoki procent tkanki tłuszczowej, natomiast osoby z rozbudowaną tkanką mięśniową mogą mieć wysokie BMI, a niski procent tkanki tłuszczowej [380]. Dlatego też problem stanowi określenie, czy w przypadku spadku masy ciała wynika on ze zmniejszenia masy mięśniowej, czy tkanki tłuszczowej [380]. W przypadku otyłości tkanka tłuszczowa zwiększa się poprzez hipertrofię, czyli wzrost objętości adipocytów i/lub hiperplazję, czyli wzrost liczby adipocytów, która w przeciwieństwie do hipertrofii jest procesem nieodwracalnym [383].

4.3. Stan zapalny w otyłości

Tkanka tłuszczowa, a przede wszystkim WAT jest dynamiczna metabolicznie i uwalnia wiele bioaktywnych peptydów, określanych jako adipocytokiny lub adipokiny o działaniu zarówno miejscowym, jak i ogólnoustrojowym [384]. Jej plejotropowy charakter opiera się na uwalnianiu licznych hormonów, czynników wzrostu, chemokin, cytokin, adipokin, czynników układu dopełniacza i białek macierzy, które dzięki występującym w tkance tłuszczowej receptorom pełnią funkcje w regulacji przyjmowania pokarmów, wydatkowania energii, utrzymania homeostazy metabolizmu, ciśnienia krwi oraz odporności [385,386]. Nadmierna podaż makroskładników wzmacnia uwalnianie mediatorów stanu zapalnego, co dodatkowo koreluje z licznymi powikłaniami, jak insulinooporność (IR, ang. *insulin resistance*), choroby układu krążenia, MetS, niealkoholowe stłuszczenie wątroby, czy niektóre rodzaje raka [387,388]. Zaburzona równowaga w wydzielaniu adipokin pro- i przeciwzapalnych spowodowana rozrostem tkanki tłuszczowej w przebiegu otyłości odpowiedzialna jest za toczące się w tkance tłuszczowej chroniczne zapalenie, określane jako zapalenie niskiego

stopnia [389]. Do adipokin prozapalnych uwalnianych nadmiernie przez tkankę tłuszczową w otyłości, a których stężenie ulega obniżeniu podczas ograniczenia podaży kalorii, należą m.in. TNF- α , IL-1, IL-6, inhibitor aktywatora plazminogenu (PAI-1, ang. *plasminogen activator inhibitor*), białko chemotaktyczne monocytów 1 (MCP-1, ang. *monocyte chemotactic protein 1*), białko C-reaktywne (CRP, ang. *C-reactive protein*), ICAM, rezystyna, wisfatyna, leptyna oraz hormony płciowe [383,390–392]. Odpowiadają one za regulację proliferacji i apoptozy adipocytów, promują lipolizę i hamują syntezę lipidów, zmniejszając stężenie lipidów poprzez mechanizmy para- i autokrynne [392]. W wyniku nadmiernej ilości tkanki tłuszczowej dochodzi natomiast do obniżenia syntezy i uwalniania czynników przeciwzapalnych, takich jak adiponektyna, omentyna, rozpuszczalne białko hamujące drogę przekazu sygnału Wnt (SFRP5, ang. *soluble frizzled-related protein 5*), antagonist receptor IL-1 oraz interleukiny IL-4, IL-10, czy IL-13 [391,393]. Wraz ze wzrostem masy ciała zwiększa się liczba eozynofili oraz zachodzą zmiany w populacji limfocytów T, tzn. zmniejsza się populacja Treg, a wzrasta liczba limfocytów T CD4+, wydzielających IFN- γ , a także limfocytów pomocniczych Th1 i limfocytów T CD8+, różnicujących rezydujące makrofagi do fenotypu klasycznie aktywowanego lub fenotypu makrofaga M1 [394–398]. W wyniku rekrutacji monocytów krwi obwodowej, które reagują na chemokiny (CCL2, CXCL5), dochodzi do wzrostu liczby makrofagów w tkance tłuszczowej [399]. Po dalszej ekspansji cytokiny prozapalne (np. IL-6, IL-18, TNF- α) oraz adipokiny, takie jak leptyna i rezystyna, promują środowisko prozapalne i przyczyniają się do zaburzeń metabolicznych [393]. Leptyna i adiponektyna są najobficiej uwalniane przez adipocyty i prawdopodobnie najlepiej zbadane wśród pozostałych adipokin pod względem ich udziału w procesach nowotworzenia [400].

4.4. Adipokiny

4.4.1. Wybrane adipokiny prozapalne

Leptyna to niewielki peptyd (16 kD) odkryty w 1994 roku [357,401]. Jest hormonem syntetyzowanym przez WAT, a gen kodujący to białko (*LEP/ob*) znajduje się na chromosomie 7q31.3 [402]. Leptyna jest uważana za cytokinę prozapalną, strukturalnie i funkcjonalnie wykazującą podobieństwo do rodziny cytokin IL-6 [357]. Leptyna wydzielana jest głównie przez adipocyty wprost proporcjonalnie do ilości tkanki tłuszczowej i poznana była jako

„hormon sytości” [403]. Krąży w osoczu związana z białkami i na drodze dyfuzji wnika do OUN, powodując uczucie sytości, dzięki czemu reguluje równowagę pomiędzy przyjmowaniem pokarmu, a wydatkiem energetycznym [404,405]. Hamuje lipogenezę i stymuluje lipolizę, zmniejszając poziom lipidów w mięśniach szkieletowych, wątrobie i komórkach beta trzustki, co poprawia wrażliwość na insulinę [401]. W przypadku otyłości dochodzi do znacznego wzrostu stężenia leptyny, a jednocześnie do zmniejszenia jej działania anoreksogenego i stymulującego utratę masy ciała, co wiąże się z wykształceniem mechanizmu oporności na ten hormon [366]. Stężenie leptyny w tkance tłuszczowej i osoczu krwi zależy od ilości tkanki tłuszczowej oraz od bilansu energetycznego, dlatego też jej poziom jest wyższy u osób otyłych i wzrasta przy nadmiernej podaży kalorii, natomiast głodzenie powoduje spadek jej stężenia [406]. Leptyna jest wytwarzana przede wszystkim w podskórnej tkance tłuszczowej, a jej stężenie zwiększa się nie tylko w otyłości, ale również w wyniku działania glikokortykosteroidów, w przebiegu ostrej infekcji i pod wpływem cytokin prozapalnych, podczas gdy jej wydzielanie hamowane jest przez ekspozycję na zimno, stymulację adrenergiczną, przez działanie hormonu wzrostu i hormonów tarczycy, melatoninę, a także palenie tytoniu i tiazolidynodiony, należące do leków przeciwcukrzycowych [357,385,407]. Leptyna w stanie zapalnym wzmacnia funkcję fagocytarną makrofagów oraz wytwarzanie cytokin prozapalnych IL-6, IL-12, IL-18 i TNF α , chemokin IL-8, CCL2/MCP-1, a także mediatorów zapalnych: prostaglandyn, leukotrienów cysteinylowych, czy leukotrienu B4 [393]. Podczas jej przyjmowania zwiększa się stężenie CRP we krwi, co stanowi kolejny dowód jej działania prozapalnego [401]. Leptyna może również indukować wytwarzanie ROS w makrofagach, neutrofilach i komórkach śródbłonna oraz nasilać indukowaną przez IFN γ ekspresję NOS [393,408]. Długa forma receptora leptyny syntetyzowana jest przez wiele komórek odpornościowych i inicjuje wewnątrzkomórkową sygnalizację w celu aktywacji kinazy tyrozynowej Jak2, utajonego czynnika transkrypcyjnego STAT3, szlaków MAPK, Erk1/2 (ang. *extracellular signal-regulated kinase*) i PI3K (ang. *phosphoinositide 3-kinases*), które aktywują wrodzoną odpowiedź immunologiczną i stanowią szlaki sygnałowe krytyczne dla przeżycia, proliferacji i różnicowania komórek [393,400,409]. Krótkie izoformy receptora aktywują białko MAPK z niewielkim efektem przy aktywacji STAT, jednak obydwie formy są obecne w chorobach niezłośliwych oraz raku [400]. Ponadto leptyna wiąże się z receptorami transbłonowymi w komórkach raka żołądka, okrężnicy, estrogenozależnego raka piersi, niewrażliwego na androgeny raka stercza, a także raka komórek tarczycy, wywołując

angiogenezę, proliferację, migrację i inwazję komórek nowotworowych oraz inhibicję apoptozy [405].

Wisfatyna jest wielofunkcyjnym białkiem o masie 52 kD [410]. Jest znana również jako czynnik stymulujący kolonię komórek pre-B (PBEF, ang. *pre-B-cell colony-enhancing factor*), uwalniany przez limfocyty i wpływający na ich dojrzewanie oraz regulację stanu zapalnego [411]. Nazywana również NAMPT (fosforybozylotransferaza nikotynamidu), ze względu na funkcję enzymu biorącego udział w biosyntezie dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD⁺) z nikotynamidu [412]. Wytwarzana jest w ludzkich leukocytach i tkance tłuszczowej trzewnej, w ludzkich i zwierzęcych hepatocytach, tkance mięśniowej oraz w zwierzęcych adipocytach, nerkach i sercu [413]. Dane literaturowe wskazują, że głównym miejscem wydzielania wisfatyny są makrofagi, a nie adipocyty tkanki tłuszczowej [413]. Jej stężenie jest zwiększone u osób z otyłością brzuszną oraz cukrzycą typu 2 [414]. Adipokina ta zwiększa wpływ IL-7 i czynnika komórek macierzystych (SCF, ang. *stem cell factor*) na tworzenie kolonii komórek pre-B i wydaje się być mediatorem stanu zapalnego [412]. Wykazano, że rekombinowana wisfatyna indukuje w ludzkich monocytach produkcję prozapalnych cytokin, w tym IL-1 β , IL-6 i TNF- α , a także cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-10 i antagonistę receptora IL-1 [412]. Źródła podają również, że wisfatyna może być syntetyzowana i uwalniana przez neutrofile w odpowiedzi na reakcję zapalną, wykazując funkcje inhibitora apoptozy i przyczyniając się do przedłużenia czasu życia neutrofilii np. w przebiegu sepsy [412,415]. Stężenie wisfatyny jest podwyższone w posocznicy, chorobie zapalnej jelit, czy ostrym uszkodzeniu płuc [416]. Jej obecność wykryto również w guzach i osoczu pacjentów z różnymi typami nowotworów, co może wskazywać na jej kliniczne znaczenie w progresji nowotworu, na jej korelację ze stadiem guza oraz procesem metastazy [411].

Rezystyna jest białkiem o masie cząsteczkowej 12,5 kDa i strukturze podobnej do cytokin [417]. U ludzi rezystyna jest wytwarzana głównie przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, makrofagi i komórki szpiku [418]. Kwestia uwalniania rezystyny przez adipocyty jest sporna. Może być uwalniana przez preadipocyty, natomiast dojrzałe adipocyty mogą nie posiadać takiej zdolności [418,419]. Dowiedziono, że u pacjentów otyłych i chorych na cukrzycę stężenie rezystyny w surowicy jest znacznie podwyższone [420,421]. Podobnie, zwiększona ekspresja rezystyny została skorelowana z markerami stanu zapalnego, z patogenezą choroby wieńcowej, czy innych chorób sercowo-naczyniowych [418,422]. Produkcja rezystyny zachodzi również podczas różnicowania monocytów i makrofagów [423].

Adipokina ta promuje fenotyp prozapalny podobny do M1 w makrofagach [424]. Wzrostowi masy tkanki tłuszczowej u ludzi może towarzyszyć naciek makrofagów i monocytów, które uwalniają rezystynę, przez co mogą oddziaływać na wiele typów komórek i tkanek [419,425]. Hormon ten odgrywa rolę w regulacji ekspresji cząsteczek adhezyjnych i czynników wzrostu, co skutkuje wzmożoną angiogenezą i promocją nowotworzenia [423]. Co więcej, ludzka rezystyna promuje również wytwarzanie licznych cząsteczek zapalnych, takich jak VCAM-1, ICAM-1 i MCP-1, a także dodatkowo aktywuje szlak sygnałowy p38 MAPK, który upośledza sygnalizację insuliny i zaburza odpowiedź na stres oksydacyjny i proliferację komórek [426]. Rezystyna sprzyja wydzielaniu TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 i IL-12, generuje ROS i hamuje NOS [427,428]. Badania wykazały, iż jej poziom wzrasta w nowotworach, jednak wzrost ten może być niezależny od występowania otyłości i może korelować ze zwiększonym ryzykiem progresji, angiogenezy i przerzutów w różnych typach nowotworu [426].

4.4.2. Wybrane adipokiny przeciwzapalne

Adiponektyna została odkryta w 1995 roku, a gen kodujący to białko usytuowany w locus 3q27, zidentyfikowano również jako gen podatności na cukrzycę typu 2 i MetS [429–431]. Adiponektyna uwalniana jest głównie przez adipocyty WAT i może występować w ludzkiej surowicy w kilku formach, mianowicie w postaci białka pełnej długości (fAd, ang. *full-length adiponectin*) oraz w postaci frakcji, różniących się masą cząsteczkową, takich jak postać trimeryczna o niskiej masie cząsteczkowej (LMW, ang. *low molecular weight*), heksameryczna o średniej masie cząsteczkowej (MMW, ang. *middle molecular weight*) oraz frakcja wysokocząsteczkowa (HMW, ang. *high molecular weight*), składająca się z 10-18 cząsteczek adiponektyny, lub też jako fragment adiponektyny zawierający globularną domenę (gAd, ang. *globular adiponectin*) [431–433]. W działaniu adiponektyny pośredniczą receptory AdipoR1 i AdipoR2, które aktywują AMPK (ang. *5'AMP-activated protein kinase*) w komórkach i tkankach układu odpornościowego [434]. U ludzi występuje ujemna korelacja między adiponektyną a masą tkanki tłuszczowej, co oznacza, że jej stężenie jest odwrotnie proporcjonalne do BMI i otyłości trzewnej [435]. Koreluje ujemnie również z glikemią na czczo, stężeniem trójglicerydów, lipoprotein o niskiej gęstości (LDL, ang. *low-density lipoprotein*) i CRP, natomiast dodatnio ze stężeniem lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL, ang. *high-density lipoprotein*) [436–438]. Hormon ten w warunkach otyłości poprawia wrażliwość

komórek na insulinę, stymuluje utlenianie kwasów tłuszczowych, wychwytuje glukozę w mięśniach szkieletowych i tkance tłuszczowej oraz bierze udział w hamowaniu produkcji glukozy w wątrobie [357]. Wykazuje silne działanie przeciwmiażdżycowe poprzez inhibicję adhezji monocytów do komórek śródbłonna, hamowanie transformacji makrofagów w komórki piankowate oraz hamowanie aktywacji komórek śródbłonna [405,439]. Działanie przeciwzapalne hormonu dotyczy blokowania szlaku NF- κ B i obniżenia produkcji cytokin, takich jak TNF- α , IL-6 i IL-18 [393]. Adiponektyna zmniejsza poziom TNF- α i CRP, pobudza śródbłonek do wytwarzania NO, przeciwzapalnej IL-10 oraz tkankowego inhibitora metaloproteinazy-1, ale również hamuje wytwarzanie ROS za pośrednictwem LDL, spowalniając proces miażdżycowy [439–441]. Silnymi czynnikami hamującymi wytwarzanie adiponektyny są wysokie poziomy ROS oraz cytokiny prozapalne TNF- α oraz IL-6, a jej niedobór skutkuje redukcją poziomu NO i adhezją leukocytów [442,443]. Adiponektyna równoważy wpływ leptyny na funkcje komórkowe, poprzez jej plejotropowe działanie antyproliferacyjne, antyangiogenne, przeciwzapalne i przeciwmiażdżycowe [444]. Ustalono, iż hipoadiponektynemia stanowi czynnik ryzyka dla nowotworzenia [445]. Hormon ten może wybiórczo wiązać się z rakotwórczymi czynnikami wzrostu, uniemożliwiając ich przyłączenie do odpowiednich receptorów oraz hamuje proces migracji komórek śródbłonna i zapobiega angiogenezie [446].

Omentyna (inaczej intelektyna) jest lektyną o masie 34 kD, która została po raz pierwszy zidentyfikowana w komórkach Panetha. Może wiązać się z galaktofuranozowymi elementami ściany komórkowej bakterii, biorąc udział w mechanizmach obronnych jelita przed patogenami [447]. Występuje w formie dwóch homologów, omentyny-1 wykrywanej w osoczu krwi oraz omentyny-2 uwalnianej do światła jelita [448]. Główną postać krążącej omentyny stanowi omentyna-1, której głównym źródłem jest tkanka trzewna [449]. Jej stężenie jest obniżone w otyłości oraz w zaburzeniach metabolicznych, jak IR lub nietolerancja glukozy, w chorobie policystycznych jajników, w reumatoidalnym zapaleniu stawów, chorobie sercowo-naczyniowej, czy w dysfunkcji śródbłonna [447,450,451]. W odniesieniu do innych adipokin, wykazuje dodatnią korelację ze stężeniem adiponektyny, natomiast ujemną ze stężeniem leptyny [452]. Może poprawiać insulinowrażliwość oraz wychwyt glukozy stymulowany insuliną w ludzkich adipocytach tkanki podskórnej i trzewnej [447,449]. Niektóre badania wskazują na jej działanie przeciwzapalne poprzez hamowanie NF- κ B oraz zmniejszanie uwalniania CRP i TNF- α [447,453]. Zainteresowanie omentyną-1 w kontekście

raka spowodowane było obserwacją, że jej stężenie u pacjentów nowotworowych jest odmienne niż u osób zdrowych [448]. Odnotowano jej nieprawidłowy poziom, obniżony lub podwyższony w guzach litych [451]. Dane literaturowe wskazują, że omentyna-1 w raku jajnika zapobiega progresji i przerzutowaniu poprzez interakcję z laktotransferyną, a także powoduje spadek proliferacji poprzez brak podaży energii związany ze zwiększonym wychwytem glukozy [452,454].

4.5. Endokrynną funkcją tkanki tłuszczowej w otyłości a stres oksydacyjny

Zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych adipokiny indukują wytwarzanie ROS generując nasilony stres oksydacyjny, co prowadzi do zaburzonej produkcji innych adipokin i tym samym sprzyja stanowi zapalnemu [405,455]. Te zależności dowodzą, że stres oksydacyjny i stan zapalny są ze sobą silnie powiązane i wspólnie odgrywają ogromną rolę w patogenezie powikłań związanych z otyłością, jak dysfunkcja śródbłonna i IR [405,455]. Komórki tkanki tłuszczowej stanowią źródło cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, TNF- α), a te z kolei są silnymi stymulatorami produkcji ROS i RNS przez makrofagi i monocyty [366]. Naciekające makrofagi, które uwalniają do obwodu kolejne mediatory prozapalne, wraz ze szkodliwymi produktami silnego stresu oksydacyjnego, uwalnianymi również z uszkodzonych naczyń krwionośnych, nasilają hipoksję adipocytów i lipolizę, a negatywny skutek interakcji makroflagów z innymi komórkami odpornościowymi przyczynia się do rozwoju chorób metabolicznych, immunologicznych, w tym również wywiera wpływ na rozwój i progresję nowotworów [456–458]. WAT, która jest jedynym magazynem nadmiernej ilości lipidów w organizmie, to jednocześnie tkanka najbardziej narażona na modyfikacje wywołane przedłużającym się nasilonym stresem oksydacyjnym, który niekorzystnie wpływa na wydzielanie hormonów, powoduje podwyższenie poziomu lipidów w surowicy, upośledza komórkową obronę antyoksydacyjną oraz funkcje mitochondriów [405]. Do mechanizmów, wywołujących wzmożony stres oksydacyjny w przebiegu otyłości, należą takie procesy, jak utlenianie kwasów tłuszczowych w mitochondriach i peroksysomach, nadmierne zużycie tlenu generujące ROS w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, np. poprzez mechaniczne obciążenie mięśnia sercowego, czy nadmierna podaż lipidów (dieta bogata w tłuszcze) zmieniająca metabolizm tlenu [401]. Wraz z rozrostem tkanki tłuszczowej spada aktywność enzymów antyoksydacyjnych (CAT, SOD oraz GPx), czego konsekwencją są takie

nieprawidłowości, jak dysfunkcja śródbłonna związana ze zmniejszeniem biodostępności czynników rozszerzających naczynia (zwłaszcza NO) oraz wzrost stężenia czynników kurczliwości pochodzących ze śródbłonna, sprzyjający chorobie miażdżycowej [366,459]. Otyłość, w przebiegu której zwiększa się rozmiar i aktywność endokrynną adipocytów, a co za tym idzie zostaje zaburzona równowaga pomiędzy czynnikami pro- i przeciwzapalnymi, sprzyja rozwojowi IR i nadmiernej generacji ROS, co indukuje oksydacyjne modyfikacje najważniejszych biomolekuł i w konsekwencji może inicjować procesy kancerogenne [405]. Głównym biomarkerem stresu oksydacyjnego w tkance tłuszczowej jest MDA (produkt LPO) [460].

4.6. Otyłość a procesy nowotworzenia

Dokładne mechanizmy biologiczne łączące otyłość z ryzykiem rozwoju raka oraz złym rokowaniem nie są do końca poznane, jednak szacuje się, iż przyrost masy ciała wiąże się z ok. 20% wszystkich przypadków nowotworów [461]. Niektóre dane sugerują, iż obciążenie zdrowotne wynikające z nadwagi i otyłości może być większe niż wpływ palenia papierosów [462]. Zaburzenia metaboliczne związane z otyłością, takie jak przewlekły stan zapalny, zaburzenia sygnalizacji steroidów płciowych, podwyższone stężenie insuliny oraz insulinopodobnych czynników wzrostu, niedotlenienie wywołane otyłością, podatność genetyczna, czy migrujące komórki zrębu, tworzą środowisko, które może promować wzrost i progresję komórek nowotworowych [400]. Otyłość wpływa na progresję raka poprzez rozregulowanie wydzielania adipocytokin, w tym zwiększoną produkcję onkogennej leptyny wraz ze zmniejszoną produkcją adiponektyny, wykazującą właściwości antynowotworowe [463]. Według IARC i Światowego Funduszu Badań nad Rakiem (WCRF, ang. *World Cancer Research Fund*) otyłość jest silnie związana z ryzykiem rozwoju raka endometrium, gruczolakoraka przełyku, raka jelita grubego, stercza, nerki oraz piersi w okresie pomenopauzalnym [463]. Coraz więcej danych wskazuje na znaczenie otyłości oraz MetS w rozwoju GEP-NETs [464]. Badania Santos i wsp. [465] wskazują na związek rozwoju dobrze zróżnicowanych GEP-NETs z MetS, zwiększonym obwodem talii, IR oraz z podwyższonym stężeniem glukozy na czczo oraz trójglicerydów w osoczu krwi. Te badania stanowią swego rodzaju przełom ze względu na brak wcześniej zgłaszanych powiązań między nieprawidłowościami antropometrycznymi, biochemicznymi i klinicznymi charakteryzującymi

MetS lub IR a GEP-NETs [465]. Retrospektywne badanie Feola i wsp. [466] pokazuje, iż cukrzyca typu 2 oraz otyłość mogą stanowić niezależne czynniki ryzyka rozwoju GEP-NEN.

II. Cel pracy

Cytokiny stanowiące nieodłączny element stanu zapalnego pełnią funkcje diagnostyczne i prognostyczne w wielu typach nowotworów. Niektóre badania wskazują również, że układ odpornościowy poprzez szereg cytokin i czynników wzrostu wpływa na procesy biologiczne zaangażowane w rozwój NENs. Tkanka tłuszczowa wydziela adipokiny o funkcji zapalnej oraz adipokiny stymulujące nadmierne generowanie ROS, co oznacza, że w otyłości współistnieją ze sobą dwa kluczowe procesy zaangażowane w rozwój nowotworów, czyli przewlekły stan zapalny oraz wzmożony stres oksydacyjny. Proces diagnostyczny NENs nie jest oczywisty, a wyzwaniem dla klinicystów stanowią szczególnie NENs nieczynne hormonalnie, czyli nowotwory neuroendokrynne, które nie manifestują objawów klinicznych. Dlatego też poszukuje się biomarkerów małoinwazyjnych do szybkiego rozpoznania NENs. Ze względu na fakt, że zagadnienia związane ze stresem oksydacyjnym, stanem zapalnym i funkcją endokrynną tkanki tłuszczowej nie są dostatecznie zgłębiane w przebiegu NENs, a także brakuje miarodajnych biomarkerów pozwalających na łatwiejszą diagnostykę NENs o różnej lokalizacji, specyficznych dla choroby.

Celem pracy było:

- określenie wpływu stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego, regulacji metabolizmu węglowodanów i funkcji endokrynej tkanki tłuszczowej na etapie rozpoznania NENs o różnej lokalizacji,
- ocena niedoborów melatoniny w przebiegu NENs o różnej lokalizacji,
- określenie korelacji między stężeniem chromograniny A a wybranymi adipokinami, wykładnikami stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego we krwi pacjentów z NENs o różnej lokalizacji,
- identyfikacja potencjalnych nowych biomarkerów przydatnych w diagnostyce NENs o różnej lokalizacji oraz wyznaczenie parametrów o najwyższej czułości,
- określenie prawdopodobieństwa wystąpienia choroby na podstawie badanych parametrów.

W tym celu zaplanowano:

- oznaczenie we krwi pacjentów z nowo zdiagnozowanymi NENs o różnej lokalizacji oraz w grupie osób zdrowych aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT i GPx) w erytrocytach oraz stężenia MDA w osoczu i erytrocytach,
- oznaczenie we krwi pacjentów z NENs o różnej lokalizacji oraz w grupie osób zdrowych stężenia chromograniny A, melatoniny, wybranych adipokin (leptyny, wisfatyny, rezystyny, omentyny-1), parametrów związanych z regulacją gospodarki węglowodanowej oraz cytokin, chemokin i czynników troficzných związanych ze stanem zapalnym,
- przeprowadzenie analizy statystycznej umożliwiającej określenie udziału badanych parametrów w rozwoju NENs o różnej lokalizacji, zbadanie korelacji pomiędzy nimi, a także identyfikację potencjalnych markerów przydatnych w diagnostyce tego typu nowotworów.

III. Materiał i metody

1. Charakterystyka grupy badanej

W badaniu uczestniczyło 86 pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi, którzy stanowili grupę badaną oraz 35 osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną. Pacjentów podzielono ze względu na lokalizację guza: trzustka – pNENs (n=22), przewód pokarmowy – GI-NENs (n=34), płuco – L-NENs (n=12), inna lokalizacja – o-NENs (n=18). Pacjenci kierowani byli do Centrum Onkologii im. Prof. Franciszka Łukaszczyka z powodu podejrzenia guzów neuroendokrynnych (brak konkretnej diagnozy, podwyższone stężenie CgA lub objawy charakterystyczne dla NENs). Pacjenci poddawani byli diagnostyce radioizotopowej (^{68}Ga -DOTATATE PET/CT) w celu potwierdzenia lub wykluczenia diagnozy, zlokalizowania zmiany pierwotnej i określenia typu NEN lub zlokalizowania przerzutów. Warunkiem włączenia chorego do badania było rozpoznanie nowotworu neuroendokrynnego. Kryteria wykluczenia pacjenta obejmowały obecność innych chorób ostrych i przewlekłych. Kryteria wykluczenia w grupie kontrolnej obejmowały choroby przewlekłe i/lub ostre, takie jak nowotwory, cukrzyca, otyłość, choroby autoimmunologiczne i zaburzenia kardiometaboliczne. Podstawową charakterystykę (dane antropometryczne) uczestników projektu przedstawiono w Tabelach 3 i 4. Wskaźnik BMI wyliczono na podstawie wzoru przedstawionego na Rycinie 2. Na wykonanie badania otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o numerze KB 423/2020. Uczestnicy projektu zostali poinformowani o celu badań i wyrazili pisemną zgodę na udział w eksperymencie.

Zgodnie z zaleceniami Polskiej Sieci Guzów Neuroendokrynnych z 2022 roku, badanie SRI z zastosowaniem techniki PET/CT (czułość 54-100%) służy do lokalizacji zmiany pierwotnej, oceny stopnia zaawansowania choroby i efektów leczenia oraz kwalifikacji do antyproliferacyjnego leczenia SSA i celowanej terapii radioizotopowej [54]. Metoda PET/CT wykorzystuje analogi somatostatyny znakowane ^{68}Ga , do których należy DOTATATE wykorzystywany w Zakładzie Medycyny Nuklearnej w Centrum Onkologii im. Prof. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy. Znakowanie tego analogu somatostatyny odbywało się w Laboratorium Produkcji Radiofarmaceutyków Zakładu Medycyny Nuklearnej przy Centrum

Onkologii im. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy z użyciem zarejestrowanego generatora $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ oraz gotowych zestawów NETSPOT (Advanced Accelerator Applications SA, Rueil-Malmaison Cedex, Francja). Po jego wyznakowaniu, ^{68}Ga -DOTATATE poddawany był kontroli jakości i po pozytywnym wyniku tej kontroli był podawany dożylnie zakwalifikowanym pacjentom, w dawce około 140-200 MBq. Badanie służyło potwierdzeniu lub wykluczeniu diagnozy, zlokalizowaniu zmiany pierwotnej i określeniu typu NEN lub zlokalizowaniu przerzutów.

Tab. 3. Antropometryczne i kliniczne dane pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (NENs) oraz zdrowych ochotników (grupa kontrolna). Dane przedstawiono w postaci średniej \pm błąd standardowy (SEM).

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna
n (kobieta/mężczyzna)	n=86 (46/40)	n=35 (29/6)
Wiek [lata]	57,83 \pm 2,04	52,6 \pm 1,83
Masa ciała [kg]	78,06 \pm 2,56	61,11 \pm 1,29
Wzrost [cm]	170,12 \pm 1,43	165,63 \pm 1,23
BMI [kg/m²]	26,90 \pm 0,75	22,23 \pm 0,31

Tab. 4. Antropometryczne i kliniczne dane pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi trzustki (pNENs), przewodu pokarmowego (GI-NENs), płuca (L-NENs) oraz innych lokalizacji (o-NENs). Dane przedstawiono w postaci średniej \pm błąd standardowy (SEM).

Parametr	pNENs	GI-NENs	L-NENs	o-NENs
n	22	34	12	18
Wiek [lata]	60,38 \pm 1,43	58,79 \pm 1,96	64,55 \pm 2,19	51,06 \pm 2,46
Masa ciała [kg]	82,82 \pm 2,24	74,38 \pm 2,59	86,92 \pm 2,88	73,28 \pm 2,06
Wzrost [cm]	169,50 \pm 1,48	169,62 \pm 1,40	168,83 \pm 1,63	172,67 \pm 1,27
BMI [kg/m²]	28,75 \pm 0,59	25,69 \pm 0,69	30,50 \pm 0,89	24,53 \pm 0,55

2. Materiał do badań

Materiał do badań stanowiła krew żylna pobierana jednorazowo z żyły odłokciowej od każdego pacjenta przez osobę wykwalifikowaną. Procedura odbywała się w godzinach rannych, na czczo, na terenie Centrum Onkologii im. Prof. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy, bezpośrednio przed podaniem radiofarmaceutyku. Materiał do badań od zdrowych ochotników został pobrany jednorazowo z żyły odłokciowej w godzinach rannych, na czczo, przez osobę wykwalifikowaną na terenie Katedry Biologii i Biochemii Medycznej Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Do planowanych badań pobrano 9 ml krwi do próbówki z antykoagulantem K₂EDTA (wersenian dipotasowy, sól dipotasowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego) w celu izolacji osocza i erytrocytów oraz 9 ml krwi do próbówki pozbawionej antykoagulantu, zawierającej aktywator wykrzepiania oraz żel separujący, z której pozyskiwano surowicę.

2.1. Pozyskiwanie osocza krwi i masy erytrocytarnej

Próbkę krwi żyłnej pobraną do próbówki z K₂EDTA wirowano przez 10 minut przy 6000g w temp. 4°C. Po odwirowaniu supernatant (osocze krwi) oddzielano od masy erytrocytarnej, którą przepłukiwano trzykrotnie zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS, ang. *phosphate buffered saline*) w stosunku 1:3. Zawiesinę krwinek wirowano w tych samych warunkach co próbkę pierwotną po każdym płukaniu. Po ostatnim wirowaniu oddzielano supernatant od masy erytrocytarnej i sporządzano zawiesinę masy krwinkowej w soli fizjologicznej w stosunku 1:1.

W krwinkach czerwonych oznaczano stężenie hemoglobiny (Hb), aktywność SOD-1, CAT oraz GPx. Stężenie MDA, oznaczanego jako stężenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS, ang. *thiobarbituric acid reactive substances*) badano zarówno w osoczu, jak i w erytrocytach. Parametry te mierzono metodami spektrofotometrycznymi. Do oznaczenia enzymów antyoksydacyjnych użyto aparatu Cary 100 (Varian, California, USA), natomiast do określenia stężenia TBARS wykorzystano aparat Cary 60 UV Vis (Agilent Technologies, California, USA). Oznaczenia powyższych parametrów wykonywano w osoczu krwi oraz w erytrocytach bezpośrednio po pobraniu i przygotowaniu materiału do badań.

2.2. Pozyskiwanie surowicy krwi

Materiał z aktywatorem wykrzepiania we wnętrzu probówki pozostawiano na ok. 1 godzinę w temp. 37°C w celu dokładnego wykrzepienia, a następnie wirowano przez 10 minut przy obrotach 6000g. Po odwirowaniu oddzielano surowicę od masy krwinkowej i zamrażano ją w temp. -80°C do czasu wykonania analizy.

W surowicy krwi oznaczono stężenie melatoniny oraz chromograniny A, do czego użyto gotowe zestawy oparte na metodzie immunoenzymatycznej ELISA firmy Cloud-Clone Corp. (Katy, Texas, USA), a odczytu dokonano z użyciem spektrofotometru płytkowego SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Niemcy). Do oznaczenia stężenia omentyny-1 użyto natomiast gotowego zestawu ELISA firmy BioVendor (BioVendor Laboratorni medicina, Brno, Czechy). W surowicy oznaczono również stężenie 10 parametrów diabetologicznych oraz 48 parametrów stanu zapalnego z wykorzystaniem komercyjnych multipleksowych testów ELISA: Bio-Plex Bio-Human Diabetes 10-plex assay oraz Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel firmy BIO-RAD Laboratories Inc. (California, USA). Odczytu dokonano w analizatorze Bio-Plex System 200 (BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, California, USA). W skład Bio-Plex Pro Human Diabetes - 10-plex Panel oraz w skład Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel wchodzi parametry wymienione w Tabeli 5.

Tab. 5. Parametry diabetologiczne i zapalne zawarte w zestawach Bio-Plex Pro Human Diabetes - 10-plex Panel oraz w Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel 48-plex firmy BIO-RAD.

Bio-Plex Pro Human			
Diabetes: 10-plex Panel	Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel: 48-plex Panel		
C-peptyd	CTACK/CCL27	IL-5	MCP-3/CCL7
Grelina	Eotaxin	IL-6	M-CSF
GIP	bFGF	IL-7	MIF
GLP-1	G-CSF	IL-8	MIG
Glukagon	GM-CSF	IL-9	MIP-1 α /CCL3
Insulina	GRO- α /CXCL-1	IL-10	MIP-1 β /CCL-4
Leptyna	HGF	IL-12 (p70)	β -NGF
PAI-1	IFN- α 2	IL-12(p40)	PDGF-BB
Rezystyna	IFN- γ	IL-13	RANTES/CCL5
Wisfatyna	IL-1 α	IL-15	SCF
	IL-1 β	IL-16	SCGF- β
	IL-1ra	IL-17	SDF-1 α + β /CXCL12
	IL-2	IL-18	TNF- α
	IL-2R α	IP-10/CXCL10	TNF- β
	IL-3	LIF	TRAIL
	IL-4	MCP-1/CCL2	VEGF

CTACK/CCL27 (ang. *cutaneous T-cell-attracting chemokine*, skórna chemokina przyciągająca limfocyty T); bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*, podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów); β -NGF (ang. *nerve growth factor* β , czynnik wzrostu nerwów β); G-CSF (ang. *granulocyte colony-stimulating factor*, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów); GIP (ang. *glucose-dependent insulinotropic peptide*, glukozozależny peptyd insulinotropowy); GLP-1 (ang. *glucagon-like peptide-1*, glukagonopodobny peptyd 1); GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, czynnik stymulujący tworzenie granulocytów i makrofagów); GRO- α (ang. *growth regulated oncogene*, onkogen regulowany wzrostem); HGF (ang. *hepatocyte growth factor*, czynnik wzrostu hepatocytów); INF (ang. *interferone*, interferon); IL (ang. *interleukin*, interleukina); IL-1ra – antagonist receptoru IL-1 (ang. *interleukin-1 receptor antagonist*); IP-10 (ang. *interferon γ -induced protein 10 kDa*, indukowane interferonem γ białko 10kDa); LIF (ang. *leukemia inhibitory factor*, czynnik hamujący białaczkę); M-CSF (ang. *macrophage colony stimulating factor*, czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów); MCP-1

(ang. *monocyte chemotactic protein 1*, białko chemotaktyczne monocytów), MIF (ang. *macrophage migration inhibitory factor*, czynnik hamujący migrację makrofagów); MIG (ang. *monokine induced by interferon- γ* , monokina indukowana przez interferon γ); MIP-1 α (ang. *macrophage inflammatory protein 1 alpha*, makrofagowe białko zapalne 1 α); PAI-1 (ang. *plasminogen activator inhibitor*, inhibitor aktywatora plazminogenu); PDGF-BB (ang. *platelet-derived growth factor-BB*, płytkopochodny czynnik wzrostu BB); RANTES (ang. *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*, czynnik regulowany przez aktywację, ekspresja i wydzielanie przez prawidłowe limfocyty T); SCF (ang. *stem cell factor*, czynnik komórek macierzystych); SCGF- β (ang. *stem cell growth factor*, czynnik wzrostu komórek macierzystych); SDF-1 α (ang. *stromal cell-derived factor*, czynnik pochodzący z komórek zrębu); TNF (ang. *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworu); TRAIL (ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*, ligand indukujący apoptozę związany z TNF); VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*, czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego)

3. Metody badań

3.1. Oznaczenie stężenia hemoglobiny w erytrocytach

Do oznaczenia stężenia Hb zastosowano metodę cyjanomethemoglobinową [467]. Wykorzystano odczynnik Drabkina firmy AQUA-MED ZPAM – Kolasa sp. j. (Łódź, Polska). Wzorzec hemoglobiny stanowił roztwór cyjanomethemoglobiny.

Jony Fe²⁺ hemoglobiny utleniane są do jonów Fe³⁺ przez cyjanożelazian potasowy z wytworzeniem methemoglobiny. Cyjanek potasowy dostarcza jonów cyjankowych, które reagują z methemoglobiną, czego konsekwencją jest wytworzenie cyjanomethemoglobiny, trwałego produktu o maksimum absorpcji przy 540 nm.

Sporządzano mieszaninę reakcyjną, która składała się z 5 ml odczynnika Drabkina oraz 20 μ l zawiesiny krwinkowej. Mieszaninę reakcyjną dokładnie mieszano, a następnie inkubowano przez 20 minut w temp. pokojowej. Pomiaru absorpcji mieszaniny reakcyjnej oraz wzorca wobec odczynnika Drabkina dokonywano przy $\lambda=540$ nm. Stężenie hemoglobiny obliczano korzystając ze wzoru:

$$Hb\left(\frac{g}{dl}\right) = \frac{\text{Absorbancja próby badanej}}{\text{Absorbancja wzorca}} \times \text{Stężenie wzorca}\left(\frac{g}{dl}\right).$$

3.2. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD-1, E.C.1.15.1.1)

w erytrocytach

Aktywność SOD-1 w erytrocytach była oznaczana metodą według Misry i Fridricha [468]. Analiza opierała się na inhibicji utleniania adrenaliny do adenochromu w środowisku alkalicznym w temp. 37°C.

Wstępne przygotowanie mieszaniny reakcyjnej:

- 0,9 ml wody redestylowanej schłodzonej do 4°C
- 0,1 ml zawiesiny krwinek czerwonych
- 0,5 ml alkoholu absolutnego
- 0,25 ml chloroformu

Mieszaninę wirowano przez 10 minut przy 12000g, w wyniku czego otrzymywano warstwę górną zawierającą rozpuszczony w wodzie enzym oraz warstwę dolną, w której w skład wchodziła zdenaturowana Hb oraz chloroform.

Skład właściwej mieszaniny reakcyjnej (próby badanej):

- 1,8 ml 0,05 M buforu węglanowego o pH=10,2
- 1,5 ml 0,3 mM EDTA w buforze węglanowym o pH=10,2
- 0,1 ml supernatantu zawierającego SOD rozpuszczoną w wodzie
- 0,2 ml 9 mM roztworu adrenaliny w 0,01 N HCl o pH=2,0

Skład próby kontrolnej:

- 1,9 ml 0,05 M buforu węglanowego o pH=10,2
- 1,5 ml 0,3 mM EDTA w buforze węglanowym o pH=10,2
- 0,2 ml 9 mM roztworu adrenaliny w 0,01 N HCl o pH=2,0

Skład próby zerowej:

- 2,0 ml 0,05 M buforu węglanowego o pH=10,2
- 1,0 ml 0,3 mM EDTA w buforze węglanowym o pH=10,2

Pomiaru absorbancji w próbie badanej i kontrolnej wobec próby ślepej dokonywano przez 1 minutę przy długości fali równej 480 nm w temp. 37°C. Jednostkę aktywności SOD-1 określa się jako ilość enzymu, która powoduje 50% hamowanie reakcji przy maksymalnym przyroście absorbancji o 0,025 jednostki na minutę na prostoliniowym odcinku tworzenia się adenochromu. Aktywność SOD-1 została wyrażona w IU/g Hb (IU, ang. *international unit*).

3.3. Oznaczenie aktywności katalazy (CAT, E.C. 1.11.1.6) w erytrocytach

Aktywność katalazy w erytrocytach oznaczano metodą Beersa i Seizeera [469]. Zasada metody dotyczy spadku absorbancji roztworu nadtlenku wodoru rozkładanego przez enzym, a zmniejszenie absorbancji jest wprost proporcjonalne do obniżającego się stężenia H_2O_2 . Na podstawie molowego współczynnika absorbancji można wyliczyć ilość rozłożonego H_2O_2 w określonym czasie, co pozwala na uzyskanie międzynarodowej jednostki aktywności enzymu.

Skład próby badanej:

- 2,5 ml 0,05 M buforu fosforanowego o pH=7
- 0,0012 ml roztworu nadtlenku wodoru (30%)
- 0,2 ml hemolizatu krwinek czerwonych wcześniej rozcieńczonego 1000-krotnie

Skład próby kontrolnej:

- 2,5 ml 0,05 M buforu fosforanowego o pH=7
- 0,0012 ml roztworu nadtlenku wodoru (30%)

Pomiaru dokonano, przy długości fali 240 nm, a aktywność katalazy wyrażono w IU/g Hb.

3.4. Oznaczenie aktywności cytozolowej peroksydazy glutationowej (GPx, E.C. 1.11.1.9) w erytrocytach

Aktywność GPx w erytrocytach oznaczano według metody Paglia i Valentine'a [470]. GPx rozkłada H_2O_2 powodując tym samym utlenianie GSH. GSSG, czyli disulfid glutationu zostaje z kolei zredukowany przez reduktazę glutationową (GR, ang. *glutathione reductase*) a koenzymem tej reakcji jest zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH), który ulega utlenieniu do formy $NADP^+$. Proces ten prowadzi do zmiany absorbancji przy długości fali 340 nm.

Przed przystąpieniem do przygotowania właściwej mieszaniny reakcyjnej przygotowano hemolizat z odczynnikiem Drabkina. Wymagało to rozcieńczenia zawiesiny krwinek czerwonych w stosunku 1:1 w PBS. Do 0,2 ml PBS dodawano 0,2 ml zawiesiny krwinek czerwonych i mieszano. Hemolizat sporządzano poprzez dodanie 0,1 ml rozcieńczonej zawiesiny krwinkowej do 0,4 ml wody redestylowanej schłodzonej do 4°C, a następnie

mrożono roztwór w temp. -20°C przez 4 minuty. Po etapie mrożenia zawiesinę wirowano przez 10 minut przy 6000g w 4°C . Mieszanina hemolizatu z odczynnikami Drabkina składała się z 0,1 ml supernatantu oraz 0,1 ml stężonego odczynnika Drabkina.

Skład próby badanej:

- 2,63 ml 0,05 M buforu fosforanowego o $\text{pH}=7$ zawierającego 0,005 M EDTA
- 0,1 ml mieszaniny hemolizat-odczynnik Drabkina
- 0,1 ml 0,0084 M roztworu NADPH
- 0,01 ml roztworu GR (100 IU/mg białka/1 ml)
- 0,01 ml 1,125 M azydku sodowego
- 0,1 ml 0,15 M roztworu GSH

Skład próby kontrolnej:

- 2,63 ml 0,05 M buforu fosforanowego o $\text{pH}=7$ zawierającego 0,005 M EDTA
- 0,05 ml wody redestylowanej
- 0,1 ml 0,0084 M roztworu NADPH
- 0,01 ml roztworu GR (100 IU/mg białka/1 ml)
- 0,01 ml 1,125 M azydku sodowego
- 0,1 ml 0,15 M roztworu GSH

W celu zainicjowania reakcji bezpośrednio przed pomiarem dodawano roztwór nadtlenu wodoru (0,1 ml) zarówno do próby badanej, jak i kontrolnej. Dokonywano dwukrotnego pomiaru w drugiej i czwartej minucie po zapoczątkowaniu reakcji, przy $\lambda=340\text{ nm}$. Aktywność GPx wyrażono w IU/g Hb.

3.5. Oznaczenie stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w osoczu i w erytrocytach

Stężenie MDA w erytrocytach i osoczu oznaczano metodą Buege i Aust'a [471] w modyfikacji Esterbauera i Cheesemana [472]. MDA jest głównym produktem peroksydacji lipidów, który reaguje z kwasem tiobarbiturowym (TBA, ang. *2-thiobarbituric acid*), dlatego dla uproszczenia poziom wszystkich substancji reagujących z TBA wyraża się w przeliczeniu na mol MDA.

Skład próby badanej dla MDA w erytrocytach:

- 0,5 ml hemolizatu (0,25 ml wody i 0,25 ml zawiesiny krwinek czerwonych)
- 0,5 ml 5% TCA (ang. *trichloroacetic acid*, kwas trójchlorooctowy)
- 0,1 ml 0,01% BHT (ang. *butylated hydroxytoluene*, butylowany hydroksytoluen)

Skład próby zerowej:

- 0,5 ml wody
- 0,5 ml 5% TCA
- 0,1ml 0,01% BHT

Przygotowaną próbę badaną oraz zerową wytrząsano i inkubowano 10 minut w temp. pokojowej. Po inkubacji próby wirowano przez 10 minut przy 2000g w temp. 4°C, w celu uzyskania supernatantu. W kolejnym kroku przygotowywano właściwą mieszaninę reakcyjną.

Skład mieszaniny reakcyjnej dla oznaczenia MDA w erytrocytach i w osoczu:

- 0,5 ml supernatantu dla MDA w erytrocytach lub 0,5 ml osocza dla MDA w osoczu krwi
- 4,5 ml roztworu 0,375% TBA i 15% TCA w 0,25M HCl

Przygotowane mieszaniny reakcyjne inkubowano 20 minut w łaźni wodnej w temp. 100°C. Próbkę schłodzono, a następnie wirowano przez 15 minut przy 2000g w temp. 4°C. Absorbancję mierzono przy długości fali równej 532 nm względem próby ślepej. Stężenie MDA w erytrocytach wyrażano w nmol/g Hb, natomiast w osoczu krwi w nmol/ml.

3.6. Ilościowe oznaczenie chromograniny A

Do wykonania oznaczenia wykorzystano gotowy zestaw analityczny oparty na metodzie ELISA. Zestaw zawierał niezbędne do oznaczeń odczynniki i materiały, a pomiarów dokonano zgodnie z dołączoną instrukcją producenta. Zastosowana metoda jest testem immunoenzymatycznym kanapkowym do ilościowego pomiaru CgA *in vitro*.

Wszystkie elementy zestawu oraz próbki badane doprowadzono do temp. pokojowej (18-25°C). W pierwszym kroku przygotowano serię rozcieńczeń standardu, na podstawie których została wyznaczona krzywa kalibracyjna. Próbki surowicy badanej wymagały 100-krotnego rozcieńczenia w 0,01 mol/L PBS o pH=7,0-7,2. Tak przygotowane standardy, próby ślepe, kontrole oraz próbki badane dodano po 100 µl do odpowiednich studzienek mikropłytki opłaszczonych przeciwciałem monoklonalnym przeciwko CgA i inkubowano w temp. 37°C przez 1 godzinę. Po inkubacji usunięto roztwór ze studzienek i dodano roztwór z biotynyłowymi przeciwciałami (po 100 µl) i ponownie inkubowano przez 1 godzinę w temp. 37°C. Po zakończonej inkubacji 3-krotnie przepłukano płytkę płuczka automatyczną (350 µl roztworu płuczającego) w celu usunięcia nadmiaru przeciwciał niezwiązanych z antygenem. Następnie dodano po 100 µl roztworu zawierającego awidynę skoniugowaną z peroksydazą chrzanową (HRP, ang. *horseradish peroxidase*) i poddano kolejnej inkubacji (30 min, temp. 37°C). Po 5-krotnym płukaniu płytki do każdej ze studzienek dodano po 90 µl substratu chromogenego TMB (3,3',5,5'-tetrametylobenzodyna) i inkubowano 20 min w temp. 37°C chroniąc przed światłem, co skutkowało zmianą barwy roztworu na niebieską. Po dodaniu roztworu TMB zabarwieniu ulegały tylko te studzienki, które zawierały antygen ze związanym analitem, co umożliwiło przyłączenie w kolejnych etapach biotyny oraz awidyny skoniugowanej z enzymem. Dodanie po 50 µl roztworu kwasu siarkowego (VI) zatrzymało reakcję enzym-substrat i spowodowało zmianę zabarwienia kompleksu na kolor żółty. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 450 nm. Stężenie badanego antygenu wyznaczono na podstawie krzywej wzorcowej i wyrażono w pg/ml. Absorbancja jest proporcjonalna do stężenia CgA. Zakres detekcji testu wynosił: 31,2-2000 pg/ml.

3.7. Ilościowe oznaczenie melatoniny

Do wykonania oznaczeń wykorzystano gotowy zestaw analityczny oparty na metodzie ELISA. Zestaw zawierał niezbędne do oznaczeń odczynniki i materiały, a pomiarów dokonano zgodnie z dołączoną instrukcją producenta. W tym teście wykorzystuje się technikę immunoenzymatycznego kompetycyjnego hamowania więc istnieje odwrotna korelacja między stężeniem melatoniny w próbce, a intensywnością sygnału testowego. Cechą charakterystyczną testu ELISA kompetycyjnego jest współzawodnictwo dwóch przeciwciał (przeciwciało skoniugowane z enzymem i przeciwciało w badanej surowicy) o wiązanie z antygenem [473].

Wszystkie elementy zestawu oraz próbki badane doprowadzono do temp. pokojowej (18-25°C). W pierwszym kroku przygotowano szereg rozcieńczeń standardu, który posłużył do utworzenia krzywej kalibracyjnej. Przygotowane standardy, próbę ślepą, kontrole oraz próbki badane dodano (po 50 µl) do odpowiednich studzienek mikro płytki opłaszczonych przeciwciałem monoklonalnym przeciwko melatoninie. Natychmiast po dodaniu w/w próbek do każdej ze studzienek rozpipetowano po 50 µl roztworu biotynylowanych przeciwciał i inkubowano płytkę przez 1 godzinę w temp. 37°C. Po zakończonej inkubacji 3-krotnie przepłukano płytkę płuczką automatyczną w celu usunięcia nadmiaru przeciwciał niezwiązanych z antygenem. Następnie dodano do wszystkich studzienek po 100 µl awidyny związanej z HRP i poddano kolejnej inkubacji (30 minut w temperaturze 37°C). Po 5-krotnym płukaniu do każdej studzienki dodano roztwór TMB w ilości 90 µl i inkubowano 20 minut w temp. 37°C chroniąc przed światłem, co skutkowało zmianą zabarwienia roztworu na niebieską. W ostatnim etapie dodano po 50 µl roztworu kwasu siarkowego (VI), który zatrzymał reakcję i spowodował zmianę zabarwienia roztworu w studzienkach na kolor żółty. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 450 nm. Stężenie melatoniny wyrażono w pg/ml. Zakres wykrywalności analitu w teście wynosił: 12,35-1000 pg/ml.

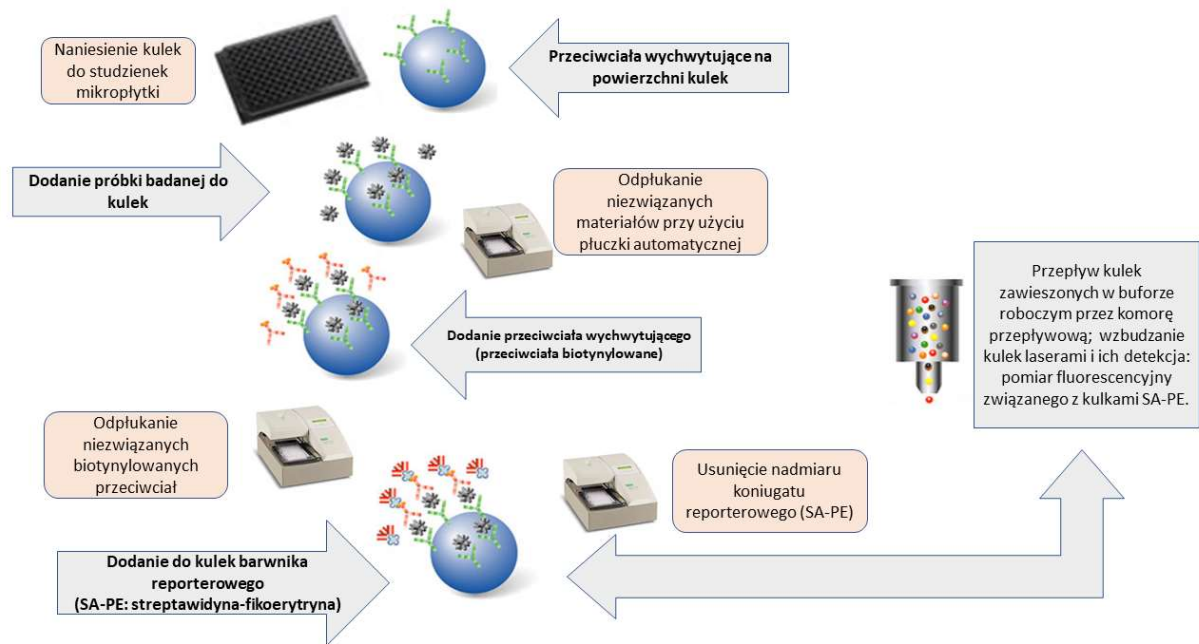
3.8. Ilościowe oznaczenie omentyny-1

Do wykonania oznaczeń wykorzystano gotowy zestaw analityczny oparty na metodzie ELISA. Zestaw zawierał niezbędne do oznaczeń odczynniki i materiały, a pomiarów dokonano zgodnie z dołączoną instrukcją producenta. Zastosowana metoda jest testem immunoenzymatycznym kanapkowym do ilościowego pomiaru omentyny-1 *in vitro*.

Wszystkie elementy zestawu oraz próbki badane doprowadzono do temp. pokojowej. W pierwszym kroku przygotowano serię rozcieńczeń standardu, na podstawie których została wyznaczona krzywa kalibracyjna. Próbki surowicy badanej wymagały 40-krotnego rozcieńczenia w dołączonym do zestawu buforze do rozcieńczeń. Tak przygotowane standardy, próby ślepe, kontrole oraz próbki badane dodano po 100 μ l do odpowiednich studzienek mikro płytki opłaszczonych przeciwciałem poliklonalnym przeciwko ludzkiej omentynie-1 i inkubowano w temp. 37°C przez 2 godziny, bez wytrząsania. Po zakończonej inkubacji 3-krotnie przepłukano płytkę buforem z użyciem płuczki automatycznej (350 μ l buforu płuczającego) w celu usunięcia nadmiaru przeciwciał niezwiązanych z antygenem. Po usunięciu roztworu ze studzienek, dodano po 100 μ l roztworu z przeciwciałami znakowanymi biotyną i ponownie inkubowano przez 30 minut w temp. 37°C. Po zakończonej inkubacji ponownie przeprowadzono 3-krotne płukanie płytki, a po usunięciu roztworu dodano po 100 μ l koniugatu streptawidyna-HRP i poddano kolejnej inkubacji przez 30 minut w temp. 37°C. Po 3-krotnym płukaniu płytki do każdej ze studzienek dodano po 100 μ l substratu chromogennego i inkubowano 10 minut w temp. 37°C, chroniąc przed światłem, co skutkowało zmianą zabarwienia roztworu na niebieską. W kolejnym etapie dodano po 100 μ l kwaśnego roztworu zatrzymującego reakcję i zmierzono absorbancję otrzymanego żółtego produktu. Pomiaru absorbancji dokonano przy 450 nm oraz 630 nm. Następnie absorbancję zmierzoną przy $\lambda=630$ nm odejmowano od absorbancji uzyskanej przy $\lambda=450$ nm. Uzyskana absorbancja była proporcjonalna do stężenia omentyny-1. Stężenie omentyny-1 wyrażono w ng/ml. Zakres wykrywalności omentyny-1 dla tego testu wynosił: 0,5-64,0 ng/ml.

3.9. Ilościowe oznaczenie adipokin, parametrów związanych z metabolizmem węglowodanowym oraz parametrów stanu zapalnego przy użyciu zestawów Bio-Plex Pro Human Diabetes 10-plex Panel oraz Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel

Badania przesiewowe przeprowadzono dla pełnego panelu cytokin, chemokin i czynników troficznych, które zostały wymienione w Tabeli 4. System Bio-Plex, oparty na technologii Luminex xMAP jest kompletnym systemem umożliwiającym jednoczesne ilościowe oznaczenie do 100 różnych analitów z pojedynczej próbki. Składa się z 96-dołkowego fluoroscencyjnego czytnika mikroplitek, oprogramowania Bio-Plex Manager™, zestawów do kalibracji i walidacji oraz zestawów testowych. Analiza multipleksowa dająca możliwość jednoczesnego analizowania wielu analitów dostarcza więcej informacji z mniejszej objętości materiału biologicznego i w krótszym czasie niż tradycyjne metody immunologiczne. Podobnie jak ELISA, testy Bio-Plex Pro są testami immunologicznymi, których podstawą są kulki magnetyczne będące nośnikami reagentów. Opierają się na metodzie kanapkowej, która wykorzystuje przeciwciała do wykrywania analitu, ale różni się od typowej ELISA substratem wychwytyjącym i metodą wykrywania. System matrycy zawieszinowej Bio-Plex wykorzystuje zestawy kolorowych kulek polistyrenowych, z których każdy może być skoniugowany z innym specyficznym reagentem, a ten z kolei jest przeznaczony dla określonego rodzaju analitu. W celu przeprowadzenia testu multipleksowego próbki badane i standardy poddaje się reakcji z mieszaniną kulek w studzienkach mikroplutki. Przeciwciała wychwytyjące skierowane przeciwko konkretnemu biomarkerowi są kowalencyjnie związane z kulkami. Po serii przemyć w celu usunięcia niezwiązanych elementów dodaje się biotynylowane przeciwciało i inkubuje w celu utworzenia kompleksu kanapkowego. Po odpłukaniu nadmiaru przeciwciał biotynylowanych i dodaniu koniugatu streptawidyna-fikoerytryna (SA-PE) tworzony jest ostateczny kompleks wykrywający. Fikoerytryna służy w teście jako wskaźnik fluorescencyjny lub reporter. Schemat testu immunologicznego typu kanapkowego wykorzystywanego w systemie Bio-Plex przedstawiono na Rycinie 3.

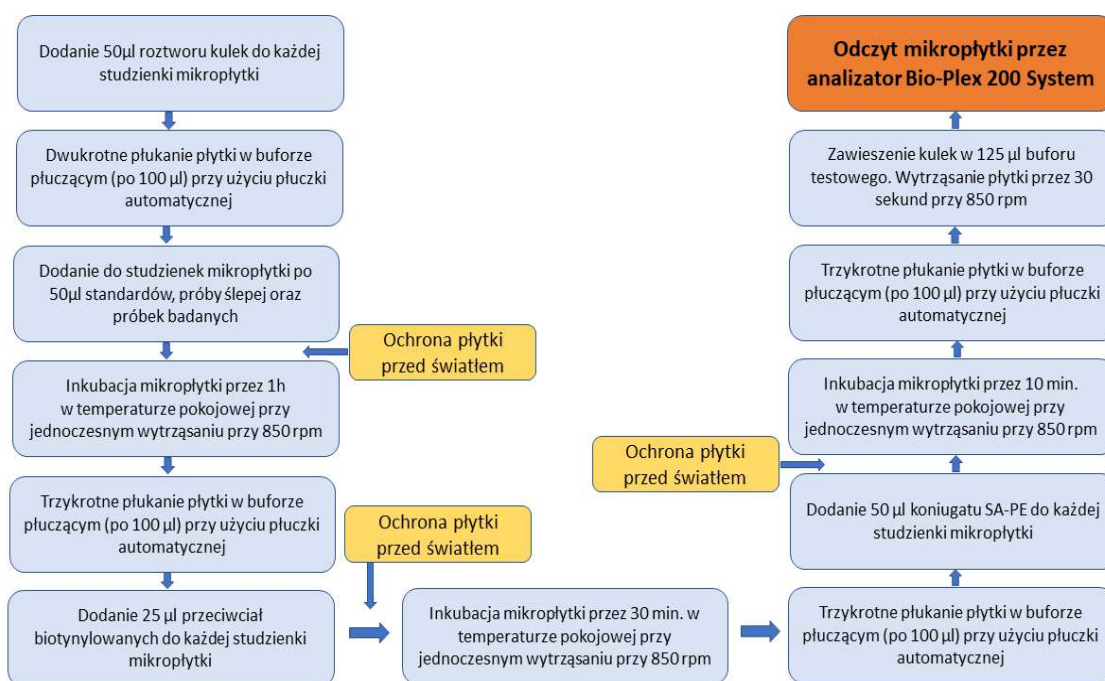


Ryc. 3. Test immunologiczny typu kanapkowego wykorzystywany w systemie Bio-Plex, opracowanie własne na podstawie [474].

System Bio-Plex 200 identyfikuje specyficzną reakcję na podstawie koloru kulek, oceniając ją ilościowo. W technologii tej jedno przeciwciało specyficzne dla określonego analitu jest przyłączane do zestawu kulek o tym samym kolorze, a drugie przeciwciało jest używane do ilościowego oznaczania związanego antygenu. Obrazowanie lub wzbudzenie laserowe jest następnie wykorzystywane do wykrycia różnych parametrów na podstawie koloru kulek i określenia stężenia analitu poprzez pomiar fluorescencji barwnika reporterowego. Intensywność reakcji mierzona jest na podstawie znakowanych fluorescencyjnie cząsteczek reporterowych, również specyficznych dla każdego docelowego analitu. W systemie Bio-Plex 200 zawartość każdej studzienki mikroplatyki pobierana jest przez analizator, mieszanina reakcyjna przepływa przez komorę przepływową, w której dwa lasery wzbudzają kulki. Czerwony laser pełni funkcje klasyfikatora kulek i wzbudza świecenie barwników w każdej pojedynczej kulce rozpoznając jej zakres widmowy. Zielony laser natomiast pobudza do fluorescencji cząsteczkę reporterową (PE) związaną z kulkami, co pozwala na określenie ilościowe badanego biomarkera. Oprogramowanie Bio-Plex Manager automatycznie dostarcza analizy danych oraz generuje szczegółowy raport zbiorczy, dostarczając danych dla każdego z badanych parametrów w postaci mediany intensywności

fluorescencyjnej (MFI, ang. *median fluorescence intensity*) oraz stężenia wyrażone w pg/ml. Stężenie analitu związanego z każdą kulką jest proporcjonalne do MFI sygnału reporterowego.

Analizę przeprowadzono zgodnie z dołączoną do testów instrukcją wykonania. Do badania użyto surowicy krwi, którą uprzednio 4-krotnie rozcieńczono dołączonym do zestawu rozcieńczalnikiem. Przed rozpoczęciem analizy przygotowano szereg rozcieńczeń wzorca w celu utworzenia ośmiopunktowej krzywej wzorcowej. Liofilizowany standard rozpuszczono z użyciem dołączonego do zestawu rozcieńczalnika HB i inkubowano 30 minut na lodzie. W kolejnym etapie rozcieńczano kulki buforem testowym. Ważnym elementem procedury wykonania testu było dokładne mieszanie reagentów oraz próbek. Przeciwciała detekcyjne oraz koniugat reporterowy SA-PE przygotowano bezpośrednio przed dodaniem do studzienek mikro płytki. Przebieg badania przedstawia Rycina 4.



Ryc. 4. Przebieg oznaczeń z zastosowaniem multipleksowych zestawów ELISA (test immunoenzymatyczny) .

4. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą języków programowania R (v.4.2.1) z pakietami dplyr (1.0.9), officer (0.4.3) i Hmisc (4.7-1) oraz Python (v. 3.8.10) z bibliotekami statsmodels (0.13.5), matplotlib (3.6.3), pandas (1.4.3) i scikit learn (1.1.3). Dla każdej grupy wyznaczana była średnia i błąd standardowy oraz mediana i pierwszy i trzeci kwartyl. Normalność rozkładów danych weryfikowano dla każdej zmiennej testem Shapiro-Wilka. W przypadku, gdy można przyjąć założenie o normalności rozkładu zmiennych, wykonano test t-Studenta i porównywano średnie, natomiast jeżeli odrzucono założenie o normalności wykonano test U Manna-Whitneya i wnioskowano na podstawie median. Poziom istotności ustalono na poziomie 0,05.

W celu analizy parametrów wśród poszczególnych lokalizacji NENs wykonano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA lub jej nieparametryczny odpowiednik – test Kruskala-Wallis). Sprawdzenie normalności rozkładu zmiennych w grupach dokonano testem Shapiro-Wilka. Równość wariancji w grupach sprawdzono testem Levene’a. Jeśli założenia normalności lub równości wariancji nie były spełnione, wykonywano nieparametryczny odpowiednik analizy wariancji. Po odrzuceniu hipotezy o równości średnich zostały wykonane testy post-hoc Tukey’a, natomiast w przypadku odrzucenia hipotezy o równości median dokonywano porównania wielokrotnego za pomocą testu post-hoc U Manna-Whitneya.

Wyznaczono współczynniki korelacji rangowych Spearmana między wartościami chromograniny A, a pozostałymi badanymi parametrami.

Dla wybranych parametrów wykonano analizę umożliwiającą wykreślenie krzywych ROC (ang. *receiver operating characteristic*), opisujących zależność między stwierdzonym NEN a wartościami badanych parametrów oraz wzór modelu regresji logistycznej pozwalający na wyznaczenie prawdopodobieństwa występowania choroby u pacjenta w oparciu o wartości parametrów GRO- α i TNF- β , określające ich przydatność jako parametrów pomocnych w diagnostyce NENs. Wyznaczono punkty odcięcia dla zmiennych wykorzystując indeks Youdena.

IV. Wyniki

1. Analiza parametrów antropometrycznych u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi oraz w grupie osób zdrowych

Wyniki dotyczące parametrów antropometrycznych we wszystkich badanych grupach przedstawiono w Tabeli 6. Odnotowano istotne statystycznie zmiany w przypadku masy ciała i BMI między każdą badaną grupą a grupą kontrolną. Ponadto, zaobserwowano istotne różnice w przypadku wzrostu w grupach pacjentów z NENs, GI-NENs oraz o-NENs w porównaniu z grupą kontrolną, a także różnice w wieku pomiędzy grupami pacjentów z NENs, pNENs, GI-NENs oraz L-NENs a osobami zdrowymi.

Tab. 6. Parametry antropometryczne o statystycznym rozkładzie normalnym oraz testy nieparametryczne analizowane w grupie wszystkich pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (grupa badana, NENs), a także u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi trzustki (pNENs), układu pokarmowego (GI-NENs), płuca (L-NENs) oraz innych lokalizacji (o-NENs) w odniesieniu do osób zdrowych (grupa kontrolna, Ctrl). Wyniki przedstawiono jako wartość średnią ± błąd standardowy (SEM) oraz jako medianę (M) i rozkład kwartylowy (Q1; Q3); *P* – poziom istotności.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	<i>P</i> _{NENs vs Ctrl}	pNENs	<i>P</i> _{pNENs vs Ctrl}	GI-NENs	<i>P</i> _{GI-NENs vs Ctrl}	L-NENs	<i>P</i> _{L-NENs vs Ctrl}	o-NENs	<i>P</i> _{o-NENs vs Ctrl}
Masa ciała [kg]	Średnia	61,114	78,058	<0,001	82,818	<0,001	74,382	<0,001	86,918	<0,001	73,278	0,001
	SEM	1,294	2,559		2,244		2,592		2,878		2,063	
	Mediana	60,000	78,000		83,500		73,000		87,500		73,500	
	Q1; Q3	55,500; 66,500	68,00; 87,00		75,500; 91,000		4,250; 85,750		80,000; 90,500		67,000; 78,750	
Wzrost [cm]	Średnia	165,629	170,116	0,004	169,500	0,092	169,618	0,038	168,833	0,309	172,667	0,003
	SEM	1,228	1,426		1,483		1,408		1,634		1,272	
	Mediana	167,000	170,000		173,000		169,000		167,000		173,500	
	Q1; Q3	160,000; 170,000	164,000; 177,000		164,000; 176,000		162,000; 176,750		161,750; 178,000		166,176; 75,000	
BMI [kg/m ²]	Średnia	22,227	26,902	<0,001	28,749	<0,001	25,694	<0,001	30,501	<0,001	24,528	0,011
	SEM	0,309	0,754		0,596		0,694		0,897		0,555	
	Mediana	22,321	26,879		27,451		25,961		29,358		24,574	
	Q1; Q3	20,922; 23,839	23,736; 29,068		26,069; 30,899		22,461; 29,014		27,236; 34,861		22,459; 26,785	
Wiek [lata]	Średnia	52,600	57,829	0,003	60,381	0,002	58,788	0,004	60,546	0,025	51,059	0,899
	SEM	1,827	2,043		1,426		1,964		2,189		2,459	
	Mediana	50,000	60,500		62,000		60,000		64,000		51,000	
	Q1; Q3	45,500; 58,500	51,000; 66,000		53,000; 67,000		54,000; 66,000		54,000; 69,500		42,000; 62,000	

Kolor czerwony czcionki – wynik istotnie statystyczny;

Wynik pogrubiony - wskazanie, czy do analizy brano pod uwagę średnią lub medianę.

BMI – wskaźnik masy ciała

2. Analiza parametrów stresu oksydacyjnego u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi oraz w grupie osób zdrowych

W niniejszej pracy wykazano istotny statystycznie wzrost stężenia MDA w osoczu krwi u pacjentów z NENs bez względu na lokalizację w porównaniu z grupą kontrolną. W przypadku MDA w erytrocytach istotny wzrost jego stężenia w porównaniu z grupą osób zdrowych dotyczył NENs, L-NENs oraz o-NENs o odpowiednio 20%, 18% i 70%. W pozostałych grupach nie wykazano różnic. Aktywność SOD w grupach badanych zmniejszyła się istotnie statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast nie wykazano istotnych statystycznie różnic w aktywności CAT. Aktywność GPx zwiększyła się w przypadku pacjentów z pNENs o ok. 32%, a zmniejszyła u pacjentów z GI-NENs o ok. 19% w porównaniu z grupą kontrolną. Odnotowano istotny statystycznie spadek stężenia melatoniny, o ok. 80-85% we wszystkich grupach pacjentów z NENs w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej. Zestawienie przedstawionych wyników znajduje się w Tabeli 7.

Tab. 7. Parametry stresu oksydacyjnego o statystycznym rozkładzie normalnym oraz testy nieparametryczne analizowane w grupie wszystkich pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (grupa badana, NENs), a także w grupie pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi trzustki (pNENs), układu pokarmowego (GI-NENs), płuca (L-NENs) oraz innych lokalizacji (o-NENs) w odniesieniu do osób zdrowych (grupa kontrolna, Ctrl). Wyniki przedstawiono jako wartość średnią ± błąd standardowy (SEM) oraz jako medianę (M) i rozkład kwartylowy (Q1; Q3); *P* – poziom istotności.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	<i>P</i> _{NENs vs Ctrl}	pNENs	<i>P</i> _{pNENs vs Ctrl}	GI-NENs	<i>P</i> _{GI-NENs vs Ctrl}	L-NENs	<i>P</i> _{L-NENs vs Ctrl}	o-NENs	<i>P</i> _{o-NENs vs Ctrl}
MDA w osoczu [nmol/ml]	Średnia	0,375	0,495	<0,001	0,518	<0,001	0,477	<0,001	0,466	0,002	0,517	<0,001
	SEM	0,010	0,020		0,016		0,019		0,012		0,028	
	Mediana	0,380	0,480		0,505		0,475		0,480		0,470	
	Q1; Q3	0,343; 0,400	0,410; 0,550		0,450; 0,565		0,403; 0,548		0,390; 0,505		0,400; 0,598	
MDA w erytrocytach [nmol/g Hb]	Średnia	23,888	39,381	0,008	35,973	0,182	39,198	0,029	36,468	0,452	45,672	0,001
	SEM	0,659	4,352		3,709		4,491		5,086		4,517	
	Mediana	23,720	28,470		26,685		28,035		24,530		40,270	
	Q1; Q3	21,200; 26,098	22,310; 52,520		21,110; 47,040		21,678; 52,580		22,045; 36,040		24,633; 56,248	
SOD [IU/g Hb]	Średnia	888,709	707,540	<0,001	694,255	<0,001	706,999	<0,001	700,316	<0,001	729,217	<0,001
	SEM	18,894	12,921		11,628		12,659		13,489		14,747	
	Mediana	900,990	695,930		689;140		696,650		679,800		726,300	
	Q1; Q3	813,175; 953,048	648,140; 768,360		650,653; 733,283		644,763; 760,183		640,710; 754,220		651,483; 770,183	

Tab. 7. Kontynuacja.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	$P_{\text{NENs vs Ctrl}}$	pNENs	$P_{\text{pNENs vs Ctrl}}$	GI-NENs	$P_{\text{GI-NENs vs Ctrl}}$	L-NENs	$P_{\text{L-NENs vs Ctrl}}$	o-NENs	$P_{\text{o-NENs vs Ctrl}}$
CAT [10 ⁴ x IU/g Hb]	Średnia	63,302	65,407	0,344	68,758	0,07	63,215	0,973	67,820	0,242	63,977	0,829
	SEM	1,894	1,793		1,809		1,725		1,829		1,793	
	Mediana	62,725	64,440		68,595		62,055		66,010		64,260	
	Q1; Q3	55,573; 71,528	59,530; 69,950		61,765; 75,058		57,388; 68,973		62,260; 75,400		57,315; 69,875	
GPx [IU/g Hb]	Średnia	14,581	15,575	0,749	19,550	0,004	12,061	0,043	15,626	0,460	17,326	0,361
	SEM	1,127	1,026		0,952		0,789		0,471		1,148	
	Mediana	14,740	14,440		19,435		11,985		15,290		14,430	
	Q1; Q3	10,178; 17,075	12,010; 18,850		15,675; 23,388		8,660; 14,700		13,925; 16,840		13,025; 19,120	
Melatonina [ng/ml]	Średnia	72,837	13,459	<0,001	13,412	<0,001	14,182	<0,001	11,370	<0,001	13,619	<0,001
	SEM	5,030	1,212		0,983		1,636		0,851		0,689	
	Mediana	67,820	11,991		12,324		11,469		10,345		13,022	
	Q1; Q3	53,991; 79,834	9,268; 16,091		9,325; 16,657		9,296; 16,076		7,653; 14,359		10,262; 15,503	

Kolor czerwony czcionki – wynik istotnie statystyczny;

Wynik pogrubiony - wskazanie, czy do analizy brano pod uwagę średnią lub medianę.

CAT - katalaza, GPx – peroksydaza glutationowa, MDA - dialdehyd malonowy, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

3. Analiza parametrów diabetologicznych u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi oraz w grupie osób zdrowych

W przypadku parametrów diabetologicznych odnotowano istotny statystycznie wzrost poziomu GIP we wszystkich badanych grupach pacjentów z NENs w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie C-peptydu wzrosło istotnie statystycznie o 53% w grupach pacjentów z NENs oraz GI-NENs w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast różnice istotne statystycznie w stężeniu insuliny wykazały grupy pacjentów z NENs, pNENs, GI-NENs oraz L-NENs. Wykazano również istotny spadek stężenia greliny w grupie L-NENs, natomiast wyniki stężenia GLP-1 nie wykazywały istotnych statystycznie różnic w żadnej z badanych grup. Ponadto odnotowano istotny statystycznie spadek stężenia glukagonu u pacjentów z NENs, pNENs i GI-NENs o 94% oraz u pacjentów z o-NENs o 96%. Natomiast stężenie PAI-1 zmniejszyło się istotnie w przypadku pacjentów z NENs (o 15%), GI-NENs (o 21%) oraz o-NENs (o 27%) w porównaniu z grupą kontrolną. Zestawienie przedstawionych wyników znajduje się w Tabeli 8.

Tab. 8. Parametry diabetologiczne o statystycznym rozkładzie normalnym oraz testy nieparametryczne analizowane w grupie wszystkich pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (grupa badana, NENs), a także u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi trzustki (pNENs), układu pokarmowego (GI-NENs), płuca (L-NENs) oraz innych lokalizacji (o-NENs) w odniesieniu do osób zdrowych (grupa kontrolna, Ctrl). Wyniki przedstawiono jako wartość średnią ± błąd standardowy (SEM) oraz jako medianę (M) i rozkład kwartylowy (Q1; Q3); *P* – poziom istotności.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	<i>P</i> _{NENs vs Ctrl}	pNENs	<i>P</i> _{pNENs vs Ctrl}	GI-NENs	<i>P</i> _{GI-NENs vs Ctrl}	L-NENs	<i>P</i> _{L-NENs vs Ctrl}	o-NENs	<i>P</i> _{o-NENs vs Ctrl}
C-peptyd [pg/ml]	Średnia	871,044	1217,657	0,008	1295,564	0,067	1200,582	0,005	1258,601	0,081	1116,112	0,475
	SEM	91,066	120,591		149,347		92,116		111,098		144,553	
	Mediana	720,040	1104,092		1021,126		1104,092		1369,339		876,698	
	Q1; Q3	450,365; 1201,565	717,139; 1752,144		680,708; 1880,199		802,835; 1490,507		848,469; 1716,698		559,814; 1677,433	
Grelina [pg/ml]	Średnia	294,642	409,114	0,493	359,642	0,700	586,806	0,359	161,419	0,007	285,315	0,227
	SEM	28,559	102,382		63,016		143,987		23,642		49,029	
	Mediana	246,990	228,897		239,964		294,981		110,515		144,506	
	Q1; Q3	171,955; 373,140	102,281; 484,448		106,505; 455,979		161,126; 746,229		75,864; 245,301		66,289; 402,681	
GIP [pg/ml]	Średnia	3,000	35,097	<0,001	43,149	<0,001	34,1249	<0,001	30,752	<0,001	29,349	<0,001
	SEM	0,000	4,646		7,876		1,714		4,203		2,993	
	Mediana	3,000	32,089		34,125		32,733		28,112		28,719	
	Q1; Q3	3,000; 3,000	25,387; 41,575		25,949; 43,571		28,279; 40,416		8,574; 41,848		18,249; 42,635	
GLP-1 [pg/ml]	Średnia	69,546	85,418	0,139	83,986	0,283	93,811	0,143	91,555	0,189	64,945	0,779
	SEM	10,586	6,767		5,449		7,262		8,393		5,083	
	Mediana	75,900	80,949		86,893		82,553		80,083		71,729	
	Q1; Q3	12,000; 130,995	68,091; 101,511		71,816; 99,958		72,141; 103,418		64,299; 131,059		49,466; 85,815	

Tab. 8. Kontynuacja.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	$P_{\text{NENs vs Ctrl}}$	pNENs	$P_{\text{pNENs vs Ctrl}}$	GI-NENs	$P_{\text{GI-NENs vs Ctrl}}$	L-NENs	$P_{\text{L-NENs vs Ctrl}}$	o-NENs	$P_{\text{o-NENs vs Ctrl}}$
Glukagon [pg/ml]	Średnia	1305,305	187,356	0,001	167,033	0,013	115,964	0,006	501,513	0,308	131,392	0,001
	SEM	218,895	62,352		49,863		19,389		129,457		47,067	
	Mediana	1365,480	82,453		85,150		83,140		89,280		53,201	
	Q1; Q3	47,000; 1704,81	56,670; 123,779		68,235; 144,115		60,473; 119,149		56,063; 544,052		38,954; 88,928	
Insulina [pg/ml]	Średnia	347,291	908,464	<0,001	1272,169	<0,001	802,258	<0,001	849,451	0,003	678,316	0,214
	SEM	67,014	139,697		188,316		100,419		110,361		138,753	
	Mediana	159,040	641,823		1092,124		621,094		729,842		314,492	
	Q1; Q3	93,315; 489,405	283,735; 1451,844		354,062; 1868,536		302,294; 1189,452		320,970; 1255,191		121,339; 838,451	
PAI-1 [pg/ml]	Średnia	4879,231	4097,510	0,005	4525,568	0,459	3849,399	<0,001	4699,812	0,793	3584,442	0,019
	SEM	181,478	259,722		245,911		158,215		376,572		318,669	
	Mediana	4919,010	4182,285		4480,819		4014,008		4869,076		3867,897	
	Q1; Q3	4006,75; 5688,760	3333,801; 4976,788		4101,443; 5291,396		3157,405; 4455,749		3849,432; 5721,210		2736,695; 4760,859	

Kolor czerwony czcionki – wynik istotnie statystyczny;

Wynik pogrubiony - wskazanie, czy do analizy brano pod uwagę średnią lub medianę.

GIP - glukozozależny peptyd insulinotropowy, GLP-1 - glukagonopodobny peptyd 1, PAI-1 - inhibitor aktywatora plazminogenu

4. Analiza stężeń wybranych adipokin oraz chromograniny A u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi oraz w grupie osób zdrowych

Wśród analizowanych adipokin zaobserwowano istotny statystycznie wzrost wisfatyny w grupach badanych w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie omentyny-1 istotnie wzrosło o 37% w grupie NENs, o 45% w grupie pNENs, o 39% w grupie GI-NENs oraz o 31% w przypadku pacjentów z L-NENs w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto we wszystkich badanych grupach pacjentów zaobserwowano istotnie niższe wartości rezystyny w porównaniu z grupą kontrolną. Największy spadek stężenia leptyny wykazano w grupie pacjentów z o-NENs (o ok. 75%). Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia CgA w grupie pacjentów z NENs oraz w grupach pacjentów z pNEN oraz L-NENs w porównaniu do grupy kontrolnej. W przypadku pacjentów z GI-NENs oraz z o-NENs nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w zakresie tego parametru. Zestawienie przedstawionych wyników znajduje się w Tabeli 9.

Tab. 9. Stężenia adipokin oraz chromograniny A o statystycznym rozkładzie normalnym oraz testy nieparametryczne analizowane w grupie wszystkich pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (grupa badana, NENs), a także u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi trzustki (pNENs), układu pokarmowego (GI-NENs), płuca (L-NENs) oraz innych lokalizacji (o-NENs) w odniesieniu do osób zdrowych (grupa kontrolna, Ctrl). Wyniki przedstawiono jako wartość średnią ± błąd standardowy (SEM) oraz jako medianę (M) i rozkład kwartyłowy (Q1; Q3); *P* – poziom istotności.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	<i>P</i> _{NENs vs Ctrl}	pNENs	<i>P</i> _{pNENs vs Ctrl}	GI-NENs	<i>P</i> _{GI-NENs vs Ctrl}	L-NENs	<i>P</i> _{L-NENs vs Ctrl}	o-NENs	<i>P</i> _{o-NENs vs Ctrl}
Omentyna-1 [ng/ml]	Średnia	563,930	762,629	<0,001	769,312	0,008	781,284	0,001	755,657	0,023	721,030	0,109
	SEM	32,747	50,789		48,218		53,209		40,429		59,134	
	Mediana	551,400	756,640		799,200		765,360		721,900		700,220	
	Q1; Q3	406,820; 687,580	527,560; 969,680		606,520; 904,970		545; 969,68		540,04; 893,01		506,960; 999,930	
Leptyna [ng/ml]	Średnia	2,907	4,076	0,390	4,351	0,531	2,582	0,249	10,254	0,428	2,238	0,012
	SEM	0,341	1,162		0,731		0,429		2,566		0,608	
	Mediana	2,076	1,973		3,150		1,736		4,321		0,499	
	Q1; Q3	1,161; 4,947	0,455; 5,306		0,657; 6,080		0,721; 3,949		0,620; 8,961		0,221; 1,879	
Rezystyna [ng/ml]	Średnia	10,530	4,089	<0,001	3,946	<0,001	3,486	<0,001	5,277	0,001	4,673	<0,001
	SEM	0,923	0,530		0,508		0,149		0,725		0,833	
	Mediana	9,196	3,495		3,435		3,481		4,123		3,813	
	Q1; Q3	6,795; 13746,3	2,812; 4,513		2,892; 3,838		2,872; 3,994		2,818; 6,458		1,819; 5,238	

Tab. 9. Kontynuacja.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	$P_{\text{NENs vs Ctrl}}$	pNENs	$P_{\text{pNENs vs Ctrl}}$	GI-NENs	$P_{\text{GI-NENs vs Ctrl}}$	L-NENs	$P_{\text{L-NENs vs Ctrl}}$	o-NENs	$P_{\text{o-NENs vs Ctrl}}$
Wisfatyna [pg/ml]	Średnia	88,111	370,624	<0,001	437,224	<0,001	280,437	<0,001	500,071	<0,001	373,612	<0,001
	SEM	44,007	58,086		82,132		16,656		81,496		51,814	
	Mediana	19,000	295,082		304,758		279,406		349,868		285,484	
	Q1; Q3	19,000; 19,000	222,943; 392,974		236,889; 398,116		224,374; 336,883		242,476; 536,654		192,984; 565,988	
Chromogranina A [ng/ml]	Średnia	16,004	20,578	<0,001	23,363	<0,001	18,794	0,093	21,705	<0,001	19,793	0,128
	SEM	0,625	1,382		1,209		1,475		0,676		1,648	
	Mediana	15,690	21,068		24,170		19,122		21,546		19,507	
	Q1; Q3	13,230; 18,191	17,466; 25,760		19,200; 27,118		15,688; 24,591		18,560; 24,745		16,650; 24,522	

Kolor czerwony czcionki – wynik istotnie statystyczny;

Wynik pogrubiony - wskazanie, czy do analizy brano pod uwagę średnią lub medianę.

5. Analiza parametrów stanu zapalnego pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi oraz w grupie osób zdrowych

Wśród parametrów stanu zapalnego o istotnym statystycznie wzroście stężeń we wszystkich grupach badanych w odniesieniu do grupy kontrolnej wyróżnia się: CTACK, eotaksynę, G-CSF, GM-CSF, GRO- α , HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-2R α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-16, IL-17A, LIF, MCP-1, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, β -NGF, RANTES, SCF, SCGF- β , TNF- α , VEGF. Istotny statystycznie spadek stężeń we wszystkich grupach badanych w porównaniu z grupą kontrolną zaobserwowano w przypadku PDGF-BB oraz TNF- β . Brak zmian istotnych statystycznie we wszystkich grupach badanych pacjentów dotyczył IL-13 oraz IP-10. W przypadku bFGF odnotowano istotny statystycznie, ok. pięciokrotny wzrost stężenia w grupie pacjentów z NENs, pNENs, GI-NENs oraz o-NENs w porównaniu z grupą kontrolną. W tych samych grupach odnotowano zmiany istotne statystycznie również w przypadku IL-3, IL-12(p40) oraz IL-12(p70). Istotny statystycznie wzrost stężenia IL-9 (o 4%) zauważono wyłącznie w przypadku grupy pacjentów z pNENs, natomiast dla IL-18 odnotowano istotne zmiany dla pacjentów z grupy NENs, pNENs, a największy (ok. trzykrotny) wzrost stężenia IL-18 wystąpił w grupie badanej z o-NENs. Istotny wzrost wartości stężenia MIP-1 α wystąpił w grupie NENs bez względu na lokalizację oraz w grupach z pNENs, L-NENs i o-NENs, a w przypadku MIP-1 β doszło do istotnego statystycznie spadku oznaczanego stężenia w grupie pacjentów z NENs, pNENs oraz GI-NENs w porównaniu z grupą kontrolną. Dla parametru SDF-1 α + β wystąpił spadek stężenia dla grupy pacjentów z NENs w porównaniu z grupą kontrolną o ok. 2%. Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia TRAIL w grupie pacjentów z NENs, pNENs, L-NENs oraz o-NENs w porównaniu z grupą kontrolną. Nie wykazano takich różnic w przypadku grupy pacjentów z GI-NENs. Zestawienie przedstawionych wyników znajduje się w Tabeli 10.

Tab. 10. Parametry stanu zapalnego o statystycznym rozkładzie normalnym oraz testy nieparametryczne analizowane w grupie wszystkich pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (grupa badana, NENs), a także u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi trzustki (pNENs), układu pokarmowego (GI-NENs), płuca (L-NENs) oraz innych lokalizacji (o-NENs) w odniesieniu do osób zdrowych (grupa kontrolna, Ctrl). Wyniki przedstawiono jako wartość średnią ± błąd standardowy (SEM) oraz jako medianę (M) i rozkład kwartylowy (Q1; Q3); *P* – poziom istotności.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	<i>P</i> _{NENs vs Ctrl}	pNENs	<i>P</i> _{pNENs vs Ctrl}	GI-NENs	<i>P</i> _{GI-NENs vs Ctrl}	L-NENs	<i>P</i> _{L-NENs vs Ctrl}	o-NENs	<i>P</i> _{o-NENs vs Ctrl}
CTACK [pg/ml]	Średnia	894,803	1927,558	<0,001	2046,284	<0,001	1900,696	<0,001	1899,128	<0,001	1842,714	<0,001
	SEM	48,462	113,570		132,427		92,955		138,879		113,093	
	Mediana	842,840	1801,195		1913,330		1779,335		1769,180		1719,680	
	Q1; Q3	698,120; 1049,150	1432,195; 2472,720		1459,898; 2792,185		1415,223; 2243,500		1384,928; 2393,668		1387,505; 2301,153	
Eotaksyna [pg/ml]	Średnia	102,969	165,514	<0,001	178,007	<0,001	163,576	<0,001	136,197	0,007	174,439	<0,001
	SEM	9,032	12,692		10,552		16,493		5,598		9,229	
	Mediana	98,650	150,030		164,950		127,745		127,550		185,775	
	Q1; Q3	64,200; 119,520	118,448; 194,305		141,575; 217,908		108,738; 189,695		112,910; 167,540		146,850; 195,445	
bFGF [pg/ml]	Średnia	29,309	101,890	0,002	112,291	<0,001	94,401	0,048	88,812	0,114	111,186	0,004
	SEM	2,409	12,138		12,523		12,832		11,348		11,187	
	Mediana	26,730	133,220		144,910		133,220		125,990		129,605	
	Q1; Q3	24,240; 31,070	3,260; 152,680		23,553; 163,558		3,260; 146,51		21,750; 134,923		79,025; 154,158	
G-CSF [pg/ml]	Średnia	34,778	737,933	<0,001	913,524	<0,001	630,031	<0,001	589,319	<0,001	837,249	<0,001
	SEM	4,791	125,906		207,276		76,826		80,329		83,662	
	Mediana	30,510	597,170		607,140		546,930		449,110		903,540	
	Q1; Q3	6,350; 44,610	398,873; 876,375		443,848; 868,785		358,305; 700,353		247,543; 944,458		558,408; 1078,023	

Tab. 10. Kontynuacja.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	$P_{\text{NENs vs Ctrl}}$	pNENs	$P_{\text{pNENs vs Ctrl}}$	GI-NENs	$P_{\text{GI-NENs vs Ctrl}}$	L-NENs	$P_{\text{L-NENs vs Ctrl}}$	o-NENs	$P_{\text{o-NENs vs Ctrl}}$
GM-CSF [pg/ml]	Średnia	0,480	21,652	<0,001	32,473	<0,001	18,869	<0,001	14,040	<0,001	18,395	<0,001
	SEM	0,000	6,058		11,475		1,725		1,633		1,775	
	Mediana	0,480	18,700		20,045		18,700		15,215		20,925	
	Q1; Q3	0,480; 0,480	13,020; 24,770		11,490; 28,430		14,133; 23,718		7,560; 19,535		14,010; 24,553	
GRO- α [pg/ml]	Średnia	591,017	1201,284	<0,001	1201,293	<0,001	1181,305	<0,001	1191,067	0,007	1251,388	<0,001
	SEM	61,061	41,437		51,255		38,072		27,844		44,281	
	Mediana	636,390	1203,480		1228,575		1180,305		1183,845		1267,205	
	Q1; Q3	398,290; 866,195	1042,035; 1330,193		1011,850; 1362,553		1032,423; 1277,410		1090,975; 1242,095		1046,550; 1445,648	
HGF [pg/ml]	Średnia	290,862	603,779	<0,001	760,277	<0,001	525,714	<0,001	534,668	<0,001	606,316	<0,001
	SEM	16,337	45,835		65,110		31,627		26,137		38,179	
	Mediana	279,070	568,470		664,330		504,700		513,180		647,805	
	Q1; Q3	228,550; 332,305	425,690; 721,720		487,510; 929,650		386,788; 662,275		422,355; 622,555		432,268; 725,788	
IFN- α 2 [pg/ml]	Średnia	0,950	54,939	<0,001	54,284	<0,001	50,206	<0,001	51,971	<0,001	68,127	<0,001
	SEM	0,000	6,302		6,509		5,546		7,666		6,535	
	Mediana	0,950	47,600		50,230		47,600		52,400		80,285	
	Q1; Q3	0,950; 0,950	33,820; 79,083		28,040; 85,050		36,710; 58,020		19,100; 70,538		41,988; 97,953	

Tab. 10. Kontynuacja.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	$P_{\text{NENs vs Ctrl}}$	pNENs	$P_{\text{pNENs vs Ctrl}}$	GI-NENs	$P_{\text{GI-NENs vs Ctrl}}$	L-NENs	$P_{\text{L-NENs vs Ctrl}}$	o-NENs	$P_{\text{o-NENs vs Ctrl}}$
IFN- γ [pg/ml]	Średnia	6,975	18,793	<0,001	24,374	<0,001	17,672	<0,001	14,103	<0,001	17,016	<0,001
	SEM	0,418	2,519		4,162		1,757		0,811		1,259	
	Mediana	6,220	15,540		18,000		15,335		14,505		19,615	
	Q1; Q3	5,720; 8,480	11,360; 21,220		11,145; 23,513		11,573; 19,718		10,955; 16,463		9,098; 22,220	
IL-1 α [pg/ml]	Średnia	4,536	132,769	<0,001	136,961	<0,001	151,977	<0,001	103,671	<0,001	108,013	<0,001
	SEM	0,562	19,067		14,442		25,823		11,611		9,538	
	Mediana	3,730	120,040		136,640		120,040		114,085		109,610	
	Q1; Q3	3,730; 3,730	90,530; 156,540		90,530; 161,948		102,220; 142,735		68,830; 153,465		78,285; 147,330	
IL-1 β [pg/ml]	Średnia	0,494	7,011	<0,001	7,483	<0,001	7,552	<0,001	5,656	<0,001	6,229	<0,001
	SEM	0,071	0,568		0,481		0,641		0,495		0,537	
	Mediana	0,290	7,430		7,430		7,430		6,160		7,115	
	Q1; Q3	0,290; 0,290	6,160; 8,660		6,320; 9,110		6,160; 8,660		4,773; 7,353		5,995; 8,660	
IL-1ra [pg/ml]	Średnia	165,569	990,829	<0,001	1070,059	<0,001	1021,947	<0,001	857,021	<0,001	916,117	<0,001
	SEM	12,182	116,934		100,479		151,371		66,033		83,746	
	Mediana	147,050	982,710		164,085		913,975		982,710		1044,785	
	Q1; Q3	127,355; 214,180	687,760; 1221,310		761,498; 1377,235		687,760; 982,710		538,735; 1221,310		573,178; 1221,310	

Tab. 10. Kontynuacja.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	$P_{\text{NENs vs Ctrl}}$	pNENs	$P_{\text{pNENs vs Ctrl}}$	GI-NENs	$P_{\text{GI-NENs vs Ctrl}}$	L-NENs	$P_{\text{L-NENs vs Ctrl}}$	o-NENs	$P_{\text{o-NENs vs Ctrl}}$
IL-2 [pg/ml]	Średnia	1,290	19,790	<0,001	27,971	<0,001	17,092	<0,001	6,807	0,016	24,031	<0,001
	SEM	0,000	4,479		6,136		3,993		2,210		3,457	
	Mediana	1,290	1,290		26,535		1,290		1,290		28,105	
	Q1; Q3	1,290; 1,290	1,290; 33,340		1,290; 40,148		1,290; 29,150		1,290; 1,290		1,290; 36,743	
IL-2Rα [pg/ml]	Średnia	46,435	196,963	<0,001	235,252	<0,001	178,799	<0,001	170,715	<0,001	202,601	<0,001
	SEM	3,012	21,452		36,328		9,196		14,132		16,332	
	Mediana	41,550	184,690		201,830		172,175		179,145		232,075	
	Q1; Q3	34,695; 53,460	139,098; 237,415		141,965; 240,715		140,905; 217,390		134,390; 228,775		121,44; 267,62	
IL-3 [pg/ml]	Średnia	0,189	5,998	0,007	12,139	<0,001	4,419	0,009	0,710	0,422	4,873	0,048
	SEM	0,059	3,151		5,361		1,879		0,339		2,103	
	Mediana	0,130	0,130		0,130		0,130		0,130		0,130	
	Q1; Q3	0,130; 0,130	0,130; 0,130		0,130; 9,753		0,130; 0,130		0,130; 0,130		0,130; 0,130	
IL-4 [pg/ml]	Średnia	2,061	13,458	<0,001	13,959	<0,001	13,998	<0,001	10,643	<0,001	13,732	<0,001
	SEM	0,175	0,920		0,936		0,891		0,985		0,889	
	Mediana	2,110	13,380		15,250		12,895		10,920		14,320	
	Q1; Q3	1,560; 2,630	11,430; 16,160		13,380; 17,710		11,430; 15,933		8,465; 15,250		13,015; 16,603	

Tab. 10. Kontynuacja.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	$P_{\text{NENs vs Ctrl}}$	pNENs	$P_{\text{pNENs vs Ctrl}}$	GI-NENs	$P_{\text{GI-NENs vs Ctrl}}$	L-NENs	$P_{\text{L-NENs vs Ctrl}}$	o-NENs	$P_{\text{o-NENs vs Ctrl}}$
IL-5 [pg/ml]	Średnia	7,597	104,324	<0,001	129,867	<0,001	103,819	<0,001	68,115	<0,001	97,430	<0,001
	SEM	3,967	18,354		28,905		14,254		9,590		11,003	
	Mediana	3,630	90,840		83,265		94,500		53,910		105,085	
	Q1; Q3	3,630; 3,630	50,753; 135,880		64,140; 150,483		56,000; 127,555		29,918; 103,185		48,535; 139,145	
IL-6 [pg/ml]	Średnia	0,380	20,376	<0,001	29,279	<0,001	16,572	<0,001	15,721	<0,001	19,707	<0,001
	SEM	0,000	4,373		7,978		1,289		1,631		2,520	
	Mediana	0,380	16,450		16,020		15,735		18,860		21,705	
	Q1; Q3	0,380; 0,380	10,828; 23,400		9,753; 23,118		11,043; 18,720		10,308; 20,995		10,618; 25,525	
IL-7 [pg/ml]	Średnia	1,920	29,907	<0,001	31,307	<0,001	28,094	<0,001	17,003	<0,001	41,513	<0,001
	SEM	0,000	4,014		3,055		2,295		1,714		7,359	
	Mediana	1,920	28,665		30,920		26,290		21,660		30,920	
	Q1; Q3	1,920; 1,920	21,66; 39,41		21,660; 39,410		21,660; 37,288		8,715; 21,660		21,660; 39,410	
IL-8 [pg/ml]	Średnia	7,344	32,311	<0,001	31,553	<0,001	31,559	<0,001	23,802	<0,001	41,330	<0,001
	SEM	0,573	3,448		2,375		3,231		2,409		5,145	
	Mediana	6,170	27,120		27,120		27,120		21,220		36,210	
	Q1; Q3	5,090; 8,835	19,71; 40,64		23,595; 39,533		22,420; 36,210		15,575; 33,935		24,735; 51,445	

Tab. 10. Kontynuacja.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	$P_{\text{NENs vs Ctrl}}$	pNENs	$P_{\text{pNENs vs Ctrl}}$	GI-NENs	$P_{\text{GI-NENs vs Ctrl}}$	L-NENs	$P_{\text{L-NENs vs Ctrl}}$	o-NENs	$P_{\text{o-NENs vs Ctrl}}$
IL-9 [pg/ml]	Średnia	503,224	553,179	0,06	582,967	0,026	535,613	0,247	519,992	0,401	574,442	0,077
	SEM	3,812	23,369		26,181		23,729		11,058		25,255	
	Mediana	507,130	529,595		527,495		525,940		518,020		567,565	
	Q1; Q3	486,610; 523,280	461,395; 610,28		489,970; 671,618		436,353; 590,805		474,243; 572,660		472,458; 695,888	
IL-10 [pg/ml]	Średnia	1,060	4,928	<0,001	5,600	<0,001	4,824	<0,001	4,024	<0,001	4,903	<0,001
	SEM	0,000	0,542		0,604		0,589		0,466		0,394	
	Mediana	1,060	5,810		5,810		4,730		3,650		5,810	
	Q1; Q3	1,060; 1,060	3,650; 5,810		3,650; 7,6250		3,650; 5,810		1,060; 6,328		3,650; 5,810	
IL-12 (p40) [pg/ml]	Średnia	14,680	120,544	0,004	239,431	<0,001	86,404	0,020	14,680	-	109,021	0,002
	SEM	0,000	41,511		60,843		34,389		0,000		28,677	
	Mediana	14,680	14,680		14,680		14,680		14,680		14,680	
	Q1; Q3	14,680; 14,680	14,680; 14,680		14,680; 501,588		14,680; 14,680		14,680; 14,680		14,680; 101,388	
IL-12 (p70) [pg/ml]	Średnia	1,430	8,943	<0,001	13,244	<0,001	6,216	0,001	4,790	0,097	11,938	<0,001
	SEM	0,000	2,805		4,226		1,681		1,967		2,746	
	Mediana	1,430	1,430		1,430		1,430		1,430		1,430	
	Q1; Q3	1,430; 1,430	1,430; 13,280		1,430; 17,250		1,430; 9,853		1,430; 1,430		1,430; 16,335	

Tab. 10. Kontynuacja.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	$P_{\text{NENs vs Ctrl}}$	pNENs	$P_{\text{pNENs vs Ctrl}}$	GI-NENs	$P_{\text{GI-NENs vs Ctrl}}$	L-NENs	$P_{\text{L-NENs vs Ctrl}}$	o-NENs	$P_{\text{o-NENs vs Ctrl}}$
IL-13 [pg/ml]	Średnia	0,889	3,775	0,832	5,684	0,817	0,982	0,2	1,193	0,674	9,021	0,378
	SEM	0,283	2,599		4,096		0,662		0,349		3,347	
	Mediana	0,310	0,310		0,310		0,310		0,310		0,310	
	Q1; Q3	0,310; 0,310	0,310; 0,310		0,310; 0,310		0,310; 0,310		0,310; 0,310		0,310; 0,310	
IL-15 [pg/ml]	Średnia	12,420	101,486	<0,001	115,005	<0,001	98,009	<0,001	79,740	<0,001	106,596	<0,001
	SEM	0,000	11,381		19,159		5,791		7,362		8,318	
	Mediana	12,420	98,040		94,400		96,845		90,735		122,950	
	Q1; Q3	12,420; 12,420	76,918; 122,828		75,513; 135,325		83,705; 111,045		62,355; 108,208		79,748; 144,375	
IL-16 [pg/ml]	Średnia	46,065	142,684	<0,001	138,537	<0,001	137,757	<0,001	129,958	<0,001	168,400	<0,001
	SEM	3,278	10,309		6,917		5,950		8,376		19,119	
	Mediana	42,960	137,630		140,660		131,520		125,300		157,060	
	Q1; Q3	33,995; 54,785	112,730; 167,280		115,883; 165,555		113,130; 165,825		105,150; 151,105		109,490; 188,315	
IL-17A [pg/ml]	Średnia	2,440	61,754	<0,001	63,687	<0,001	50,179	<0,001	43,051	<0,001	97,718	<0,001
	SEM	0,000	10,735		9,7130		10,949		7,839		11,853	
	Mediana	2,440	45,020		65,400		34,630		39,825		105,060	
	Q1; Q3	2,440; 2,440	2,440; 85,390		2,440; 100,165		2,440; 64,138		2,440; 75,430		53,920; 143,860	

Tab. 10. Kontynuacja.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	$P_{\text{NENs vs Ctrl}}$	pNENs	$P_{\text{pNENs vs Ctrl}}$	GI-NENs	$P_{\text{GI-NENs vs Ctrl}}$	L-NENs	$P_{\text{L-NENs vs Ctrl}}$	o-NENs	$P_{\text{o-NENs vs Ctrl}}$
IL-18 [pg/ml]	Średnia	37,177	79,345	0,031	95,033	0,019	62,399	0,928	56,297	0,064	111,073	0,004
	SEM	3,838	14,289		15,041		15,054		6,482		14,562	
	Mediana	33,040	54,020		66,200		36,085		54,130		101,000	
	Q1; Q3	19,300; 46,660	23,450; 106,270		25,973; 147,408		0,660; 64,370		37,400; 69,585		41,190; 171,503	
IP-10 [pg/ml]	Średnia	505,567	491,863	0,163	511,727	0,553	429,777	0,169	745,253	0,555	406,439	0,208
	SEM	66,167	103,892		92,580		57,265		222,879		46,099	
	Mediana	404,620	342,245		342,245		315,085		372,695		316,550	
	Q1; Q3	315,975; 498,360	259,760; 489,630		256,700; 603,998		256,185; 472,150		285,425; 437,823		260,240; 489,630	
LIF [pg/ml]	Średnia	13,931	289,931	<0,001	303,332	<0,001	302,315	<0,001	215,728	<0,001	300,844	<0,001
	SEM	2,315	20,797		21,345		18,201		21,387		23,329	
	Mediana	3,860	299,310		321,290		299,310		230,150		332,060	
	Q1; Q3	3,806; 16,830	230,150; 345,485		276,840; 350,795		236,068; 337,445		172,625; 293,338		273,643; 369,168	
MCP-1 [pg/ml]	Średnia	35,973	135,349	<0,001	155,233	<0,001	126,162	<0,001	124,063	<0,001	135,993	<0,001
	SEM	3,654	9,869		12,585		7,132		9,595		10,624	
	Mediana	28,000	120,585		163,480		116,620		109,030		126,465	
	Q1; Q3	2,077; 42,300	98,090; 168,800		103,855; 192,360		100,465; 141,223		94,465; 159,253		98,090; 172,260	

Tab. 10. Kontynuacja.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	$P_{\text{NENs vs Ctrl}}$	pNENs	$P_{\text{pNENs vs Ctrl}}$	GI-NENs	$P_{\text{GI-NENs vs Ctrl}}$	L-NENs	$P_{\text{L-NENs vs Ctrl}}$	o-NENs	$P_{\text{o-NENs vs Ctrl}}$
MCP-3 [pg/ml]	Średnia	0,480	9,159	<0,001	8,591	<0,001	8,987	<0,001	8,169	<0,001	11,048	<0,001
	SEM	0,000	1,112		1,153		1,075		1,200		1,109	
	Mediana	0,4800	8,445		8,160		7,970		4,945		13,305	
	Q1; Q3	0,480; 0,480	4,178; 14,453		1,433; 13,405		5,255; 12,263		2,655; 15,575		6,203; 15,913	
M-CSF [pg/ml]	Średnia	5,488	26,649	<0,001	43,082	<0,001	20,643	<0,001	17,514	<0,001	23,673	<0,001
	SEM	0,547	6,974		13,013		1,972		1,617		2,385	
	Mediana	5,490	20,400		26,860		18,640		16,855		28,125	
	Q1; Q3	3,510; 6,670	12,778; 30,860		15,030; 37,670		11,853; 27,918		8,373; 24,298		11,158; 36,655	
MIF [pg/ml]	Średnia	551,077	4393,315	<0,001	3021,977	<0,001	2749,025	<0,001	5719,388	<0,001	8778,466	<0,001
	SEM	89,691	1153,163		453,538		423,452		1362,801		2105,608	
	Mediana	386,500	2184,485		1933,495		1998,285		2249,665		3988,935	
	Q1; Q3	283,140; 652,035	1205,510; 4484,038		1383,488; 4239,573		1000,705; 3338,740		1323,430 ; 4948,253		2560,720; 1089,443	
MIG [pg/ml]	Średnia	155,589	368,074	<0,001	348,199	<0,001	329,548	<0,001	583,975	0,001	315,344	0,002
	SEM	24,873	58,754		31,239		41,401		121,192		43,934	
	Mediana	107,630	289,300		300,335		294,680		299,945		241,335	
	Q1; Q3	77,960; 182,010	181,283; 435,408		219,783; 424,935		172,31; 346,778		224,233; 573,963		148,498; 340,143	

Tab. 10. Kontynuacja.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	$P_{\text{NENs vs Ctrl}}$	pNENs	$P_{\text{pNENs vs Ctrl}}$	GI-NENs	$P_{\text{GI-NENs vs Ctrl}}$	L-NENs	$P_{\text{L-NENs vs Ctrl}}$	o-NENs	$P_{\text{o-NENs vs Ctrl}}$
MIP-1 α [pg/ml]	Średnia	1,661	4,449	<0,001	5,178	<0,001	3,699	0,167	4,526	0,003	4,980	0,006
	SEM	0,155	0,613		0,629		0,598		0,605		0,634	
	Mediana	1,450	4,500		5,070		4,500		4,185		5,640	
	Q1; Q3	1,280; 1,900	0,120; 6,660		2,933; 7,013		0,120; 5,640		2,465; 5,270		1,455; 7,105	
MIP-1 β [pg/ml]	Średnia	412,563	397,224	0,044	416,419	<0,001	381,010	0,002	391,675	0,05	409,449	0,889
	SEM	4,009	14,943		17,282		15,747		5,244		14,630	
	Mediana	416,030	399,495		404,480		371,135		401,880		419,905	
	Q1; Q3	400,110; 427,305	334,810; 428,508		339,468; 461,943		314,613; 417,730		372,998; 412,615		359,648; 452,280	
β -NGF [pg/ml]	Średnia	1,899	56,871	<0,001	67,774	<0,001	51,626	<0,001	46,278	<0,001	60,971	<0,001
	SEM	0,659	7,775		13,247		3,966		4,672		5,324	
	Mediana	0,470	51,175		54,085		48,915		48,595		70,595	
	Q1; Q3	0,470; 0,470	33,278; 75,460		31,830; 79,353		36,658; 60,553		27,363; 63,148		43,595; 81,948	
PDGF-BB [pg/ml]	Średnia	3439,245	2004,191	<0,001	2043,183	<0,001	1742,355	<0,001	2190,393	<0,001	2367,329	0,011
	SEM	263,637	159,215		137,755		145,219		111,933		220,913	
	Mediana	2942,130	1815,200		2039,345		1626,230		2145,465		1980,380	
	Q1; Q3	2208,445; 4427,820	1436,980; 2339,930		1507,975; 2375,278		1259,250; 1897,810		1614,393; 2669,803		1720,720; 2740,890	

Tab. 10. Kontynuacja.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	$P_{\text{NENs vs Ctrl}}$	pNENs	$P_{\text{pNENs vs Ctrl}}$	GI-NENs	$P_{\text{GI-NENs vs Ctrl}}$	L-NENs	$P_{\text{L-NENs vs Ctrl}}$	o-NENs	$P_{\text{o-NENs vs Ctrl}}$
RANTES [ng/ml]	Średnia	12,113	19,621	<0,001	19,569	<0,001	19,725	<0,001	20,948	<0,001	18,476	0,001
	SEM	0,881	1,092		1,266		949,513		1,005		1,247	
	Mediana	10,763	19,886		22,108		19,189		20,859		17,088	
	Q1; Q3	9,172; 12,808	15,373; 26,467		14,238; 26,467		16,155; 25,784		17,088; 26,467		14,191; 26,467	
SCF [pg/ml]	Średnia	62,223	221,129	<0,001	227,069	<0,001	216,744	<0,001	211,583	<0,001	229,439	<0,001
	SEM	3,133	16,227		12,801		17,940		17,124		17,250	
	Mediana	59,320	205,960		232,190		193,220		205,960		219,595	
	Q1; Q3	49,770; 73,340	154,495; 272,450		188,295; 292,340		152,485; 217,658		153,403; 262,918		151,480; 296,950	
SCGF-β [ng/ml]	Średnia	37,312	92,457	<0,001	105,015	<0,001	78,456	<0,001	77,094	<0,001	116,467	<0,001
	SEM	1,231	9,354		10,486		5,691		3,418		14,426	
	Mediana	38,600	79,978		84,858		69,744		78,039		110,991	
	Q1; Q3	32,965; 42,116	54,132; 112,019		55,818; 130,998		53,077; 99,785		65,879; 86,003		53,588; 122,323	
SDF-1α+β [ng/ml]	Średnia	1,588	1,529	<0,001	1,535	0,516	1,487	0,196	1,579	0,705	1,569	0,847
	SEM	0,051	0,053		0,048		0,056		0,058		0,052	
	Mediana	1,491	1,465		1,436		1,454		1,455		1,643	
	Q1; Q3	1,383; 1,860	1,301; 1,715		1,299; 1,722		1,247; 1,571		1,343; 1,760		1,369; 1,738	

Tab. 10. Kontynuacja.

Parametr		Rodzaj grupy										
		Ctrl	NENs	$P_{\text{NENs vs Ctrl}}$	pNENs	$P_{\text{pNENs vs Ctrl}}$	GI-NENs	$P_{\text{GI-NENs vs Ctrl}}$	L-NENs	$P_{\text{L-NENs vs Ctrl}}$	o-NENs	$P_{\text{o-NENs vs Ctrl}}$
TNF- α [pg/ml]	Średnia	48,158	173,847	<0,001	182,839	<0,001	174,802	<0,001	165,696	<0,001	165,569	<0,001
	SEM	2,320	13,893		12,409		13,317		20,021		12,699	
	Mediana	45,940	163,640		182,315		152,650		147,080		169,045	
	Q1; Q3	42,180; 50,255	140,030; 205,900		141,450; 243,555		141,450; 185,08		85,588; 216,110		122,730; 205,900	
TNF- β [pg/ml]	Średnia	1201,914	723,991	<0,001	750,210	<0,001	669,421	<0,001	779,793	<0,001	762,051	<0,001
	SEM	11,812	36,829		37,893		31,593		42,249		40,658	
	Mediana	1198,140	685,300		701,100		672,540		671,515		734,695	
	Q1; Q3	1177,025; 1252,715	567,848; 825,223		585,623; 875,013		544,333; 733,680		643,128; 846,990		612,058; 864,148	
TRAIL [pg/ml]	Średnia	20,015	30,308	<0,001	38,692	0,002	23,540	0,423	33,090	0,001	31,074	0,018
	SEM	0,979	3,599		4,208		3,534		2,779		2,763	
	Mediana	18,840	31,660		39,650		24,250		28,540		33,195	
	Q1; Q3	17,225; 23,045	17,450; 42,550		23,658; 46,565		1,780; 38,915		24,665; 36,120		21,853; 43,260	
VEGF [pg/ml]	Średnia	24,597	1181,978	<0,001	1418,872	<0,001	1098,865	<0,001	842,130	<0,001	1287,751	<0,001
	SEM	6,587	204,587		326,194		135,675		145,091		144,655	
	Mediana	18,010	1029,025		956,305		976,230		889,135		1163,430	
	Q1; Q3	18,010; 18,010	550,305; 1629,028		564,498; 1687,435		565,918; 1475,593		18,010; 1302,310		972,533; 1833,853	

Kolor czerwony czcionki – wynik istotnie statystyczny;

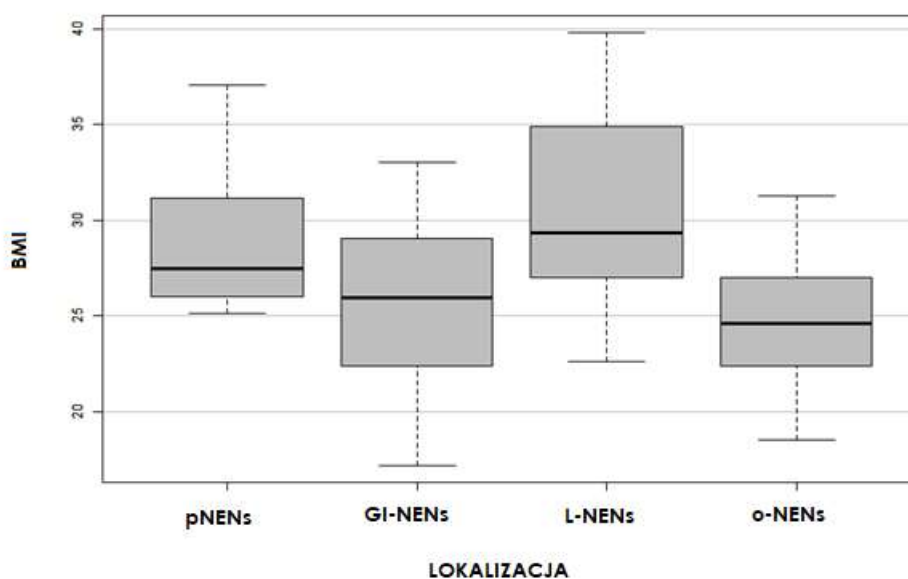
Wynik pogrubiony - wskazanie, czy do analizy brano pod uwagę średnią lub medianę.

bFGF - podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów, CTACK - skórna chemokina przyciągająca limfocyty T, G-CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów, GM-CSF - czynnik stymulujący tworzenie granulocytów i makrofagów, GRO- α - onkogen regulowany wzrostem, HGF - czynnik wzrostu hepatocytów, IFN - interferon), IL- interleukina, IP-10 - indukowane interferonem γ białko 10kDa, LIF - czynnik hamujący białaczkę, MCP - białko chemotaktyczne monocytów, M-CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów, MIG – monokina indukowana przez interferon γ , MIP - makrofagowe białko zapalne, β -NGF - czynnik wzrostu nerwów, PDGF-BB - płytkopochodny czynnik wzrostu BB), RANTES - regulowana aktywacja, prawidłowa ekspresja i sekrecja komórek T, SCF - czynnik komórek macierzystych, SCGF- β - czynnik wzrostu komórek macierzystych, SDF - czynnik pochodzący z komórek zrębu, TRAIL - ligand indukujący apoptozę związany z TNF, TNF – czynnik martwicy nowotworu, VEGF - czynnik wzrostu śródbłonna naczyńowego

6. Analiza ANOVA

W teście ANOVA odnotowano 3 parametry istotne statystycznie, które zostały potwierdzone testem post-hoc. Wśród nich wyróżnia się BMI, GPx oraz grelinę.

W przypadku BMI odnotowano niższe istotne statystycznie wartości w grupie pacjentów z o-NENs w porównaniu z grupą pacjentów z pNENs oraz L-NENs, co przedstawia Rycina 5.



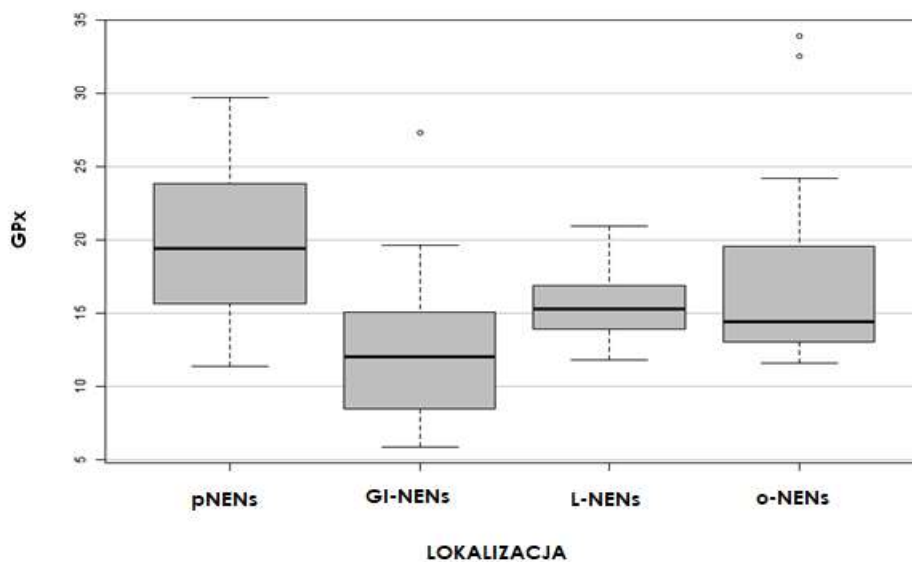
Porównanie	p-wartość	Decyzja
GI-NENs vs pNENs	0.15396	---
L-NENs vs pNENs	1.00000	---
L-NENs vs GI-NENs	0.06331	---
o-NENs vs pNENs	0.00316	***
o-NENs vs GI-NENs	1.00000	---
GI-NENs vs L-NENs	0.00976	***

***różnica między medianami $p < 0,05$

--- brak różnicy między medianami

Ryc. 5. Wykres skrzynkowy dla BMI u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (NENs) o różnych lokalizacjach oraz wyniki testu post-hoc U Manna-Whitneya.

Wartości GPx różnią się istotnie statystycznie między grupą pacjentów z GI-NENs w porównaniu z grupami pacjentów z pNENs, L-NENs oraz o-NENs. Przedstawienie wyników pokazuje Rycina 6.



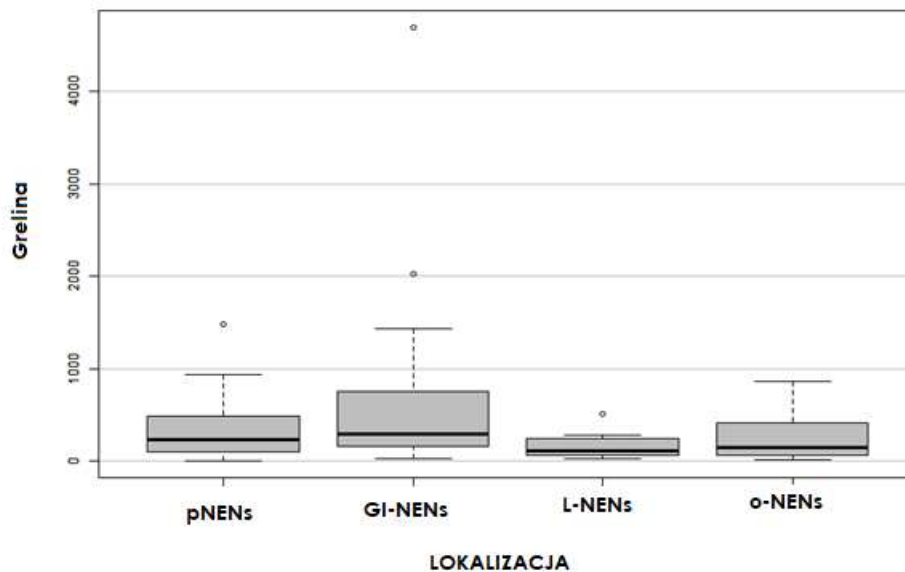
Porównanie	p-wartość	Decyzja
GI-NENs vs pNENs	0.00004	***
L-NENs vs pNENs	0.31673	---
L-NENs vs GI-NENs	0.04584	***
o-NENs vs pNENs	0.47699	---
o-NENs vs GI-NENs	0.00544	***
GI-NENs vs L-NENs	1.00000	---

***różnica między medianami $p < 0,05$

--- brak różnicy między medianami

Ryc. 6. Wykres skrzynkowy dla GPx u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (NENs) o różnych lokalizacjach oraz test post-hoc U Manna-Whitneya.

Stężenie greliny wykazywało różnicę istotną statystycznie w przypadku porównania grupy pacjentów z L-NENs z grupą pacjentów z GI-NENs, co pokazuje Rycina 7.



Porównanie	p-wartość	Decyzja
GI-NENs vs pNENs	1.00000	---
L-NENs vs pNENs	0.70809	---
L-NENs vs GI-NENs	0.04988	***
o-NENs vs pNENs	1.00000	---
o-NENs vs GI-NENs	0.45119	---
GI-NENs vs L-NENs	1.00000	---

***różnica między medianami $p < 0,05$

--- brak różnicy między medianami

Ryc. 7. Wykres skrzynkowy dla greliny u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (NENs) o różnych lokalizacjach oraz test post-hoc U Manna-Whitneya.

Niektóre zmienne były istotne statystycznie w pierwszym etapie analizy, jednak test post-hoc nie wskazał grup, które wykazują poziom istotności $p < 0,05$. Oznacza to, iż różnice w populacji występują, ale na podstawie badanej próbki nie można przewidzieć, w której z grup ta różnica występuje. Aby sprawdzić jakie są konkretne zmiany pomiędzy grupami różniącymi się lokalizacją guza należałoby przeprowadzić badania na większej liczbie pacjentów lub powtórzyć badanie bardziej precyzyjnym testem. Dotyczyło to zmiennych: masa ciała, PAI-1, IL-7, IL-12(p40) oraz PDGF-BB. Dla zmiennych o rozkładzie parametrycznym: wzrost, SOD, CAT, omentyna-1, CgA, CTACK, GRO- α nie stwierdzono różnic pomiędzy średnimi. Dla zmiennych o rozkładzie nieparametrycznym: wiek, MDA w osoczu i krwinkach czerwonych, melatoniny, C-peptydu, GIP, GLP-1, glukagonu, insuliny, leptyny, rezystyny, wisfatyny, eotaksyny, bFGF, G-CSF, GM-CSF, HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IFN-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-2R α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, IP-10, LIF, MCP-1, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , β -NGF, RANTES, SCF, SCGF- β , SDF-1 α + β , TNF- α , TNF- β , TRAIL, VEGF nie stwierdzono różnic pomiędzy medianami.

7. Korelacje

Przeprowadzono analizę korelacji między CgA, jako podstawowym markerem NENS a wybranymi parametrami oznaczanymi w niniejszej pracy. Parametry, takie jak aktywność GPx, a także stężenie GLP-1, glukagonu, leptyny, wisfatyny, GM-CSF, GRO- α , HGF, IFN- γ , IL-1 α , IL-2R α , IL-5, IL-9, IP-10, M-CSF, MIP-1 β , SCGF- β , TNF- β korelowały dodatnio ze stężeniem CgA, natomiast stężenie omentyny-1 korelowało z tą zmienną w sposób ujemny (Tabela 11).

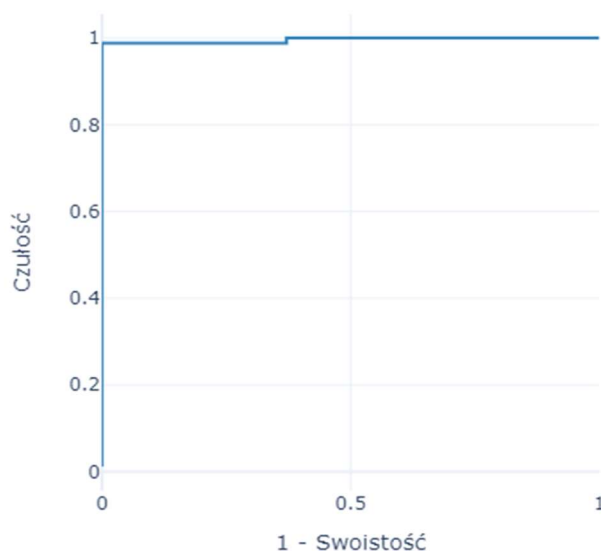
Tab. 11. Korelacje badanych zmiennych z chromograniną A

Parametr	Chromogranina A	
	Korelacja	<i>p</i>
GPx	0.244	0.024
Omentyna-1	- 0.246	0.027
GLP-1	0.24	0.028
Glukagon	0.26	0.017
Leptyna	0.335	0.002
Wisfatyna	0.224	0.041
GM-CSF	0.246	0.024
GRO- α	0.259	0.017
HGF	0.243	0.026
IFN- γ	0.234	0.032
IL-1 α	0.237	0.03
IL-2R α	0.26	0.017
IL-5	0.238	0.029
IL-9	0.274	0.012
IP-10	0.274	0.012
M-CSF	0.278	0.011
MIP-1 β	0.283	0.009
SCGF- β	0.302	0.005
TNF- β	0.253	0.02

8. Analiza krzywych ROC

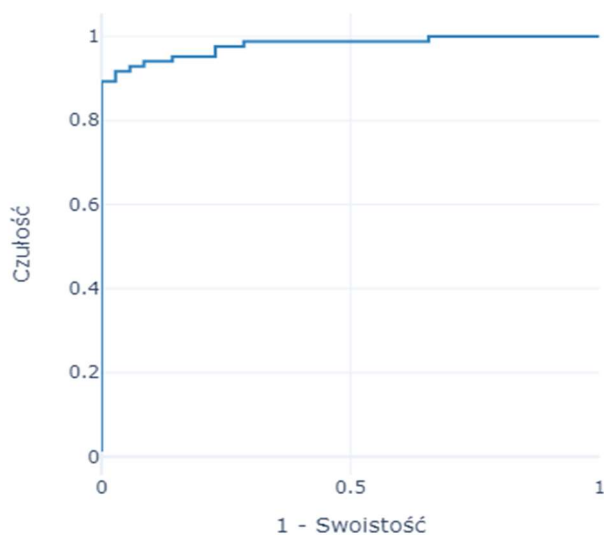
Dla parametrów wykazujących znamienne statystycznie różnice wykonano wykreślenie krzywych ROC, aby zlokalizować potencjalnie najbardziej czułe i swoiste markery NENs. Krzywe te przedstawiono dla parametrów, dla których pole pod krzywą (AUC, ang. *area under curve*) wynosiło $>0,9$ i $p < 0,05$ czyli dla: melatoniny, SCF, G-CSF, β -NGF, IL-16, MCP-1, IL-2R α , TNF- α , MIF, IL-1 α , GIP, IL-4, LIF, TNF- β , IL-1ra, IL-1 β , IL-15, IL-7, IL-8, IL-6, GRO- α , M-CSF, CTACK, SCGF- β , IFN- α 2. Dla wyżej wymienionych zmiennych w tabelach przedstawiono również wartości AUC, przedział ufności, wartość p , a także wyznaczony punkt odcięcia. Analiza wykazała, że stężenie melatoniny oraz TNF- β to markery negatywne, co oznacza, że ich niższe wartości pozwalają na klasyfikację pacjenta jako chorego. W pozostałych opisywanych przypadkach to wyższe wartości predysponują do wykrycia choroby.

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
Melatonina	0,9608	0,9210	1,0006	<0,0001	<31,3620	0,9880	0,0000



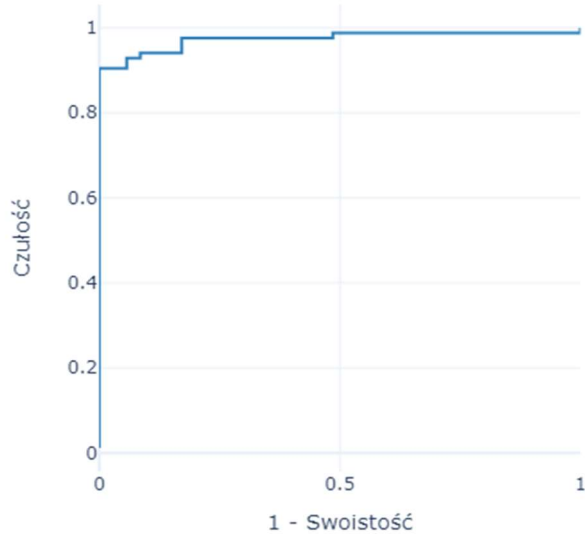
Ryc. 8. Krzywa ROC dla melatoniny.

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
SCF	0,9575	0,9207	0,9942	<0,0001	>127,1400	0,8929	0,0000



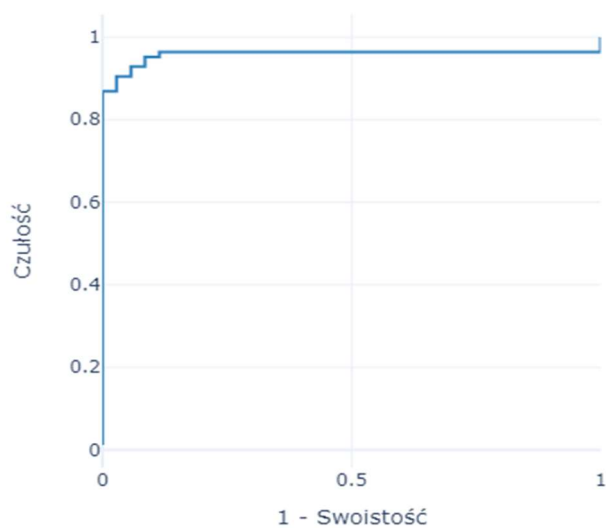
Ryc. 9. Krzywa ROC dla SCF (czynnik komórek macierzystych).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
G-CSF	0,9537	0,9142	0,9931	<0,0001	>161,5700	0,9048	0,0000



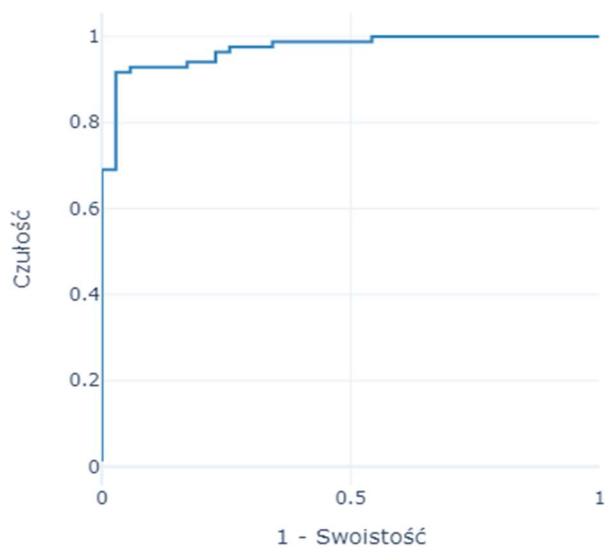
Ryc. 10. Krzywa ROC dla G-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów)

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
β -NGF	0,9513	0,9121	0,9906	<0,0001	>13,5500	0,9048	0,0286



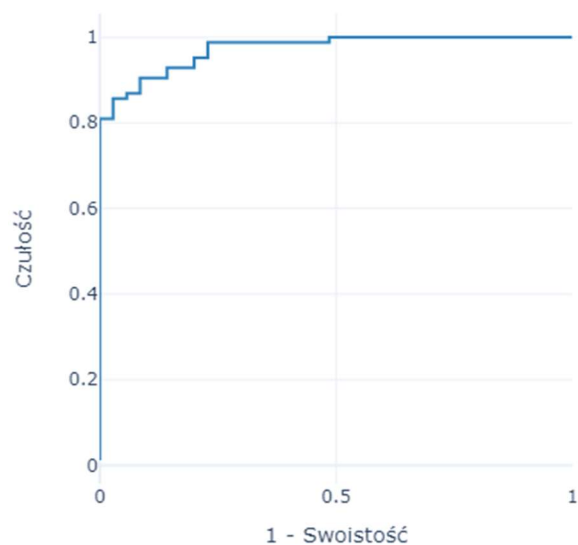
Ryc. 11. Krzywa ROC dla β -NGF (czynnik wzrostu nerwów β).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
IL-16	0,9505	0,9110	0,9899	<0,0001	>82,2400	0,9167	0,0286



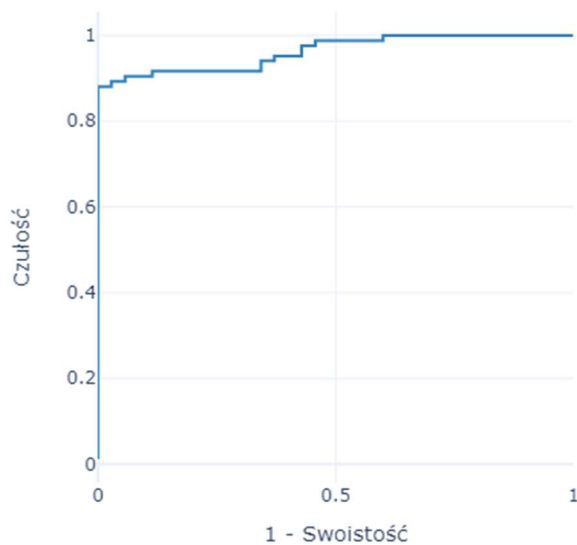
Ryc. 12. Krzywa ROC dla IL-16 (interleukina 16).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
MCP-1	0,9505	0,9123	0,9887	<0,0001	>82,7700	0,8571	0,0286



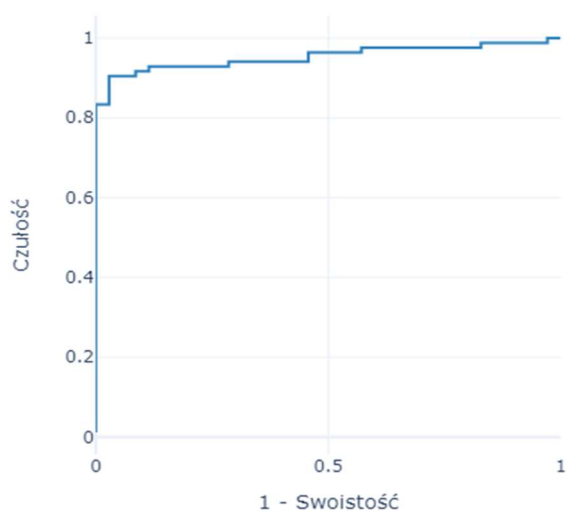
Ryc. 13. Krzywa ROC dla MCP-1 (białko chemotaktyczne monocytów 1).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
IL-2R α	0,9405	0,8988	0,9823	<0,0001	>106,8600	0,8810	0,0000



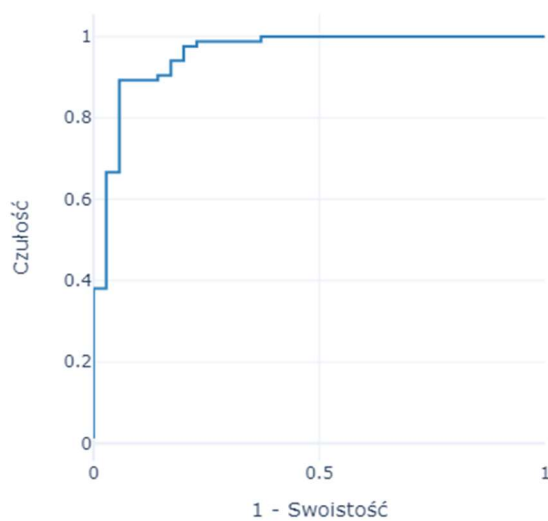
Ryc. 14. Krzywa ROC dla IL-2R α (podjednostka α receptora dla interleukiny 2).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
TNF- α	0,9347	0,8888	0,9806	<0,0001	>81,1500	0,9048	0,0286



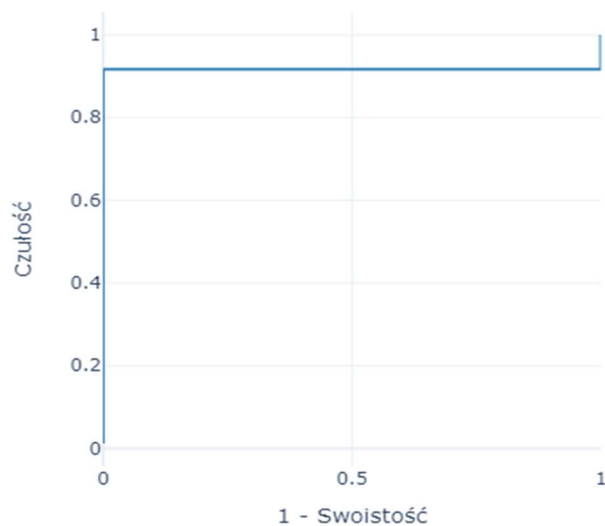
Ryc. 15. Krzywa ROC dla TNF- α (czynnik martwicy nowotworu α).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
MIF	0,9346	0,8837	0,9854	<0,0001	>908,2800	0,8929	0,0571



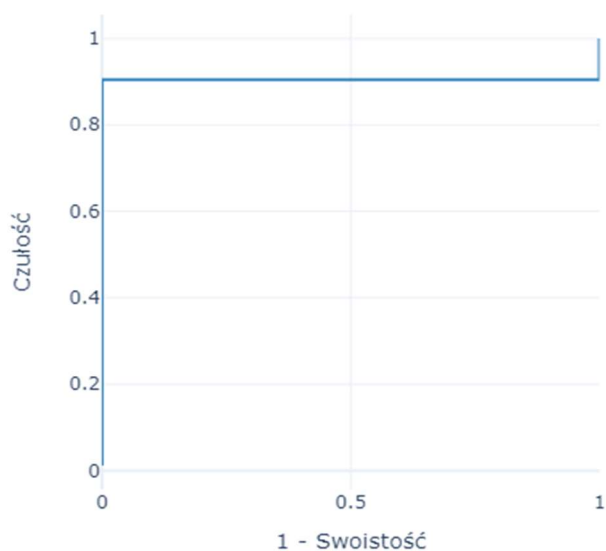
Ryc. 16. Krzywa ROC dla MIF (czynnik hamujący migrację makrofagów).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
IL-1 α	0,9337	0,8902	0,9772	<0,0001	>56,5100	0,9167	0,0000



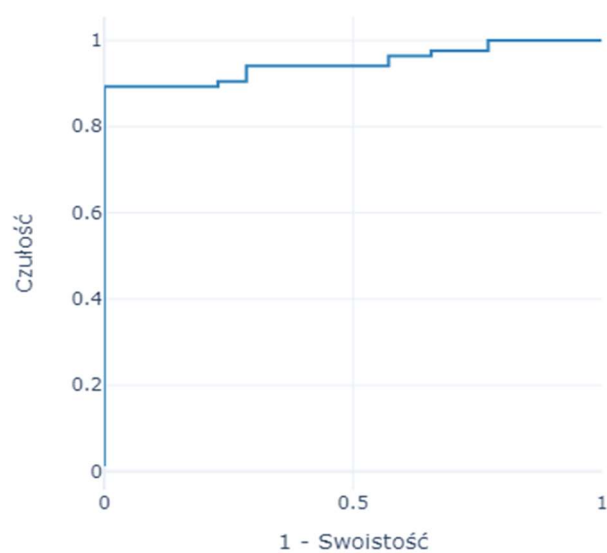
Ryc. 17. Krzywa ROC dla IL-1 α (interleukina 1 α).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
GIP	0,9302	0,8868	0,9736	<0,0001	>7,6000	0,9048	0,0000



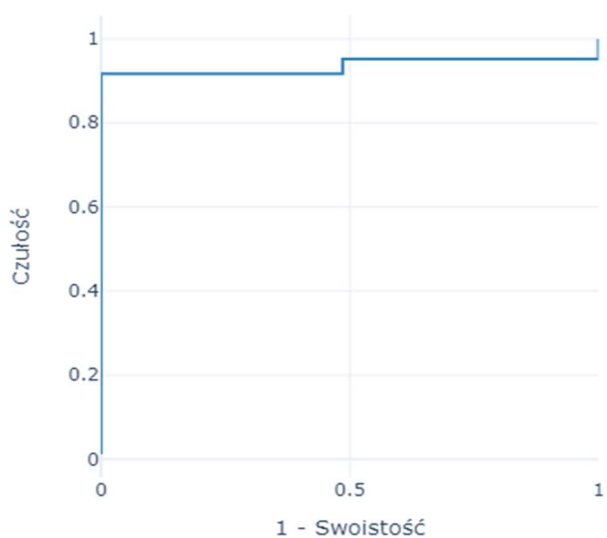
Ryc. 18. Krzywa ROC dla GIP (glukozozależny peptyd insulinotropowy).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
IL-4	0,9299	0,8838	0,9760	<0,0001	>8,2800	0,8929	0,0000



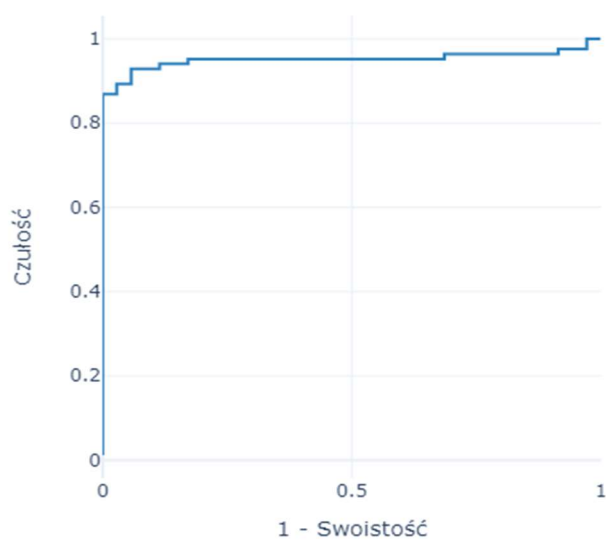
Ryc. 19. Krzywa ROC dla IL-4 (interleukina 4).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
LIF	0,9297	0,8822	0,9773	<0,0001	>73,3100	0,9167	0,0000



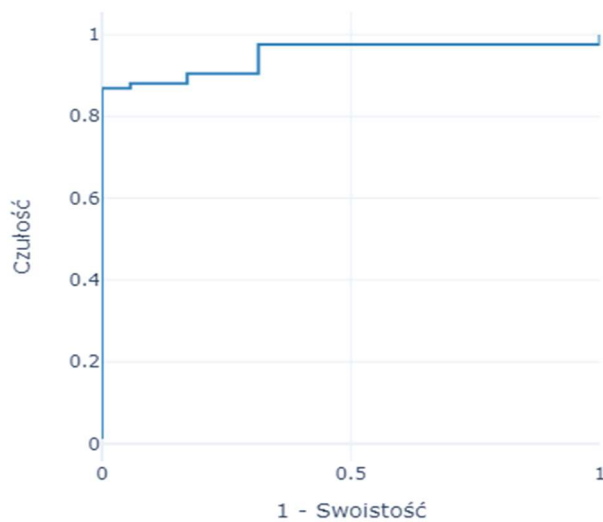
Ryc. 20. Krzywa ROC dla LIF (czynnik hamujący białaczkę).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
TNF-β	0,9296	0,8787	0,9804	<0,0001	<1092,13	0,9286	0,0571



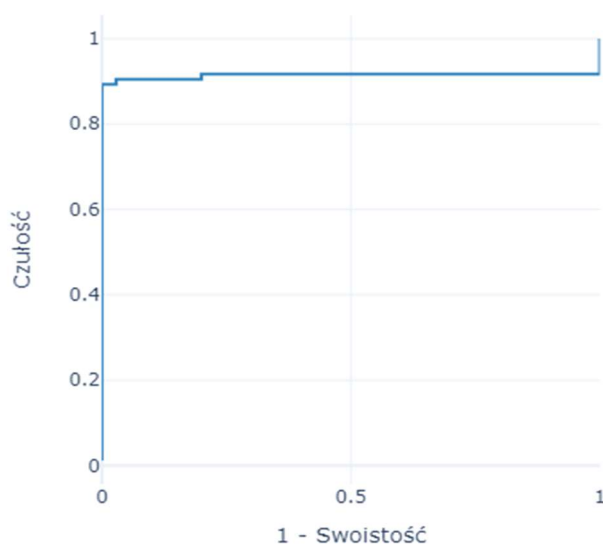
Ryc. 21. Krzywa ROC dla TNF-β (czynnik martwicy nowotworu β).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
IL-1ra	0,9289	0,8807	0,9771	<0,0001	>387,1600	0,8690	0,0000



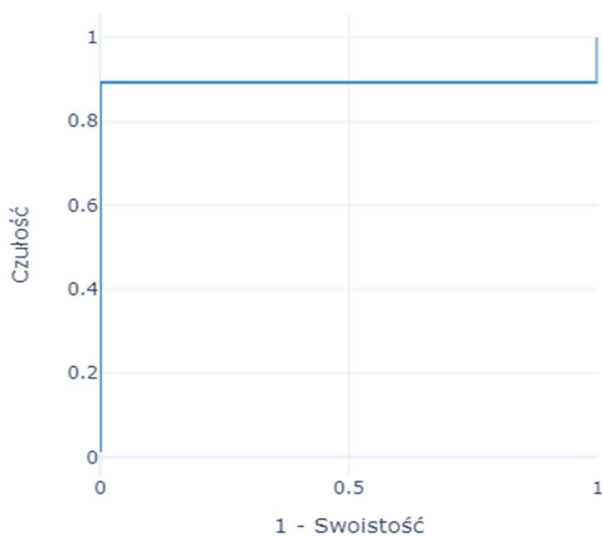
Ryc. 22. Krzywa ROC dla IL-1ra (antagonista receptora interleukiny 1).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
IL-1β	0,9261	0,8793	0,9728	<0,0001	>1,8000	0,8929	0,0000



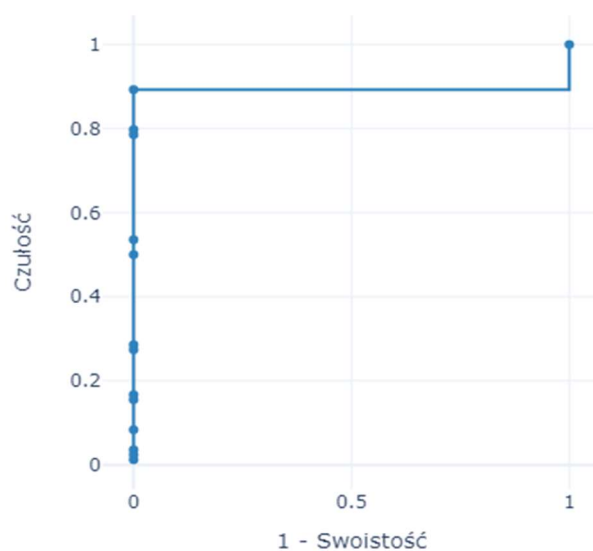
Ryc. 23. Krzywa ROC dla IL-1β (interleukina 1β).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
IL-15	0,9244	0,8800	0,9689	<0,0001	>40,4800	0,8929	0,0000



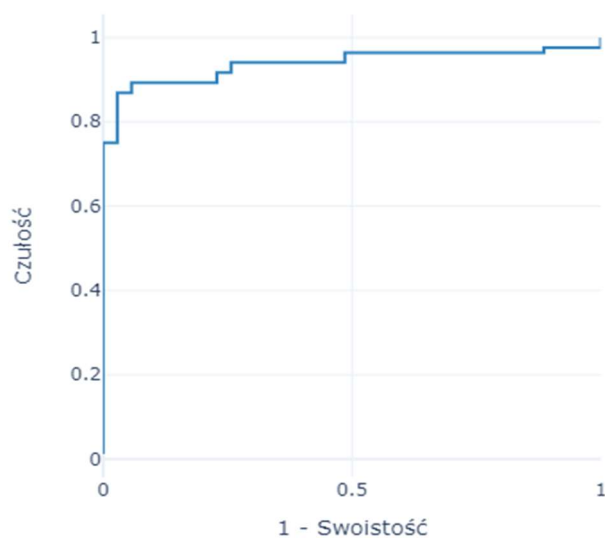
Ryc. 24. Krzywa ROC dla IL-15 (interleukina 15).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
IL-7	0,9244	0,8800	0,9689	<0,0001	>10,9800	0,8929	0,0000



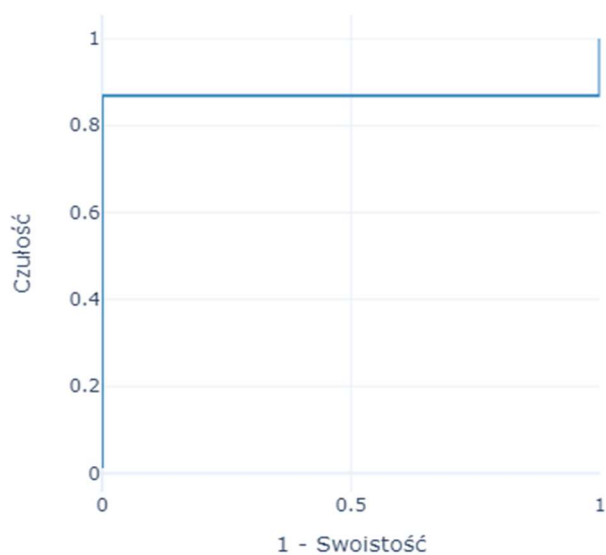
Ryc. 25. Krzywa ROC dla IL-7 (interleukina 7).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
IL-8	0,9179	0,8660	0,9698	<0,0001	>17,5800	0,8690	0,0286



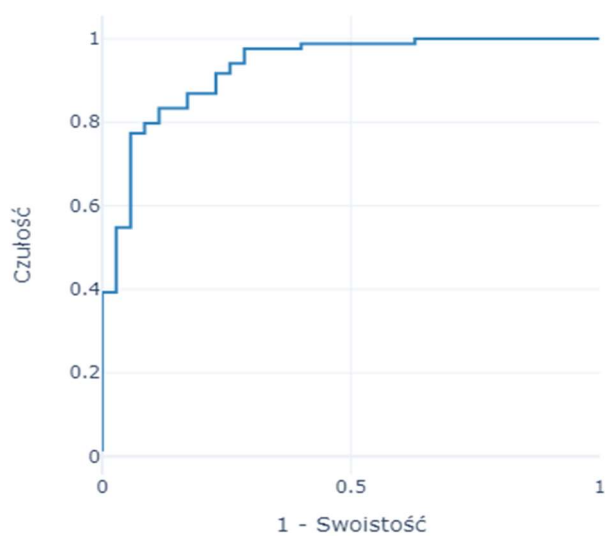
Ryc. 26. Krzywa ROC dla IL-8 (interleukina 8).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
IL-6	0,9128	0,8664	0,9592	<0,0001	>6,8200	0,8690	0,0000



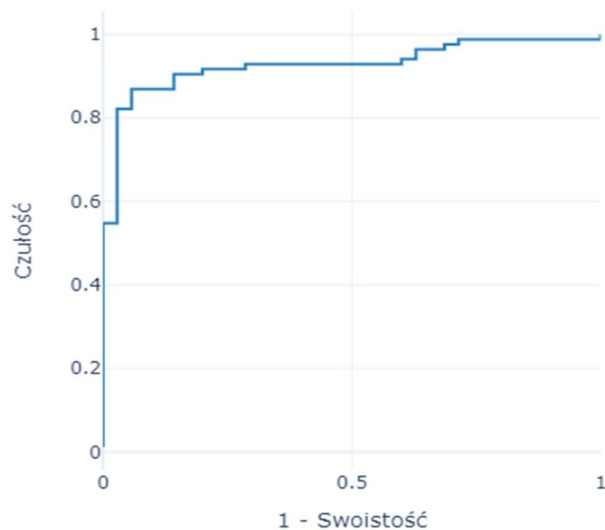
Ryc. 27. Krzywa ROC dla IL-6 (interleukina 6).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
GRO- α	0,9098	0,8529	0,9667	<0,0001	>974,5000	0,8333	0,1143



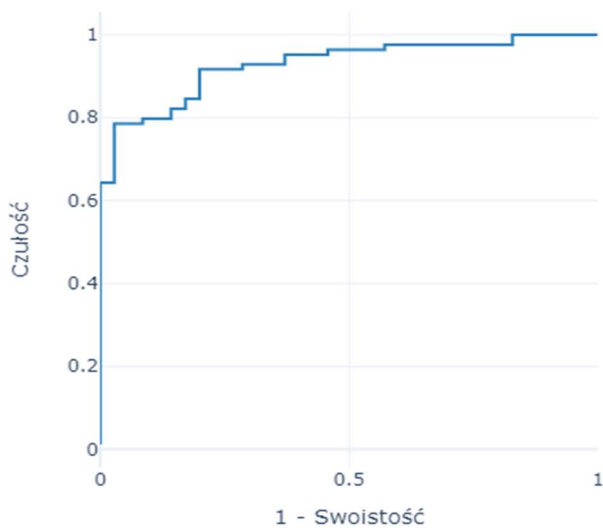
Ryc. 28. Krzywa ROC dla GRO- α (onkogen regulowany wzrostem).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
M-CSF	0,9090	0,8546	0,9633	<0,0001	>8,5500	0,8690	0,0571



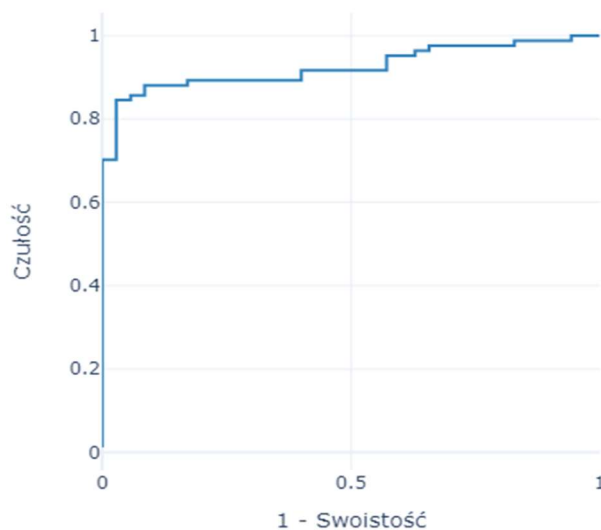
Ryc. 29. Krzywa ROC dla M-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
CTACK	0,9073	0,8548	0,9598	<0,0001	>1369,8500	0,7857	0,0286



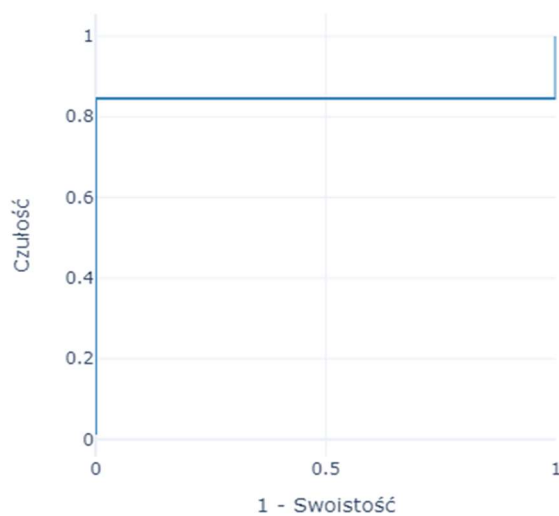
Ryc. 30. Krzywa ROC dla CTACK (skórna chemokina przyciągająca limfocyty T).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
SCGF-β	0,9035	0,8490	0,9580	<0,0001	>48890,9000	0,8452	0,0286



Ryc. 31. Krzywa ROC dla SCGF-β (czynnik wzrostu komórek macierzystych).

Parametr	AUC	AUC↓	AUC↑	p	Punkt odcięcia	Czułość	Swoistość
IFN-α2	0,9012	0,8530	0,9493	<0,0001	>12,3800	0,8452	0,0000

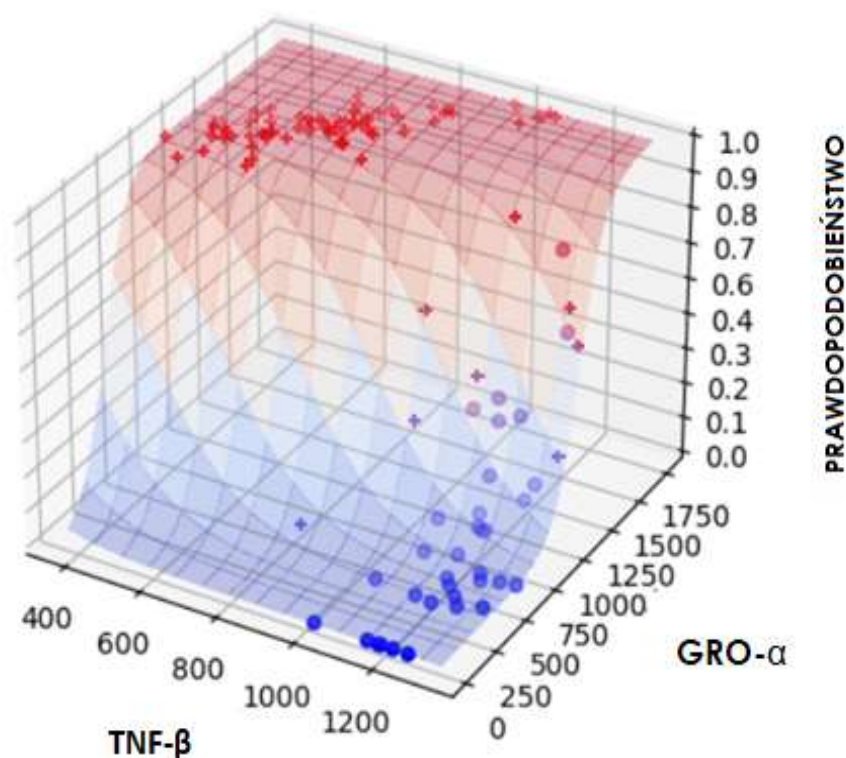


Ryc. 32. Krzywa ROC dla IFN-α2 (interferon α2).

Pozostałe parametry wykazujące zmiany istotne statystycznie w analizie krzywych ROC, dla których AUC wynosiło $<0,9$ to: HGF, IFN- γ , GM-CSF, rezystyna, VEGF, MCP-3, wisfatyna, SOD, IL-5, IL-10, waga, BMI, IL-17A, RANTES, MIG, MDA w osoczu, PDGF-BB, eotaksyna, CgA, insulina, IL-2, MIP-1 α , glukagon, TRAIL, bFGF, omentyna-1, wzrost, PAI-1, wiek, C-peptyd, IL-12(p70), MDA w krwinkach czerwonych, IL-18, IL-3, IL-12(p40). Brak zmian istotnych statystycznie występował w przypadku zmiennych: MIP-1 β , IL-9, GLP-1, IP-10, SDF-1 α + β , CAT, GPx, IL-13, grelina, leptyna.

9. Wzór logiczny modelu regresji

Do analizy regresji logistycznej zostało wybranych 7 parametrów, które jednocześnie wykazywały zmiany istotne statystycznie w przypadku analizy krzywych ROC oraz korelowały z CgA. Były to zmienne: IL-2R α , IL-1 α , TNF- β , GRO- α , HGF, IL-5, melatonina. Model regresji logistycznej z metodą eliminacji cech pozwolił na wskazanie grupy parametrów, których zmiany pozwalają w największym stopniu rozróżnić pacjentów w grupach. Dla obserwacji wygenerowano trójwymiarowy wykres zależności zmiennych TNF- β i GRO- α od uzyskiwanego prawdopodobieństwa zaklasyfikowania pacjenta jako chorego, co przedstawiono na Rycinie 33. Dodatkowo wyznaczono przybliżony kształt hiperpłaszczyzny wyznaczającej parametry modelu. Dokładność modelu wyniosła 94,55%.



Ryc. 33. Trójwymiarowy wykres zależności zmiennych TNF- β (czynnik martwicy nowotworu β) i GRO- α (onkogen regulowany wzrostem). Kształt + oznacza wynik pacjenta chorego, natomiast o oznacza wynik pacjenta zdrowego.

Wzór uzyskanego modelu regresji ma postać:

$$p_t = \frac{1}{1 + \exp(-(-0,009171X_t + 0,01051Y_t))}$$

gdzie:

p_t - prawdopodobieństwo wskazania u pacjenta choroby

X_t - wartość pomiaru parametru TNF- β

Y_t - wartość pomiaru parametru GRO- α

V. Dyskusja

Nowotwory neuroendokryne to wyjątkowa grupa nowotworów złośliwych, które mimo zwiększającej się świadomości lekarzy oraz większego dostępu do przesiewowych metod endoskopowych oraz obrazowych wciąż sprawiają trudności diagnostyczne. Niska częstość występowania (ok. 2% nowotworów złośliwych), heterogenność guza oraz niespecyficzny obraz kliniczny często utrudniają rozpoznanie [10]. Badania międzynarodowe Simron Singh i wsp. [475] z 2016 roku wskazały średnie opóźnienie diagnozy od wystąpienia objawów o 52 miesiące. NENs wzbudzają jednak coraz większe zainteresowanie i intensywnie poszukuje się markerów wspierających diagnostykę oraz ocenę skuteczności leczenia.

TME, które powstaje w otoczeniu guza jest złożonym i ciągle ewoluującym układem, ze względu na fakt, że komórki nowotworowe wykazują silnie stymulującą aktywność wpływającą na zmiany molekularne, komórkowe i fizyczne w otaczających tkankach [476]. Chroniczny stan zapalny, predysponujący do nowotworzenia związany jest z różnymi etapami powstawania nowotworów, w tym z transformacją komórkową, promocją, przeżyciem, proliferacją, inwazją, angiogenezą i przerzutami [208]. Stan zapalny kształtuje TME wpływając na plastyczność komórek poprzez przejście nabłonkowo-mezenchymalne, zmiany cech fenotypowych komórek, polaryzację komórek odpornościowych, ROS, cytokiny, mechanizmy epigenetyczne, miRNA i złożone kaskady regulacyjne w komórkach nowotworowych i zrębowych [477]. Ciekawy jest fakt, iż komórki zapalne związane z rakiem, które mogą promować rozwój nowotworu, charakteryzują się również stabilnością genetyczną i jednocześnie wolniej nabywają lekooporność, co może stanowić rodzaj strategii terapeutycznej raka, ukierunkowanej na stan zapalny [208]. Rudolf Virchow jako pierwszy zasugerował związek zapalenia z promocją nowotworu, jednak to dwaj inni lekarze, Wilhelm Busch oraz William Coley dali początek immunoterapii [478]. Również adipocyty, które fizjologicznie odpowiedzialne są za magazynowanie nadmiaru energii, mogą oddziaływać na TME poprzez wydzielanie adipokin, enzymów, hormonów, czynników wzrostu i cytokin, wspierając progresję nowotworu [476]. Dotyczy to głównie guzów z wysoką zawartością tkanki tłuszczowej, a otyłość, w której występuje zwiększona aktywność endokrynną, stanowi jeden z czynników ryzyka nowotworów, np. piersi, trzustki, czy jajnika [476]. Wiele adipokin

odpowiada za gospodarkę węglowodanowo-lipidową i mogą one przyczyniać się do inicjacji i progresji różnych typów nowotworów poprzez stymulację metabolicznego przeprogramowania komórek [479,480]. W wielu badaniach potwierdzono również udział ROS w rozwoju otyłości, powikłań z nią związanych oraz w nowotworzeniu, poprzez inicjowanie uszkodzeń DNA i niestabilności genetycznej, aktywowanie sygnalizacji pronowotworowych, a także zwiększanie przeżycia i proliferacji komórek [481]. Co ważne, w stanie zapalnym mastocyty i leukocyty są rekrutowane do miejsca uszkodzenia, co prowadzi do „wybuchu tlenowego” na skutek zwiększonego poboru tlenu, a co za tym idzie zwiększonego uwalniania i gromadzenia ROS w miejscu uszkodzenia [312]. Po wystąpieniu bodźca zapalnego inicjacja karcynogenezy przez ROS może odbywać się bezpośrednio przez utlenianie lub nitrowanie jądrowego DNA, RNA, czy lipidów lub pośrednio poprzez szlaki sygnalizacyjne aktywowane przez ROS [312]. Stan zapalny wpływa na nadzór immunologiczny i odpowiedź na zastosowaną terapię, dlatego odpowiednia modulacja odpowiedzi odpornościowej mogłaby stać się celem interwencji terapeutycznej, również dla NENs [482]. Komórki nowotworowe rozwijają również mechanizmy, dzięki którym dostosowują się do generacji ROS głównie poprzez zwiększoną aktywność układu antyoksydacyjnego w celu ich neutralizacji, przy jednoczesnym utrzymaniu sygnalizacji pronowotworowej i odporności na apoptozę [483]. W tym przypadku skutecznym mogłyby się okazać takie strategie przeciwnowotworowe, których mechanizm skupia się na poziomie stresu oksydacyjnego, ponieważ komórki nowotworowe charakteryzują się zaburzoną równowagą oksydacyjno-antyoksydacyjną w porównaniu z ich prawidłowymi odpowiednikami [481,483]. Należy podkreślić, że NENs nie były przedmiotem wielu badań w kontekście stresu oksydacyjnego, homeostazy adipokin, czy stanu zapalnego dlatego niniejsza praca może stanowić cenny wkład w aktualny stan wiedzy w tym zakresie.

1. Analiza stresu oksydacyjnego w nowotworach neuroendokrynych o różnej lokalizacji

1.1. Analiza procesu peroksydacji lipidów oraz enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej w nowotworach neuroendokrynych o różnej lokalizacji

Nasilony stres oksydacyjny stwierdzono w różnych typach nowotworów [484]. Dobrze poznanym efektem wzmożonego stresu oksydacyjnego jest proces LPO, a produktem o największym znaczeniu biologicznym, odzwierciedlającym jego natężenie, jest stężenie MDA [485]. Oznaczanie poziomu MDA w ocenie nasilenia stresu oksydacyjnego było wykorzystywane w szeregu badań dotyczących różnych jednostek chorobowych [486]. W niniejszej pracy wykazano istotny statystycznie wzrost stężenia MDA w osoczu krwi we wszystkich grupach badanych w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast w przypadku MDA w erytrocytach wyższe wartości zaobserwowano w grupie pacjentów z NENs, GI-NENs oraz o-NENs, co potwierdza nasiloną LPO u pacjentów z NENs i wzmożony stres oksydacyjny towarzyszący nowotworzeniu. Dane literaturowe wskazują, iż płuca są narządem o największym narażeniu na tlen atmosferyczny i ze względu na dużą powierzchnię i silne ukrwienie są szczególnie podatne na uszkodzenia oksydacyjne, co związane jest z silnym utlenianiem białek, lipidów i DNA [487]. Płuca wykazują silną enzymatyczną i nieenzymatyczną obronę antyoksydacyjną, jednak ze względu na ciągłą ekspozycję na zanieczyszczenia znajdujące się w powietrzu (np. dym tytoniowy, dym spalin, emisje gazowe) i ciągłe generowanie ROS w płucach dochodzi do uszkodzeń oksydacyjnych [488]. Badania Topdag i wsp. [489] oraz Gonenc i wsp. [490] wykazały również istotnie statystycznie wyższe stężenie MDA w tkance nowotworowej niż w tkance zdrowej w przypadku raka płuca. Identyczny rezultat otrzymał również zespół Cobanoglu [491], który oprócz produktów peroksydacji lipidów badał ponadto produkty uszkodzeń DNA i stężenie koenzymu Q10 u chorych na raka płuca.

Stres oksydacyjny jest częstą cechą zaburzeń jelitowych, takich jak zapalenie okrężnicy, czy rak jelita grubego, co wiąże się ze zwiększonym wytwarzaniem produktów peroksydacji lipidów, m.in. MDA [492]. Badania nad rakiem jelita grubego Skrzydlewskiej i wsp. [493] wskazują znamienne statystycznie wzrost stężenia MDA u pacjentów z rakiem jelita grubego

w porównaniu z tkanką nienowotworową, a także wzrost poziomu MDA podczas progresji raka jelita grubego. Ponadto inne badania dowodzą, iż pacjenci z rakiem jelita grubego oraz z zaawansowanym procesem przerzutowania do wątroby, których miejscem pierwotnym raka było jelito grube, wykazują zwiększone stężenia MDA zarówno w moczu, jak i osoczu [494–496]. Natomiast po zabiegach operacyjnych stężenie MDA zmniejszało się w porównaniu ze stanem sprzed operacji [497]. MDA jest toksycznym i mutagennym metabolitem, który reaguje z DNA tworząc addukty, takie jak M1G (pirymido[1,2-a]puryn-10(3H)-on), który jest silnie mutagenny w ludzkich komórkach i został wykryty w tkankach z toczącym się silnym stresem oksydacyjnym [492,498]. Aldehydy reagują nie tylko z kwasami nukleinowymi, ale również z aminokwasami, co ma związek z uszkodzeniami białek oraz niekorzystnym wpływem na wiele funkcji, w tym naprawę DNA [499,500]. W eksperymencie dotyczącym wpływu MDA na cytotoksyczność i mutagenezę wywołaną światłem UV i BPDE (epoksyd benzo(a)pirenodiolu), stwierdzono podatność komórki na śmierć indukowaną zarówno UV, jak i BPDE, co dotyczyło ludzkiej linii nabłonka okrężnicy oraz wątroby [500]. Obecność MDA hamuje również naprawę wycinania nukleotydów w przypadku uszkodzeń DNA wywołanych zarówno światłem UV, jak i BPDE w komórkach nowotworowych, co wskazuje, że wewnątrzkomórkowe aldehydy odgrywają ważną rolę w mutagenezie i karcynogenezie związanej ze stresem oksydacyjnym poprzez indukcję uszkodzeń DNA oraz hamowanie jego naprawy [492,500]. Badania Braga-Neto i wsp. [501] dowiodły również istotnej różnicy w stężeniu MDA w przypadku raka żołądka w porównaniu z grupą kontrolną, ale nie odnotowano różnic w stężeniu aldehydu między etapami raka żołądka w odróżnieniu od raka jelita grubego. W niniejszej pracy w badaniach nad pacjentami z NENs o różnej lokalizacji również wykazano znamiennej statystycznie wzrost stężenia MDA w przypadku grupy pacjentów z GI-NENs. Brak jest danych literaturowych dotyczących nasilenia LPO w przypadku NENs, jednak dotychczasowa wiedza dotycząca nowotworów układu pokarmowego potwierdza niezaprzeczalną rolę stresu oksydacyjnego w ich patogenezie [502]. Dochodzi m.in. do niekorzystnej zmiany integralności błon komórkowych, zwiększonej przepuszczalności i stanu zapalnego, powstającego w wyniku uszkodzenia komórek [502].

W niniejszej pracy zaobserwowano największy wzrost MDA w osoczu krwi w przypadku pNENs (o 38%) w porównaniu z grupą kontrolną, co wykazało również badanie Goroshinskaya i wsp. [503], w którym odnotowano wzrost stężenia MDA w osoczu o 30% w porównaniu z grupą kontrolną. Takie wyniki mogą świadczyć o szczególnej wrażliwości

komórek trzustki na działanie stresu oksydacyjnego i w konsekwencji procesu peroksydacji lipidów. W większości opisywanych przypadków raka, również analizując NENs, sugeruje się zwiększoną produkcję ROS i zaburzoną równowagę oksydacyjną, o czym świadczy zwiększona LPO mierzona za pomocą MDA.

Rola stresu oksydacyjnego w rozwoju raka jest jednak złożona [501]. W komórkach złośliwych różnego typu obserwuje się trwale podwyższone stężenie ROS oraz zwiększone tempo metabolizmu ze względu na transformację komórek nowotworowych, podczas gdy poziom przeciwutleniaczy najczęściej jest w nich obniżony [504,505]. Mimo, iż w tak niekorzystnych warunkach zamiast do proliferacji komórek nowotworowych powinno dochodzić do ich apoptozy, to specyficzny dla nowotworu system obrony antyoksydacyjnej neutralizuje wysoki poziom ROS [506]. Ucieczka transformowanych komórek spod działania ROS jest możliwa dzięki alternatywnej drodze obrony antyoksydacyjnej, mianowicie przez wieloswoiste białko transportowe (RALBP1, ang. *Ral-binding protein1*), a także zwiększoną aktywność jądrowego czynnika erytroidowego (Nrf2, ang. *nuclearerythroid2-related factor*) odpowiedzialnego za syntezę antyoksydantów w komórce [506]. Zwiększona aktywność Nrf2 w komórkach nowotworowych jest wynikiem mutacji w cytoplazmatycznej części Keap1 (ang. *Kelch-like ECH-associated protein 1*), która w warunkach prawidłowych po połączeniu się z Nrf2 powoduje jego inaktywację [507].

W niniejszej pracy zaobserwowano istotny statystycznie spadek aktywności SOD w erytrocytach we wszystkich grupach badanych NENs w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast zmiany w aktywności CAT nie były istotne statystycznie. W przypadku GPx, doszło do zwiększenia jej aktywności w pNENs, a w GI-NENs aktywność tego enzymu spadła. W badaniach Goroshinskaya i wsp. [503] oceniono aktywność SOD i CAT w krwinkach czerwonych pacjentów z nowotworem neuroendokrynnym trzustki w porównaniu do grupy kontrolnej i zaobserwowano spadek aktywności tych enzymów odpowiednio o 39,7% i 46,5% w grupie badanej, co może świadczyć o silnej inhibicji enzymów stanowiących jedną z linii obrony antyoksydacyjnej [503]. W niniejszej pracy aktywność SOD w grupie pacjentów z pNENs zmniejszyła się o 22%, natomiast w przypadku aktywności CAT nie wykazano żadnej zmiany istotnej statystycznie. Niska aktywność SOD i CAT w nowotworach może powodować kumulację ROS, natomiast zwiększenie aktywności GPx może usuwać ich szkodliwe działanie, ale może być również mechanizmem kompensacyjnym w unieczynnianiu H₂O₂ przy niskiej aktywności CAT [508]. Niektóre dane wskazują na brak różnic w aktywności SOD u pacjentów

z rakiem trzustki, co może sugerować, iż wszelkie różnice w aktywności prowadzące do rozwoju nowotworu mogą być zjawiskiem lokalnym [509]. Ok. 95% raków trzustki związanych jest z mutacją w onkogenie *K-ras*, co również sprzyja produkcji ROS poprzez aktywację oksydazy NADPH, lecz raczej nie wpływa bezpośrednio na obniżenie aktywności SOD [510]. NADPH jest głównym źródłem wewnątrzkomórkowych ROS w komórkach raka trzustki, głównie $O_2^{\bullet-}$, który działa jak antyapoptotyczny, sprzyjający przeżyciu mediator w tym typie raka [511,512]. W komórkach raka trzustki o niskiej ekspresji SOD, jego nadekspresja spowalnia wzrost guza, co sugeruje, że ścisła regulacja przez SOD jest ważna dla przeżycia guza. Niektóre szlaki sygnałowe są unieczynniane poprzez dysmutację $O_2^{\bullet-}$, jednak późniejszy wzrost H_2O_2 może być toksyczny [512]. Mniejsze ilości H_2O_2 mogą również funkcjonować jako cząsteczka sygnalizująca wzrost guza [512]. Badanie Liu i wsp. [513] udowodniło, iż połączenie SOD z GPx wzmacniało hamowanie guza trzustki o 71% w porównaniu z grupą kontrolną, co sugeruje, że GPx może być genem supresorowym raka trzustki. Z badań Chio i wsp. [514] wynika, iż również aktywacja Nrf2 jest kluczowym regulatorem stabilności guza trzustki. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych w niniejszej pracy, dane literaturowe wskazują na zwiększoną lub zmniejszoną aktywność CAT w komórkach nowotworowych [515]. Zwiększoną aktywność CAT wykryto m.in. w raku żołądka, a istotnie zmniejszoną aktywność CAT wykazano w niedrobnokomórkowym raku płuca (aktywność SOD wyższa, GPx bez zmian) w porównaniu z grupą kontrolną [516,517]. Znacząco wyższe wartości CAT, ale również GPx oraz MDA odnotowano w tkankach guza okrężnicy w porównaniu z prawidłową błoną śluzową okrężnicy, co prawdopodobnie miało miejsce w odpowiedzi na zwiększony stres oksydacyjny występujący w tkankach nowotworowych [518]. W badaniach Zińczuka i wsp. [519] na grupie 50 pacjentów leczonych operacyjnie z powodu raka jelita grubego i grupie 40 osób zdrowych wykazano, iż aktywność SOD była istotnie statystycznie wyższa, natomiast aktywność CAT i GPx była istotnie niższa u pacjentów w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną, co częściowo pokrywa się z wynikami niniejszych badań u pacjentów z GI-NENs. Aktywność GPx w analizie porównawczej czterech grup pacjentów z NENs okazała się być najniższa w GI-NENs w porównaniu z pNENs, L-NENs oraz o-NENs, co może świadczyć o nasilonej funkcji tego enzymu w NENs. GPx okazała się być również parametrem dodatnio korelującym ze stężeniem CgA. Badania Zińczuk i wsp. [519] sugerują przydatność tego enzymu jako markera w ocenie stopnia zaawansowania guza raka jelita grubego. W raku płuca według badań Zalewskiej-Ziob i wsp. [520] GPx wykazywała wyższą aktywność w raku płuca w porównaniu z tkanką

nienowotworową, natomiast SOD i CAT miały wyższą aktywność w tkance nienowotworowej, co może świadczyć o ochronie komórek płuca przed stresem oksydacyjnym. Izoenzym GPx2 (inaczej żołądkowo-jelitowa peroksydaza glutationowa, GI-GPx) ulega ekspresji w nabłonku przewodu pokarmowego, odpowiadając za homeostazę pro- i antyoksydacyjną błony śluzowej [521]. Lennicke i wsp. [522] w badaniach na myszach typu dzikiego (WT) oraz myszach z nokautem GPx (KO) z zastosowaną dietą z prawidłową zawartością selenu (+Se) lub dietą z niedoborem selenu (-Se) wykazali, że utrata GPx2 moduluje poziom ekspresji markerów specyficznych dla danego typu komórek, co może odzwierciedlać dysproporcje między typami komórek absorpcyjnych i wydzielniczych. Myszy KO wykazywały obniżony poziom mRNA markerów różnicowania, takich jak CgA dla komórek enteroendokrynych i bogatego w leucynę receptora sprzężonego z białkiem G (Lgr5, ang. *leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*) dla komórek macierzystych, w porównaniu z odpowiednimi grupami WT. Utrata GPx2 związana była ze zmniejszonym poziomem CgA, ale towarzyszyło temu również obniżenie poziomu ekspresji mRNA hormonów jelitowych, GLP1, greliny i somatostatyny [522]. W innym badaniu, na podstawie próbek ludzkiego guza jelita grubego pobranych od pacjentów, którzy przeszli resekcję okrężnicy lub wątroby z powodu pierwotnego lub przerzutowego gruczolakoraka dowiedziono, iż nadekspresja GPx2 była związana ze zwiększonym poziomem mRNA dla CgA [523]. Poza tym nadekspresja GPx2 pobudzała różnicowanie, proliferację i wzrost guza, ale była ujemnie skorelowana z ROS (głównie H₂O₂) [523]. Ciekawym wydaje się być fakt, że według doniesień łączne zastosowanie jako markerów GPx oraz CgA może zwiększać wydajność diagnostyczną w raku wątrobowokomórkowym [524]. Stężenie CgA było znacząco wyższe u pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym w porównaniu z pacjentami z marskością wątroby i grupą kontrolną, natomiast aktywność GPx była znacznie niższa u pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym w porównaniu z pacjentami z marskością wątroby i grupą kontrolną [525,526].

W porównaniu z innymi rodzajami raka, liczba badań nad stresem oksydacyjnym skoncentrowanych na NETs jest stosunkowo niska. Jednak heterogenność NETs i rosnąca częstość występowania wymaga poszerzenia dotychczasowej wiedzy.

1.2. Analiza stężenia melatoniny w nowotworach neuroendokrynych o różnej lokalizacji

Funkcjonalnie, komórki produkujące melatoninę są nieodłącznym elementem rozproszonego systemu neuroendokrynego o szerokim spektrum aktywności biologicznej za pomocą mechanizmów endo- i parakrynych [527]. Dane literaturowe potwierdzają onkostatyczne działanie MEL w wielu nowotworach, m.in. raku piersi, jajnika, gruczołu krokowego, żołądka, czy jelita grubego [348]. Niewiele jest jednak informacji dotyczących roli melatoniny w NENs. Wyniki niniejszej pracy wykazały znaczny, istotny statystycznie spadek stężenia MEL w grupie pacjentów z NENs bez względu na lokalizację guza oraz w każdej z grup osobno, czyli w pNENs, GI-NENs, L-NENs oraz o-NENs w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie zmian pomiędzy poszczególnymi grupami pacjentów, co sugeruje, że najważniejsze zmiany dotyczą grupy badanej w porównaniu z grupą kontrolną. MEL okazała się być również jednym z bardziej czułych parametrów w NENs, a jej niska wartość może sugerować występowanie toczącego się procesu chorobowego. Sugeruje się, iż obniżenie poziomu krążącej melatoniny może brać udział w patogenezie NENs. Receptory dla MEL wykryto w komórkach enterochromafinowych przewodu pokarmowego. Szacuje się, iż ilość MEL uwalnianej z przewodu pokarmowego przewyższa 400-krotnie poziomy MEL uwalnianej z szyszynki i proces ten nie zależy od cyklu dobowego, a raczej jest związany z przyjmowaniem pokarmów [528,529]. Ciekawe okazują się być spostrzeżenia Fanny Söderquist i wsp. [530], którzy przeprowadzili badania na grupie 43 pacjentów z nowotworem neuroendokrynym jelita cienkiego (SI-NET, ang. *small intestinal neuroendocrine tumors*). Materiał do badań pobrano w dwóch punktach czasowych, przed i po leczeniu. Leczenie obejmowało zabieg chirurgiczny lub podawanie IFN- α i SA. Zauważono, iż u pacjentów z regresją lub stabilizacją choroby stężenie MEL było niższe, w porównaniu do stężenia przed leczeniem, co mogło być spowodowane zmniejszeniem obciążenia nowotworem, skutkując spadkiem MEL pochodzącej z guza. Wyższy poziom MEL był związany również z nudnościami w obu punktach czasowych i zaczerwienieniem przy drugim pobraniu próbki [530]. Natomiast Cheng i wsp. [531] wykazali wyższe wartości MEL u 70% pacjentów z rakiem pęcherza moczowego po leczeniu niż przed leczeniem. U tych pacjentów przeprowadzono również badanie jakości snu PSQI (ang. *Pittsburgh Sleep Quality Index*) przy pomocy kwestionariusza, na podstawie którego dowiedziono, iż u pacjentów po leczeniu

występuje poprawa jakości snu [531]. Na podstawie badań dotyczących przeciwnowotworowego działania melatoniny zaproponowano, że efekty te obejmują tłumienie proliferacji, indukcję apoptozy, działanie przeciwprzerutowe i dążenie do różnicowania komórek [532]. Lee i wsp. [533] wykazali, że fizjologiczne poziomy MEL mogą modulować ekspresję miRNA w linii komórkowej raka piersi bez przerzutów, promując właściwości antyproliferacyjne. Ten sam szlak działania MEL dotyczył również komórek niedotlenionego raka gruczołu krokowego *in vitro* [534]. W przypadku innych badań podawanie MEL zmniejszało wzrost komórek, zatrzymywało progresję cyklu komórkowego i indukcję różnicowania komórek raka gruczołu krokowego, a efekty okazały się niezależne od receptora [535]. Prawdopodobnie najlepiej poznanym efektem onkostatycznym MEL jest jej udział w modulacji i zmniejszeniu poziomu ekspresji receptora estrogenu (ER, ang. *estrogen receptor*) oraz wpływ na hamowanie aktywności aromatazy w komórkach raka piersi [536,537]. Badania epidemiologiczne wykazały, że zapadalność na raka jelita grubego znacznie wzrosła u ludzi, którzy kiedykolwiek wykonywali pracę zmianową i/lub nocną, a inne badania potwierdziły, iż amplituda rytmu wydzielania MEL u pacjentów z rakiem jelita grubego była istotnie obniżona [538–541]. Odkrycia te wskazują, że zaburzenie produkcji i/lub wydzielania MEL może być związane ze wzrostem częstości występowania raka jelita grubego, a melatonina może mieć duży potencjał modulowania rozwoju i progresji tego typu nowotworu [541]. Ciekawym spostrzeżeniem w ramach badań Söderquist i wsp. [530] w materiale tkankowym było stwierdzenie występowania różnicy w ekspresji receptorów MT1 oraz MT2. Receptory MT1 praktycznie nie występowały zarówno w tkance pierwotnej, jak i przerzutowej, natomiast ekspresja MT2 była średnia do wysokiej w guzach pierwotnych, a obniżona w tkance przerzutowej SI-NENs. Badania dotyczące ekspresji receptora MEL przyniosły różne efekty. Nemeth i wsp. [542] wykazali znaczny spadek ekspresji MT1 w tkankach gruczolakoraka okrężnicy w porównaniu ze zdrową tkanką błony śluzowej okrężnicy tych samych pacjentów. Zmniejszona ekspresja MT1 w ludzkim raku jelita grubego może wskazywać na rolę melatoniny w tej chorobie. Nasrabadi i wsp. [543] wykazali również wyższą ekspresję receptorów MT1 i MT2 w gruczolakoraku żołądka w porównaniu z grupą kontrolną. Inni badacze zaobserwowali, iż wyższa ekspresja MT1 w raku piersi była niezależnym czynnikiem prognostycznym dłuższego przeżycia całkowitego i przeżycia wolnego od zdarzeń w grupie nowotworów z dodatnim receptorem estrogenowym [544,545]. González i wsp. [546] stwierdzili, że nadekspresja receptora MT1 w komórkach raka piersi

wywołuje silniejsze hamowanie aromatazy przez MEL i wskazują na znaczenie receptora MT1, chroniącego przed niekorzystnym wpływem estrogenów w komórkach raka piersi. W badaniach Jabłońskiej i wsp. [547] zauważono wyższą ekspresję dwóch receptorów (MT1 i MT2) w niedrobnokomórkowym raku płuca (NSCLC, ang. *non-small cell lung cancer*) w porównaniu z osobami zdrowymi. Ze względu na obniżone stężenie melatoniny w tkankach obwodowych chorych na NSCLC czy raka jelita grubego, sugeruje się istnienie mechanizmów kompensacyjnych i obronnych prowadzących do zwiększonej ekspresji receptorów melatoniny. Najnowsze badania potwierdziły przeciwnowotworowe działanie melatoniny na niemal każdym etapie powstawania i rozwoju nowotworu poprzez łączne działanie wielu mechanizmów, co czyni ją obiecującą opcją terapeutyczną dla różnych typów nowotworów [548].

Istnieje wiele badań dotyczących skuteczności jednoczesnego stosowania chemioterapii i suplementacji MEL potwierdzających jej korzystne działanie przeciwnowotworowe w raku płuca, piersi, szyjki macicy, jelita grubego, wątroby, czy nowotworów hematologicznych [548]. Dość szeroką analizę przeprowadzono na podstawie 8 randomizowanych badań związanych ze stosowaniem melatoniny w terapii guzów litych [549]. We wszystkich tych badaniach, podawano MEL łącznie z chemioterapią w dawce 20 mg raz dziennie, co w efekcie powodowało całkowitą lub częściową remisję, znaczną poprawę odsetka rocznej przeżywalności, a także zredukowane działania niepożądane związane z radiochemioterapią, takie jak trombocytopenia, neurotoksyczność i zmęczenie [549]. Udowodniono, iż MEL wzmacnia potencjał przeciwnowotworowy różnych leków chemioterapeutycznych w ludzkich komórkach gruczolakoraka jelita grubego HT-29 [550]. Inkubacja komórek raka z 1 mM MEL zwiększała działanie cytotoksyczne 5-fluorouracylu indukując apoptozę związaną z nadprodukcją wewnątrzkomórkowych ROS. Natomiast inkubacja komórek raka w 1 mM MEL z cisplatyną wywierała głównie działanie cytostatyczne, które prowadziło do spadku żywotności komórek w czasie [550]. Mimo, iż połączenie MEL z cisplatyną nie uwrażliwiało komórek raka jelita grubego dostatecznie, by indukować apoptozę, to już wykorzystanie tej kombinacji w innych ludzkich liniach komórkowych np. raka jajnika, raka wątrobowokomórkowego, czy raka szyjki macicy, dawało odpowiedni efekt, zmniejszając proliferację i wzmagając apoptozę [551–553]. Zdolność MEL do zwiększania wrażliwości komórek nowotworowych na leczenie, przy jednoczesnej ochronie komórek prawidłowych przed toksycznością stosowanej terapii wyjaśnia ewentualne zastosowanie MEL

jako środka wspomagającego leczenie oraz poprawiającego jakość życia pacjenta. Ważne jest, że MEL stanowi również zegar biologiczny, a jej wytwarzanie zmniejsza się wraz z wiekiem i jej przedwczesny lub konstytutywny niedobór może stanowić o fizjologicznym procesie starzenia, który również predysponuje do rozwoju raka [554]. Również praca zmianowa, wiążąca się brakiem snu narażeniem na sztuczne światło w nocy, co obniża syntezę MEL, może okazać się czynnikiem prokarcynogennym [555]. Kolejnym ważnym powodem wykorzystania MEL jako markera przesiewowego w nowotworach jest jej silne działanie antyoksydacyjne (bezpośrednie lub pośrednie poprzez indukcję enzymów antyoksydacyjnych), dlatego jej niższe stężenie może predysponować do mutagenyzy DNA spowodowanej ROS [537].

2. Analiza wybranych parametrów diabetologicznych w nowotworach neuroendokrynych o różnej lokalizacji

Otyłość jest wciąż poważnym problemem zdrowia publicznego, a jej wzrost wśród dzieci i dorosłych u obu płci dotyczy zarówno krajów rozwiniętych, jak i rozwijających się [556]. Otyłość wiąże się ze zwiększonym ryzykiem śmiertelności ogólnej, predysponuje do wielu chorób oraz wpływa na zwiększoną zapadalność i śmiertelność na raka [556,557]. Nieprawidłowości metaboliczne związane ze zmianami funkcji endokrynej tkanki tłuszczowej mogą przyczyniać się do rozwoju i progresji raka poprzez regulację odrębnych szlaków sygnałowych [557]. W komórkach nowotworowych dochodzi do zmiany metabolizmu glukozy poprzez zwiększony jej wychwyt i aktywność glikolityczną w obecności tlenu (efekt Warburga), a coraz więcej dowodów wskazuje na fakt, że zaburzona równowaga w syntezie i wydzielaniu adipokin i cytokin zapalnych ma indukujący wpływ na ten proces [556–558].

C-peptyd, który jest wytwarzany w ilościach równomolowych do endogennej insuliny, to powszechnie stosowana miara funkcji komórek beta trzustki [559]. W przeciwieństwie do insuliny, która jest metabolizowana głównie w wątrobie i jej okres półtrwania wynosi 5-10 minut, C-peptyd rozkładany jest w kanaliku bliższym nerki, co stanowi o tym, że jego degradacja jest wolniejsza i okres półtrwania wynosi 25-30 minut [559,560]. C-peptyd ma znaczenie kliniczne w pomiarze rezerwy komórek beta trzustki w cukrzycy typu 1, diagnostyce różnicowej cukrzycy typu 1, typu 2, typu MODY (ang. *maturity onset diabetes of the young*) i typu LADA (ang. *latent autoimmune diabetes in adults*) [559,560]. Stosowany jest również

jako parametr zastępczy do monitorowania endogennej produkcji insuliny, do oceny hipoglikemii niezwiązanej z cukrzycą i diagnozowania stanów, takich jak insulinoma [559]. W niniejszej pracy wykazano istotny statystycznie wzrost stężenia C-peptydu w przypadku grupy pacjentów z NENs oraz GI-NENs (o ok. 53%) w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast w przypadku pNENs, mimo iż wartości były wyższe niż w grupie kontrolnej, to nie zaobserwowano różnic istotnie statystycznych pomiędzy tymi grupami. Analiza Fogar i wsp. [561] wykazała, iż C-peptyd w raku trzustki z hiperglikemią w 26% przypadków był nieobecny, w 24% miał stężenie obniżone, w 29% - podwyższone, a w 21% - w normie. Hiperglikemia związana z rakiem trzustki może być spowodowana różnymi mechanizmami, ponieważ u większości pacjentów czynność komórek beta może być prawidłowa, a stan hiperglikemii może zależeć od zmienionej obwodowej wrażliwości na insulinę z powodu samej patologii trzustki lub zajęcia wątroby przez zmiany przerzutowe [561]. Niskie wartości stężenia C-peptydu obserwuje się w przypadku niewłaściwego podawania insuliny, pankreatektomii, cukrzycy typu 1 oraz w LADA [560]. W przypadku objawów zwanych triadą Whipple'a (objawy hipoglikemii, niskie stężenie glukozy we krwi oraz złagodzenie objawów po podwyższeniu poziomu glukozy), wykonuje się pomiar stężenia C-peptydu, by wykluczyć podanie egzogennej insuliny [562,563]. W insulinoma występuje nadmierne uwalnianie insuliny przez trzustkę, co powoduje hipoglikemię, dlatego też pacjent z insulinoma będzie miał wysoki poziom C-peptydu we krwi, przy jednocześnie wysokim stężeniu insuliny [563]. Vidal i wsp. [564] zauważyli związek wyższych stężeń C-peptydu z rozwojem gruczolakoraka jelita grubego, silniej skorelowany u mężczyzn niż u kobiet. Metaanaliza Li i wsp. [565] z 2020 roku wykazała dodatnią korelację stężenia C-peptydu z rakiem piersi. Co ciekawe, inne badania sugerują niewielki związek poziomu C-peptydu ze śmiertelnością z powodu raka płuca u kobiet [566]. Według Thoty i wsp. [567] wpływ na wzrost stężenia C-peptydu w surowicy ma również otyłość.

Insulina jest anabolicznym hormonem polipeptydowym, regulującym poziom glukozy we krwi oraz indukującym magazynowanie glukozy w wątrobie, mięśniach i tkance tłuszczowej [568]. U pacjentów z chorobami metabolicznymi przebiegającymi z hiperinsulinemią (otyłość, cukrzyca typu 2, MetS) częstość występowania raka może być zwiększona [569]. Insulina ma funkcje mitogenne, promujące proliferację szczególnie zaznaczoną w komórkach nowotworowych, często wyrażających nadekspresję receptora insuliny [569]. IR jest powiązana z etiologią niektórych nowotworów, w tym raka okrężnicy,

endometrium, trzustki, nerki oraz raka piersi i gruczołu krokowego [570,571]. Przewlekła hiperinsulinemia i wzrost insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF-I (ang. *insulin-like growth factor I*), pełnią rolę w inicjacji i progresji nowotworów u pacjentów z insulinopornością (np. w raku okrężnicy) [570]. Insulina i IGF-1 hamują również syntezę globuliny wiążącej hormony płciowe, co zwiększa dostępność hormonów, których działanie w nabłonku piersi i endometrium może sprzyjać proliferacji komórkowej i hamować apoptozę [572,573]. Zwiększone ryzyko raka u pacjentów z IR może również dotyczyć nadmiernego uwalniania ROS oraz otyłości, która jest najczęstszym czynnikiem ryzyka IR i dodatkowo przebiega z chronicznym stanem zapalnym [573,574]. W niniejszym badaniu stężenie insuliny wzrosło istotnie statystycznie w NENs, pNENs, GI-NENs oraz L-NENs, ale najwyższy, bo aż 7-krotny wzrost dostrzeżono w przypadku pNENs. Insulinoma są zwykle łagodne i występują pojedynczo, ale mogą być również jedną ze składowych zespołu MEN1, co sugeruje, że mogą współwystępować również z innymi NENs i znacznie zwiększać wydzielanie insuliny, C-peptydu, rzadziej proinsuliny (rzadkie rodzaje insulinoma) [575]. Co istotne, wzrost stężenia insuliny w pozostałych grupach z NENs mógł mieć miejsce ektopowo, ze względu na możliwość współwystępowania insulinoma. Ektopowe guzy wydzielające insulinę stanowią ok 1-2% wszystkich insulinoma i zlokalizowane są zwykle w okolicy okołotrzustkowej i okołodwunastniczej [576]. Ramkumar i wsp. [576] opisali przypadek kobiety z nawracającą hipoglikemią, u której w trakcie diagnostyki stwierdzono hipoglikemię spowodowaną hiperinsulinemią i zmianę w prawej nerce. Charakter neuroendokryny guza potwierdzono PET z użyciem 68Ga-DOTANOC oraz 99mTc-HYNICTOC. Po nefrektomii nie doszło do nawrotu stanów hipoglikemicznych [576]. Uwalnianie insuliny przy braku guza trzustki odkryto również w przypadku raka szyjki macicy, rakowiaka oskrzela, rakowiaka jajników i guza neuroendokrynnego wątroby [576]. Mechanizm hipoglikemii dotyczył bezpośredniego uwalniania insuliny przez guz, lub przez zajęcie wątroby masą guza [577–580].

Glukagon uwalniany jest przez komórki alfa trzustki i odpowiada za homeostazę glukozy zarówno u zwierząt, jak i ludzi [581]. Jego niewielka część jest również uwalniana przez komórki wydzielania wewnętrznego w przewodzie pokarmowym [582]. Warunki hipoglikemiczne powodują, iż glukagon wzmaga glikogenolizę oraz glukoneogenezę w wątrobie [583]. W związku z tym prawidłowe stężenie glukozy w osoczu zależy w dużej mierze od zrównoważonego wydzielania insuliny i glukagonu [583]. Długotrwała ekspozycja na wysoki poziom glukagonu jest głównym czynnikiem rozwoju IR, a w konsekwencji cukrzycy

[584]. W niniejszym badaniu wykazano, iż stężenie glukagonu istotnie spadło w grupach pacjentów z NENs, pNENs, GI-NENs, oraz o-NENs w porównaniu z grupą kontrolną, co może stanowić o zaburzonym metabolizmie glukozy u tych pacjentów i wynikać ze znacznie zwiększonej sekrecji insuliny. Wiadomo bowiem, iż wydzielanie glukagonu może być hamowane przez hiperglikemię, insulinę, somatostatynę, GLP-1 i GIP [585]. Glukagon w kontekście nowotworów najczęściej kojarzony jest z rzadkim typem nowotworu neuroendokrynnego - glukagonoma (0,01-0,1 przypadków/100000/rok) [586]. Klasyczny zespół glukagonoma obejmuje utratę masy ciała, nekrolityczny rumień wędrujący (NME, ang. *necrolytic migratory erythera*), cukrzycę i nieprawidłowości błony śluzowej [587]. Wermers i wsp. [588] w przebadali 41 pacjentów z potwierdzonymi NENs oraz 22 pacjentów wyłącznie z hiperglukagonemią. Pacjenci z zespołem glukagonoma często mieli cukrzycę (40%) i NME - 67% w momencie wstępnej oceny, a najczęstszym początkowym objawem była utrata masy ciała (73%). Najwyższe mediany wartości stężeń glukagonu w surowicy wystąpiły u pacjentów z zespołem glukagonoma lub insulinoma, natomiast najniższe u pacjentów z zespołem rakowiaka, zespołem Zollingera-Ellisona lub cukrzycą bez NME [588]. Niewiele jest doniesień potwierdzających rolę glukagonu w nowotworzeniu, ale ryzyko to na pewno znacznie się zwiększa w cukrzycy. Yagi i wsp. [589] wskazali obecność receptora glukagonu w liniach komórkowych i tkance raka okrężnicy, a badania molekularne potwierdzają, iż glukagon działa jako aktywator wzrostu komórek nowotworowych poprzez dezaktywację AMPK i aktywację MAPK. Godfrey i wsp. [590] po raz pierwszy wysunili hipotezę o hamującej roli glukagonu w raku wątroby, za pośrednictwem receptorów dla glukagonu.

GLP-1 jest hormonem insulinotropowym syntetyzowanym w błonie śluzowej jelita, uwalnianym w odpowiedzi na przyjęcie pokarmu w celu zwiększenia uwalniania insuliny [591]. Receptor GLP-1 w tkankach prawidłowych obecny jest w niewielkich ilościach, ale w przypadku guzów neuroendokrynnych najbardziej charakterystyczny jest dla insulinoma, dlatego receptory te mogą stanowić cele molekularne do ważnych zastosowań klinicznych (jak obrazowanie scyntygraficzne i radioterapia za pomocą znakowanych radioaktywnie analogów peptydowych) [592,593]. Ponadto obecność receptora GLP-1 potwierdzono również w gastrinoma, NET oskrzela, w guzach chromochłonnych, czy w raku rdzeniastym tarczycy [594]. W niniejszym badaniu nie wykazano zmian istotnych statystycznie w stężeniu GLP-1 w żadnej z grup badanych w porównaniu z grupą kontrolną. Guimaraes i wsp. [595] opisali przypadek pacjenta z pNET zlokalizowanym w głowie trzustki. W tkance guza wykryto wysokie

stężenie glukagonu oraz śladowe ilości GLP-1, insuliny i somatostatyny. Był to pierwszy przypadek pNETs współdzielający GLP-1 i glukagon, a uwalnianie GLP-1 mogło być związane z przebytą przez pacjenta operacją pomostowania żołądka [595,596]. Todd i wsp. [591] opisali przypadek rakowiaka jajnika z towarzyszącym zwiększonym uwalnianiem GLP-1, którego poziom wzrastał również po podaniu glukozy w doustnym teście obciążenia glukozą, natomiast stężenie glukagonu było stłumione i nie wzrastało w warunkach hipoglikemii. Badania te dowiodły, iż podwyższone stężenie GLP-1 może być związane z hipoglikemią oraz że peptyd opóźnia opróżnianie żołądka i hamuje wydzielanie glukagonu [591]. Natomiast w 2012 roku po raz pierwszy opisano przypadek pacjenta, u którego dochodziło do wydzielania glukagonu i GLP-1 z przerzutowego pNET, co powodowało zarówno cukrzycę, jak i hipoglikemię [597].

GIP, podobnie jak GLP-1 należy do inkretyn, uwalnianych przez błonę śluzową jelita cienkiego w odpowiedzi na zależną od glukozy stymulację uwalniania insuliny [598]. Receptor dla GIP zlokalizowano w większości typów pNETs, NETs żołądka, jelita krętego i oskrzeli, a szczególnie charakterystyczny jest dla złośliwych insulinoma, które nie wykazują ekspresji receptorów somatostatynowych oraz GLP-1 [599]. W niniejszej pracy wykazano statystycznie istotny wzrost stężenia GIP w NENs w porównaniu do grupy osób zdrowych. GIP związany jest głównie z otyłością i cukrzycą, ponadto badany jest pod kątem terapeutycznym w przypadku obniżenia stężenia glukozy, czy też redukcji masy ciała [600]. Podobnie jak w przypadku GLP-1, wagotomia i plastyka odźwiernika żołądka zwiększają uwalnianie GIP [600].

PAI-1 jest członkiem nadrodziny inhibitorów proteazy serynowej i głównym inhibitorem aktywatora plazminogenu typu tkankowego i moczowego [601]. Posiada właściwości prozapalne, a wzrost jego stężenia jest spowodowany działaniem TNF- α oraz IL-6 [601]. W niniejszym badaniu stężenie PAI-1 było istotnie statystycznie wyższe u pacjentów z NENs bez względu na lokalizację oraz w grupie pacjentów z GI-NENs oraz o-NENs w porównaniu z grupą kontrolną, co może świadczyć o prokancerogennym działaniu tego czynnika w kontekście nowotworów neuroendokrynych. Liczne doniesienia wskazują na jego rolę pronowotworową, ze względu na funkcje stymulujące wzrost i migrację komórek, ponadto PAI-1 wzmaga angiogenezę, przez co predysponuje do procesu metastazy, a także wykazuje aktywność przeciwapoptotyczną [602,603]. Wysokie stężenia PAI-1 przewidują słabszą przeżywalność i odpowiedź na leczenie u chorych na raka piersi, jajnika, pęcherza moczowego, okrężnicy i niedrobnokomórkowego raka płuca [603,604]. Badania Norsett i wsp.

[605] pokazały, iż zwiększenie stężenia gastryny w osoczu krwi jest związane ze zwiększeniem wydzielania PAI-1 w żołądku, ale w badanym układzie czynnik ten hamował migrację i inwazję komórek stymulowanych gastryną. Autorzy dowodzą, że niektóre efekty gastryny mogą opóźniać progresję nowotworu i pełnić funkcję ochronną [605].

Grelina jest oreksygennym hormonem peptydowym, uwalnianym głównie z żołądka który stymuluje apetyt i uwalnianie hormonu wzrostu [606]. W niniejszej pracy zaobserwowano istotny statystycznie spadek stężenia greliny wyłącznie w przypadku pacjentów z L-NENs. W pozostałych przypadkach nie stwierdzono żadnych zmian. Wyjaśnienie uzyskanego wyniku niewątpliwie wymaga dalszych badań, można natomiast wskazać, że zaburzenia wynikające z niedoboru greliny mogą uczestniczyć w rozwoju L-NENs. Niektóre doniesienia wskazują na rolę greliny jako regulatora progresji nowotworu, a w GI-NENs uwalnianie greliny zostało dobrze udokumentowane [607]. Autorzy twierdzą, iż stężenie greliny u pacjentów z NETs nie wykazuje istotnej różnicy między guzami pochodzenia żołądkowo-jelitowego i trzustkowego oraz, że rakowiaki i guzy trzustki rzadko powodują nadmierne uwalnianie greliny [608]. Dowiedziono, iż peptyd ten może łagodzić objawy kacheksji nowotworowej, stymulując m.in. efekty anaboliczne [609]. Wielu badaczy wykazało również zmiany stężenia greliny w zespole MEN-1 [610]. Ponadto, Ekeblad i wsp. [611] wykazali znacznie wyższe stężenie greliny w NENs związanych z MEN-1 niż u pacjentów z guzami sporadycznymi lub w grupie kontrolnej. U pacjentów z NENs z obecnością przerzutów do wątroby wykazano podwyższony poziom greliny uwalnianej prawdopodobnie z guza neuroendokrynnego [612]. W badaniu Wang i wsp. [612] porównywano stężenie greliny i BMI u pacjentów z przerzutami i bez przerzutów, w efekcie wnioskując, że wyższe BMI związane jest z wyższym stężeniem greliny i dotyczy pacjentów z przerzutami do wątroby. Wyniki te mogą sugerować, że grelina uwalniana przez guzy przerzutowe w wątrobie lub poza nią może wywierać u pacjentów działanie oreksygenne, zapobiegając dzięki temu wyniszczeniu nowotworowemu oraz pozwalając na utrzymanie przez pacjentów BMI na stałym poziomie [607,612]. Na podstawie badań Waltera i wsp. [613] stwierdzono, że raki neuroendokrynnie dobrze zróżnicowane o różnej lokalizacji, również z trwającym procesem metastazy, charakteryzują się znacznie zwiększonym stężeniem greliny, która nie manifestuje klinicznych objawów, czy też funkcjonalnych konsekwencji. W niniejszym badaniu na podstawie analizy ANOVA dostrzeżono istotną statystycznie zmianę między grupą pacjentów z L-NENs, gdzie stężenie greliny było najniższe, a pacjentami z GI-NENs, u których stężenie

tego parametru było najwyższe wśród grup badanych. Grelina jest hormonem uwalnianym nie tylko w żołądku, ale też w innych częściach układu pokarmowego, jak dwunastnica, jelito czcze, jelito kręte, czy okrężnica, co sprawia, że NENs tych lokalizacji wydzielają jej zwiększone ilości. Co ważne, wydzielanie greliny jest zwiększone u pacjentów z hiperplazją komórek żołądka w porównaniu z prawidłową tkanką, co może sugerować przydatność tego parametru w przewidywaniu progresji rakowiaka [607,614]. Opierając się na wspomnianych badaniach Wanga i wsp. [612] można stwierdzić, że grelina uwalniana w większych ilościach z układu pokarmowego, ale też z guzów neuroendokrynych, w tym z guzów przerzutowych, może pobudzać łaknienie, chroniąc przed wyniszczeniem przez nowotwór i utrzymując zrównoważony bilans energetyczny. Niedobór greliny u pacjentów z L-NENs stwierdzony w niniejszej pracy może w związku z tym skutkować ich gorszym rokowaniem.

3. Analiza BMI oraz stężenia wybranych adipokin w nowotworach neuroendokrynych o różnej lokalizacji

Łatwość stosowania BMI jako miary tkanki tłuszczowej sprawia, że jest to przydatne narzędzie przesiewowe w kierunku otyłości [615]. Wyższe BMI w momencie rozpoznania niekorzystnie rokuje w raku piersi, gruczołu krokowego, jamy ustnej oraz białaczkach [616]. Natomiast wzrost BMI korelował z poprawą rokowania w przypadku chorób hematologicznych, raka płuca, nerki, czy w przypadku nowotworów głowy i szyi [616]. Santos i wsp. [465] przeanalizowali związek dobrze zróżnicowanych GEP-NETs (WD GEP-NETs) z otyłością i MetS. U pacjentów biorących udział w badaniu występowały guzy przewodu pokarmowego lub trzustki stopnia G1/G2 z chorobą miejscową, z przerzutami regionalnymi i odległymi. Występowanie WD GEP-NETs było istotnie statystycznie związane z komponentami MetS, a korelacja była silniejsza, gdy liczba składowych MetS była większa niż cztery. Wykazano również istotny związek WD GEP-NETs z obwodem talii oraz stężeniem trójglicerydów i glukozy na czczo w porównaniu z osobami zdrowymi. Ponadto stwierdzono umiarkowany związek z ciężką IR, ale nie wykazano istotnych różnic pomiędzy pacjentami, a grupą kontrolną w przypadku masy ciała, BMI oraz cukrzycą typu 2, mimo iż nieprawidłowa glikemia na czczo występowała istotnie częściej u pacjentów niż u osób zdrowych [465]. Co ciekawe w niniejszym badaniu analiza BMI w poszczególnych grupach pacjentów z NENs

(ANOVA) wykazała istotną statystycznie różnicę w wartościach BMI pomiędzy grupami o-NENs i pNENs oraz pomiędzy grupami GI-NENs i L-NENs, gdzie najwyższe BMI dotyczyło grupy pacjentów z L-NENs. Prawdopodobnie w niektórych analizowanych przypadkach NENs, przyrost lub spadek masy ciała może raczej wynikać z biologicznych konsekwencji działania hormonów uwalnianych przez guzy (zaburzenia stanu odżywiania) niż zapoczątkowywać rozwój nowotworu. Dane literaturowe dowodzą, iż w przypadku L-NETs może dochodzić do ektopowego uwalniania ACTH z guza płuca, co prowadzi do zespołu Cushinga i niezamierzonego przyrostu masy ciała, a także może wiązać się z gorszym przeżyciem [617]. Również w przypadku pNENs, wśród których najczęściej występującym jest insulinoma, może dochodzić do nadmiernego przyrostu masy ciała w sytuacji, kiedy pacjenci chcą złagodzić skutki hipoglikemii i spożywają duże ilości pożywienia [618,619]. Również wspomniane zwiększone wydzielanie greliny może wspomagać utrzymanie BMI i ochronę przed kacheksją, jednak ze względu na źródła wydzielania greliny może to dotyczyć głównie przypadków GI-NENs lub innych lokalizacji z obecnością guzów przerzutowych umiejscowionych w układzie pokarmowym. Wiele doniesień mówi o związku BMI i MetS z rozwojem i progresją GEP-NETs. U pacjentów otyłych wykazano zwiększone ryzyko wystąpienia rakowiaka [620,621]. Według Zhan i wsp. [622] BMI było istotnie wyższe u pacjentów z insulinoma w porównaniu do grupy kontrolnej. Cherenfant i wsp. [623] nie wykazali związku BMI z ryzykiem przerzutów odległych i zgonem z powodu pNETs. Jednak w wielu badaniach potwierdzono ochronną rolę wyższego BMI, co u mężczyzn wiązało się z mniejszym ryzykiem rozwoju NETs żołądka, jelita cienkiego, trzustki i płuca, a u kobiet NETs jelita cienkiego [624]. Według niektórych danych, zwiększone BMI było związane z opóźnieniem progresji NETs, ze zmniejszoną śmiertelnością i dłuższym czasem przeżycia [625–627]. Inne badania wskazują jednakże, że to pacjenci z niższym BMI mają dłuższe przeżycie całkowite oraz dłuższy czas wolny od progresji [628]. Niezależnym czynnikiem ryzyka GEP-NETs, głównie pNETs, jest natomiast cukrzyca typu 2, co zostało potwierdzone w 3 niezależnych badaniach [466,629,630].

Leptyna u osób otyłych funkcjonuje jako adipokina prozapalna i jest związana z niektórymi typami nowotworów. Wyższe stężenie krążącej leptyny lub ekspresja jej receptora w nowotworach może stanowić niekorzystny czynnik prognostyczny [631]. Odnotowano związek leptyny z ryzykiem gruczolaka przełyku u osób otyłych [632]. Zwiększona wielkość adipocytów okołoguzowych wiązała się ze zwiększonym wydzielaniem leptyny, angiogenezą oraz przerzutami do węzłów chłonnych [633]. Podobnie w przypadku

raka żołądka, wyższe uwalnianie leptyny korelowało dodatnio ze stadiem choroby, z przerzutami oraz z gorszym przeżyciem [634]. W niniejszej pracy istotny spadek stężenia leptyny odnotowano wyłącznie w grupie pacjentów z o-NENs w porównaniu z grupą kontrolną. Dodatkowo należy wskazać, że BMI pacjentów z o-NENs było wyższe w porównaniu z osobami zdrowymi. Wykazano, iż CgA, która jest znanym markerem NENs może hamować uwalnianie leptyny w GEP-NENs, natomiast insulina może zwiększać produkcję leptyny w tkance tłuszczowej [631,635]. Kerenidi i wsp. [636] wykazali, że stężenie leptyny w raku płuca było niższe w porównaniu z grupą kontrolną, jednak pacjenci ci mieli również krótszy czas przeżycia, a analiza wieloczynnikowa wykazała, że poziom leptyny jest niezależnym czynnikiem prognostycznym.

Rezystyna to adipokina odgrywająca rolę w rozwoju IR w stanie otyłości. Silnie prozapalna, u ludzi jest syntetyzowana głównie przez makrofagi [637]. Badania molekularne sugerują, że odgrywa rolę w proliferacji, przerzutach, angiogenezie, zapaleniu, a także w regulacji metabolizmu w komórkach nowotworowych [426]. Jej podwyższony poziom w surowicy odnotowano u pacjentów z rakiem piersi, chłoniakiem, rakiem płaskonabłonkowym przełyku, gruczolakorakiem endometrium, rakiem żołądka i jelita grubego [426]. Zwiększone stężenie rezystyny w raku piersi było istotnie związane z markerami nowotworowymi i zapalnymi, wielkością guza, stopniem zaawansowania nowotworu, stadiem i zajęciem węzłów chłonnych, co może czynić ją markerem prognostycznym [638]. Jednak w niniejszym badaniu u pacjentów z NENs wykazano istotny statystycznie spadek stężenia rezystyny we wszystkich grupach pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną, co nie pokrywa się z jej prokarcynogenną funkcją. Podobne wyniki w przypadku pNETs otrzymała grupa naukowców prowadząca badania na transgenicznym mysim modelu pNET RipTag2 [639]. W badaniu tym zaobserwowano, że zahamowanie produkcji cytokin i chemokin poprawia przeżywalność myszy oraz zapobiega progresji pNETs. W porównaniu do grupy kontrolnej doszło do spadku stężenia rezystyny, glukagonu, GIP, GLP-1, insuliny, leptyny i PP. Wyniki te wskazują, że występowanie inhibitora szlaków sygnalizacyjnych indukujących zapalenie i wzmagających uwalnianie czynników zapalnych może zmienić kierunek działania adipokin. Niewątpliwie dalsze badania są niezbędne do poznania roli rezystyny w NENs.

Wisfatyna jest wielofunkcyjna i odgrywa kluczową rolę w promowaniu progresji raka, poprzez proliferację komórek rakowych, angiogenezę, przerzuty i lekooporność [411].

W niniejszym badaniu pacjenci z NENs, bez względu na lokalizację, mieli istotnie podwyższone stężenie tej adipokiny. Jest to zgodne z danymi literaturowymi. W wielu nowotworach, m.in. w raku nerkowokomórkowym, raku płaskonabłonkowym płuca, gruczolakoraku żołądka, gruczolakoraku trzustki, guzie chromochłonnym, czy raku tarczycy wydzielanie wisfatyny było zwiększone i w wielu przypadkach korelowało z zaawansowanym stadium nowotworu i przerzutami, co stanowi o jej niewątpliwej roli w karcynogenezie [411,640]. Sawicka-Gutaj i wsp. [641] w swoich badaniach dowiedli, iż pacjenci z rakiem kory nadnerczy mają znacznie wyższe stężenie wisfatyny w surowicy krwi i stwierdzili również, że im bardziej zaawansowany nowotwór, tym istotnie wyższy poziom tej adipokiny. Na tej podstawie można wnioskować, że wisfatyna może być potencjalnym markerem predykcji ryzyka progresji guzów nadnerczy [641].

Omentyna-1 jako jedyna z badanych adipokin ma właściwości przeciwzapalne, przeciwutleniające i przeciwapoptotyczne [642]. W niniejszej pracy stężenie tego hormonu było istotnie wyższe u pacjentów z NENs bez względu na lokalizację, a także u pacjentów z guzami w takich lokalizacjach jak pNENs, GI-NENs oraz L-NENs w porównaniu z grupą kontrolną, co może mieć znaczenie prognostyczne. Fazeli i wsp. [643] wykazali rolę omentyny-1 w raku jelita grubego. Przebadano 39 pacjentów z rakiem jelita grubego i 30 osób zdrowych. Stężenie omentyny-1 było istotnie wyższe u chorych w porównaniu z grupą kontrolną, niezależnie od występowania otyłości [643]. Inne badania Aleksandrova i wsp. [644] dowiodły, że omentyna-1 może być niezależnym predyktorem ryzyka raka jelita grubego, jednak przyczyna wysokiego stężenia tej adipokiny u tych pacjentów nie jest znana. Należy zaznaczyć, że w tych badaniach dodatni związek omentyny-1 utrzymywał się u pacjentów z BMI<30 kg/m², sugerując potencjalną interakcję ze stanem otyłości [644]. Analiza roli omentyny-1 w raku nerkowokomórkowym dostarczyła informacji o ujemnej korelacji między stężeniem omentyny-1 a BMI, co może wskazywać, że BMI był głównym czynnikiem wpływającym na poziom tej adipokiny [645]. Natomiast badania Tahmasebpour i wsp. [646] dowiodły, iż stężenie omentyny-1 w surowicy było istotnie niższe u pacjentów z rakiem piersi w porównaniu z osobami zdrowymi. Omentyna-1 była istotnie wyższa w stopniu I raka w porównaniu do stopnia II i III. Omówione badania dostarczają informacji o omentynie-1, której rola w raku jest kontrowersyjna i może dotyczyć funkcji pronowotworowej, jak i roli w szlakach antyonkogennych [646]. Wątpliwości te wynikają z zaobserwowanych różnych poziomów omentyny-1 w różnych rodzajach raka, mianowicie jej stężenie jest podwyższone

w przewlekłym i ostrym zapaleniu trzustki, raku gruczołu krokowego i jelita grubego, natomiast zmniejszone u pacjentów z rakiem piersi, pęcherza moczowego i nerki [645–648].

4. Analiza parametrów stanu zapalnego w nowotworach neuroendokrynnych o różnej lokalizacji

W szeregu badań wykazano, iż układ immunologiczny wywiera zarówno pozytywny, jak i negatywny wpływ na proces nowotworzenia, a mikrośrodowisko zapalne stanowi niezbędny składnik guza, który został powiązany również z rozwojem i progresją NENs [649,650]. Według badań Yu i wsp. [651] pacjenci z nieswoistym zapaleniem jelita mieli dwukrotnie wyższe ryzyko wystąpienia guzów neuroendokrynnych. Ze względu na wysokie unaczynienie NENs, można postulować, że czynniki angiogenne, takie jak VEGF, bFGF, PDGF, TGF- β , czy SDF-1 α + β , mają prawdopodobnie duży wkład w progresję i angiogenezę w tym typie nowotworów. W niniejszym badaniu wszystkie z wymienionych wyżej czynników proangiogennych poza SDF1 α + β były istotnie statystycznie zwiększone w grupie pacjentów z NENs, pNENS, GI-NENs, L-NENs oraz o-NENs w porównaniu z grupą kontrolną. W przypadku czynnika bFGF nie wykazano istotności statystycznej w populacji L-NENs, co potwierdzają również niektóre dane literaturowe [652]. Wśród analizowanych chemokin, wykazano istotne statystycznie zmiany również w przypadku innych czynników proangiogennych, w tym GRO- α (CXCL1), MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5), a także czynników angiostatycznych, takich jak CTACK (CCL27), eotaksyny, MCP-3 (CCL7), MIG (CXCL9) i MIP-1 α (CCL3). Stężenie proangiogennej SDF1 α + β (CXCL12) było istotnie statystycznie obniżone w populacji ogólnej NENs bez względu na lokalizację w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie MIP-1 β (CCL4) było istotnie obniżone w trzech grupach (NENs, pNEN, GI-NENs), natomiast dla IP-10 (CXCL10) nie wykazano żadnej istotnej zmiany w porównaniu z grupą kontrolną.

Jednym z najsilniejszych czynników indukujących angiogenezę jest VEGF [653]. Pavel i wsp. [652] na podstawie badań na grupie pacjentów z NENs trzustki, jelita krętego oraz rakowiakiem oskrzeli wykazali istotny statystycznie wzrost stężenia VEGF w porównaniu z grupą kontrolną. Poziom VEGF był znacząco wyższy u pacjentów z progresją choroby w porównaniu z pacjentami z chorobą stabilną. Takich zmian nie dostrzeżono, porównując poziom czynnika w grupie kontrolnej z grupą pacjentów z chorobą stabilną. Co ciekawe

stężenie VEGF istotnie wzrastało wraz ze wzrostem guza, natomiast istotnie zmniejszało się w stabilnej chorobie bez względu na rodzaj zastosowanej terapii. VEGF sprzyja wzrostowi guza i dotyczy to głównie NENs niskiego stopnia, bardziej zróżnicowanych, ponieważ w guzach złośliwych proces ten jest niestały i heterogenny [127]. Paradoksem neuroendokrynnym jest fakt, iż w przypadku łagodnych pNENs wyższe stężenia VEGF rokują dobrze, ponieważ w pNENs gęstość naczyń stanowi o tempie różnicowania, a nie o agresywności guza [127,285]. W badaniu Pavela i wsp. [652] zaobserwowano ponadto, że stężenie IL-8 było istotnie statystycznie wyższe w grupie pacjentów z NENs oraz w grupie pacjentów z chorobą postępującą w porównaniu z grupą kontrolną oraz dowiedziono, iż interleukina ta może stanowić predyktor krótszego przeżycia. Wyniki te pozwalają zaproponować VEGF oraz IL-8 jako markery rokowania i kontroli terapii w NENs. Stężenie bFGF natomiast w tym badaniu nie korelowało ani ze wzrostem guza, ani z przeżyciem pacjentów [652]. PDGF-BB może stabilizować nowo powstałe naczynia [654]. W niniejszym badaniu wartość tego czynnika była istotnie niższa we wszystkich badanych grupach w porównaniu z grupą kontrolną. PDGF pochodzący z guza odpowiada przede wszystkim za angiogenezę, pośrednio wpływając na wzrost guza, proces metastazy i lekooporność [655]. Jednakże jego działanie autokryne odpowiada za modulowanie złośliwych fenotypów proliferacji komórek, przez co może promować nowotwór [655]. Dlatego niższe wartości PDGF mogą być korzystne dla NENs, a sam czynnik lub jego receptor może stanowić strategię terapeutyczną. Nadmierne uwalnianie GRO- α również może prowadzić do uszkodzenia tkanki, angiogenezy i nowotworzenia. Wyciszenie tej proangiogennej chemokiny skorelowane było z poziomem IL-6 i z IL-8 w ludzkich komórkach czerniaka [656]. Ponadto leczenie w raku jajnika skierowane na GRO- α i IL-8 zmniejszało potencjał przerzutowy guza [657].

Berkovic i wsp. [232] w swoich badaniach wykazali związek między TNF- α i IL-2, a indukcją GEP-NET. Ich wpływ wiązał się w znacznym stopniu z polimorfizmami pojedynczych nukleotydów dla tych cytokin i określono, że są czulszymi markerami zarówno dla funkcjonalnych, jak i niefunkcjonalnych GEP-NETs niż stosowana rutynowo CgA. Określono między innymi, że allel *TNF- α -308A* jest specyficzny tylko dla GI-NET jelita przedniego. Dowiedziono również, iż polimorfizmy w genach dla IL-6 oraz IL-1 β zaangażowane są w rozwój guzów neuroendokrynnych [232]. Stopień, w jakim wyżej wymienione cytokiny biorą udział w transformacji nowotworowej komórek neuroendokrynnych, zależy od rodzaju genotypu, a mianowicie obecność *IL-1 β -511/+3954 CTCC* oraz *IL-6-174 CG/GG* stanowi o zwiększonej

podatności na rozwój nieczynnych hormonalnie pNENs [288,658,659]. Z badań również wynika, iż nosiciele genotypu *IL-1β -511/+3954 CTCT* są narażeni na funkcjonalne pNENs [658]. Obserwacje te mogą przyczynić się do ułatwienia różnicowania pNETs funkcjonalnych od pNETs nieczynnych hormonalnie. Ustalenia Berkovica i wsp. [232] dotyczące polimorfizmów cytokin oraz ich zwiększonych stężeń w surowicy pacjentów sugerują możliwość modulowania nowotworzenia w GEP-NETs. Wykazano również, że podwyższony poziom IL-6 w surowicy jest ważnym biomarkerem niefunkcjonalnych pNETs [232]. Mahecic i wsp. [288] przeprowadzili analizę różnych cytokin w tkance nowotworowej. Potwierdzono, iż immunohistochemiczna ekspresja TNF- α zwiększona była w guzach o wysokim wskaźniku proliferacji, w guzach o wysokim stopniu złośliwości oraz dodatkowo korelowała ze śmiercią pacjenta. Większość GEP-NENs wykazywała wysoką ekspresję IL-6, choć pomiar ten nie był istotny statystycznie, natomiast ekspresja IL-1 β oraz IL-2 była zmniejszona. Schimmack i wsp. [660] wykazali u pacjentów z pNENs wzrost stężenia CRP wraz ze zwiększonym ogólnoustrojowym poziomem IL-6 oraz G-CSF, co wskazuje na złożoną odpowiedź zapalną. W niniejszym badaniu analizowane czynniki wzrostu: G-CSF, GM-CSF, HGF, M-CSF, β -NGF, SCF i SCGF- β wykazały istotny statystycznie wzrost stężenia w surowicy pacjentów z NENs w każdej lokalizacji w porównaniu z grupą kontrolną. SCF, G-CSF oraz β -NGF okazały się być jednymi z bardziej czułych markerów wśród badanych zmiennych, pozwalały na najlepsze rozróżnienie prawdziwie chorych pacjentów od osób zdrowych. Co ciekawe, wykazano, że modyfikacje w ekspresji β -NGF mogą przyczynić się do progresji NENs gruczołu krokowego, a jego blokowanie poprzez szlaki sygnalizacyjne znacząco hamowało różnicowanie tego nowotworu [661]. Sygnalizacja NGF jest zaangażowana w proliferację, przeżycie oraz migrację komórek raka piersi [662]. W liniach komórkowych rakowiaka trzustki NGF pełnił funkcje mitogenne, bez wpływu na skład komórkowy i ich fenotyp [663].

W niniejszym badaniu wykazano znaczący wzrost stężenia zarówno interleukin przeciwzapalnych (IL-4, IL-10), jak i prozapalnych (IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2Ra, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17A) we wszystkich grupach badanych w porównaniu z grupą kontrolną. Zaobserwowano również, że stężenia interleukin prozapalnych w porównaniu do interleukin przeciwzapalnych miały wyższe wartości. Stężenie IL-9 było istotnie statystycznie wyższe wyłącznie w przypadku grupy pNENs, a IL-18 w NENs, pNENs oraz o-NENs w porównaniu z grupą kontrolną. IL-2, IL-3, IL-12(p40), IL-12(p70) oraz IL-13 to interleukiny, dla których w niniejszym badaniu w większości przypadków zaobserwowano stężenia poniżej zakresu

wykrywalności testu, zarówno u osób chorych, jak i zdrowych. Jednak na uwagę zasługuje tutaj IL-2, która najwyższe istotne statystycznie stężenia osiągnęła w grupie pacjentów z pNENs oraz o-NENs w porównaniu z grupą kontrolną. IL-2 odgrywa rolę w regulacji układu neuroendokrynnego oraz w wydzielaniu hormonów w przewodzie pokarmowym [288]. IL-2 stanowi również środek do wywołania odpowiedzi przeciwnowotworowej w warunkach wzrostu i progresji nowotworu [649].

Inne cytokiny, których stężenie istotnie wzrastało w przebiegu wszystkich badanych NENs w porównaniu z grupą kontrolną, to IFN- α 2, IFN- γ , LIF, MIF oraz TNF- α . Natomiast stężenie proapoptotycznego TRAIL istotnie wzrosło w grupie pacjentów z NENs, pNENs, L-NENs oraz o-NENs w porównaniu z grupą osób zdrowych. W przypadku GI-NENs nie zaobserwowano takich zmian. Istotny spadek stężenia wystąpił w przypadku cytotoksycznej cytokiny TNF- β we wszystkich grupach badanych w porównaniu z grupą kontrolną. Brak jest doniesień dotyczących związku TNF- β z NENs, co wymaga dalszych badań ukierunkowanych na ten czynnik. Buhrmann i wsp. [664] udowodnili, iż czynnik ten indukuje porównywalną do TNF- α proliferację i inwazję komórek raka jelita grubego.

5. Analiza stężenia CgA w nowotworach neuroendokrynnych o różnej lokalizacji

W guzach neuroendokrynnych stwierdza się podwyższone stężenie CgA, co potwierdzają również wyniki niniejszej pracy. Wzrost stężenia CgA był istotny statystycznie w przypadku grupy pacjentów z NENs, pNENs oraz L-NENs w porównaniu z grupą kontrolną. Co interesujące, w przypadku grupy pacjentów z GI-NENs oraz o-NENs nie wykazano takich zmian, co sugeruje, że przydatność diagnostyczna tego markera jest dyskusyjna. Wartość odcięcia dla CgA równa 18,161 ng/ml umożliwiła rozróżnienie między grupą kontrolną a osobami chorymi z czułością 72% oraz swoistością 26%. Analiza przeprowadzona w niniejszej pracy wskazuje, że czułość CgA nie jest najwyższa spośród badanych zmiennych i może nie być to idealny parametr diagnostyczny dla NENs, jednakże badania innych naukowców stanowią o jego potencjale prognostycznym i predykcyjnym. Czuość CgA w NENs zależy od ogniska pierwotnego, stopnia zróżnicowania, zaawansowania choroby i wynosi 60-80% [665]. Najwyższe stężenie CgA w NENs obserwuje się w przypadku zespołu rakowiaka

oraz u chorych z przerzutami do wątroby [93]. W przypadku przerzutów pozawątrobowych nie zaobserwowano istotnego wzrostu poziomu CgA [93]. Podwyższony poziom CgA w NENs uwalniających ten peptyd może korelować z masą guza i z nawrotami, jest on uważany za marker złego rokowania i krótszego przeżycia w przypadku pacjentów z GEP-NENs [666,667]. Z przeglądu literatury wynika, iż średni poziom CgA w SCLC jest wyższy w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast w przypadku NENs oskrzeli, stężenie CgA jest niższe w porównaniu z innymi rodzajami NENs i, co ważne, może być porównywalne do wartości występujących w innych nienowotworowych jednostkach chorobowych [666]. Na podstawie badań Tsai i wsp. [668] wnioskuje się, iż CgA może być markerem predykcyjnym dla obciążenia guzem, dla całkowitego przeżycia i progresji guza w GEP-NETs. Analizując poziomy wyjściowe CgA oraz ich zmiany w trakcie obserwacji dostrzeżono, iż wyższe poziomy wyjściowe CgA wiązały się gorszym całkowitym przeżyciem, a wzrost stężenia CgA o więcej niż 40% w trakcie obserwacji wiąże się z większym prawdopodobieństwem wystąpienia progresji lub nawrotu choroby [668]. Wang i wsp. [669] poddali badaniu 145 pacjentów z GEP-NETs (GI-NENs – 63,4%, pNENs – 28,3%, o-NENs – 8,3%), wśród których byli również pacjenci po resekcji guza (pacjenci bez resztkowej lub nawrotowej choroby), a terapie ogólnoustrojowe obejmowały chemioterapię cytotoksyczną, leczenie SA i terapię celowaną. Stężenie CgA w surowicy było istotnie wyższe u pacjentów z GEP-NENs z aktywną chorobą w porównaniu z pacjentami po resekcji guza lub zdrowymi osobami. Rozróżnienie między osobami zdrowymi lub wolnymi od choroby, a pacjentami z aktywną chorobą umożliwiło określenie wartości odcięcia CgA na poziomie 95 ng/ml (czułość 51,2% , swoistość 87,5%). Ponadto pacjenci ze stężeniem CgA w surowicy wyższym niż 95 ng/ml mieli znacznie krótsze przeżycie w porównaniu z pacjentami ze stężeniem CgA niższym od tej wartości. Wykazano również istotnie wyższe stężenie CgA w przypadku rakowiaków i NENs w IV stadium zaawansowania [669]. W swoich badaniach Zhang i wsp. [670] wykazali istotnie wyższe stężenie CgA u pacjentów z NENs w porównaniu z grupą kontrolną. W badaniu tym, wykorzystującym metodę ELISA, wyznaczono punkt odcięcia 85,3 ng/ml (czułość 64,4%, swoistość 92,7%). Donica i wsp. [671] zaobserwowali istotnie wyższe stężenie CgA w GI-NENs oraz L-NENs. Oznaczenie wykonano testem ELISA i wyznaczono punkt odcięcia równy 18 U/L, przy czułości 71% i swoistości 87% [671]. Z kolei Zatelli i wsp. [672] określili stężenie CgA u 202 pacjentów z GEP-NETs za pomocą dwóch rodzajów testów (IRMA oraz ELISA). Za pomocą analizy krzywych ROC zidentyfikowali dla nich punkty odcięcia: IRMA: CgA=53 ng/ml (czułość 71,3%, swoistość 71%), ELISA: CgA=16 U/l

(czułość 84%, swoistość 85%). Dla pacjentów z przerzutami lub bez w przypadku testów IRMA i ELISA, czułość i swoistość wynosiły odpowiednio 57% i 63,3% oraz 55,6% i 71,4%. Stwierdzono niższe poziomy CgA u pacjentów z rozległymi przerzutami niż u pacjentów z przerzutami wyłącznie do wątroby. Badania te potwierdzają, że CgA nie jest na tyle czuły i swoisty, aby być skutecznym markerem w diagnostyce przesiewowej GEP-NETs. Może jednak być stosowany w monitorowaniu pacjenta, trzeba jednak podkreślić, że należałoby wykonać oznaczenie CgA tym samym testem, aby móc porównywać wyniki badań.

W niniejszym badaniu wykazano istnienie dodatniej korelacji szeregu parametrów, głównie zapalnych, ze stężeniem CgA, co może sugerować ich użyteczność zarówno w diagnostyce, jak i w obserwacji zmian, jakie zachodzą podczas progresji lub remisji choroby. W przypadku stężenia omentyny-1 natomiast zaobserwowano ujemną korelację z poziomem CgA, co może wynikać z opisanej wyżej dwojakiej roli, zarówno anty-, jak i pronowotworowej tej adipokiny. Należy wskazać, iż dostępne dane literaturowe potwierdzają, że CgA jest zaangażowana w stan zapalny i procesy autoimmunologiczne, a także jest modulatorem funkcji bariery śródbłonka i inhibitorem aktywacji komórek śródbłonka spowodowanej przez zapalne i proangiogenne cytokiny, co może mieć znaczenie w angiogenezie, stanie zapalnym i nowotworzeniu [666,673]. Sciola i wsp. [674] dowiedli, iż CgA korelowało dodatnio z TNF- α w surowicy pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelita, co może sugerować aktywację układu neuroendokrynnego w odpowiedzi na stan zapalny. Autorzy twierdzą, iż z klinicznego punktu widzenia przy wysokiej wartości CgA w nieswoistym zapaleniu jelita można podejrzewać rakowiaka, co wcale nie jest rzadkim przypadkiem [674]. Natomiast Zhang i wsp. [675] wykazali dodatnią korelację stężenia CgA z prokalcytoniną i CRP u pacjentów z zespołem ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej. Papalou i wsp. [676] stwierdzili dodatnią korelację CgA z CRP u pacjentów z NENs i zaobserwowali, że CRP ma znaczący wpływ na stopień zaawansowania choroby (wraz ze wzrostem stężenia CRP istnieje większe prawdopodobieństwo wystąpienia NENs z przerzutami niż bez przerzutów). Abdul i wsp. [677] wykazali, iż zarówno IL-1 α , jak i IL-1 β były nieobecne w dwóch liniach komórkowych raka neuroendokrynnego okrężnicy, przy jednoczesnym wysokim stężeniu CgA. Co ciekawe, IL-1 w raku okrężnicy o różnicowaniu zewnątrzwydzielniczym zmniejszała wydzielanie CgA i zwiększała stężenie antygenu karcynoembrionalnego (CEA, ang. *carcinoembryonic antigen*), co było związane ze złym rokowaniem. Jednakże inne badania sugerują, że IL-1 koreluje z rakiem neuroendokrynnym gruczołu krokowego [678]. Analiza parametrów korelujących

z CgA jest bardzo ważna, by wspomóc wartość diagnostyczną tego parametru oraz przyczynić się do szybkiej i skutecznej identyfikacji pacjentów z wysokim ryzykiem choroby przerzutowej w momencie wstępnej diagnozy. W wyniku współdzielania CgA z innymi peptydami bioaktywnymi istnieje wiele przyczyn wzrostu CgA, które nie są związane z NENs, co ogranicza jej czułość i swoistość w warunkach diagnostycznych [99].

6. Analiza krzywych ROC

W niniejszej pracy wyznaczenie krzywych ROC pozwoliło na wybór parametrów najlepiej spełniających kryteria markera dla NENs. Wybrano takie parametry, dla których wartość wskaźnika AUC wynosiła $\geq 0,9$, co świadczy o tym, że stanowią one silne markery fenotypu zapalnego w porównaniu z pozostałymi, które miały niższą wartość diagnostyczną. Analiza ta pozwoliła również na wyznaczenie dla danych parametrów punktów odcięcia, dzięki którym można rozróżnić osoby zdrowe od pacjentów z aktywną chorobą. Krzywe ROC zostały również wykorzystane do oceny czułości i swoistości diagnostycznej badanych zmiennych.

Wśród analizowanych parametrów istotnych statystycznie z $AUC \geq 0,9$ najlepszą czułość stwierdzono w przypadku MEL (99%), jednak nie wykazywała ona żadnej swoistości diagnostycznej (0,00%). Jest to parametr, z którym należy postępować ostrożnie ze względu na jego powszechne występowanie oraz plejotropową rolę nie tylko w wielu typach nowotworów, ale również w innych jednostkach chorobowych. MEL może blokować niekorzystną tendencję komórek do transformacji nowotworowej, czy progresji guza poprzez hamowanie wydzielania czynników wzrostu, takich jak IGF-1, HGF, PDGF, FGF, VEGF, indukowanie apoptozy poprzez dodatnią regulację genów supresorowych (np. *p53*), a ujemną protoonkogenów, a także przez działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne [356]. Warto podkreślić, iż niższy poziom MEL u osób pracujących w nocy zwiększa ryzyko zachorowania na raka [539]. Przeciwnowotworowe działanie MEL zwraca uwagę na jej potencjalne zastosowanie jako środka zapobiegawczego lub terapeutycznego w leczeniu nowotworów [356]. Pozostałe parametry o wysokiej czułości to TNF- β (93%), LIF (92%), IL-1 α (92%), IL-16 (92%), GIP (90%), TNF- α (90%), β -NGF (90%) oraz G-CSF (90%), jednak swoistość tych parametrów również była niewielka ($\leq 5\%$). Wyniki te wskazują, że na podstawie czułości można prawidłowo rozpoznać chorobę, gdy ona występuje, jednak niska swoistość nie

pozwała nam na weryfikację wyników prawdziwie ujemnych, czyli wykluczenie osób zdrowych. W przypadku GRO- α , czułość wynosiła 83%, a swoistość 11%, natomiast dla TNF- β , wartości te były odpowiednio równe 93% i 5%. Należy wskazać, że zmienne te, wykorzystane do modelu regresji, wykazywały najbardziej pożądane wartości pod względem czułości i swoistości, co świadczy o spójności wyników analizy.

7. Wzór predykcji nowotworów neuroendokrynych

W niniejszej pracy, na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono analizę regresji logistycznej, która pozwoliła na wyznaczenie wzoru predykcji NENs. Wzór ten wyznaczono na podstawie stężenia GRO- α i TNF- β , dwóch parametrów skrajnie rozróżniających tę grupę nowotworów. Jak wspomniano wyżej, GRO- α jest czynnikiem proangiogennym, wpływa na uszkodzenie tkanki i odgrywa rolę w rozwoju nowotworu. Stanowi zarówno czynnik wzrostu, jak i silny czynnik chemotaktyczny, biorący udział w gojeniu ran poprzez wpływ na migrację komórek i angiogenezę [679]. Jego ekspresja jest indukowana przez PDGF, wraz z którym może zwiększać namnażanie się komórek nowotworowych np. w przypadku glejaka [679,680]. Jego rolę związaną ze wzrostem guza pierwotnego, angiogenezą, proliferacją i rozwojem przerzutów opisano w wielu ludzkich nowotworach, m.in. w raku jelita grubego, piersi, pęcherza moczowego, żołądka czy w czerniaku [681]. TNF- β jest natomiast czynnikiem cytotoksycznym i wywiera kilka efektów na komórki, w tym na proces apoptozy, stymulację wzrostu, indukcję ekspresji ICAM-1, czy indukcję różnicowania komórek [682,683]. Fizjologiczna rola tego czynnika opiera się na kontroli rozwoju tkanki limfatycznej, wspomaganie kontaktu między limfocytami a ich środowiskiem oraz tworzenie tkanki limfatycznej [683]. Zaobserwowano, iż TNF- β bierze udział w odporności nowotworów i może hamować nowotworzenie, jednak niektóre badania wskazują również na jego rolę sprzyjającą procesowi nowotworowemu, np. w przypadku raka jelita grubego [664,683]. Interesującym się wydaje, że oznaczenie stężenia tych dwóch parametrów można wykorzystać do obliczenia prawdopodobieństwa wystąpienia NENs u pacjenta.

Z przeprowadzonej analizy wynika, iż GRO- α jest markerem pozytywnym, czyli wartości powyżej punktu odcięcia (>974,5 pg/ml) stanowią o chorobie pacjenta, natomiast TNF- β jest markerem negatywnym, czyli o chorobie mogą świadczyć wartości tego parametru poniżej

1092,13 pg/ml. Opracowany wzór określa prawdopodobieństwo wystąpienia NENs z dokładnością 94,5%. Istotnym jest, że w niniejszym badaniu model diagnostyczny NENs został skonstruowany na podstawie nieinwazyjnych krążących w krwiobiegu parametrów, co może znacznie ułatwiać weryfikację większej liczby pacjentów z tym typem nowotworów. Jednakże, aby zweryfikować stabilność i dokładność tego modelu, należałoby wykonać badania na większej grupie osób. Inni badacze również zajmowali się opracowaniem modeli ułatwiających diagnostykę NENs. Wang i wsp. [684] na podstawie wielowymiarowej analizy regresji logistycznej ustalili model predykcji insulinoma, który uwzględniał BMI, hemoglobinę glikowaną (HbA1c, ang. *hemoglobin A1c*), glukozę oraz C-peptyd. Wzór ma postać: $p = 7,399 + (0,310 \times \text{BMI}) - (1,851 \times \text{HbA1c}) - (1,467 \times \text{0-h glukoza w osoczu}) + (1,963 \times \text{0-h C-peptyd})$, gdzie 0-h to wartość pomiaru parametrów na czczo, przed wykonaniem testu obciążenia glukozą 75g. Optymalna wartość odcięcia wynosiła $-0,17$, o czułości - 89,2% i swoistości - 86,4%, co pokazało, że wartość $p \geq -0,17$ może być stosowana jako marker diagnostyczny do przewidywania insulinoma u pacjentów z hipoglikemią [684]. Torimoto i wsp. [685] wyznaczyli natomiast inny wskaźnik dla insulinoma, opierający się na wartościach glukozy na czczo (FGP, ang. *fasting plasma glucose*) oraz HbA1c. Wskaźnik ten był niższy u pacjentów z insulinoma w porównaniu z grupą kontrolną, a punkt odcięcia dla wskaźnika w celu rozpoznania insulinoma wynosił 447,1 z czułością 95%. Z kolei Geisler i wsp. [686] wyznaczyli wskaźnik diagnostyczny w NENs na podstawie modelu regresji logistycznej łącząc parametry IL-8, IL-10 oraz TNF w celu rozróżnienia pacjentów od grupy osób zdrowych. IL-8 oraz TNF były istotnie statystycznie podwyższone w grupie pacjentów, natomiast IL-10 wykazywała niższe stężenie w surowicy pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną, a wzór ustalony przez badaczy wyglądał następująco: $(0,098831 \times \text{TNF}) + (0,22409 \times \text{IL-8}) - (0,067070 \times \text{IL-10}) - 9565043$. Niewątpliwie kierunek badań dotyczący skonstruowania modelu pozwalającego skutecznie identyfikować pacjentów z NENs na podstawie badania stężenia kilku parametrów wydaje się być bardzo obiecujący ze względu na trudności diagnostyczne tego typu nowotworów.

8. Podsumowanie

Podsumowując, należy wskazać, że zarówno stres oksydacyjny, jak i stan zapalny oraz zaburzenia endokrynej funkcji tkanki tłuszczowej odgrywają kluczową rolę w nowotworzeniu w przypadku nowotworów neuroendokrynych. Ze względu na heterogenność badanej grupy nowotworów znalezienie wiarygodnego, uniwersalnego markera dla wszystkich badanych lokalizacji jest szczególnie trudne. Niewątpliwie na uwagę zasługuje mikrośrodowisko guza, które skupia w sobie wiele typów komórek, zarówno prawidłowych, jak i patologicznych oraz czynników, które regulują odpowiedź immunologiczną za pośrednictwem licznych szlaków sygnalizacyjnych. Stan zapalny w mikrośrodowisku guza jest charakterystyczny dla wszystkich guzów. Kierunek aktywacji układu odpornościowego, w stronę eliminacji komórek nowotworowych lub w stronę ich powstawania zależy od rodzaju i fenotypu komórek oraz profilu uwalnianych cytokin. Wiele badań naukowych potwierdziło udział cytokin jako czynników modyfikujących rozwój, progresję i rokowanie nowotworów. Elementem sprzyjającym utrzymywaniu się stanu zapalnego jest również otyłość i zwiększone uwalnianie ROS, czyli zaburzona równowaga oksydacyjno-antyoksydacyjna. Niniejsze badanie pokazuje, że w przebiegu NENs wiele parametrów prozapalnych wydzielanych jest w nadmiernej ilości, a aktywność enzymów antyoksydacyjnych ulega rozregulowaniu. Zauważono znaczny spadek stężenia MEL w NENs, co może stanowić o dużych niedoborach tego hormonu w tym typie nowotworów, być może niedoborach wtórnych. Potwierdzono, iż poszczególne parametry skorelowane z CgA i łącznie z nią oznaczane, mogłyby usprawnić diagnostykę NENs. Wiele parametrów wykazało się dużo wyższą czułością niż dotychczas stosowana CgA, co może stanowić o ich przydatności. Niniejsze badanie umożliwiło wskazanie wielu nowych parametrów, które mogą uczestniczyć w procesie diagnostycznym, a być może również rokowniczym lub terapeutycznym w przypadku NENs. Potrzeba jest jednak kolejnych badań potwierdzających ich udział nie tylko w rozpoznaniu, ale również w progresji choroby i odpowiedzi na terapię.

VI. Wnioski

Otrzymane wyniki stały się podstawą do sformułowania następujących wniosków:

1. W przebiegu nowotworów neuroendokrynych występuje szereg zaburzeń związanych ze zmianą równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, aktywacją stanu zapalnego oraz wydzielaniem adipokin przez tkankę tłuszczową.
2. Wzrost stężenia MDA w erytrocytach oraz w osoczu krwi pacjentów wskazuje na udział nasilonej peroksydacji lipidów w rozwoju i progresji nowotworów neuroendokrynych wszystkich lokalizacji.
3. Zaburzenie enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej było nasilone w przypadku nowotworów neuroendokrynych żołądkowo-jelitowych oraz trzustki w porównaniu z pozostałymi lokalizacjami, co wskazuje na odmienny wzorzec zmian w zakresie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej dla różnych NENs.
4. Wykazano znaczne niedobory melatoniny u pacjentów z nowotworami neuroendokrynymi, co może wskazywać na rolę tego hormonu w patogenezie nowotworów lub może być zjawiskiem wtórnym do procesu nowotworzenia.
5. W przebiegu nowotworów neuroendokrynych dochodzi do istotnego zaburzenia gospodarki węglowodanowej, o czym świadczy zmiana w profilu uwalnianych adipokin oraz parametrów diabetologicznych, co zostało potwierdzone dla pacjentów z NENs w przypadku wszystkich badanych lokalizacji.
6. Stwierdzono zaburzenie wydzielania licznych cytokin, chemokin i czynników troficznych, zarówno prozapalnych i proangiogennych, jak i przeciwzapalnych i przeciwingiennych, co potwierdza zasadniczy udział stanu zapalnego w NENs, przy czym wzorzec i nasilenie tych zmian były odmienne dla nowotworów o różnej lokalizacji.
7. Niniejsze badanie pozwoliło na wskazanie nowych parametrów, które mogłyby znaleźć potencjalne zastosowanie jako małoinwazyjne markery w procesie diagnostycznym, rokowniczym, czy też terapeutycznym nowotworów neuroendokrynych.
8. Wykazano, że chromogranina A, ze względu na czułość 72% i swoistość 26%, nie jest dostatecznie miarodajnym markerem, by stosować ją jako niezależny marker w diagnostyce nowotworów neuroendokrynych każdej lokalizacji. Jednakże

równoczesne oznaczanie innych parametrów skorelowanych ze stężeniem chromograniny A, takich jak GPx, GLP-1, M-CSF, GM-CSF, SCGF- β , HGF, GRO- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-2R α , IL-5, IL-9, IP-10, MIP-1 β , TNF- β , glukagon, leptyna, wisfatyna lub omentyna-1 mogłoby usprawnić diagnostykę NENs, w porównaniu z oznaczaniem każdego z tych parametrów osobno.

9. Parametry, takie jak melatonina, G-CSF, β -NGF, IL-16, TNF- α , IL-1- α , GIP, LIF i TNF- β , wykazują wysoką czułość (>90%) w diagnostyce nowotworów neuroendokrynych, jednakże ich swoistość jest bardzo niska ($\leq 5\%$).
10. Wyznaczony wzór predykcji dla nowotworów neuroendokrynych z zastosowaniem oznaczania stężenia GRO- α i TNF- β pozwala na określenie prawdopodobieństwa potwierdzenia lub wykluczenia nowotworów neuroendokrynych z dokładnością 94,5%.

VII. Streszczenie

Nowotwory neuroendokryne (NENs, ang. *neuroendocrine neoplasms*) stanowią niejednorodną grupę nowotworów, wywodzących się z rozsianego układu komórek neuroendokrynych. Oprócz etiologii genetycznej przyczyna NENs nie jest do końca znana. Najczęściej występują NENs żołądkowo-jelitowo-trzustkowe (GEP-NETs, ang. *gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*) i płuca. Nowotwory te stanowią duży problem diagnostyczny, ze względu na brak charakterystycznych objawów oraz swoistych markerów pomocnych w rozpoznaniu. Ich ostateczna diagnoza często ma miejsce na etapie zaawansowanej choroby lub w momencie procesu metastazy, co znacznie opóźnia skuteczną terapię i wiąże się z ryzykiem wystąpienia przerzutów. Wśród markerów niespecyficznych przydatnych w diagnostyce NENs wyróżnia się chromograninę A (CgA, ang. *chromogranin A*), enolazę swoistą dla neuronów (NSE, ang. *neuron-specific enolase*) oraz gonadotropiny, natomiast markery swoiste, to m.in. insulina, glukagon, gastryna, czy somatostatyna, które manifestują również obraz kliniczny w danym rodzaju NENs.

Celem niniejszej pracy było oznaczenie we krwi pacjentów z NENs o różnej lokalizacji oraz u osób zdrowych szeregu parametrów związanych ze stresem oksydacyjnym, aktywnością endokrynną tkanki tłuszczowej i stanem zapalnym oraz identyfikacja potencjalnych, nowych markerów diagnostycznych dla NENs.

Badaniem objęto 86 pacjentów z rozpoznaniem NENs, którzy byli pacjentami Centrum Onkologii im. Prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy. Pacjentów podzielono ze względu na lokalizację guza: trzustka – pNENs (n=22), przewód pokarmowy – GI-NENs (n=34), płuco – L-NENs (n=12), inna lokalizacja – o-NENs (n=18). Grupę kontrolną stanowiło 35 osób zdrowych. Kryteria wykluczenia pacjentów z NENs obejmowały inne nowotwory i choroby ostre i przewlekłe, natomiast osoby z grupy kontrolnej wykluczała z badania obecność chorób ostrych i przewlekłych (nowotwór, cukrzyca, otyłość), zaburzenia autoimmunologiczne i kardiometaboliczne. Materiał do badań stanowiła krew żylna pobrana jednorazowo, rano, na czczo przez wykwalifikowany personel. Do planowanych badań pobierano 9 ml krwi do probówki z antykoagulantem w celu izolacji osocza i erytrocytów oraz 9 ml krwi do probówki zawierającej aktywator wykrzepiania oraz żel separujący, z której pozyskiwano surowicę. Badania wykonano za zgodą Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera

w Bydgoszczy UMK w Toruniu: KB 423/2020. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, ang. *superoxide dismutase*), peroksydazy glutationowej (GPx, ang. *glutathione peroxidase*) oraz katalazy (CAT, ang. *catalase*) mierzono w erytrocytach, natomiast stężenie malonyldialdehydu (MDA, ang. *malondialdehyde*) oceniono zarówno w erytrocytach, jak i osoczu krwi. Do pomiaru w/w parametrów zastosowano metody spektrofotometryczne, pomiar kinetyczny. Stężenie CgA, melatoniny i omentyny-1 oznaczono za pomocą gotowych zestawów ELISA. Stężenie wybranych adipokin oraz szeregu parametrów stanu zapalnego oznaczono za pomocą gotowych, multipleksowych zestawów ELISA.

W ramach analizy statystycznej dla każdej grupy wyznaczona została średnia i błąd standardowy oraz mediana z pierwszym i trzecim kwartylem. Przeprowadzono również jednoczynnikową analizę wariancji testem ANOVA lub jej odpowiednikiem – testem Kruskala-Wallisa wśród czterech grup pacjentów z NENs. Wyznaczono współczynniki korelacji między wartościami CgA, a pozostałymi badanymi parametrami. Dla wybranych parametrów wykonano analizę umożliwiającą wykreślenie krzywych ROC (ang. *receiver operating characteristic*) wraz z punktami odcięcia, oraz czułością i swoistością zmiennych, a także wyznaczono wzór modelu regresji logistycznej pozwalający na wyznaczenie prawdopodobieństwa występowania choroby u pacjenta.

Zaobserwowano wzrost stężenia MDA w osoczu krwi pacjentów z NENs bez względu na lokalizację, a w przypadku stężenia MDA w erytrocytach istotna zmiana dotyczyła NENs, L-NENs oraz o-NENs w porównaniu z grupą kontrolną, co wskazuje, że w przebiegu NENs może dochodzić do nasilonego procesu peroksydacji lipidów. Aktywność SOD zmniejszyła się istotnie we wszystkich grupach badanych w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast nie odnotowano takich zmian w przypadku CAT. Aktywność GPx zwiększyła się znacząco w pNENs, natomiast w GI-NENs jej aktywność uległa obniżeniu w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie melatoniny było istotnie niższe we wszystkich grupach NENs.

W przypadku parametrów diabetologicznych różnice istotne statystycznie w grupie pacjentów z NENs dotyczyły stężenia glukozozależnego peptydu insulinotropowego (GIP, ang. *glucose-dependent insulinotropic peptide*), insuliny, glukagonu oraz inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1, ang. *plasminogen activator inhibitor*) w porównaniu z grupą kontrolną. Odnotowano również obniżone stężenie greliny w grupie pacjentów z L-NENs. Natomiast wśród badanych adipokin zaobserwowano wzrost stężenia wisfatyny oraz spadek stężenia rezystyny we wszystkich lokalizacjach NENs w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie

omentyny-1 wzrosło we wszystkich grupach poza o-NENs, natomiast poziom leptyny wykazał różnicę wyłącznie w przypadku grupy pacjentów z o-NENs. Stężenie CgA było istotnie statystycznie wyższe w przypadku NENs, pNENs oraz L-NENs.

Wśród parametrów stanu zapalnego o istotnym statystycznie wzroście stężenia we wszystkich grupach badanych w odniesieniu do grupy kontrolnej wyróżnia się CTACK (skórna chemokina przyciągająca limfocyty T, ang. *cutaneous T-cell-attracting chemokine*), eotaksynę, G-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów, ang. *granulocyte colony-stimulating factor*), GM-CSF (czynnik stymulujący tworzenie granulocytów i makrofagów, ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), GRO- α (onkogen regulowany wzrostem, ang. *growth regulated oncogene*), HGF (czynnik wzrostu hepatocytów, ang. *hepatocyte growth factor*), IFN- α 2, IFN- γ (ang. *interferone γ*), IL-1 α (IL, ang. *interleukin*), IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-2R α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-16, IL-17A, LIF (czynnik hamujący białaczkę, ang. *leukemia inhibitory factor*), MCP-1 (białko chemotaktyczne monocytów 1, ang. *monocyte chemotactic protein 1*), MCP-3, M-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów, ang. *macrophage colony stimulating factor*), MIF (czynnik hamujący migrację makrofagów, ang. *macrophage migration inhibitory factor*), MIG (monokina indukowana przez interferon γ , ang. *monokine induced by interferon- γ*), β -NGF (czynnik wzrostu nerwów β , ang. *nerve growth factor β*), RANTES (czynnik regulowany przez aktywację, ekspresja i wydzielanie przez prawidłowe limfocyty T, ang. *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*), SCF (czynnik komórek macierzystych, ang. *stem cell factor*), SCGF- β (czynnik wzrostu komórek macierzystych), ang. *stem cell growth factor*), TNF- α (czynnik martwicy nowotworu, ang. *tumor necrosis factor*), VEGF (czynnik wzrostu śródbłonna naczyń, ang. *vascular endothelial growth factor*), natomiast spadek stężenia dotyczył TNF- β oraz PDGF-BB (płytkopochodny czynnik wzrostu, ang. *platelet-derived growth factor*) w porównaniu z grupą kontrolną. Brak zmian istotnych statystycznie we wszystkich grupach badanych pacjentów dotyczył IL-13 oraz IP-10 (indukowane interferonem γ białko 10kDa, ang. *interferon γ -induced protein 10 kDa*).

Ponadto wykazano, iż istnieje dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem CgA a takimi parametrami stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego, jak GPx, GLP-1 (glukagonopodobny peptyd 1, ang. *glucagon-like peptide-1*), M-CSF, GM-CSF, SCGF- β , HGF, GRO- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-2R α , IL-5, IL-9, IP-10, MIP-1 β (makrofagowe białko zapalne 1 β , ang. *macrophage inflammatory protein 1 beta*), TNF- β , glukagon, leptyna, wisfatyna, natomiast w sposób ujemny z tą zmienną korelowała omentyna-1.

Analiza krzywych ROC (ang. *receiver operating characteristic*) pozwoliła na wskazanie najbardziej czułych i swoistych parametrów, które zostały użyte również do analizy regresji logistycznej w celu wyznaczenia wzoru prawdopodobieństwa wystąpienia choroby. Wzór stworzono na podstawie stężenia GRO- α oraz TNF- β , które skrajnie różnicują grupę nowotworów neuroendokrynych i dla których czułość i swoistość wynosiła odpowiednio 83% i 11% oraz 93% i 5%. Po weryfikacji krzywej ROC dla CgA, odnotowano, iż czułość dla tego parametru wynosi 72%, swoistość 26%.

Niniejsze badanie dowodzą, iż stres oksydacyjny, stan zapalny oraz zaburzona funkcja tkanki tłuszczowej biorą udział w przebiegu NENs. Zidentyfikowano parametry o większej czułości niż poziom CgA, które mogłyby uczestniczyć w procesie diagnostycznym, a być może również rokowniczym lub terapeutycznym w przypadku NENs. Zaobserwowane istotnie niższe stężenie melatoniny może sugerować jej wpływ na patogenezę nowotworów lub niedobory wtórne tego hormonu, związane z procesem nowotworzenia. Wyznaczony wzór predykcji dla NENs z zastosowaniem oznaczania stężenia GRO- α i TNF- β pozwala na potwierdzenie lub wykluczenie nowotworów z dokładnością 94,5%.

Niewątpliwie niezbędne są kolejne badania dotyczące udziału wskazanych nowych potencjalnych markerów NENs nie tylko w rozpoznaniu, ale również w progresji choroby i odpowiedzi na terapię.

Słowa kluczowe: adipokiny; nowotwory neuroendokryne; melatonina; stres oksydacyjny, stan zapalny

VIII. Summary

Neuroendocrine neoplasms (NENs) are a heterogeneous group of neoplasms originating from a disseminated system of neuroendocrine cells. Apart from the genetic etiology, the cause of NENs is not fully known.

The most common NENs include gastroenteropancreatic (GEP-NETs) and lungs (L-NENs) tumors. They are still a big diagnostic problem due to the lack of characteristic symptoms and specific markers helpful in their diagnosis. Their final diagnosis often takes place at the stage of advanced disease or at the time of metastasis, which significantly delays effective therapy and is associated with the risk of metastases. Among non-specific markers useful in the diagnosis of NENs, chromogranin A (CgA), neuron-specific enolase (NSE) and gonadotropins should be mentioned, while specific markers include insulin, glucagon, gastrin or somatostatin, which also manifest the clinical feature in a given type of NENs.

The aim of this study was to determine a number of parameters related to oxidative stress, endocrine function of adipose tissue and inflammation in the blood of patients with NENs of various locations and in healthy people, as well as to identify potential new diagnostic markers for NENs.

The study included 86 patients of the Oncology Center Prof. Franciszek Łukaszczyk in Bydgoszcz, Poland diagnosed with NENs of various locations (pancreas, gastrointestinal tract, lung, other locations). The patients were divided according to the tumor location: pancreas – pNENs (n=22), gastrointestinal tract – GI-NENs (n=34), lungs – L-NENs (n=12), other location – o-NENs (n=18). The control group consisted of 35 healthy people. The exclusion criteria for the NEN patients included other cancers and acute and chronic diseases, while the control group excluded the presence of acute and chronic diseases (cancer, diabetes, obesity), autoimmune and cardiometabolic disorders. The material for the study was venous blood samples collected once, in the morning, on an empty stomach by qualified personnel. For the planned tests, 9 ml of blood sample was collected into a tube with anticoagulant for the plasma and erythrocyte isolation, while 9 ml of blood sample was collected into a tube without anticoagulant, containing clotting activator and separating gel, for the serum isolation. The research was carried out with the consent of the Bioethics Committee at Collegium Medicum in Bydgoszcz of the Nicolaus Copernicus University in Toruń: KB 423/2020. Superoxide

dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) activities were measured in erythrocytes, while malonyldialdehyde (MDA) level was assessed in both the erythrocytes and blood plasma. Spectrophotometric methods and kinetic measurement were used to measure the above-mentioned parameters. CgA, melatonin and omentin-1 concentrations were determined using ready-made ELISA kits. The concentration of selected adipokines and a number of inflammatory parameters were determined using ready-made multiplex ELISA kits.

As a part of the statistical analysis, the mean and standard error, as well as the median with the first and third quartiles were determined for each group. A one-way ANOVA or its equivalent, the Kruskal-Wallis test, was also performed among four groups of NEN patients with NENs. Correlation coefficients between the CgA values and the other parameters were determined. For the selected parameters, an analysis was performed to plot the ROC (receiver operating characteristic) curves with cut-off points, as well as the sensitivity and specificity of the variables, and a logistic regression model was determined to determine the probability of the disease.

Increased plasma MDA concentration in the NEN patients was observed, regardless of the location. In the case of the erythrocytic MDA concentration, a significant change concerned NENs, L-NENs and o-NENs compared to the control group, which indicates that an increased lipid peroxidation process accompanies the course of NENs. The SOD activity decreased significantly in all study groups compared to the control group, while no changes were noted in the case of CAT. The GPx activity increased significantly in pNENs, while, in GI-NENs, its activity decreased compared to the control group. Melatonin concentration was significantly lower in all groups of NENs.

In the case of diabetic parameters, statistically significant differences in the group of patients with NENs concerned the concentration of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP), insulin, glucagon and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) compared to with the control group. A decreased concentration of ghrelin was noted in the group of patients with L-NENs. However, among the tested adipokines, an increase in the concentration of visfatin and a decrease in the concentration of resistin were observed in all locations of NENs compared to the control group. The concentration of omentin-1 increased in all groups except for o-NENs, while the level of leptin showed a difference only in the group of patients with o-NENs. The CgA concentration was statistically significantly higher in NENs, pNENs and L-NENs.

Among the parameters of inflammation, a statistically significant increase in the concentration of the following parameters was observed in all tested groups in relation to the control group: CTACK (cutaneous T-cell-attracting chemokine), eotaxin, G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), GRO- α (growth regulated oncogene), HGF (hepatocyte growth factor), IFN- α 2, IFN- γ (Interferone γ), IL-1 α (IL), IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-2R α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-16, IL-17A, LIF (leukemia inhibitory factor), MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1), MCP-3, M-CSF (macrophage colony stimulating factor), MIF (macrophage migration inhibitory factor), MIG (monokine induced by interferon- γ), β -NGF (nerve growth factor β), RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted), SCF (factor stem cell factor), SCGF- β (stem cell growth factor), TNF- α (tumor necrosis factor), VEGF (vascular endothelial growth factor). In turn, the decrease in the concentration of TNF- β and PDGF-BB (platelet-derived growth factor) was observed in all tested groups compared to the control group. There were no statistically significant changes in IL-13 and IP-10 (interferon γ -induced protein 10 kDa levels in all groups of patients.

In addition, a positive correlation between the concentration of CgA and such parameters of oxidative stress and inflammation as GPx, GLP-1 (glucagon-like peptide-1), M-CSF, GM-CSF, CGF- β , HGF, GRO- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-2R α , IL-5, IL-9, IP-10, MIP-1 β (macrophage inflammatory protein 1 beta), TNF- β , glucagon, leptin, visfatin, was shown, while the omentin-1 level was negatively correlated with the concentration of CgA.

The analysis of the ROC curves allowed to indicate the most sensitive and specific parameters, which were also used for the logistic regression analysis in order to determine the disease probability pattern. The formula was created based on the concentration of GRO- α and TNF- β , which allowed for the extreme differentiation the groups of NENs. The sensitivity and specificity for GRO- α and TNF- β were 83% and 11% and 93% and 5%, respectively. Verifying the ROC curve for CgA, it was noted that the sensitivity for this parameter was 72%, and the specificity was 26%.

The results of the study indicate that oxidative stress, inflammation and impaired adipose tissue function are involved in the course of NENs. Parameters with greater sensitivity than the CgA level, which could be used as markers in the diagnostics and maybe also in the prognosis or therapeutic process of NENs, were identified. The observed significantly lower concentration of melatonin may suggest its influence on the cancer pathogenesis or its

secondary deficiencies associated with the process of carcinogenesis. The predictive formula for NENs determined with the use of GRO- α and TNF- β concentrations allows for the confirmation or exclusion of those neoplasms with an accuracy of 94.5%.

Undoubtedly, further research is needed on the role of the indicated new potential NEN markers not only in the diagnosis, but also in the progression of the disease and response to therapy.

Keywords: adipokine; inflammation; melatonin; neuroendocrine tumors; oxidative stress

IX. Spis Tabel

Tab. 1. Klasyfikacja guzów żołądkowo-jelitowo-trzustkowych (GEP-NETs) na podstawie stopnia złośliwości według IARC WHO z 2019 roku.

Tab. 2. Rola wybranych czynników stanu zapalnego w procesie nowotworzenia.

Tab. 3. Antropometryczne i kliniczne dane pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (NENs) oraz zdrowych ochotników (grupa kontrolna).

Tab. 4. Antropometryczne i kliniczne dane pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi trzustki (pNENs), przewodu pokarmowego (GI-NENs), płuca (L-NENs) oraz innych lokalizacji (o-NENs).

Tab. 5. Parametry diabetologiczne i zapalne zawarte w zestawach Bio-Plex Pro Human Diabetes - 10-plex Panel oraz w Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel 48-plex firmy BIO-RAD.

Tab. 6. Parametry antropometryczne o statystycznym rozkładzie normalnym oraz testy nieparametryczne analizowane w grupie wszystkich pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (grupa badana, NENs), a także u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi trzustki (pNENs), układu pokarmowego (GI-NENs), płuca (L-NENs) oraz innych lokalizacji (o-NENs) w odniesieniu do osób zdrowych (grupa kontrolna, Ctrl).

Tab. 7. Parametry stresu oksydacyjnego o statystycznym rozkładzie normalnym oraz testy nieparametryczne analizowane w grupie wszystkich pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (grupa badana, NENs), a także w grupie pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi trzustki (pNENs), układu pokarmowego (GI-NENs), płuca (L-NENs) oraz innych lokalizacji (o-NENs) w odniesieniu do osób zdrowych (grupa kontrolna, Ctrl).

Tab. 8. Parametry diabetologiczne o statystycznym rozkładzie normalnym oraz testy nieparametryczne analizowane w grupie wszystkich pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (grupa badana, NENs), a także u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi trzustki (pNENs), układu pokarmowego (GI-NENs), płuca (L-NENs) oraz innych lokalizacji (o-NENs) w odniesieniu do osób zdrowych (grupa kontrolna, Ctrl).

Tab. 9. Stężenia adipokin oraz chromograniny A o statystycznym rozkładzie normalnym oraz testy nieparametryczne analizowane w grupie wszystkich pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (grupa badana, NENs), a także u pacjentów z nowotworami

neuroendokrynnymi trzustki (pNENs), układu pokarmowego (GI-NENs), płuca (L-NENs) oraz innych lokalizacji (o-NENs) w odniesieniu do osób zdrowych (grupa kontrolna, Ctrl).

Tab. 10. Parametry stanu zapalnego o statystycznym rozkładzie normalnym oraz testy nieparametryczne analizowane w grupie wszystkich pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi (grupa badana, NENs), a także u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi trzustki (pNENs), układu pokarmowego (GI-NENs), płuca (L-NENs) oraz innych lokalizacji (o-NENs) w odniesieniu do osób zdrowych (grupa kontrolna, Ctrl).

Tab. 11. Korelacje badanych zmiennych z chromograniną A.

X. Spis Rycin

Ryc. 1. Schemat podziału nowotworów neuroendokrynych (NENs) za względu na czynność hormonalną, pochodzenie embrionalne oraz lokalizację guza.

Ryc. 2. Wzór do wyznaczenia wskaźnika masy ciała BMI.

Ryc. 3. Test immunologiczny typu kanapkowego wykorzystywany w systemie Bio-Plex.

Ryc. 4. Przebieg oznaczeń z zastosowaniem multipleksowych zestawów ELISA (test immunoenzymatyczny).

Ryc. 5. Wykres skrzynkowy dla BMI u pacjentów z nowotworami neuroendokrynymi (NENs) o różnych lokalizacjach oraz wyniki testu post-hoc U Manna-Whitneya.

Ryc. 6. Wykres skrzynkowy dla GPx u pacjentów z nowotworami neuroendokrynymi (NENs) o różnych lokalizacjach oraz test post-hoc U Manna-Whitneya.

Ryc. 7. Wykres skrzynkowy dla greliny u pacjentów z nowotworami neuroendokrynymi (NENs) o różnych lokalizacjach oraz test post-hoc U Manna-Whitneya.

Ryc. 8. Krzywa ROC dla melatoniny.

Ryc. 9. Krzywa ROC dla SCF (czynnik komórek macierzystych).

Ryc. 10. Krzywa ROC dla G-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów).

Ryc. 11. Krzywa ROC dla β -NGF (czynnik wzrostu nerwów β).

Ryc. 12. Krzywa ROC dla IL-16 (interleukina 16).

Ryc. 13. Krzywa ROC dla MCP-1 (białko chemotaktyczne monocytów).

Ryc. 14. Krzywa ROC dla IL-2R α (podjednostka α receptora dla interleukiny 2).

Ryc. 15. Krzywa ROC dla TNF- α (czynnik martwicy nowotworu α).

Ryc. 16. Krzywa ROC dla MIF (czynnik hamujący migrację makrofagów).

Ryc. 17. Krzywa ROC dla IL-1 α (interleukina 1 α).

Ryc. 18. Krzywa ROC dla GIP (glukozozależny peptyd insulinotropowy).

Ryc. 19. Krzywa ROC dla IL-4 (interleukina 4).

Ryc. 20. Krzywa ROC dla LIF (czynnik hamujący białaczkę).

Ryc. 21. Krzywa ROC dla TNF- β (czynnik martwicy nowotworu β).

Ryc. 22. Krzywa ROC dla IL-1ra (antagonista receptora interleukiny 1).

Ryc. 23. Krzywa ROC dla IL-1 β (interleukina 1 β).

Ryc. 24. Krzywa ROC dla IL-15 (interleukina 15).

Ryc. 25. Krzywa ROC dla IL-7.

Ryc. 26. Krzywa ROC dla IL-8.

Ryc. 27. Krzywa ROC dla IL-6.

Ryc. 28. Krzywa ROC dla GRO- α .

Ryc. 29. Krzywa ROC dla M-CSF.

Ryc. 30. Krzywa ROC dla CTACK.

Ryc. 31. Krzywa ROC dla SCGF- β .

Ryc. 32. Krzywa ROC dla IFN- α 2.

Ryc. 33. Trójwymiarowy wykres zależności zmiennych TNF- β (czynnik martwicy nowotworu β) i GRO- α (onkogen regulowany wzrostem).

XI. Piśmiennictwo

1. Trofimiuk-Müldner, M.; Lewkowicz, E.; Wysocka, K.; Pach, D.; Kiełtyka, A.; Stefańska, A.; Sowa-Staszczak, A.; Tomaszewska, R.; Hubalewska-Dydejczyk, A. Epidemiologia Nowotworów Neuroendokrynych Układu Pokarmowego w Krakowie i Powiecie Krakowskim w Latach 2007-2011. *Endokrynol. Pol.* **2017**, *68*, 42–46, doi:10.5603/EP.2017.0006.
2. Modlin, I.M.; Shapiro, M.D.; Kidd, M. Siegfried Oberndorfer: Origins and Perspectives of Carcinoid Tumors. *Hum. Pathol.* **2004**, *35*, 1440–1451, doi:10.1016/j.humpath.2004.09.018.
3. Díez, M.; Teulé, A.; Salazar, R. Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors: Diagnosis and Treatment. *Ann. Gastroenterol.* **2013**, *26*, 29–36.
4. Hauso, O.; Gustafsson, B.I.; Kidd, M.; Waldum, H.L.; Drozdov, I.; Chan, A.K.C.; Modlin, I.M. Neuroendocrine Tumor Epidemiology. *Cancer* **2008**, *113*, 2655–2664, doi:10.1002/cncr.23883.
5. Dasari, A.; Shen, C.; Halperin, D.; Zhao, B.; Zhou, S.; Xu, Y.; Shih, T.; Yao, J.C. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol.* **2017**, *3*, 1335, doi:10.1001/jamaoncol.2017.0589.
6. Grenader, T.; Pavel, M.E.; Ruszniewski, P.B.; Ćwikła, J.B.; Phan, A.T.; Raderer, M.; Sedláčková, E.; Cadiot, G.; Wolin, E.M.; Capdevila, J.; et al. Prognostic Value of the Neutrophil/Lymphocyte Ratio in Enteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Anticancer. Drugs* **2020**, *31*, 216–222, doi:10.1097/CAD.0000000000000909.
7. Yao, J.C.; Hassan, M.; Phan, A.; Dagohoy, C.; Leary, C.; Mares, J.E.; Abdalla, E.K.; Fleming, J.B.; Vauthey, J.N.; Rashid, A.; et al. One Hundred Years after “Carcinoid”: Epidemiology of and Prognostic Factors for Neuroendocrine Tumors in 35,825 Cases in the United States. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 3063–3072, doi:10.1200/JCO.2007.15.4377.
8. Mehrvarz Sarshekeh, A.; Gu, D.; Zhou, S.; Bo, Z.; Shen, C.; Dasari, A. Racial Differences in the Incidence and Survival of Patients with Neuroendocrine Tumors (NETs). *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, e16175–e16175, doi:10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e16175.
9. Taal, B.G.; Visser, O. Epidemiology of Neuroendocrine Tumours. *Neuroendocrinology*

- 2004**, *80*, 3–7, doi:10.1159/000080731.
10. Raphael, M.J.; Chan, D.L.; Law, C.; Singh, S. Principles of Diagnosis and Management of Neuroendocrine Tumours. *Cmaj* **2017**, *189*, E398–E404, doi:10.1503/cmaj.160771.
 11. Del Arco, C.D.; Sastre, J.; Peinado, P.; Díaz, Á.; Medina, L.O.; Fernández Aceñero, M.J. Neuroendocrine Neoplasms in Rare Locations: Clinicopathological Features and Review of the Literature. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **2018**, *22*, 308–315, doi:10.4103/ijem.IJEM-446-17.
 12. Das, S.; Dasari, A. Epidemiology, Incidence, and Prevalence of Neuroendocrine Neoplasms: Are There Global Differences? *Curr. Oncol. Rep.* **2021**, *23*, 43, doi:10.1007/s11912-021-01029-7.
 13. Fisseler-Eckhoff, A.; Demes, M. Neuroendocrine Tumors of the Lung. *Cancers (Basel)*. **2012**, *4*, 777–798, doi:10.3390/cancers4030777.
 14. Moran, C.A.; Suster, S.; Coppola, D.; Wick, M.R. Neuroendocrine Carcinomas of the Lung a Critical Analysis. *Am. J. Clin. Pathol.* 2009, *131*.
 15. Valente, M.; Catena, L.; Milione, M.; Pusceddu, S.; Formisano, B.; Bajetta, E. Common Diagnostic Challenges in the Histopathologic Diagnosis of Neuroendocrine Lung Tumors: A Case Report. *Case Rep. Oncol.* **2010**, *3*, doi:10.1159/000317313.
 16. Warren, W.H.; Gould, V.E.; Faber, L.P.; Kittle, C.F.; Memoli, V.A. Neuroendocrine Neoplasms of the Bronchopulmonary Tract. A Classification of the Spectrum of Carcinoid to Small Cell Carcinoma and Intervening Variants. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **1985**, *89*, 819–825.
 17. Lázaro, S.; Pérez-Crespo, M.; Lorz, C.; Bernardini, A.; Oteo, M.; Enguita, A.B.; Romero, E.; Hernández, P.; Tomás, L.; Morcillo, M.Á.; et al. Differential Development of Large-Cell Neuroendocrine or Small-Cell Lung Carcinoma upon Inactivation of 4 Tumor Suppressor Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116*, 22300–22306, doi:10.1073/pnas.1821745116.
 18. Frilling, A.; Åkerström, G.; Falconi, M.; Pavel, M.; Ramos, J.; Kidd, M.; Modlin, I.M. Neuroendocrine Tumor Disease: An Evolving Landscape. *Endocr. Relat. Cancer* **2012**, *19*, R163–R185, doi:10.1530/ERC-12-0024.
 19. Schimmack, S.; Svejda, B.; Lawrence, B.; Kidd, M.; Modlin, I.M. The Diversity and Commonalities of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Langenbeck's Arch. Surg.* **2011**, *396*, 273–298, doi:10.1007/s00423-011-0739-1.

20. Alwan, H.; La Rosa, S.; Andreas Kopp, P.; Germann, S.; Maspoli-Conconi, M.; Sempoux, C.; Bulliard, J. Incidence Trends of Lung and Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms in Switzerland. *Cancer Med.* **2020**, *9*, 9454–9461, doi:10.1002/cam4.3524.
21. Rossi, R.E.; Massironi, S. The Increasing Incidence of Neuroendocrine Neoplasms Worldwide: Current Knowledge and Open Issues. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 3794, doi:10.3390/jcm11133794.
22. Aluri, V.; Dillon, J.S. Biochemical Testing in Neuroendocrine Tumors. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2017**, *46*.
23. Gut, P.; Komarowska, H.; Czarnywojtek, A.; Waligórska-Stachura, J.; Bączyk, M.; Ziemnicka, K.; Fischbach, J.; Wrotkowska, E.; Ruchała, M. Familial Syndromes Associated with Neuroendocrine Tumours. *Współczesna Onkol.* **2015**, *3*, 176–183, doi:10.5114/wo.2015.52710.
24. Pavel, M.; Öberg, K.; Falconi, M.; Krenning, E.P.; Sundin, A.; Perren, A.; Berruti, A. Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, doi:10.1016/j.annonc.2020.03.304.
25. Halperin, D.M.; Shen, C.; Dasari, A.; Xu, Y.; Chu, Y.; Zhou, S.; Shih, Y.-C.T.; Yao, J.C. Frequency of Carcinoid Syndrome at Neuroendocrine Tumour Diagnosis: A Population-Based Study. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 525–534, doi:10.1016/S1470-2045(17)30110-9.
26. Jensen, R.T.; Cadiot, G.; Brandi, M.L.; De Herder, W.W.; Kaltsas, G.; Komminoth, P.; Scoazec, J.Y.; Salazar, R.; Sauvanet, A.; Kianmanesh, R. ENETS Consensus Guidelines for the Management of Patients with Digestive Neuroendocrine Neoplasms: Functional Pancreatic Endocrine Tumor Syndromes. *Neuroendocrinology* **2012**, *95*.
27. Rossi, R.E.; Elvevi, A.; Citterio, D.; Coppa, J.; Invernizzi, P.; Mazzaferro, V.; Massironi, S. Gastrinoma and Zollinger Ellison Syndrome: A Roadmap for the Management between New and Old Therapies. *World J. Gastroenterol.* **2021**, *27*.
28. Metz, D.C.; Jensen, R.T. Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors: Pancreatic Endocrine Tumors. *Gastroenterology* **2008**, *135*.
29. Metz, S.A.; McRae, J.R.; Robertson, R.P. Prostaglandins as Mediators of Paraneoplastic Syndromes: Review and up-Date. *Metabolism* **1981**, *30*.
30. Rubin de Celis Ferrari, A.C.; Glasberg, J.; Riechelmann, R.P. Carcinoid Syndrome: Update on the Pathophysiology and Treatment. *Clinics* **2018**, *73*.

31. Gade, A.K.; Olariu, E.; Douthit, N.T. Carcinoid Syndrome: A Review. *Cureus* **2020**, doi:10.7759/cureus.7186.
32. Hannah-Shmouni, F.; Stratakis, C.A.; Koch, C.A. Flushing in (Neuro)Endocrinology. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2016, *17*.
33. Liu, E.H.; Solorzano, C.C.; Katznelson, L.; Vinik, A.I.; Wong, R.; Randolph, G. AACE/ACE Disease State Clinical Review: Diagnosis and Management of Midgut Carcinoids. *Endocr. Pract.* 2015, *21*.
34. Vinik, A.I.; Gonin, J.; England, B.G.; Jackson, T.; McLeod, M.K.; Cho, K. Plasma Substance-P in Neuroendocrine Tumors and Idiopathic Flushing: The Value of Pentagastrin Stimulation Tests and the Effects of Somatostatin Analog. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1990**, *70*, doi:10.1210/jcem-70-6-1702.
35. Vinik, A.I.; Chaya, C. Clinical Presentation and Diagnosis of Neuroendocrine Tumors. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2016, *30*.
36. Naalla, R.; Konchada, K.; Kannappan, O.; Lingadakai, R. Duodenal Carcinoid with Carcinoid Syndrome. *BMJ Case Rep.* **2014**, doi:10.1136/bcr-2013-202159.
37. Mota, J.M.; Sousa, L.G.; Riechelmann, R.P. Complications from Carcinoid Syndrome: Review of the Current Evidence. *Ecancermedicalscience* 2016, *10*.
38. Ahmed, M. Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors in 2020. *World J. Gastrointest. Oncol.* 2020, *12*.
39. Ohe, M.R. von der; Camilleri, M.; Kvols, L.K.; Thomforde, G.M. Motor Dysfunction of the Small Bowel and Colon in Patients with the Carcinoid Syndrome and Diarrhea. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, doi:10.1056/nejm199310073291503.
40. Santra, A.; Dutta, P.; Pothal, S.; Manjhi, R. Misdiagnosed Case of Bronchial Carcinoid Presenting with Refractory Dyspnoea and Wheeze: A Rare Case Report and Review of Literature. *Malaysian J. Med. Sci.* **2013**, *20*.
41. Aggarwal, G.; Obideen, K.; Wehbi, M. Carcinoid Tumors: What Should Increase Our Suspicion? *Cleve. Clin. J. Med.* 2008, *75*.
42. Pellikka, P.A.; Tajik, A.J.; Khandheria, B.K.; Seward, J.B.; Callahan, J.A.; Pitot, H.C.; Kvols, L.K. Carcinoid Heart Disease: Clinical and Echocardiographic Spectrum in 74 Patients. *Circulation* **1993**, *87*, doi:10.1161/01.cir.87.4.1188.
43. Luis, S.A.; Pellikka, P.A. Carcinoid Heart Disease: Diagnosis and Management. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016, *30*.

44. Kvols, L.K.; Moertel, C.G.; O'Connell, M.J.; Schutt, A.J.; Rubin, J.; Hahn, R.G. Treatment of the Malignant Carcinoid Syndrome. Evaluation of a Long-Acting Somatostatin Analogue. *N. Engl. J. Med.* **1986**, *315*.
45. Condrón, M.E.; Jameson, N.E.; Limbach, K.E.; Bingham, A.E.; Sera, V.A.; Anderson, R.B.; Schenning, K.J.; Yockelson, S.; Harukuni, I.; Kahl, E.A.; et al. A Prospective Study of the Pathophysiology of Carcinoid Crisis. *Surg. (United States)* **2019**, *165*, doi:10.1016/j.surg.2018.04.093.
46. Kos-Kudła, B.; Hubalewska-Dydejczyk, A.; Kuśnierz, K.; Lampe, P.; Marek, B.; Nasierowska-Guttmejer, A.; Nowakowska-Duława, E.; Pilch-Kowalczyk, J.; Sowa-Staszczak, A.; Rosiek, V.; et al. Nowotwory Neuroendokrynne Trzustki — Zasady Postępowania (Rekomendowane Przez Polską Sieć Guzów Neuroendokrynnych). *Endokrynol. Pol.* **2014**, *64*, doi:10.5603/ep.2013.0031.
47. O'Toole, D.; Salazar, R.; Falconi, M.; Kaltsas, G.; Couvelard, A.; De Herder, W.W.; Hyrdel, R.; Nikou, G.; Krenning, E.; Vullierme, M.P.; et al. Rare Functioning Pancreatic Endocrine Tumors. In Proceedings of the Neuroendocrinology; 2006; Vol. 84.
48. Klöppel, G. Tumour Biology and Histopathology of Neuroendocrine Tumours. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007, *21*.
49. Modlin, I.M.; Lye, K.D.; Kidd, M. A 5-Decade Analysis of 13,715 Carcinoid Tumors. *Cancer* **2003**, *97*, doi:10.1002/cncr.11105.
50. Andreasi, V.; Partelli, S.; Muffatti, F.; Manzoni, M.F.; Capurso, G.; Falconi, M. Update on Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Dig. Liver Dis.* 2021, *53*.
51. Takayanagi, D.; Cho, H.; Machida, E.; Kawamura, A.; Takashima, A.; Wada, S.; Tsunoda, T.; Kohno, T.; Shiraishi, K. Update on Epidemiology, Diagnosis, and Biomarkers in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Cancers (Basel)*. 2022, *14*.
52. Nagtegaal, I.D.; Odze, R.D.; Klimstra, D.; Paradis, V.; Rugge, M.; Schirmacher, P.; Washington, K.M.; Carneiro, F.; Cree, I.A. The 2019 WHO Classification of Tumours of the Digestive System. *Histopathology* **2020**, *76*, 182–188, doi:10.1111/his.13975.
53. Rindi, G.; Klimstra, D.S.; Abedi-Ardekani, B.; Asa, S.L.; Bosman, F.T.; Brambilla, E.; Busam, K.J.; de Krijger, R.R.; Dietel, M.; El-Naggar, A.K.; et al. A Common Classification Framework for Neuroendocrine Neoplasms: An International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO) Expert Consensus Proposal. *Mod. Pathol.* **2018**, *31*, 1770–1786, doi:10.1038/s41379-018-0110-y.

54. Kos-Kudła, B.; Foltyn, W.; Malczewska, A.; Bednarczuk, T.; Bolanowski, M.; Borowska, M.; Chmielik, E.; Ćwikla, J.B.; Gisterek, I.; Handkiewicz-Junak, D.; et al. Update of the Diagnostic and Therapeutic Guidelines for Gastro-Entero-Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms (Recommended by the Polish Network of Neuroendocrine Tumours). *Endokrynol. Pol.* **2022**, *73*, 387–454, doi:10.5603/EP.a2022.0049.
55. Bałdys-Waligórska, A.; Nowak, A. Neuroendocrine Neoplasms of the Digestive System – Current Classification and Terminology. *Nowotwory* 2021, *71*.
56. Popa, O.; Taban, S.; Pantea, S.; Plopeanu, A.; Barna, R.; Cornianu, M.; Pascu, A.-A.; Dema, A.L. The New WHO Classification of Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors and Immunohistochemical Expression of Somatostatin Receptor 2 and 5. *Exp. Ther. Med.* **2021**, *22*, 1–9, doi:10.3892/etm.2021.10613.
57. Modlin, I.M.; Oberg, K.; Chung, D.C.; Jensen, R.T.; de Herder, W.W.; Thakker, R. V.; Caplin, M.; Delle Fave, G.; Kaltsas, G.A.; Krenning, E.P.; et al. Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumours. *Lancet Oncol.* **2008**, *9*, 61–72, doi:10.1016/S1470-2045(07)70410-2.
58. Vinik, A.I.; Silva, M.P.; Woltering, G.; W. Go, V.L.; Warner, R.; Caplin, M. Biochemical Testing for Neuroendocrine Tumors. *Pancreas* **2009**, *38*, 876–889, doi:10.1097/MPA.0b013e3181bc0e77.
59. Vinik, A.I.; Gonzales, M.R.C. New and Emerging Syndromes Due to Neuroendocrine Tumors. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2011**, *40*, 19–63, doi:10.1016/j.ecl.2010.12.010.
60. Pobłocki, J.; Jasińska, A.; Syrenicz, A.; Andrysiak-Mamos, E.; Szczuko, M. The Neuroendocrine Neoplasms of the Digestive Tract: Diagnosis, Treatment and Nutrition. *Nutrients* **2020**, *12*, 1–21, doi:10.3390/nu12051437.
61. Garcia-Carbonero, R.; Capdevila, J.; Crespo-Herrero, G.; Díaz-Pérez, J.A.; Martínez del Prado, M.P.; Alonso Orduña, V.; Sevilla-García, I.; Villabona-Artero, C.; Beguiristain-Gómez, A.; Llanos-Muñoz, M.; et al. Incidence, Patterns of Care and Prognostic Factors for Outcome of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors (GEP-NETs): Results from the National Cancer Registry of Spain (RGETNE). *Ann. Oncol.* **2010**, *21*, 1794–1803, doi:10.1093/annonc/mdq022.
62. Ewang-Emukowhate, M.; Nair, D.; Caplin, M. The Role of 5-Hydroxyindoleacetic Acid in Neuroendocrine Tumors: The Journey so Far. *Int. J. Endocr. Oncol.* **2019**, *6*, IJE17,

doi:10.2217/ije-2019-0001.

63. Deacon, A.C. The Measurement of 5-Hydroxyindoleacetic Acid in Urine. *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* **1994**, *31*, 215–232, doi:10.1177/000456329403100302.
64. Corcuff, J.-B.; Chardon, L.; El Hajji Ridah, I.; Brossaud, J. Urinary Sampling for 5HIAA and Metanephrines Determination: Revisiting the Recommendations. *Endocr. Connect.* **2017**, *6*, R87–R98, doi:10.1530/EC-17-0071.
65. Mashige, F.; Matsushima, Y.; Kanazawa, H.; Sakuma, I.; Takai, N.; Bessho, F.; Ohkubo, A. Acidic Catecholamine Metabolites and 5-Hydroxyindoleacetic Acid in Urine: The Influence of Diet. *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* **1996**, *33*, 43–49, doi:10.1177/000456329603300106.
66. Feldman, J.M.; Lee, E.M. Serotonin Content of Foods: Effect on Urinary Excretion of 5-Hydroxyindoleacetic Acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **1985**, *42*, 639–643, doi:10.1093/ajcn/42.4.639.
67. Tohmola, N.; Johansson, A.; Sane, T.; Renkonen, R.; Hämäläinen, E.; Itkonen, O. Transient Elevation of Serum 5-HIAA by Dietary Serotonin and Distribution of 5-HIAA in Serum Protein Fractions. *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* **2015**, *52*, 428–433, doi:10.1177/0004563214554842.
68. Potter, W.Z. Selective Antidepressants and Cerebrospinal Fluid. *Arch. Gen. Psychiatry* **1985**, *42*, 1171, doi:10.1001/archpsyc.1985.01790350045009.
69. Bajetta, E.; Ferrari, L.; Martinetti, A.; Celio, L.; Procopio, G.; Artale, S.; Zilembo, N.; Di Bartolomeo, M.; Seregni, E.; Bombardieri, E. Chromogranin A, Neuron Specific Enolase, Carcinoembryonic Antigen, and Hydroxyindole Acetic Acid Evaluation in Patients with Neuroendocrine Tumors. *Cancer* **1999**, *86*, 858–865, doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19990901)86:5<858::AID-CNCR23>3.0.CO;2-8.
70. Carling, R.; Degg, T.; Allen, K.; Bax, N.; Barth, J. Evaluation of Whole Blood Serotonin and Plasma and Urine 5-Hydroxyindole Acetic Acid in Diagnosis of Carcinoid Disease. *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* **2002**, *39*, 577–582, doi:10.1177/000456320203900605.
71. Tohmola, N.; Itkonen, O.; Sane, T.; Markkanen, H.; Joenväärä, S.; Renkonen, R.; Hämäläinen, E. Analytical and Preanalytical Validation of a New Mass Spectrometric Serum 5-Hydroxyindoleacetic Acid Assay as Neuroendocrine Tumor Marker. *Clin. Chim. Acta* **2014**, *428*, 38–43, doi:10.1016/j.cca.2013.10.025.
72. Kunz, P.L.; Reidy-Lagunes, D.; Anthony, L.B.; Bertino, E.M.; Brendtro, K.; Chan, J.A.;

- Chen, H.; Jensen, R.T.; Kim, M.K.; Klimstra, D.S.; et al. Consensus Guidelines for the Management and Treatment of Neuroendocrine Tumors. *Pancreas* **2013**, *42*, 557–577, doi:10.1097/MPA.0b013e31828e34a4.
73. Lindström, M.; Tohmola, N.; Renkonen, R.; Hämäläinen, E.; Schalin-Jäntti, C.; Itkonen, O. Comparison of Serum Serotonin and Serum 5-HIAA LC-MS/MS Assays in the Diagnosis of Serotonin Producing Neuroendocrine Neoplasms: A Pilot Study. *Clin. Chim. Acta* **2018**, *482*, 78–83, doi:10.1016/j.cca.2018.03.030.
74. Allen, K.R.; Degg, T.J.; Anthoney, D.A.; Fitzroy-Smith, D. Monitoring the Treatment of Carcinoid Disease Using Blood Serotonin and Plasma 5-Hydroxyindoleacetic Acid: Three Case Examples. *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* **2007**, *44*, 300–307, doi:10.1258/000456307780480936.
75. Eehalt, F.; Saeger, H.D.; Schmidt, C.M.; Grützmann, R. Neuroendocrine Tumors of the Pancreas. *Oncologist* **2009**, *14*, 456–467, doi:10.1634/theoncologist.2008-0259.
76. Savu, C.; Melinte, A.; Diaconu, C.; Stiru, O.; Gherghiceanu, F.; Tudorica, Ștefan; Dumitrașcu, O.; Bratu, A.; Balescu, I.; Bacalbasa, N. Lung Neuroendocrine Tumors: A Systematic Literature Review (Review). *Exp. Ther. Med.* **2021**, *23*, 176, doi:10.3892/etm.2021.11099.
77. Kanakis, G.; Kaltsas, G. Biochemical Markers for Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumours (GEP-NETs). *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2012**, *26*, 791–802, doi:10.1016/j.bpg.2012.12.006.
78. Gut, P.; Czarnywojtek, A.; Fischbach, J.; Bączyk, M.; Ziemnicka, K.; Wrotkowska, E.; Gryczyńska, M.; Ruchała, M. Chromogranin A – Unspecific Neuroendocrine Marker. Clinical Utility and Potential Diagnostic Pitfalls. *Arch. Med. Sci.* **2016**, *1*, 1–9, doi:10.5114/aoms.2016.57577.
79. Louthan, O. Chromogranin a in Physiology and Oncology. *Folia Biol. (Praha)*. **2011**, *57*, 173–181.
80. D'amico, M.A.; Ghinassi, B.; Izzicupo, P.; Manzoli, L.; Di Baldassarre, A. Biological Function and Clinical Relevance of Chromogranin A and Derived Peptides. *Endocr. Connect.* **2014**, *3*, R45–R54, doi:10.1530/EC-14-0027.
81. Ferrari, L.; Seregni, E.; Bajetta, E.; Martinetti, A.; Bombardieri, E. The Biological Characteristics of Chromogranin A and Its Role as a Circulating Marker in Neuroendocrine Tumours. *Anticancer Res.* **19**, 3415–3427.

82. Bargsten, G.; Grube, D. Serotonin Storage and Chromogranins: An Experimental Study in Rat Gastric Endocrine Cells. *J. Histochem. Cytochem.* **1992**, *40*, 1147–1155, doi:10.1177/40.8.1352316.
83. Boudreaux, J.P.; Klimstra, D.S.; Hassan, M.M.; Woltering, E.A.; Jensen, R.T.; Goldsmith, S.J.; Nutting, C.; Bushnell, D.L.; Caplin, M.E.; Yao, J.C. The NANETS Consensus Guideline for the Diagnosis and Management of Neuroendocrine Tumors. *Pancreas* **2010**, *39*, 753–766, doi:10.1097/MPA.0b013e3181ebb2a5.
84. Helle, K.B. The Granin Family of Uniquely Acidic Proteins of the Diffuse Neuroendocrine System: Comparative and Functional Aspects. *Biol. Rev.* **2004**, *79*, 769–794, doi:10.1017/S146479310400644X.
85. Stridsberg, M.; Eriksson, B.; Oberg, K.; Janson, E. A Comparison between Three Commercial Kits for Chromogranin A Measurements. *J. Endocrinol.* **2003**, *177*, 337–341, doi:10.1677/joe.0.1770337.
86. Maxwell, J.E.; O’Dorisio, T.M.; Howe, J.R. Biochemical Diagnosis and Preoperative Imaging of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **2016**, *25*, 171–194, doi:10.1016/j.soc.2015.08.008.
87. Atwell, T.D.; Charboneau, J.W.; Que, F.G.; Rubin, J.; Lewis, B.D.; Nagorney, D.M.; Callstrom, M.R.; Farrell, M.A.; Pitot, H.C.; Hobday, T.J. Treatment of Neuroendocrine Cancer Metastatic to the Liver: The Role of Ablative Techniques. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* **2005**, *28*, 409–421, doi:10.1007/s00270-004-4082-6.
88. Roche, A.; Girish, B. V.; de Baère, T.; Baudin, E.; Boige, V.; Elias, D.; Lasser, P.; Schlumberger, M.; Ducreux, M. Trans-Catheter Arterial Chemoembolization as First-Line Treatment for Hepatic Metastases from Endocrine Tumors. *Eur. Radiol.* **2003**, *13*, 136–140, doi:10.1007/s00330-002-1558-0.
89. Razzore, P.; Arnaldi, G. Circulating Neuroendocrine Tumors Biomarkers. Why? When? How? Suggestions for Clinical Practice from Guidelines and Consensus. *J. Cancer Metastasis Treat.* **2016**, *2*, 348, doi:10.20517/2394-4722.2016.39.
90. Welin, S.; Stridsberg, M.; Cunningham, J.; Granberg, D.; Skogseid, B.; Eriksson, B.; Janson, E.T. Elevated Plasma Chromogranin A Is the First Indication of Recurrence in Radically Operated Midgut Carcinoid Tumors. *Neuroendocrinology* **2009**, *89*, 302–307, doi:10.1159/000179900.
91. Jensen, E.H.; Kvols, L.; McLoughlin, J.M.; Lewis, J.M.; Alvarado, M.D.; Yeatman, T.;

- Malafa, M.; Shibata, D. Biomarkers Predict Outcomes Following Cytoreductive Surgery for Hepatic Metastases from Functional Carcinoid Tumors. *Ann. Surg. Oncol.* **2007**, *14*, 780–785, doi:10.1245/s10434-006-9148-z.
92. Tomassetti, P.; Migliori, M.; Simoni, P.; Casadei, R.; De lasio, R.; Corinaldesi, R.; Gullo, L. Diagnostic Value of Plasma Chromogranin A in Neuroendocrine Tumours. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2001**, *13*, 55–58, doi:10.1097/00042737-200101000-00010.
93. ARNOLD, R.; WILKE, A.; RINKE, A.; MAYER, C.; KANN, P.; KLOSE, K.; SCHERAG, A.; HAHMANN, M.; MULLER, H.; BARTH, P. Plasma Chromogranin A as Marker for Survival in Patients With Metastatic Endocrine Gastroenteropancreatic Tumors. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2008**, *6*, 820–827, doi:10.1016/j.cgh.2008.02.052.
94. Oladejo, A. Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors (GEP-NETs) - Approach to Diagnosis and Management. *Ann. Ibadan Postgrad. Med.* **2011**, *7*, 29–33, doi:10.4314/aipm.v7i2.64085.
95. Yang, X.; Yang, Y.; Li, Z.; Cheng, C.; Yang, T.; Wang, C.; Liu, L.; Liu, S. Diagnostic Value of Circulating Chromogranin a for Neuroendocrine Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–14, doi:10.1371/journal.pone.0124884.
96. Hsiao, R.J.; Mezger, M.S.; O'Connor, D.T. Chromogranin A in Uremia: Progressive Retention of Immunoreactive Fragments. *Kidney Int.* **1990**, *37*, 955–964, doi:10.1038/ki.1990.71.
97. Öberg, K. Diagnostic Work-up of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Clinics* **2012**, *67*, 109–112, doi:10.6061/clinics/2012(Sup01)18.
98. Fossmark, R.; Jianu, C.S.; Martinsen, T.C.; Qvigstad, G.; Syversen, U.; Waldum, H.L. Serum Gastrin and Chromogranin A Levels in Patients with Fundic Gland Polyps Caused by Long-Term Proton-Pump Inhibition. *Scand. J. Gastroenterol.* **2008**, *43*, 20–24, doi:10.1080/00365520701561959.
99. Marotta, V.; Zatelli, M.C.; Sciammarella, C.; Ambrosio, M.R.; Bondanelli, M.; Colao, A.; Faggiano, A. Chromogranin A as Circulating Marker for Diagnosis and Management of Neuroendocrine Neoplasms: More Flaws than Fame. *Endocr. Relat. Cancer* **2018**, *25*, R11–R29, doi:10.1530/ERC-17-0269.
100. Matar, S.; Malczewska, A.; Oberg, K.; Bodei, L.; Aslanian, H.; Lewczuk-Myślicka, A.; Filosso, P.L.; Suarez, A.L.; Kolasińska-Ćwikła, A.; Roffinella, M.; et al. Blood Chromogranin A Is Not Effective as a Biomarker for Diagnosis or Management of

- Bronchopulmonary Neuroendocrine Tumors/Neoplasms. *Neuroendocrinology* **2020**, *110*, 185–197, doi:10.1159/000500202.
101. Kaltsas, G.A.; Besser, G.M.; Grossman, A.B. The Diagnosis and Medical Management of Advanced Neuroendocrine Tumors. *Endocr. Rev.* **2004**, *25*, 458–511, doi:10.1210/er.2003-0014.
 102. Lv, Y.; Han, X.; Zhang, C.; Fang, Y.; Pu, N.; Ji, Y.; Wang, D.; Xuefeng, X.; Lou, W. Combined Test of Serum CgA and NSE Improved the Power of Prognosis Prediction of NF-PNETs. *Endocr. Connect.* **2018**, *7*, 169–178, doi:10.1530/EC-17-0276.
 103. Miki, M.; Ito, T.; Hijioka, M.; Lee, L.; Yasunaga, K.; Ueda, K.; Fujiyama, T.; Tachibana, Y.; Kawabe, K.; Jensen, R.T.; et al. Utility of Chromogranin B Compared with Chromogranin A as a Biomarker in Japanese Patients with Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2017**, *47*, 520–528, doi:10.1093/jjco/hyx032.
 104. Fahrenkamp, A.G.; Wibbeke, C.; Böcker, W.; Schmid, K.W.; Winde, G.; Döfner, D.; Fischer-Colbrie, R. Immunohistochemical Distribution of Chromogranins A and B and Secretogranin II in Neuroendocrine Tumours of the Gastrointestinal Tract. *Virchows Arch.* **1995**, *426*, doi:10.1007/BF00191345.
 105. Røseth, A.; Chapman, R.; Ramachandran, R.; Sheehan, C. Gastrointestinal Tract. In *The Immunoassay Handbook*; Elsevier, 2013; pp. 891–900.
 106. Bech, P.; Martin, N.; Ramachandran, R.; Bloom, S. The Biochemical Utility of Chromogranin A, Chromogranin B and Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript for Neuroendocrine Neoplasia. *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* **2014**, *51*, 8–21, doi:10.1177/0004563213489670.
 107. Braga, F.; Ferraro, S.; Mozzi, R.; Dolci, A.; Panteghini, M. Biological Variation of Neuroendocrine Tumor Markers Chromogranin A and Neuron-Specific Enolase. *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 148–151, doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.09.005.
 108. Ryczek, R.; Kwasiński, P.J.; Dymus, J.; Galas, A.; Kaźmierczak-Dziuk, A.; Karasek, A.M.; Mielniczuk, M.; Buksińska-Lisik, M.; Krzesiński, P. Neuron-Specific Enolase Concentrations for the Prediction of Poor Prognosis of Comatose Patients after out-of-Hospital Cardiac Arrest: An Observational Cohort Study. *Kardiol. Pol.* **2021**, doi:10.33963/KP.15917.
 109. Gut, P.; Czarnywojtek, A.; Sawicka-Gutaj, N.; Woliński, K.; Maciejewski, A.; Komarnicki, P.; Ruchała, M. Determination of Neuron-Specific Enolase in Patients with Midgut-Type

- Tumour Treated with Somatostatin Analogues. *Endokrynol. Pol.* **2021**, *72*, 308–318, doi:10.5603/EP.a2021.0060.
110. Rorstad, O.P. Neuroendocrine Tumors. In *Endocrine Biomarkers*; Elsevier, 2017; pp. 399–437.
 111. Nobels, F.R.E.; Kwekkeboom, D.J.; Coopmans, W.; Schoenmakers, C.H.H.; Lindemans, J.; De Herder, W.W.; Krenning, E.P.; Bouillon, R.; Lamberts, S.W.J. Chromogranin A as Serum Marker for Neuroendocrine Neoplasia: Comparison with Neuron-Specific Enolase and the α -Subunit of Glycoprotein Hormones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, *82*, 2622–2628, doi:10.1210/jc.82.8.2622.
 112. Kaiser, E.; Kuzmits, R.; Pregant, P.; Burghuber, O.; Worofka, W. Clinical Biochemistry of Neuron Specific Enolase. *Clin. Chim. Acta* **1989**, *183*, 13–31, doi:10.1016/0009-8981(89)90268-4.
 113. Mjølnes, P.; Sagatun, L.; Nordrum, I.S.; Waldum, H.L. Neuron-Specific Enolase as an Immunohistochemical Marker Is Better Than Its Reputation. *J. Histochem. Cytochem.* **2017**, *65*, 687–703, doi:10.1369/0022155417733676.
 114. Yao, J.C.; Pavel, M.; Phan, A.T.; Kulke, M.H.; Hoosen, S.; St. Peter, J.; Cherfi, A.; Öberg, K.E. Chromogranin A and Neuron-Specific Enolase as Prognostic Markers in Patients with Advanced PNET Treated with Everolimus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 3741–3749, doi:10.1210/jc.2011-0666.
 115. Panzuto, F.; Severi, C.; Cannizzaro, R.; Falconi, M.; Angeletti, S.; Pasquali, A.; Corleto, V.D.; Annibale, B.; Buonadonna, A.; Pederzoli, P.; et al. Utility of Combined Use of Plasma Levels of Chromogranin A and Pancreatic Polypeptide in the Diagnosis of Gastrointestinal and Pancreatic Endocrine Tumors. *J. Endocrinol. Invest.* **2004**, *27*, 6–11, doi:10.1007/BF03350903.
 116. Guo, X.; Gao, S.; Li, Z.; Hao, J. The Role of Biomarker in Pancreatic Neuroendocrine Tumor. *J. Pancreatol.* **2021**, *Publish Ah*, doi:10.1097/JP9.0000000000000076.
 117. GROSSMANN, M.; TRAUTMANN, M.E.; POERTL, S.; HOERMANN, R.; BERGER, P.; ARNOLD, R.; MANN, K. Alpha-Subunit and Human Chorionic Gonadotropin- β Immunoreactivity in Patients with Malignant Endocrine Gastroenteropancreatic Tumours. *Eur. J. Clin. Invest.* **1994**, *24*, 131–136, doi:10.1111/j.1365-2362.1994.tb00978.x.
 118. Öberg, K.; Wide, L. HCG and HCG Subunits as Tumour Markers in Patients with

- Endocrine Pancreatic Tumours and Carcinoids. *Acta Endocrinol. (Copenh)*. **1981**, *98*, 256–260, doi:10.1530/acta.0.0980256.
119. Dirnhofer, S. Selective Expression of Trophoblastic Hormones by Lung Carcinoma: Neuroendocrine Tumors Exclusively Produce Human Chorionic Gonadotropin [Alpha]-Subunit (HCG[Alpha]). *Hum. Pathol.* **2000**, *31*, 966–972, doi:10.1053/hupa.2000.9831.
 120. Shah, T.; Srirajaskanthan, R.; Bhogal, M.; Toubanakis, C.; Meyer, T.; Noonan, A.; Witney-Smith, C.; Amin, T.; Bhogal, P.; Sivathasan, N.; et al. α -Fetoprotein and Human Chorionic Gonadotrophin- β as Prognostic Markers in Neuroendocrine Tumour Patients. *Br. J. Cancer* **2008**, *99*, 72–77, doi:10.1038/sj.bjc.6604428.
 121. Kulahci, O.; Koseci, T. The Correlation of the Neutrophil-Lymphocyte Ratio and the Platelet-Lymphocyte Ratio With Pathological Findings in Neuroendocrine Tumors. *Cureus* **2021**, doi:10.7759/cureus.17164.
 122. Luo, G.; Liu, C.; Cheng, H.; Jin, K.; Guo, M.; Lu, Y.; Long, J.; Xu, J.; Ni, Q.; Chen, J.; et al. Neutrophil-Lymphocyte Ratio Predicts Survival in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Oncol. Lett.* **2017**, *13*, doi:10.3892/ol.2017.5716.
 123. Tong, Z.; Liu, L.; Zheng, Y.; Jiang, W.; Zhao, P.; Fang, W.; Wang, W. Predictive Value of Preoperative Peripheral Blood Neutrophil/Lymphocyte Ratio for Lymph Node Metastasis in Patients of Resectable Pancreatic Neuroendocrine Tumors: A Nomogram-Based Study. *World J. Surg. Oncol.* **2017**, *15*, doi:10.1186/s12957-017-1169-5.
 124. Pozza, A.; Pauletti, B.; Scarpa, M.; Ruffolo, C.; Bassi, N.; Massani, M. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio in Patients with Midgut Neuroendocrine Tumors Undergoing Resective Surgery. *Int. J. Colorectal Dis.* **2019**, *34*, doi:10.1007/s00384-019-03356-5.
 125. Gaitanidis, A.; Patel, D.; Nilubol, N.; Tirosh, A.; Sadowski, S.; Kebebew, E. Markers of Systemic Inflammatory Response Are Prognostic Factors in Patients with Pancreatic Neuroendocrine Tumors (PNETs): A Prospective Analysis. *Ann. Surg. Oncol.* **2018**, *25*, 122–130, doi:10.1245/s10434-017-6241-4.
 126. Dikmen, K.; Kerem, M. Stage Predictivity of Neutrophil/Lymphocyte and Platelet/Lymphocyte Ratios in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Turkish J. Surg.* **2020**, *36*, 1–8, doi:10.5578/turkjsurg.4375.
 127. Giannetta, E.; La Salvia, A.; Rizza, L.; Muscogiuri, G.; Campione, S.; Pozza, C.; Colao, A.A.Li.; Faggiano, A. Are Markers of Systemic Inflammatory Response Useful in the

- Management of Patients With Neuroendocrine Neoplasms? *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2021**, *12*, 1–15, doi:10.3389/fendo.2021.672499.
128. Bodei, L.; Sundin, A.; Kidd, M.; Prasad, V.; Modlin, I.M. The Status of Neuroendocrine Tumor Imaging: From Darkness to Light? *Neuroendocrinology* **2015**, *101*, 1–17, doi:10.1159/000367850.
129. Kos-Kudła, B.; Blicharz-Dorniak, J.; Strzelczyk, J.; Bałdys-Waligórska, A.; Bednarczuk, T.; Bolanowski, M.; Boratyn-Nowicka, A.; Borowska, M.; Cichocki, A.; Ćwikła, J.B.; et al. Zalecenia Ogólne Dotyczące Postępowania Diagnostyczno-Terapeutycznego w Nowotworach Neuroendokrynych Układu Pokarmowego (Rekomendowane Przez Polską Sieć Guzów Neuroendokrynych). *Endokrynol. Pol.* **2017**, *68*, 79–110, doi:10.5603/EP.2017.0015.
130. Tan, E.H. Imaging of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *World J. Clin. Oncol.* **2011**, *2*, 28, doi:10.5306/wjco.v2.i1.28.
131. Sivero, L.; Telesca, D.A.; Ruggiero, S.; Russo, T.; Amato, M.; Bianco, T.; Amato, B.; Formisano, C.; Avellino, M.; Napolitano, V. Endoscopic Diagnosis and Treatment of Neuroendocrine Tumors of the Digestive System. *Open Med.* **2016**, *11*, 369–373, doi:10.1515/med-2016-0067.
132. Turaga, K.K.; Kvols, L.K. Recent Progress in the Understanding, Diagnosis, and Treatment of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *CA. Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 113–132, doi:10.3322/caac.20097.
133. Anderson, M.A.; Carpenter, S.; Thompson, N.W.; Nostrant, T.T.; Elta, G.H.; Scheiman, J.M. Endoscopic Ultrasound Is Highly Accurate and Directs Management in Patients with Neuroendocrine Tumors of the Pancreas. *Am. J. Gastroenterol.* **2000**, *95*, 2271–2277, doi:10.1111/j.1572-0241.2000.02480.x.
134. Mason, T.; Berber, E.; Graybill, J.C.; Siperstein, A. Histological, CT, and Intraoperative Ultrasound Appearance of Hepatic Tumors Previously Treated by Laparoscopic Radiofrequency Ablation. *J. Gastrointest. Surg.* **2007**, *11*, 1333–1338, doi:10.1007/s11605-007-0214-z.
135. Koopmans, K.P.; Neels, O.N.; Kema, I.P.; Elsinga, P.H.; Links, T.P.; de Vries, E.G.E.; Jager, P.L. Molecular Imaging in Neuroendocrine Tumors: Molecular Uptake Mechanisms and Clinical Results. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2009**, *71*, 199–213, doi:10.1016/j.critrevonc.2009.02.009.

136. Opalińska, M.; Hubalewska-Dydejczyk, A.; Sowa-Staszczak, A.; Stefańska, A. NEN — the Role of Somatostatin Receptor Scintigraphy in Clinical Setting. *Nucl. Med. Rev.* **2016**, *19*, 118–125, doi:10.5603/NMR.2016.0023.
137. Lee, H.; Eads, J.R.; Pryma, D.A. 68Ga-DOTATATE Positron Emission Tomography-Computed Tomography Quantification Predicts Response to Somatostatin Analog Therapy in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Oncologist* **2021**, *26*, 21–29, doi:10.1634/theoncologist.2020-0165.
138. Sadowski, S.M.; Neychev, V.; Millo, C.; Shih, J.; Nilubol, N.; Herscovitch, P.; Pacak, K.; Marx, S.J.; Kebebew, E. Prospective Study of 68 Ga-DOTATATE Positron Emission Tomography/Computed Tomography for Detecting Gastro-Entero-Pancreatic Neuroendocrine Tumors and Unknown Primary Sites. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 588–596, doi:10.1200/JCO.2015.64.0987.
139. Treglia, G.; Castaldi, P.; Rindi, G.; Giordano, A.; Rufini, V. Diagnostic Performance of Gallium-68 Somatostatin Receptor PET and PET/CT in Patients with Thoracic and Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumours: A Meta-Analysis. *Endocrine* **2012**, *42*, 80–87, doi:10.1007/s12020-012-9631-1.
140. Kaemmerer, D.; Peter, L.; Lupp, A.; Schulz, S.; Sängler, J.; Prasad, V.; Kulkarni, H.; Haugvik, S.-P.; Hommann, M.; Baum, R.P. Molecular Imaging with 68Ga-SSTR PET/CT and Correlation to Immunohistochemistry of Somatostatin Receptors in Neuroendocrine Tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38*, 1659–1668, doi:10.1007/s00259-011-1846-5.
141. Hofman, M.S.; Lau, W.F.E.; Hicks, R.J. Somatostatin Receptor Imaging with 68 Ga DOTATATE PET/CT: Clinical Utility, Normal Patterns, Pearls, and Pitfalls in Interpretation. *RadioGraphics* **2015**, *35*, 500–516, doi:10.1148/rg.352140164.
142. Squires, M.H.; Volkan Adsay, N.; Schuster, D.M.; Russell, M.C.; Cardona, K.; Delman, K.A.; Winer, J.H.; Altinel, D.; Sarmiento, J.M.; El-Rayes, B.; et al. Octreoscan Versus FDG-PET for Neuroendocrine Tumor Staging: A Biological Approach. *Ann. Surg. Oncol.* **2015**, *22*, 2295–2301, doi:10.1245/s10434-015-4471-x.
143. Bednarczuk, T.; Zemczak, A.; Bolanowski, M.; Borowska, M.; Chmielik, E.; Ćwikła, J.B.; Foltyn, W.; Gisterek, I.; Handkiewicz-Junak, D.; Hubalewska-Dydejczyk, A.; et al. Neuroendocrine Neoplasms of the Small Intestine and the Appendix — Update of the Diagnostic and Therapeutic Guidelines (Recommended by the Polish Network of

- Neuroendocrine Tumours) [Nowotwory Neuroendokrynne Jelita Cienkiego i Wyrostka Robaczkowego — Uakt. *Endokryinol. Pol.* **2022**, *73*, 549–583, doi:10.5603/EP.a2022.0052.
144. Alevroudis, E.; Spei, M.-E.; Chatziioannou, S.N.; Tsoli, M.; Wallin, G.; Kaltsas, G.; Daskalakis, K. Clinical Utility of 18F-FDG PET in Neuroendocrine Tumors Prior to Peptide Receptor Radionuclide Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, 1813, doi:10.3390/cancers13081813.
145. Deroose, C.M.; Hindié, E.; Kebebew, E.; Goichot, B.; Pacak, K.; Taïeb, D.; Imperiale, A. Molecular Imaging of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors: Current Status and Future Directions. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 1949–1956, doi:10.2967/jnumed.116.179234.
146. Morse, B.; Al-Toubah, T.; Montilla-Soler, J. Anatomic and Functional Imaging of Neuroendocrine Tumors. *Curr. Treat. Options Oncol.* **2020**, *21*, 75, doi:10.1007/s11864-020-00770-8.
147. Baumann, T.; Rottenburger, C.; Nicolas, G.; Wild, D. Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumours (GEP-NET) – Imaging and Staging. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2016**, *30*, 45–57, doi:10.1016/j.beem.2016.01.003.
148. Singh, S.; Asa, S.L.; Dey, C.; Kennecke, H.; Laidley, D.; Law, C.; Asmis, T.; Chan, D.; Ezzat, S.; Goodwin, R.; et al. Diagnosis and Management of Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors: An Evidence-Based Canadian Consensus. *Cancer Treat. Rev.* **2016**, *47*, 32–45, doi:10.1016/j.ctrv.2016.05.003.
149. Bellizzi, A.M. Immunohistochemistry in the Diagnosis and Classification of Neuroendocrine Neoplasms: What Can Brown Do for You? *Hum. Pathol.* **2020**, *96*, 8–33, doi:10.1016/j.humpath.2019.12.002.
150. Kyriakopoulos, G.; Mavroeidi, V.; Chatzellis, E.; Kaltsas, G.A.; Alexandraki, K.I. Histopathological, Immunohistochemical, Genetic and Molecular Markers of Neuroendocrine Neoplasms. *Ann. Transl. Med.* **2018**, *6*, 252–252, doi:10.21037/atm.2018.06.27.
151. Combs, S.E.; Han, G.; Mani, N.; Beruti, S.; Nerenberg, M.; Rimm, D.L. Loss of Antigenicity with Tissue Age in Breast Cancer. *Lab. Investig.* **2016**, *96*, 264–269, doi:10.1038/labinvest.2015.138.
152. Klimstra, D.S.; Modlin, I.R.; Adsay, N.V.; Chetty, R.; Deshpande, V.; Gönen, M.; Jensen,

- R.T.; Kidd, M.; Kulke, M.H.; Lloyd, R. V.; et al. Pathology Reporting of Neuroendocrine Tumors: Application of the Delphic Consensus Process to the Development of a Minimum Pathology Data Set. *Am. J. Surg. Pathol.* **2010**, *34*, 300–313, doi:10.1097/PAS.0b013e3181ce1447.
153. Duan, K.; Mete, O. Algorithmic Approach to Neuroendocrine Tumors in Targeted Biopsies: Practical Applications of Immunohistochemical Markers. *Cancer Cytopathol.* **2016**, *124*, 871–884, doi:10.1002/cncy.21765.
154. Taupenot, L.; Harper, K.L.; O'Connor, D.T. The Chromogranin–Secretogranin Family. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1134–1149, doi:10.1056/NEJMra021405.
155. Wiedenmann, B.; Franke, W.W.; Kuhn, C.; Moll, R.; Gould, V.E. Synaptophysin: A Marker Protein for Neuroendocrine Cells and Neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83*, 3500–3504, doi:10.1073/pnas.83.10.3500.
156. Tomita, T. Significance of Chromogranin A and Synaptophysin in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **2020**, doi:10.17305/bjbms.2020.4632.
157. Bhargava, R.; Dabbs, D.J. Immunohistology of Metastatic Carcinomas of Unknown Primary. In *Diagnostic Immunohistochemistry*; Elsevier, 2011; pp. 206–255.
158. Miettinen, M. Synaptophysin and Neurofilament Proteins as Markers for Neuroendocrine Tumors. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **1987**, *111*, 813–818.
159. Guo, R.-J.; Suh, E.R.; Lynch, J.P. The Role of Cdx Proteins in Intestinal Development and Cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2004**, *3*, 593–601, doi:10.4161/cbt.3.7.913.
160. Ordóñez, N.G. Value of Thyroid Transcription Factor-1 Immunostaining in Tumor Diagnosis. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2012**, *20*, 429–444, doi:10.1097/PAI.0b013e31825439bc.
161. Nonaka, D.; Tang, Y.; Chiriboga, L.; Rivera, M.; Ghossein, R. Diagnostic Utility of Thyroid Transcription Factors Pax8 and TTF-2 (FoxE1) in Thyroid Epithelial Neoplasms. *Mod. Pathol.* **2008**, *21*, 192–200, doi:10.1038/modpathol.3801002.
162. Bellizzi, A.M. Assigning Site of Origin in Metastatic Neuroendocrine Neoplasms. *Adv. Anat. Pathol.* **2013**, *20*, 285–314, doi:10.1097/PAP.0b013e3182a2dc67.
163. Saqi, A.; Alexis, D.; Remotti, F.; Bhagat, G. Usefulness of CDX2 and TTF-1 in Differentiating Gastrointestinal From Pulmonary Carcinoids. *Am. J. Clin. Pathol.* **2005**, *123*, 394–404, doi:10.1309/UKN6-PVRK-XHG4-22DA.
164. Klimstra, D.S.; Modlin, I.R.; Coppola, D.; Lloyd, R. V.; Suster, S. The Pathologic

- Classification of Neuroendocrine Tumors. *Pancreas* **2010**, *39*, 707–712, doi:10.1097/MPA.0b013e3181ec124e.
165. Chan, J.A.; Kulke, M.H. Progress in the Treatment of Neuroendocrine Tumors. *Curr. Oncol. Rep.* **2009**, *11*, 193–199, doi:10.1007/s11912-009-0028-0.
166. Tsoli, M.; Chatzellis, E.; Koumariou, A.; Kolomodi, D.; Kaltsas, G. Current Best Practice in the Management of Neuroendocrine Tumors. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* **2019**, *10*, 204201881880469, doi:10.1177/2042018818804698.
167. Kaltsas, G.A.; Besser, G.M.; Grossman, A.B. The Diagnosis and Medical Management of Advanced Neuroendocrine Tumors. *Endocr. Rev.* **2004**, *25*, 458–511, doi:10.1210/er.2003-0014.
168. Öberg, K. Neuroendocrine Gastrointestinal Tumors - A Condensed Overview of Diagnosis and Treatment. *Ann. Oncol.* **1999**, *10*, S3–S8, doi:10.1093/annonc/10.suppl_2.S3.
169. Proye, C. Natural History of Liver Metastasis of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors: Place for Chemoembolization. *World J. Surg.* **2001**, *25*, 685–688, doi:10.1007/s00268-001-0013-8.
170. Pfitzmann, R.; Benschmidt, B.; Langrehr, J.M.; Schumacher, G.; Neuhaus, R.; Neuhaus, P. Trends and Experiences in Liver Retransplantation over 15 Years. *Liver Transplant.* **2007**, *13*, 248–257, doi:10.1002/lt.20904.
171. AHLMAN, H.; FRIMAN, S.; CAHLIN, C.; NILSSON, O.; JANSSON, S.; WÄNGBERG, B.; OLAUSSON, M. Liver Transplantation for Treatment of Metastatic Neuroendocrine Tumors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, *1014*, 265–269, doi:10.1196/annals.1294.029.
172. Eigler, T.; Ben-Shlomo, A. Somatostatin System: Molecular Mechanisms Regulating Anterior Pituitary Hormones. *J. Mol. Endocrinol.* **2014**, *53*, R1–R19, doi:10.1530/JME-14-0034.
173. Cakir, M.; Dworakowska, D.; Grossman, A. Somatostatin Receptor Biology in Neuroendocrine and Pituitary Tumours: Part 1 - Molecular Pathways. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 2570–2584, doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01125.x.
174. Guillemin, R. Hypothalamic Hormones a.k.a. Hypothalamic Releasing Factors. *J. Endocrinol.* **2005**, *184*, 11–28, doi:10.1677/joe.1.05883.
175. Hankus, J.; Tomaszewska, R. Neuroendocrine Neoplasms and Somatostatin Receptor Subtypes Expression. *Nucl. Med. Rev.* **2016**, *19*, 111–117, doi:10.5603/NMR.2016.0022.

176. Mundschenk, J.; Unger, N.; Schulz, S.; Höllt, V.; Schulz, S.; Steinke, R.; Lehnert, H. Somatostatin Receptor Subtypes in Human Pheochromocytoma: Subcellular Expression Pattern and Functional Relevance for Octreotide Scintigraphy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *88*, 5150–5157, doi:10.1210/jc.2003-030262.
177. Theodoropoulou, M.; Stalla, G.K. Somatostatin Receptors: From Signaling to Clinical Practice. *Front. Neuroendocrinol.* **2013**, *34*, 228–252, doi:10.1016/j.yfrne.2013.07.005.
178. Öberg, K.E.; Reubi, J.; Kwekkeboom, D.J.; Krenning, E.P. Role of Somatostatins in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumor Development and Therapy. *Gastroenterology* **2010**, *139*, 742-753.e1, doi:10.1053/j.gastro.2010.07.002.
179. Childs, A.; Vesely, C.; Ensell, L.; Lowe, H.; Luong, T.V.; Caplin, M.E.; Toumpanakis, C.; Thirlwell, C.; Hartley, J.A.; Meyer, T. Expression of Somatostatin Receptors 2 and 5 in Circulating Tumour Cells from Patients with Neuroendocrine Tumours. *Br. J. Cancer* **2016**, *115*, 1540–1547, doi:10.1038/bjc.2016.377.
180. Cakir, M.; Dworakowska, D.; Grossman, A. Somatostatin Receptor Biology in Neuroendocrine and Pituitary Tumours: Part 2 - Clinical Implications. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 2585–2591, doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01125_1.x.
181. Eriksson, B.; Öberg, K. Summing up 15 Years of Somatostatin Analog Therapy in Neuroendocrine Tumors: Future Outlook. *Ann. Oncol.* **1999**, *10*, S31–S38, doi:10.1093/annonc/10.suppl_2.S31.
182. Berardi, R.; Morgese, F.; Torniai, M.; Savini, A.; Partelli, S.; Rinaldi, S.; Caramanti, M.; Ferrini, C.; Falconi, M.; Cascinu, S. Medical Treatment for Gastro-Entero-Pancreatic Neuroendocrine Tumours. *World J. Gastrointest. Oncol.* **2016**, *8*, 389, doi:10.4251/wjgo.v8.i4.389.
183. Zatelli, M.C.; Fanciulli, G.; Malandrino, P.; Ramundo, V.; Faggiano, A.; Colao, A.; ___ Predictive Factors of Response to MTOR Inhibitors in Neuroendocrine Tumours. *Endocr. Relat. Cancer* **2016**, *23*, R173–R183, doi:10.1530/ERC-15-0413.
184. Pavel, M.; Valle, J.W.; Eriksson, B.; Rinke, A.; Caplin, M.; Chen, J.; Costa, F.; Falkerby, J.; Fazio, N.; Gorbounova, V.; et al. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasms: Systemic Therapy - Biotherapy and Novel Targeted Agents. *Neuroendocrinology* **2017**, *105*, 266–280, doi:10.1159/000471880.
185. Garcia-Carbonero, R.; Rinke, A.; Valle, J.W.; Fazio, N.; Caplin, M.; Gorbounova, V.; O'Connor, J.; Eriksson, B.; Sorbye, H.; Kulke, M.; et al. ENETS Consensus Guidelines for

- the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasms: Systemic Therapy - Chemotherapy. *Neuroendocrinology* **2017**, *105*, 281–294, doi:10.1159/000473892.
186. Camus, B.; Cottureau, A.-S.; Palmieri, L.-J.; Dermine, S.; Tenenbaum, F.; Brezault, C.; Coriat, R. Indications of Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT) in Gastroenteropancreatic and Pulmonary Neuroendocrine Tumors: An Updated Review. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 1267, doi:10.3390/jcm10061267.
 187. Sorbye, H.; Kong, G.; Grozinsky-Glasberg, S. PRRT in High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms (WHO G3). *Endocr. Relat. Cancer* **2020**, *27*, R67–R77, doi:10.1530/ERC-19-0400.
 188. Sundin, A.; Arnold, R.; Baudin, E.; Cwikla, J.B.; Eriksson, B.; Fanti, S.; Fazio, N.; Giammarile, F.; Hicks, R.J.; Kjaer, A.; et al. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Radiological, Nuclear Medicine and Hybrid Imaging. *Neuroendocrinology* **2017**, *105*, 212–244, doi:10.1159/000471879.
 189. Landry, C.S.; Lin, H.Y.; Phan, A.; Charnsangavej, C.; Abdalla, E.K.; Aloia, T.; Nicolas Vauthey, J.; Katz, M.H.G.; Yao, J.C.; Fleming, J.B. Resection of At-Risk Mesenteric Lymph Nodes Is Associated with Improved Survival in Patients with Small Bowel Neuroendocrine Tumors. *World J. Surg.* **2013**, *37*, 1695–1700, doi:10.1007/s00268-013-1918-8.
 190. Cives, M.; Strosberg, J. Treatment Strategies for Metastatic Neuroendocrine Tumors of the Gastrointestinal Tract. *Curr. Treat. Options Oncol.* **2017**, *18*, 14, doi:10.1007/s11864-017-0461-5.
 191. Medzhitov, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* **2010**, *140*, 771–776, doi:10.1016/j.cell.2010.03.006.
 192. Chen, L.; Deng, H.; Cui, H.; Fang, J.; Zuo, Z.; Deng, J.; Li, Y.; Wang, X.; Zhao, L. Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases in Organs. *Oncotarget* **2018**, *9*, 7204–7218, doi:10.18632/oncotarget.23208.
 193. Furman, D.; Campisi, J.; Verdin, E.; Carrera-Bastos, P.; Targ, S.; Franceschi, C.; Ferrucci, L.; Gilroy, D.W.; Fasano, A.; Miller, G.W.; et al. Chronic Inflammation in the Etiology of Disease across the Life Span. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1822–1832, doi:10.1038/s41591-019-0675-0.
 194. Pahwa, R.; Goyal, A.; Jialal, I. *Chronic Inflammation*; 2022;
 195. Hannoodee, S.; Nasuruddin, D.N. *Acute Inflammatory Response*; 2022;

196. Janeway, C.A.; Medzhitov, R. Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 197–216, doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.
197. L. Kiss, A. Inflammation in Focus: The Beginning and the End. *Pathol. Oncol. Res.* **2022**, *27*, doi:10.3389/pore.2021.1610136.
198. Kaminska, B. MAPK Signalling Pathways as Molecular Targets for Anti-Inflammatory Therapy—from Molecular Mechanisms to Therapeutic Benefits. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2005**, *1754*, 253–262, doi:10.1016/j.bbapap.2005.08.017.
199. Zhao, H.; Wu, L.; Yan, G.; Chen, Y.; Zhou, M.; Wu, Y.; Li, Y. Inflammation and Tumor Progression: Signaling Pathways and Targeted Intervention. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 263, doi:10.1038/s41392-021-00658-5.
200. Feehan, K.T.; Gilroy, D.W. Is Resolution the End of Inflammation? *Trends Mol. Med.* **2019**, *25*, 198–214, doi:10.1016/j.molmed.2019.01.006.
201. Zou, J.; Li, Q.; Kou, F.; Zhu, Y.; Lu, M.; Li, J.; Lu, Z.; Shen, L. Prognostic Value of Inflammation-Based Markers in Advanced or Metastatic Neuroendocrine Tumours. *Curr. Oncol.* **2019**, *26*, 4135, doi:10.3747/co.26.4135.
202. Greten, F.R.; Grivennikov, S.I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* **2019**, *51*, 27–41, doi:10.1016/j.immuni.2019.06.025.
203. Zeng, M.; Chen, Y.; Jia, X.; Liu, Y. The Anti-Apoptotic Role of EBV-LMP1 in Lymphoma Cells. *Cancer Manag. Res.* **2020**, *Volume 12*, 8801–8811, doi:10.2147/CMAR.S260583.
204. Ghittoni, R. The Role of Human Papillomaviruses in Carcinogenesis. *Ecancermedicalscience* **2015**, *9*, doi:10.3332/ecancer.2015.526.
205. Goncalves, P.H.; Ziegelbauer, J.; Uldrick, T.S.; Yarchoan, R. Kaposi Sarcoma Herpesvirus-Associated Cancers and Related Diseases. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2017**, *12*, 47–56, doi:10.1097/COH.0000000000000330.
206. Panfil, A.R.; Martinez, M.P.; Ratner, L.; Green, P.L. Human T-Cell Leukemia Virus-Associated Malignancy. *Curr. Opin. Virol.* **2016**, *20*, 40–46, doi:10.1016/j.coviro.2016.08.009.
207. Pecorino, L. *Biologia Molekularna Nowotworów w Praktyce Klinicznej*; Dzięgiel, P., Marszałek, A., Eds.; Edra Urban & Partner, 2018;
208. Singh, N.; Baby, D.; Rajguru, J.; Patil, P.; Thakkannavar, S.; Pujari, V. Inflammation and Cancer. *Ann. Afr. Med.* **2019**, *18*, 121, doi:10.4103/aam.aam_56_18.
209. Tan, Z.; Xue, H.; Sun, Y.; Zhang, C.; Song, Y.; Qi, Y. The Role of Tumor Inflammatory

- Microenvironment in Lung Cancer. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, doi:10.3389/fphar.2021.688625.
210. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
211. Bremnes, R.M.; Al-Shibli, K.; Donnem, T.; Sirera, R.; Al-Saad, S.; Andersen, S.; Stenvold, H.; Camps, C.; Busund, L.-T. The Role of Tumor-Infiltrating Immune Cells and Chronic Inflammation at the Tumor Site on Cancer Development, Progression, and Prognosis: Emphasis on Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2011**, *6*, 824–833, doi:10.1097/JTO.0b013e3182037b76.
212. Qin, S.; Jiang, J.; Lu, Y.; Nice, E.C.; Huang, C.; Zhang, J.; He, W. Emerging Role of Tumor Cell Plasticity in Modifying Therapeutic Response. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 228, doi:10.1038/s41392-020-00313-5.
213. Coussens, L.M.; Werb, Z. Inflammation and Cancer. *Nature* **2002**, *420*, 860–867, doi:10.1038/nature01322.
214. Prendergast, G.C. Immune Escape as a Fundamental Trait of Cancer: Focus on IDO. *Oncogene* **2008**, *27*, 3889–3900, doi:10.1038/onc.2008.35.
215. Conway, E.M.; Pikor, L.A.; Kung, S.H.Y.; Hamilton, M.J.; Lam, S.; Lam, W.L.; Bennewith, K.L. Macrophages, Inflammation, and Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *193*, 116–130, doi:10.1164/rccm.201508-1545CI.
216. Stenken, J.A.; Poschenrieder, A.J. Bioanalytical Chemistry of Cytokines – A Review. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *853*, 95–115, doi:10.1016/j.aca.2014.10.009.
217. Miller, M.D.; Krangel, M.S. Biology and Biochemistry of the Chemokines: A Family of Chemotactic and Inflammatory Cytokines. *Crit. Rev. Immunol.* **1992**, *12*, 17–46.
218. Dranoff, G. Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 11–22, doi:10.1038/nrc1252.
219. Lázár-Molnár, E.; Hegyesi, H.; Tóth, S.; Falus, A. AUTOCRINE AND PARACRINE REGULATION BY CYTOKINES AND GROWTH FACTORS IN MELANOMA. *Cytokine* **2000**, *12*, 547–554, doi:10.1006/cyto.1999.0614.
220. Grivennikov, S.I.; Greten, F.R.; Karin, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **2010**, *140*, 883–899, doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.
221. Basil, M.C.; Levy, B.D. Specialized Pro-Resolving Mediators: Endogenous Regulators of Infection and Inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 51–67,

- doi:10.1038/nri.2015.4.
222. Ramon, S.; Dalli, J.; Sanger, J.M.; Winkler, J.W.; Aursnes, M.; Tungen, J.E.; Hansen, T. V.; Serhan, C.N. The Protectin PCTR1 Is Produced by Human M2 Macrophages and Enhances Resolution of Infectious Inflammation. *Am. J. Pathol.* **2016**, *186*, 962–973, doi:10.1016/j.ajpath.2015.12.012.
223. Multhoff, G.; Molls, M.; Radons, J. Chronic Inflammation in Cancer Development. *Front. Immunol.* **2012**, *2*, doi:10.3389/fimmu.2011.00098.
224. Geismann; Schäfer; Gundlach; Hauser; Egberts; Schneider; Arlt NF-KB Dependent Chemokine Signaling in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11*, 1445, doi:10.3390/cancers11101445.
225. Kartikasari, A.E.R.; Huertas, C.S.; Mitchell, A.; Plebanski, M. Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, doi:10.3389/fonc.2021.692142.
226. Naugler, W.E.; Karin, M. NF-KB and Cancer — Identifying Targets and Mechanisms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2008**, *18*, 19–26, doi:10.1016/J.GDE.2008.01.020.
227. Wu, Y.; Zhou, B.P. TNF- α /NF-KB/Snail Pathway in Cancer Cell Migration and Invasion. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 639–644, doi:10.1038/sj.bjc.6605530.
228. Xia, Y.; Shen, S.; Verma, I.M. NF-KB, an Active Player in Human Cancers. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 823–830, doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0112.
229. Liu, Y.; Cao, X. Characteristics and Significance of the Pre-Metastatic Niche. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 668–681, doi:10.1016/j.ccell.2016.09.011.
230. Taniguchi, K.; Karin, M. NF-KB, Inflammation, Immunity and Cancer: Coming of Age. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 309–324, doi:10.1038/nri.2017.142.
231. Greten, F.R.; Eckmann, L.; Greten, T.F.; Park, J.M.; Li, Z.-W.; Egan, L.J.; Kagnoff, M.F.; Karin, M. IKK β Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell* **2004**, *118*, 285–296, doi:10.1016/j.cell.2004.07.013.
232. Berkovic, M.C.; Cacev, T.; Ivkovic, T.C.; Zjadic-Rotkvic, V.; Kapitanovic, S. New Insights into the Role of Chronic Inflammation and Cytokines in the Etiopathogenesis of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology* **2014**, *99*, doi:10.1159/000362339.
233. Mantovani, A.; Bottazzi, B.; Colotta, F.; Sozzani, S.; Ruco, L. The Origin and Function of Tumor-Associated Macrophages. *Immunol. Today* **1992**, *13*, 265–270,

- doi:10.1016/0167-5699(92)90008-U.
234. Pollard, J.W. Tumour-Educated Macrophages Promote Tumour Progression and Metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 71–78, doi:10.1038/nrc1256.
 235. Law, A.M.K.; Valdes-Mora, F.; Gallego-Ortega, D. Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Therapeutic Target for Cancer. *Cells* **2020**, *9*, 561, doi:10.3390/cells9030561.
 236. Gonzalez, H.; Hagerling, C.; Werb, Z. Roles of the Immune System in Cancer: From Tumor Initiation to Metastatic Progression. *Genes Dev.* **2018**, *32*, 1267–1284, doi:10.1101/gad.314617.118.
 237. Komarova, E.A.; Krivokrysenko, V.; Wang, K.; Neznanov, N.; Chernov, M. V.; Komarov, P.G.; Brennan, M.; Golovkina, T. V.; Rokhlin, O.; Kuprash, D. V.; et al. P53 Is a Suppressor of Inflammatory Response in Mice. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1030–1032, doi:10.1096/fj.04-3213fje.
 238. Liu, P.; Wang, Y.; Li, X. Targeting the Untargetable KRAS in Cancer Therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **2019**, *9*, 871–879, doi:10.1016/j.apsb.2019.03.002.
 239. Wang, Y.; You, M.; Wang, Y. ALTERNATIVE SPLICING OF THE K-RAS GENE IN MOUSE TISSUES AND CELL LINES. *Exp. Lung Res.* **2001**, *27*, 255–267, doi:10.1080/019021401300054028.
 240. Davalos, A.R.; Coppe, J.-P.; Campisi, J.; Desprez, P.-Y. Senescent Cells as a Source of Inflammatory Factors for Tumor Progression. *Cancer Metastasis Rev.* **2010**, *29*, 273–283, doi:10.1007/s10555-010-9220-9.
 241. Leslie, K.; Lang, C.; Devgan, G.; Azare, J.; Berishaj, M.; Gerald, W.; Kim, Y.B.; Paz, K.; Darnell, J.E.; Albanese, C.; et al. Cyclin D1 Is Transcriptionally Regulated by and Required for Transformation by Activated Signal Transducer and Activator of Transcription 3. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 2544–2552, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2203.
 242. Gronke, K.; Hernández, P.P.; Zimmermann, J.; Klose, C.S.N.; Kofoed-Branzk, M.; Guendel, F.; Witkowski, M.; Tizian, C.; Amann, L.; Schumacher, F.; et al. Interleukin-22 Protects Intestinal Stem Cells against Genotoxic Stress. *Nature* **2019**, *566*, 249–253, doi:10.1038/s41586-019-0899-7.
 243. Grivennikov, S.I. Inflammation and Colorectal Cancer: Colitis-Associated Neoplasia. *Semin. Immunopathol.* **2013**, *35*, 229–244, doi:10.1007/s00281-012-0352-6.
 244. Piotrowski, I.; Kulcenty, K.; Suchorska, W. Interplay between Inflammation and Cancer. *Reports Pract. Oncol. Radiother.* **2020**, *25*, 422–427, doi:10.1016/j.rpor.2020.04.004.

245. Kuilman, T.; Michaloglou, C.; Vredeveld, L.C.W.; Douma, S.; van Doorn, R.; Desmet, C.J.; Aarden, L.A.; Mooi, W.J.; Peeper, D.S. Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* **2008**, *133*, 1019–1031, doi:10.1016/j.cell.2008.03.039.
246. Grivennikov, S.I.; Karin, M. Inflammation and Oncogenesis: A Vicious Connection. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2010**, *20*, 65–71, doi:10.1016/J.GDE.2009.11.004.
247. Zumsteg, A.; Christofori, G. Corrupt Policemen: Inflammatory Cells Promote Tumor Angiogenesis. *Curr. Opin. Oncol.* **2009**, *21*, 60–70, doi:10.1097/CCO.0b013e32831bed7e.
248. Zeisberg, M.; Neilson, E.G. Biomarkers for Epithelial-Mesenchymal Transitions. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 1429–1437, doi:10.1172/JCI36183.
249. Yang, J.; Weinberg, R.A. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Dev. Cell* **2008**, *14*, 818–829, doi:10.1016/j.devcel.2008.05.009.
250. DeNardo, D.G.; Johansson, M.; Coussens, L.M. Immune Cells as Mediators of Solid Tumor Metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **2008**, *27*, 11–18, doi:10.1007/s10555-007-9100-0.
251. Xu, J.; Lamouille, S.; Derynck, R. TGF- β -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition. *Cell Res.* **2009**, *19*, 156–172, doi:10.1038/cr.2009.5.
252. Neufeld, G.; Kessler, O. Pro-Angiogenic Cytokines and Their Role in Tumor Angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **2006**, *25*, 373–385, doi:10.1007/s10555-006-9011-5.
253. GEINDREAU, M.; BRUCHARD, M.; VEGRAN, F. Role of Cytokines and Chemokines in Angiogenesis in a Tumor Context. *Cancers (Basel)*. **2022**, *14*, 2446, doi:10.3390/cancers14102446.
254. Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A.; Balkwill, F. Cancer-Related Inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 436–444, doi:10.1038/nature07205.
255. Szlosarek, P.W.; Balkwill, F.R. Tumour Necrosis Factor α : A Potential Target for the Therapy of Solid Tumours. *Lancet Oncol.* **2003**, *4*, 565–573, doi:10.1016/S1470-2045(03)01196-3.
256. Hassuneh, M.R.; Nagarkatti, M.; Nagarkatti, P.S. Role of Interleukin-10 in the Regulation of Tumorigenicity of a T Cell Lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **2013**, *54*, 827–834, doi:10.3109/10428194.2012.726721.

257. Naugler, W.E.; Karin, M. The Wolf in Sheep's Clothing: The Role of Interleukin-6 in Immunity, Inflammation and Cancer. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 109–119, doi:10.1016/j.molmed.2007.12.007.
258. Grivennikov, S.; Karin, E.; Terzic, J.; Mucida, D.; Yu, G.; Vallabhapurapu, S. Article IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. **2009**, 103–113, doi:10.1016/j.ccr.2009.01.001.
259. Garlanda, C.; Mantovani, A. Interleukin-1 in Tumor Progression, Therapy, and Prevention. *Cancer Cell* **2021**, *39*, 1023–1027, doi:10.1016/j.ccell.2021.04.011.
260. Gelfo, V.; Romaniello, D.; Mazzeschi, M.; Sgarzi, M.; Grilli, G.; Morselli, A.; Manzan, B.; Rihawi, K.; Lauriola, M. Roles of IL-1 in Cancer: From Tumor Progression to Resistance to Targeted Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6009, doi:10.3390/ijms21176009.
261. Fernandes, J.V.; Cobucci, R.N.O.; Jatobá, C.A.N.; de Medeiros Fernandes, T.A.A.; de Azevedo, J.W.V.; de Araújo, J.M.G. The Role of the Mediators of Inflammation in Cancer Development. *Pathol. Oncol. Res.* **2015**, *21*, 527–534, doi:10.1007/s12253-015-9913-z.
262. Lan, T.; Chen, L.; Wei, X. Inflammatory Cytokines in Cancer: Comprehensive Understanding and Clinical Progress in Gene Therapy. *Cells* **2021**, *10*, 100, doi:10.3390/cells10010100.
263. Peinado, H.; Quintanilla, M.; Cano, A. Transforming Growth Factor β -1 Induces Snail Transcription Factor in Epithelial Cell Lines. Mechanisms for Epithelial Mesenchymal Transitions. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, doi:10.1074/jbc.M211304200.
264. Hao, Y.; Baker, D.; ten Dijke, P. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2767, doi:10.3390/ijms20112767.
265. Yoshimura, A.; Wakabayashi, Y.; Mori, T. Cellular and Molecular Basis for the Regulation of Inflammation by TGF-. *J. Biochem.* **2010**, *147*, 781–792, doi:10.1093/jb/mvq043.
266. RALLIS, K.S.; CORRIGAN, A.E.; DADAH, H.; GEORGE, A.M.; KESHWARA, S.M.; SIDERIS, M.; SZABADOS, B. Cytokine-Based Cancer Immunotherapy: Challenges and Opportunities for IL-10. *Anticancer Res.* **2021**, *41*, 3247–3252, doi:10.21873/anticancer.15110.
267. Oft, M. IL-10: Master Switch from Tumor-Promoting Inflammation to Antitumor Immunity. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0214.
268. Habiba, U. e; Rafiq, M.; Khawar, M.B.; Nazir, B.; Haider, G.; Nazir, N. The Multifaceted Role of IL-12 in Cancer. *Adv. Cancer Biol. - Metastasis* **2022**, *5*, 100053, doi:10.1016/j.adcanc.2022.100053.

269. Mirlekar, B.; Pylayeva-Gupta, Y. IL-12 Family Cytokines in Cancer and Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, 167, doi:10.3390/cancers13020167.
270. Tugues, S.; Burkhard, S.H.; Ohs, I.; Vrohling, M.; Nussbaum, K.; vom Berg, J.; Kulig, P.; Becher, B. New Insights into IL-12-Mediated Tumor Suppression. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 237–246, doi:10.1038/cdd.2014.134.
271. Maini, R.N.; Taylor, P.C. Anti-Cytokine Therapy for Rheumatoid Arthritis. *Annu. Rev. Med.* **2000**, *51*, 207–229, doi:10.1146/annurev.med.51.1.207.
272. Chow, M.T.; Luster, A.D. Chemokines in Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 1125–1131, doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0160.
273. Nagarsheth, N.; Wicha, M.S.; Zou, W. Chemokines in the Cancer Microenvironment and Their Relevance in Cancer Immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 559–572, doi:10.1038/nri.2017.49.
274. SALCEDO, R.; OPPENHEIM, J.J. Role of Chemokines in Angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 Interaction, a Key Regulator of Endothelial Cell Responses. *Microcirculation* **2010**, *10*, 359–370, doi:10.1038/sj.mn.7800200.
275. Martin, D.; Galisteo, R.; Gutkind, J.S. CXCL8/IL8 Stimulates Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression and the Autocrine Activation of VEGFR2 in Endothelial Cells by Activating NF κ B through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) Complex. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 6038–6042, doi:10.1074/jbc.C800207200.
276. Lee, J.M.; Lee, M.-H.; Garon, E.; Goldman, J.W.; Salehi-Rad, R.; Baratelli, F.E.; Schaeue, D.; Wang, G.; Rosen, F.; Yanagawa, J.; et al. Phase I Trial of Intratumoral Injection of CCL21 Gene–Modified Dendritic Cells in Lung Cancer Elicits Tumor-Specific Immune Responses and CD8⁺ T-Cell Infiltration. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 4556–4568, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2821.
277. Mojic, M.; Takeda, K.; Hayakawa, Y. The Dark Side of IFN- γ : Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *19*, 89, doi:10.3390/ijms19010089.
278. Jorgovanovic, D.; Song, M.; Wang, L.; Zhang, Y. Roles of IFN- γ in Tumor Progression and Regression: A Review. *Biomark. Res.* **2020**, *8*, 49, doi:10.1186/s40364-020-00228-x.
279. Kasajima, A.; Ishikawa, Y.; Iwata, A.; Steiger, K.; Oka, N.; Ishida, H.; Sakurada, A.; Suzuki, H.; Kameya, T.; Konukiewicz, B.; et al. Inflammation and PD-L1 Expression in Pulmonary Neuroendocrine Tumors. *Endocr. Relat. Cancer* **2018**, *25*, 339–350, doi:10.1530/ERC-17-0427.

280. Ai, L.; Xu, A.; Xu, J. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond. In; 2020; pp. 33–59.
281. Tsuruoka, K.; Horinouchi, H.; Goto, Y.; Kanda, S.; Fujiwara, Y.; Nokihara, H.; Yamamoto, N.; Asakura, K.; Nakagawa, K.; Sakurai, H.; et al. PD-L1 Expression in Neuroendocrine Tumors of the Lung. *Lung Cancer* **2017**, *108*, 115–120, doi:10.1016/j.lungcan.2017.03.006.
282. Galvano, A.; Peri, M.; Guarini, A.A.; Castiglia, M.; Grassadonia, A.; De Tursi, M.; Irtelli, L.; Rizzo, S.; Bertani, A.; Gristina, V.; et al. Analysis of Systemic Inflammatory Biomarkers in Neuroendocrine Carcinomas of the Lung: Prognostic and Predictive Significance of NLR, LDH, ALI, and LIPI Score. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2020**, *12*, 175883592094237, doi:10.1177/1758835920942378.
283. Kaemmerer, D.; Reimann, C.; Specht, E.; Wirtz, R.M.; Sayeg, M.; Baum, R.P.; Schulz, S.; Lupp, A. Differential Expression and Prognostic Value of the Chemokine Receptor CXCR4 in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms. *Oncotarget* **2015**, *6*, 3346–3358, doi:10.18632/oncotarget.3242.
284. de Jong, P.R.; González-Navajas, J.M.; Jansen, N.J.G. The Digestive Tract as the Origin of Systemic Inflammation. *Crit. Care* **2016**, *20*, 279, doi:10.1186/s13054-016-1458-3.
285. Franceschi, C.; Garagnani, P.; Vitale, G.; Capri, M.; Salvioli, S. Inflammaging and ‘Garb-Aging.’ *Trends Endocrinol. Metab.* **2017**, *28*, 199–212, doi:10.1016/j.tem.2016.09.005.
286. Rumba, R.; Cipkina, S.; Cukure, F.; Vanags, A. Systemic and Local Inflammation in Colorectal Cancer. *Acta medica Litu.* **2019**, *25*, 185–196, doi:10.6001/actamedica.v25i4.3929.
287. Cives, M.; Strosberg, J. An Update on Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Oncology (Williston Park)*. **2014**, *28*, 749–756, 758.
288. Mahečić, D.H.; Berković, M.C.; Zjačić-Rotkvić, V.; Čačev, T.; Kapitanović, S.; Ulamec, M. Inflammation-Related Cytokines and Their Roles in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **2020**, *20*, doi:10.17305/bjbms.2020.4471.
289. Berković, M.C.; Jokić, M.; Marout, J.; Radošević, S.; Zjačić-Rotkvić, V.; Kapitanović, S. IL-6-174 C/G Polymorphism in the Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors (GEP-NETs). *Exp. Mol. Pathol.* **2007**, *83*, 474–479, doi:10.1016/j.yexmp.2007.08.018.
290. Pizzino, G.; Irrera, N.; Cucinotta, M.; Pallio, G.; Mannino, F.; Arcoraci, V.; Squadrito, F.;

- Altavilla, D.; Bitto, A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1–13, doi:10.1155/2017/8416763.
291. Betteridge, D.J. What Is Oxidative Stress? *Metabolism* **2000**, *49*, 3–8, doi:10.1016/S0026-0495(00)80077-3.
292. Hussain, T.; Tan, B.; Yin, Y.; Blachier, F.; Tossou, M.C.B.; Rahu, N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1–9, doi:10.1155/2016/7432797.
293. Lü, J.-M.; Lin, P.H.; Yao, Q.; Chen, C. Chemical and Molecular Mechanisms of Antioxidants: Experimental Approaches and Model Systems. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 840–860, doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x.
294. Giles, G.I.; Jacob, C. Reactive Sulfur Species: An Emerging Concept in Oxidative Stress. *Biol. Chem.* **2002**, *383*, doi:10.1515/BC.2002.042.
295. Vajragupta, O.; Boonchoong, P.; Berliner, L.J. Manganese Complexes of Curcumin Analogues: Evaluation of Hydroxyl Radical Scavenging Ability, Superoxide Dismutase Activity and Stability towards Hydrolysis. *Free Radic. Res.* **2004**, *38*, 303–314, doi:10.1080/10715760310001643339.
296. Liochev, S.I.; Fridovich, I. The Haber-Weiss Cycle—70 Years Later: An Alternative View. *Redox Rep.* **2002**, *7*, 55–57, doi:10.1179/135100002125000190.
297. Brand, M.D. The Sites and Topology of Mitochondrial Superoxide Production. *Exp. Gerontol.* **2010**, *45*, 466–472, doi:10.1016/j.exger.2010.01.003.
298. St-Pierre, J.; Buckingham, J.A.; Roebuck, S.J.; Brand, M.D. Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44784–44790, doi:10.1074/jbc.M207217200.
299. Dröse, S.; Brandt, U. Molecular Mechanisms of Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. In; 2012; pp. 145–169.
300. Tirichen, H.; Yaigoub, H.; Xu, W.; Wu, C.; Li, R.; Li, Y. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Their Contribution in Chronic Kidney Disease Progression Through Oxidative Stress. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, doi:10.3389/fphys.2021.627837.
301. Forrester, S.J.; Kikuchi, D.S.; Hernandes, M.S.; Xu, Q.; Griendling, K.K. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ. Res.* **2018**, *122*, 877–902, doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311401.
302. Ayala, A.; Muñoz, M.F.; Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and

- Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 1–31, doi:10.1155/2014/360438.
303. Elsayed Azab, A.; A Adwas, A.; Ibrahim Elsayed, A.S.; A Adwas, A.; Ibrahim Elsayed, A.S.; Quwaydir, F.A. Oxidative Stress and Antioxidant Mechanisms in Human Body. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.* **2019**, *6*, 43–47, doi:10.15406/jabb.2019.06.00173.
304. Genestra, M. Oxyl Radicals, Redox-Sensitive Signalling Cascades and Antioxidants. *Cell. Signal.* **2007**, *19*, 1807–1819, doi:10.1016/j.cellsig.2007.04.009.
305. Pacher, P.; Beckman, J.S.; Liaudet, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 315–424, doi:10.1152/physrev.00029.2006.
306. Liaudet, L.; Soriano, F.G.; Szabó, C. Biology of Nitric Oxide Signaling. *Crit. Care Med.* **2000**, *28*, N37–N52, doi:10.1097/00003246-200004001-00005.
307. Andrew, P. Enzymatic Function of Nitric Oxide Synthases. *Cardiovasc. Res.* **1999**, *43*, 521–531, doi:10.1016/S0008-6363(99)00115-7.
308. Douki, T.; Cadet, J. Peroxynitrite Mediated Oxidation of Purine Bases of Nucleosides and Isolated DNA. *Free Radic. Res.* **1996**, *24*, 369–380, doi:10.3109/10715769609088035.
309. Chakraborty, K.; Khan, G.A.; Banerjee, P.; Ray, U.; Sinha, A.K. Inhibition of Human Blood Platelet Aggregation and the Stimulation of Nitric Oxide Synthesis by Aspirin. *Platelets* **2003**, *14*, 421–427, doi:10.1080/095371032000158763.
310. Shimabukuro, M.; Ohneda, M.; Lee, Y.; Unger, R.H. Role of Nitric Oxide in Obesity-Induced Beta Cell Disease. *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 290–295, doi:10.1172/JCI119534.
311. McMurray, F.; Patten, D.A.; Harper, M.-E. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity-Recent Findings and Empirical Approaches. *Obesity* **2016**, *24*, 2301–2310, doi:10.1002/oby.21654.
312. Reuter, S.; Gupta, S.C.; Chaturvedi, M.M.; Aggarwal, B.B. Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How Are They Linked? *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1603–1616, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
313. Ramos-González, E.J.; Bitzer-Quintero, O.K.; Ortiz, G.; Hernández-Cruz, J.J.; Ramírez-Jirano, L.J. Relationship between Inflammation and Oxidative Stress and Its Effect on Multiple Sclerosis. *Neurología* **2021**, doi:10.1016/j.nrl.2021.10.003.
314. Perwez Hussain, S.; Harris, C.C. Inflammation and Cancer: An Ancient Link with Novel Potentials. *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 2373–2380, doi:10.1002/ijc.23173.
315. García-Sánchez, A.; Miranda-Díaz, A.G.; Cardona-Muñoz, E.G. The Role of Oxidative

- Stress in Physiopathology and Pharmacological Treatment with Pro- and Antioxidant Properties in Chronic Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, 2020, 1–16, doi:10.1155/2020/2082145.
316. Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C.J.; Telser, J. Role of Oxygen Radicals in DNA Damage and Cancer Incidence. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, 266, 37–56, doi:10.1023/B:MCBI.0000049134.69131.89.
 317. Nakamura, H.; Takada, K. Reactive Oxygen Species in Cancer: Current Findings and Future Directions. *Cancer Sci.* **2021**, 112, 3945–3952, doi:10.1111/cas.15068.
 318. VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Heal. Part C* **2009**, 27, 120–139, doi:10.1080/10590500902885684.
 319. Urbaniak, S.K.; Boguszewska, K.; Szewczuk, M.; Kaźmierczak-Barańska, J.; Karwowski, B.T. 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine (8-OxodG) and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) as a Potential Biomarker for Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Development. *Molecules* **2020**, 25, 202, doi:10.3390/molecules25010202.
 320. Dizdaroglu, M.; Jaruga, P.; Birincioglu, M.; Rodriguez, H. Free Radical-Induced Damage to DNA: Mechanisms and Measurement 1,2 1This Article Is Part of a Series of Reviews on "Oxidative DNA Damage and Repair." The Full List of Papers May Be Found on the Homepage of the Journal. 2Guest Editor: Miral Dizdaroglu. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, 32, 1102–1115, doi:10.1016/S0891-5849(02)00826-2.
 321. Anderson, A.P.; Luo, X.; Russell, W.; Yin, Y.W. Oxidative Damage Diminishes Mitochondrial DNA Polymerase Replication Fidelity. *Nucleic Acids Res.* **2020**, 48, 817–829, doi:10.1093/nar/gkz1018.
 322. Tan, S.-N.; Sim, S.-P.; Khoo, A.S.-B. Oxidative Stress-Induced Chromosome Breaks within the ABL Gene: A Model for Chromosome Rearrangement in Nasopharyngeal Carcinoma. *Hum. Genomics* **2018**, 12, 29, doi:10.1186/s40246-018-0160-8.
 323. Stone, K.; Ksebati, M.B.; Marnett, L.J. Investigation of the Adducts Formed by Reaction of Malondialdehyde with Adenosine. *Chem. Res. Toxicol.* **1990**, 3, 33–38, doi:10.1021/tx00013a006.
 324. Alscher, R.G. Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Controlling Oxidative Stress in Plants. *J. Exp. Bot.* **2002**, 53, 1331–1341, doi:10.1093/jexbot/53.372.1331.
 325. Younus, H. Therapeutic Potentials of Superoxide Dismutase. *Int. J. Health Sci. (Qassim)*.

- 2018**, *12*, 88–93.
326. Landis, G.N.; Tower, J. Superoxide Dismutase Evolution and Life Span Regulation. *Mech. Ageing Dev.* **2005**, *126*, 365–379, doi:10.1016/j.mad.2004.08.012.
 327. Wang, Y.; Branicky, R.; Noë, A.; Hekimi, S. Superoxide Dismutases: Dual Roles in Controlling ROS Damage and Regulating ROS Signaling. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 1915–1928, doi:10.1083/jcb.201708007.
 328. Yasui, K.; Baba, A. Therapeutic Potential of Superoxide Dismutase (SOD) for Resolution of Inflammation. *Inflamm. Res.* **2006**, *55*, 359–363, doi:10.1007/s00011-006-5195-y.
 329. Chelikani, P.; Fita, I.; Loewen, P.C. Diversity of Structures and Properties among Catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 192–208, doi:10.1007/s00018-003-3206-5.
 330. Francenia Santos-Sánchez, N.; Salas-Coronado, R.; Villanueva-Cañongo, C.; Hernández-Carlos, B. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. In *Antioxidants*; IntechOpen, 2019.
 331. Espinoza, S.E.; Guo, H.; Fedarko, N.; DeZern, A.; Fried, L.P.; Xue, Q.-L.; Leng, S.; Beamer, B.; Walston, J.D. Glutathione Peroxidase Enzyme Activity in Aging. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2008**, *63*, 505–509, doi:10.1093/gerona/63.5.505.
 332. Jiao, Y.; Wang, Y.; Guo, S.; Wang, G. Glutathione Peroxidases as Oncotargets. *Oncotarget* **2017**, *8*, 80093–80102, doi:10.18632/oncotarget.20278.
 333. Sarıkaya, E.; Doğan, S. Glutathione Peroxidase in Health and Diseases. In *Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease*; IntechOpen, 2020.
 334. Mirończuk-Chodakowska, I.; Witkowska, A.M.; Zujko, M.E. Endogenous Non-Enzymatic Antioxidants in the Human Body. *Adv. Med. Sci.* **2018**, *63*, 68–78, doi:10.1016/j.advms.2017.05.005.
 335. Kaurinovic, B.; Vastag, D. Flavonoids and Phenolic Acids as Potential Natural Antioxidants. In *Antioxidants*; IntechOpen, 2019.
 336. Reiter, R.J.; Tan, D.-X.; Mayo, J.C.; Sainz, R.M.; Leon, J.; Czarnocki, Z. Melatonin as an Antioxidant: Biochemical Mechanisms and Pathophysiological Implications in Humans. *Acta Biochim. Pol.* **2003**, *50*, 1129–1146.
 337. Erren, T.C.; Reiter, R.J. Light Hygiene: Time to Make Preventive Use of Insights – Old and New – into the Nexus of the Drug Light, Melatonin, Clocks, Chronodisruption and Public Health. *Med. Hypotheses* **2009**, *73*, 537–541, doi:10.1016/j.mehy.2009.06.003.
 338. Hardeland, R.; Pandi-Perumal, S.R.; Cardinali, D.P. Melatonin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*

- 2006**, 38, 313–316, doi:10.1016/j.biocel.2005.08.020.
339. Kvetnoy, I. Extrapineal Melatonin in Pathology: New Perspectives for Diagnosis, Prognosis and Treatment of Illness. *Neuroendocrinol. Lett.* **2002**, 23, 92–96.
340. REITER, R.J. Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions*. *Endocr. Rev.* **1991**, 12, 151–180, doi:10.1210/edrv-12-2-151.
341. Slominski, R.M.; Reiter, R.J.; Schlabritz-Loutsevitch, N.; Ostrom, R.S.; Slominski, A.T. Melatonin Membrane Receptors in Peripheral Tissues: Distribution and Functions. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, 351, 152–166, doi:10.1016/j.mce.2012.01.004.
342. Stehle, J.H.; Von Gall, C.; Korf, H.-W. Melatonin: A Clock-Output, A Clock-Input. *J. Neuroendocrinol.* **2003**, 15, 383–389, doi:10.1046/j.1365-2826.2003.01001.x.
343. Poeggeler, B.; Thuermann, S.; Dose, A.; Schoenke, M.; Burkhardt, S.; Hardeland, R. Melatonin's Unique Radical Scavenging Properties - Roles of Its Functional Substituents as Revealed by a Comparison with Its Structural Analogs. *J. Pineal Res.* **2002**, 33, 20–30, doi:10.1034/j.1600-079X.2002.01873.x.
344. Brzęczek, M.; Słonka, K.; Hyla-Klekot, L. Melatonin – a Pleiotropic Hormone. *Pediatr. i Med. Rodz.* **2016**, 12, 127–133, doi:10.15557/PiMR.2016.0011.
345. Talib, W.H.; Alsayed, A.R.; Abuawad, A.; Daoud, S.; Mahmood, A.I. Melatonin in Cancer Treatment: Current Knowledge and Future Opportunities. *Molecules* **2021**, 26, 2506, doi:10.3390/molecules26092506.
346. Tan, D.-X.; Manchester, L.C.; Terron, M.P.; Flores, L.J.; Reiter, R.J. One Molecule, Many Derivatives: A Never-Ending Interaction of Melatonin with Reactive Oxygen and Nitrogen Species? *J. Pineal Res.* **2007**, 42, 28–42, doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x.
347. Ressmeyer, A.-R.; Mayo, J.C.; Zelosko, V.; Sáinz, R.M.; Tan, D.-X.; Poeggeler, B.; Antolín, I.; Zsizsik, B.K.; Reiter, R.J.; Hardeland, R. Antioxidant Properties of the Melatonin Metabolite N 1 -Acetyl-5-Methoxykynuramine (AMK): Scavenging of Free Radicals and Prevention of Protein Destruction. *Redox Rep.* **2003**, 8, 205–213, doi:10.1179/135100003225002709.
348. Li, Y.; Li, S.; Zhou, Y.; Meng, X.; Zhang, J.-J.; Xu, D.-P.; Li, H.-B. Melatonin for the Prevention and Treatment of Cancer. *Oncotarget* **2017**, 8, 39896–39921, doi:10.18632/oncotarget.16379.
349. Smirnov, A.N. Nuclear Melatonin Receptors. *Biochemistry. (Mosc).* **2001**, 66, 19–26,

doi:10.1023/a:1002821427018.

350. Wang, R.-X.; Liu, H.; Xu, L.; Zhang, H.; Zhou, R.-X. Melatonin Downregulates Nuclear Receptor RZR/ROR γ Expression Causing Growth-Inhibitory and Anti-Angiogenesis Activity in Human Gastric Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Oncol. Lett.* **2016**, *12*, 897–903, doi:10.3892/ol.2016.4729.
351. WANG, R.-X.; LIU, H.; XU, L.; ZHANG, H.; ZHOU, R.-X. Involvement of Nuclear Receptor RZR/ROR γ in Melatonin-Induced HIF-1 α Inactivation in SGC-7901 Human Gastric Cancer Cells. *Oncol. Rep.* **2015**, *34*, 2541–2546, doi:10.3892/or.2015.4238.
352. Das, N.K.; Samanta, S. The Potential Anti-Cancer Effects of Melatonin on Breast Cancer. *Explor. Med.* **2022**, 112–127, doi:10.37349/emed.2022.00078.
353. Dai, J.; Inscho, E.W.; Yuan, L.; Hill, S.M. Modulation of Intracellular Calcium and Calmodulin by Melatonin in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *J. Pineal Res.* **2002**, *32*, 112–119, doi:10.1034/j.1600-079x.2002.1844.x.
354. Kohandel, Z.; Farkhondeh, T.; Aschner, M.; Samarghandian, S. Molecular Targets for the Management of Gastrointestinal Cancer Using Melatonin, a Natural Endogenous Body Hormone. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *140*, 111782, doi:10.1016/j.biopha.2021.111782.
355. Hardeland, R. Aging, Melatonin, and the Pro- and Anti-Inflammatory Networks. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1223, doi:10.3390/ijms20051223.
356. Wang, L.; Wang, C.; Choi, W.S. Use of Melatonin in Cancer Treatment: Where Are We? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 3779, doi:10.3390/ijms23073779.
357. Coelho, M.; Oliveira, T.; Fernandes, R. Biochemistry of Adipose Tissue: An Endocrine Organ. *Arch. Med. Sci.* **2013**, *9*.
358. Lee, Y.H.; Mottillo, E.P.; Granneman, J.G. Adipose Tissue Plasticity from WAT to BAT and in Between. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842*, 358–369, doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.011.
359. Berry, D.C.; Stenesen, D.; Zeve, D.; Graff, J.M. The Developmental Origins of Adipose Tissue. *Development* **2013**, *140*, 3939–3949, doi:10.1242/dev.080549.
360. Cui, X.B.; Chen, S.Y. White Adipose Tissue Browning and Obesity. *J. Biomed. Res.* **2017**, *31*, 1–2, doi:10.7555/JBR.31.20160101.
361. Giordano, A.; Smorlesi, A.; Frontini, A.; Barbatelli, G.; Cinti, S. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: White, Brown and Pink Adipocytes: The Extraordinary Plasticity of

- the Adipose Organ. *Eur. J. Endocrinol.* **2014**, *170*, R159–R171, doi:10.1530/EJE-13-0945.
362. Parra-Peralbo, E.; Talamillo, A.; Barrio, R. Origin and Development of the Adipose Tissue, a Key Organ in Physiology and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, doi:10.3389/fcell.2021.786129.
363. Cypess, A.M.; Lehman, S.; Williams, G.; Tal, I.; Rodman, D.; Goldfine, A.B.; Kuo, F.C.; Palmer, E.L.; Tseng, Y.-H.; Doria, A.; et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 1509–1517, doi:10.1056/NEJMoa0810780.
364. Cypess, A.M.; White, A.P.; Vernochet, C.; Schulz, T.J.; Xue, R.; Sass, C.A.; Huang, T.L.; Roberts-Toler, C.; Weiner, L.S.; Sze, C.; et al. Anatomical Localization, Gene Expression Profiling and Functional Characterization of Adult Human Neck Brown Fat. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 635–639, doi:10.1038/nm.3112.
365. Lidell, M.E.; Betz, M.J.; Leinhard, O.D.; Heglind, M.; Elander, L.; Slawik, M.; Mussack, T.; Nilsson, D.; Romu, T.; Nuutila, P.; et al. Evidence for Two Types of Brown Adipose Tissue in Humans. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 631–634, doi:10.1038/nm.3017.
366. Fonseca-Alaniz, M.H.; Takada, J.; Alonso-Vale, M.I.C.; Lima, F.B. Adipose Tissue as an Endocrine Organ: From Theory to Practice. *J. Pediatr. (Rio. J.)*. **2007**, doi:10.2223/JPED.1709.
367. Kiess, W.; Petzold, S.; Töpfer, M.; Garten, A.; Blüher, S.; Kapellen, T.; Körner, A.; Kratzsch, J. Adipocytes and Adipose Tissue. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *22*, 135–153, doi:10.1016/j.beem.2007.10.002.
368. Samuel O, O. Review on Multifaceted Involvement of Perivascular Adipose Tissue in Vascular Pathology. *Cardiovasc. Pathol.* **2020**, *49*, 107259, doi:10.1016/j.carpath.2020.107259.
369. Jaacks, L.M.; Vandevijvere, S.; Pan, A.; McGowan, C.J.; Wallace, C.; Imamura, F.; Mozaffarian, D.; Swinburn, B.; Ezzati, M. The Obesity Transition: Stages of the Global Epidemic. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2019**, *7*, 231–240, doi:10.1016/S2213-8587(19)30026-9.
370. WHO <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
371. Zatterale, F.; Longo, M.; Naderi, J.; Raciti, G.A.; Desiderio, A.; Miele, C.; Beguinot, F. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2

- Diabetes. *Front. Physiol.* **2020**, *10*, 1–20, doi:10.3389/fphys.2019.01607.
372. Chooi, Y.C.; Ding, C.; Magkos, F. The Epidemiology of Obesity. *Metabolism* **2019**, *92*, 6–10, doi:10.1016/j.metabol.2018.09.005.
373. Haththotuwa, R.N.; Wijeyaratne, C.N.; Senarath, U. Worldwide Epidemic of Obesity. In *Obesity and Obstetrics*; Elsevier, 2020; pp. 3–8.
374. Akindele, M.O.; Phillips, J.S.; Igumbor, E.U. The Relationship between Body Fat Percentage and Body Mass Index in Overweight and Obese Individuals in an Urban African Setting. *J. Public Health Africa* **2016**, doi:10.4081/jphia.2016.515.
375. Szymocha, M.; Bryàa, M.; Maniecka-bryàa, I. Praca Poglądowa Review Article Epidemia OtyáoĖci w XXI Wiekui The Obesity Epidemic in the 21 St Century. *Obesity* **2009**, *119*, 207–212.
376. Nuttall, F.Q. Body Mass Index. *Nutr. Today* **2015**, *50*, 117–128, doi:10.1097/NT.0000000000000092.
377. Weir, C.B.; Jan, A. *BMI Classification Percentile And Cut Off Points*; 2022;
378. Zierle-Ghosh, A.; Jan, A. *Physiology, Body Mass Index*; 2022;
379. Rothman, K.J. BMI-Related Errors in the Measurement of Obesity. *Int. J. Obes.* **2008**, *32*, S56–S59, doi:10.1038/ijo.2008.87.
380. Park, J.; Kim, S. Validity of Muscle-to-Fat Ratio as a Predictor of Adult Metabolic Syndrome. *J. Phys. Ther. Sci.* **2016**, *28*, 1036–1045, doi:10.1589/jpts.28.1036.
381. Dhawan, D.; Sharma, S. Abdominal Obesity, Adipokines and Non-Communicable Diseases. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2020**, *203*, 105737, doi:10.1016/j.jsbmb.2020.105737.
382. Yumuk, V.; Tsigos, C.; Fried, M.; Schindler, K.; Busetto, L.; Micic, D.; Toplak, H. European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obes. Facts* **2015**, *8*, 402–424, doi:10.1159/000442721.
383. Divella, R.; De Luca, R.; Abbate, I.; Naglieri, E.; Daniele, A. Obesity and Cancer: The Role of Adipose Tissue and Adipo-Cytokines-Induced Chronic Inflammation. *J. Cancer* **2016**, *7*, 2346–2359, doi:10.7150/jca.16884.
384. Kershaw, E.E.; Flier, J.S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 2548–2556, doi:10.1210/jc.2004-0395.
385. Matsuzawa, Y. The Metabolic Syndrome and Adipocytokines. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 2917–2921, doi:10.1016/j.febslet.2006.04.028.

386. Costa, J. V; Duarte, J.S. [Adipose Tissue and Adipokines]. *Acta Med. Port.* **2006**, *19*, 251–256.
387. Choe, S.S.; Huh, J.Y.; Hwang, I.J.; Kim, J.I.; Kim, J.B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2016**, *7*, doi:10.3389/fendo.2016.00030.
388. Menendez, A.; Wanczyk, H.; Walker, J.; Zhou, B.; Santos, M.; Finck, C. Obesity and Adipose Tissue Dysfunction: From Pediatrics to Adults. *Genes (Basel)*. **2022**, *13*, 1866, doi:10.3390/genes13101866.
389. Gustafson, B. Adipose Tissue, Inflammation and Atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* **2010**, *17*, 332–341, doi:10.5551/jat.3939.
390. Ellulu, M.S.; Patimah, I.; Khaza'ai, H.; Rahmat, A.; Abed, Y. Obesity & Inflammation: The Linking Mechanism & the Complications. *Arch. Med. Sci.* **2017**, *13*, 851–863, doi:10.5114/aoms.2016.58928.
391. Schmidt, F.M.; Weschenfelder, J.; Sander, C.; Minkwitz, J.; Thormann, J.; Chittka, T.; Mergl, R.; Kirkby, K.C.; Faßhauer, M.; Stumvoll, M.; et al. Inflammatory Cytokines in General and Central Obesity and Modulating Effects of Physical Activity. *PLoS One* **2015**, *10*, e0121971, doi:10.1371/journal.pone.0121971.
392. Wang, T.; He, C. Pro-Inflammatory Cytokines: The Link between Obesity and Osteoarthritis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2018**, *44*, 38–50, doi:10.1016/j.cytogfr.2018.10.002.
393. Mancuso, P. The Role of Adipokines in Chronic Inflammation. *ImmunoTargets Ther.* **2016**, *47*, doi:10.2147/ITT.S73223.
394. Wu, D.; Molofsky, A.B.; Liang, H.-E.; Ricardo-Gonzalez, R.R.; Jouihan, H.A.; Bando, J.K.; Chawla, A.; Locksley, R.M. Eosinophils Sustain Adipose Alternatively Activated Macrophages Associated with Glucose Homeostasis. *Science (80-)*. **2011**, *332*, 243–247, doi:10.1126/science.1201475.
395. Pacifico, L.; Di Renzo, L.; Anania, C.; Osborn, J.F.; Ippoliti, F.; Schiavo, E.; Chiesa, C. Increased T-Helper Interferon- γ -Secreting Cells in Obese Children. *Eur. J. Endocrinol.* **2006**, *154*, 691–697, doi:10.1530/eje.1.02138.
396. Lumeng, C.N.; Deyoung, S.M.; Saltiel, A.R. Macrophages Block Insulin Action in Adipocytes by Altering Expression of Signaling and Glucose Transport Proteins. *Am. J. Physiol. Metab.* **2007**, *292*, E166–E174, doi:10.1152/ajpendo.00284.2006.

397. Feuerer, M.; Herrero, L.; Cipolletta, D.; Naaz, A.; Wong, J.; Nayer, A.; Lee, J.; Goldfine, A.B.; Benoist, C.; Shoelson, S.; et al. Lean, but Not Obese, Fat Is Enriched for a Unique Population of Regulatory T Cells That Affect Metabolic Parameters. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 930–939, doi:10.1038/nm.2002.
398. Nishimura, S.; Manabe, I.; Nagasaki, M.; Eto, K.; Yamashita, H.; Ohsugi, M.; Otsu, M.; Hara, K.; Ueki, K.; Sugiura, S.; et al. CD8+ Effector T Cells Contribute to Macrophage Recruitment and Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 914–920, doi:10.1038/nm.1964.
399. Weisberg, S.P.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R.L.; Ferrante, A.W. Obesity Is Associated with Macrophage Accumulation in Adipose Tissue. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1796–1808, doi:10.1172/JCI19246.
400. Roberts, D.L.; Dive, C.; Renehan, A.G. Biological Mechanisms Linking Obesity and Cancer Risk: New Perspectives. *Annu. Rev. Med.* **2010**, *61*, 301–316, doi:10.1146/annurev.med.080708.082713.
401. Fernández-Sánchez, A.; Madrigal-Santillán, E.; Bautista, M.; Esquivel-Soto, J.; Morales-González, Á.; Esquivel-Chirino, C.; Durante-Montiel, I.; Sánchez-Rivera, G.; Valadez-Vega, C.; Morales-González, J.A. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 3117–3132, doi:10.3390/ijms12053117.
402. Green, E.D.; Maffei, M.; Braden, V. V.; Proenca, R.; DeSilva, U.; Zhang, Y.; Chua, S.C.; Leibel, R.L.; Weissenbach, J.; Friedman, J.M. The Human Obese (OB) Gene: RNA Expression Pattern and Mapping on the Physical, Cytogenetic, and Genetic Maps of Chromosome 7. *Genome Res.* **1995**, *5*, 5–12, doi:10.1101/gr.5.1.5.
403. Friedman, J.M.; Halaas, J.L. Leptin and the Regulation of Body Weight in Mammals. *Nature* **1998**, *395*, 763–770, doi:10.1038/27376.
404. Flier, J.S.; Maratos-Flier, E. Leptin's Physiologic Role: Does the Emperor of Energy Balance Have No Clothes? *Cell Metab.* **2017**, *26*, 24–26, doi:10.1016/j.cmet.2017.05.013.
405. Marseglia, L.; Manti, S.; D'Angelo, G.; Nicotera, A.; Parisi, E.; Di Rosa, G.; Gitto, E.; Arrigo, T. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *16*, 378–400, doi:10.3390/ijms16010378.
406. Laclaustra, M.; Corella, D.; Ordovas, J.M. Metabolic Syndrome Pathophysiology: The Role of Adipose Tissue. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2007**, *17*, 125–139,

- doi:10.1016/j.numecd.2006.10.005.
407. Kersten, S. Mechanisms of Nutritional and Hormonal Regulation of Lipogenesis. *EMBO Rep.* **2001**, *2*, 282–286, doi:10.1093/embo-reports/kve071.
 408. Manna, P.; Jain, S.K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2015**, *13*, 423–444, doi:10.1089/met.2015.0095.
 409. Cava, A. La; Matarese, G. The Weight of Leptin in Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 371–379, doi:10.1038/nri1350.
 410. Adeghate, E. Visfatin: Structure, Function and Relation to Diabetes Mellitus and Other Dysfunctions. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1851–1862, doi:10.2174/092986708785133004.
 411. Lin, T.-C. The Role of Visfatin in Cancer Proliferation, Angiogenesis, Metastasis, Drug Resistance and Clinical Prognosis. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *Volume 11*, 3481–3491, doi:10.2147/CMAR.S199597.
 412. AL-Suhaimi, E.A.; Shehzad, A. Leptin, Resistin and Visfatin: The Missing Link between Endocrine Metabolic Disorders and Immunity. *Eur. J. Med. Res.* **2013**, *18*, 12, doi:10.1186/2047-783X-18-12.
 413. Saddi-Rosa, P.; Oliveira, C.S.; Giuffrida, F.M.; Reis, A.F. Visfatin, Glucose Metabolism and Vascular Disease: A Review of Evidence. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2010**, *2*, 21, doi:10.1186/1758-5996-2-21.
 414. Fukuhara, A.; Matsuda, M.; Nishizawa, M.; Segawa, K.; Tanaka, M.; Kishimoto, K.; Matsuki, Y.; Murakami, M.; Ichisaka, T.; Murakami, H.; et al. Visfatin: A Protein Secreted by Visceral Fat That Mimics the Effects of Insulin. *Science (80-.)*. **2005**, *307*, 426–430, doi:10.1126/science.1097243.
 415. Jia, S.H.; Li, Y.; Parodo, J.; Kapus, A.; Fan, L.; Rotstein, O.D.; Marshall, J.C. Pre-B Cell Colony-Enhancing Factor Inhibits Neutrophil Apoptosis in Experimental Inflammation and Clinical Sepsis. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1318–1327, doi:10.1172/JCI19930.
 416. Lago, F.; Dieguez, C.; Gómez-Reino, J.; Gualillo, O. Adipokines as Emerging Mediators of Immune Response and Inflammation. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2007**, *3*, 716–724, doi:10.1038/ncprheum0674.
 417. Ahima, R.S. Adiponectin/Resistin. In *Handbook of Biologically Active Peptides*; Elsevier, 2013; pp. 1045–1048.

418. Jamaluddin, M.S.; Weakley, S.M.; Yao, Q.; Chen, C. Resistin: Functional Roles and Therapeutic Considerations for Cardiovascular Disease. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165*, 622–632, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01369.x.
419. Degawa-Yamauchi, M.; Bovenkerk, J.E.; Juliar, B.E.; Watson, W.; Kerr, K.; Jones, R.; Zhu, Q.; Considine, R. V. Serum Resistin (FIZZ3) Protein Is Increased in Obese Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *88*, 5452–5455, doi:10.1210/jc.2002-021808.
420. Steppan, C.M.; Bailey, S.T.; Bhat, S.; Brown, E.J.; Banerjee, R.R.; Wright, C.M.; Patel, H.R.; Ahima, R.S.; Lazar, M.A. The Hormone Resistin Links Obesity to Diabetes. *Nature* **2001**, *409*, 307–312, doi:10.1038/35053000.
421. Gerber, M.; Boettner, A.; Seidel, B.; Lammert, A.; Bär, J.; Schuster, E.; Thiery, J.; Kiess, W.; Kratzsch, J. Serum Resistin Levels of Obese and Lean Children and Adolescents: Biochemical Analysis and Clinical Relevance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 4503–4509, doi:10.1210/jc.2005-0437.
422. Lee, J.O.; Kim, N.; Lee, H.J.; Lee, Y.W.; Kim, S.J.; Park, S.H.; Kim, H.S. Resistin, a Fat-Derived Secretory Factor, Promotes Metastasis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells through ERM Activation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 18923, doi:10.1038/srep18923.
423. Pham, T.-T.; Nimptsch, K.; Aleksandrova, K.; Jenab, M.; Reichmann, R.; Wu, K.; Tjønneland, A.; Kyrø, C.; Schulze, M.B.; Kaaks, R.; et al. Pre-Diagnostic Circulating Resistin Concentrations Are Not Associated with Colorectal Cancer Risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Cancers (Basel)*. **2022**, *14*, 5499, doi:10.3390/cancers14225499.
424. Zuniga, M.C.; Raghuraman, G.; Hitchner, E.; Weyand, C.; Robinson, W.; Zhou, W. PKC-Epsilon and TLR4 Synergistically Regulate Resistin-Mediated Inflammation in Human Macrophages. *Atherosclerosis* **2017**, *259*, 51–59, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.02.021.
425. Codoñer-Franch, P.; Alonso-Iglesias, E. Resistin: Insulin Resistance to Malignancy. *Clin. Chim. Acta* **2015**, *438*, 46–54, doi:10.1016/j.cca.2014.07.043.
426. Deb, A.; Deshmukh, B.; Ramteke, P.; Bhati, F.K.; Bhat, M.K. Resistin: A Journey from Metabolism to Cancer. *Transl. Oncol.* **2021**, *14*, 101178, doi:10.1016/j.tranon.2021.101178.
427. Filková, M.; Haluzík, M.; Gay, S.; Šenolt, L. The Role of Resistin as a Regulator of Inflammation: Implications for Various Human Pathologies. *Clin. Immunol.* **2009**, *133*,

- 157–170, doi:10.1016/j.clim.2009.07.013.
428. Silswal, N.; Singh, A.K.; Aruna, B.; Mukhopadhyay, S.; Ghosh, S.; Ehtesham, N.Z. Human Resistin Stimulates the Pro-Inflammatory Cytokines TNF- α and IL-12 in Macrophages by NF-KB-Dependent Pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 1092–1101, doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.202.
429. Pyrzak, B.; Ruminska, M.; Popko, K.; Demkow, U. Adiponectin as a Biomarker of the Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *Eur. J. Med. Res.* **2010**, *15*, 147, doi:10.1186/2047-783X-15-S2-147.
430. Robinson, K.; Prins, J.; Venkatesh, B. Clinical Review: Adiponectin Biology and Its Role in Inflammation and Critical Illness. *Crit. Care* **2011**, *15*, 221, doi:10.1186/cc10021.
431. Achari, A.; Jain, S. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1321, doi:10.3390/ijms18061321.
432. Nigro, E.; Scudiero, O.; Monaco, M.L.; Palmieri, A.; Mazzarella, G.; Costagliola, C.; Bianco, A.; Daniele, A. New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–14, doi:10.1155/2014/658913.
433. Lin, C.F.; Chen, J.W. Obesity Paradox - The Controversial Role of Body Mass Index and Plasma Adiponectin in Coronary Artery Disease and Acute Coronary Syndrome. *Acta Cardiol. Sin.* **2013**, *29*, 381–386.
434. Yamauchi, T.; Kamon, J.; Ito, Y.; Tsuchida, A.; Yokomizo, T.; Kita, S.; Sugiyama, T.; Miyagishi, M.; Hara, K.; Tsunoda, M.; et al. Cloning of Adiponectin Receptors That Mediate Antidiabetic Metabolic Effects. *Nature* **2003**, *423*, 762–769, doi:10.1038/nature01705.
435. Schraw, T.; Wang, Z. V.; Halberg, N.; Hawkins, M.; Scherer, P.E. Plasma Adiponectin Complexes Have Distinct Biochemical Characteristics. *Endocrinology* **2008**, *149*, 2270–2282, doi:10.1210/en.2007-1561.
436. Al-Hamodi, Z.; AL-Habori, M.; Al-Meer, A.; Saif-Ali, R. Association of Adipokines, Leptin/Adiponectin Ratio and C-Reactive Protein with Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2014**, *6*, 99, doi:10.1186/1758-5996-6-99.
437. Kazumi, T.; Kawaguchi, A.; Hirano, T.; Yoshino, G. Serum Adiponectin Is Associated with High-Density Lipoprotein Cholesterol, Triglycerides, and Low-Density Lipoprotein Particle Size in Young Healthy Men. *Metabolism* **2004**, *53*, 589–593, doi:10.1016/j.metabol.2003.12.008.

438. Wolfson, N.; Gavish, D.; Matas, Z.; Boaz, M.; Shargorodsky, M. Relation of Adiponectin to Glucose Tolerance Status, Adiposity, and Cardiovascular Risk Factor Load. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, *2012*, 1–5, doi:10.1155/2012/250621.
439. Ouedraogo, R.; Gong, Y.; Berzins, B.; Wu, X.; Mahadev, K.; Hough, K.; Chan, L.; Goldstein, B.J.; Scalia, R. Adiponectin Deficiency Increases Leukocyte-Endothelium Interactions via Upregulation of Endothelial Cell Adhesion Molecules in Vivo. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 1718–1726, doi:10.1172/JCI29623.
440. Kumada, M.; Kihara, S.; Ouchi, N.; Kobayashi, H.; Okamoto, Y.; Ohashi, K.; Maeda, K.; Nagaretani, H.; Kishida, K.; Maeda, N.; et al. Adiponectin Specifically Increased Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Through Interleukin-10 Expression in Human Macrophages. *Circulation* **2004**, *109*, 2046–2049, doi:10.1161/01.CIR.0000127953.98131.ED.
441. Marta Dąbrowska, Dorota Szydlarska, E.B.-A. Adiponektyna a Insulinooporność i Miażdżyca Marta Dąbrowska, Dorota Szydlarska, Ewa Bar-Andziak. *Endokrynol. Otyłość i Zaburzenia Przemiany Mater.* **2011**, *7*, 186–191.
442. Furukawa, S.; Fujita, T.; Shimabukuro, M.; Iwaki, M.; Yamada, Y.; Nakajima, Y.; Nakayama, O.; Makishima, M.; Matsuda, M.; Shimomura, I. Increased Oxidative Stress in Obesity and Its Impact on Metabolic Syndrome. *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 1752–1761, doi:10.1172/JCI21625.
443. Deng, Y.; Scherer, P.E. Adipokines as Novel Biomarkers and Regulators of the Metabolic Syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1212*, E1–E19, doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05875.x.
444. Ouchi, N.; Kihara, S.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y.; Walsh, K. Obesity, Adiponectin and Vascular Inflammatory Disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **2003**, *14*, 561–566, doi:10.1097/00041433-200312000-00003.
445. Wang, Y.; Lam, K.S.; Xu, A. Adiponectin as a Negative Regulator in Obesity-Related Mammary Carcinogenesis. *Cell Res.* **2007**, *17*, 280–282, doi:10.1038/cr.2007.14.
446. Barb, D.; Pazaitou-Panayiotou, K.; Mantzoros, C.S. Adiponectin: A Link between Obesity and Cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2006**, *15*, 917–931, doi:10.1517/13543784.15.8.917.
447. Tan, B.K.; Adya, R.; Randeve, H.S. Omentin: A Novel Link Between Inflammation, Diabetes, and Cardiovascular Disease. *Trends Cardiovasc. Med.* **2010**, *20*, 143–148,

doi:10.1016/j.tcm.2010.12.002.

448. Paval, D.R.; Di Virgilio, T.G.; Skipworth, R.J.E.; Gallagher, I.J. The Emerging Role of Intelectin-1 in Cancer. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, doi:10.3389/fonc.2022.767859.
449. Yang, R.-Z.; Lee, M.-J.; Hu, H.; Pray, J.; Wu, H.-B.; Hansen, B.C.; Shuldiner, A.R.; Fried, S.K.; McLenithan, J.C.; Gong, D.-W. Identification of Omentin as a Novel Depot-Specific Adipokine in Human Adipose Tissue: Possible Role in Modulating Insulin Action. *Am. J. Physiol. Metab.* **2006**, *290*, E1253–E1261, doi:10.1152/ajpendo.00572.2004.
450. de Souza Batista, C.M.; Yang, R.-Z.; Lee, M.-J.; Glynn, N.M.; Yu, D.-Z.; Pray, J.; Ndubuizu, K.; Patil, S.; Schwartz, A.; Kligman, M.; et al. Omentin Plasma Levels and Gene Expression Are Decreased in Obesity. *Diabetes* **2007**, *56*, 1655–1661, doi:10.2337/db06-1506.
451. Christodoulatos, G.S.; Antonakos, G.; Karampela, I.; Psallida, S.; Stratigou, T.; Vallianou, N.; Lekka, A.; Marinou, I.; Vogiatzakis, E.; Kokoris, S.; et al. Circulating Omentin-1 as a Biomarker at the Intersection of Postmenopausal Breast Cancer Occurrence and Cardiometabolic Risk: An Observational Cross-Sectional Study. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1609, doi:10.3390/biom11111609.
452. Parida, S.; Siddharth, S.; Sharma, D. Role of Omentin in Obesity Paradox in Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, 275, doi:10.3390/cancers13020275.
453. Radzik-Zajęc, J.; Wytrychowski, K.; Wiśniewski, A.; Barg, W. The Role of the Novel Adipokines Vaspin and Omentin in Chronic Inflammatory Diseases. *Pediatr. Endocrinol. Diabetes Metab.* **2022**, doi:10.5114/pedm.2022.121371.
454. Au-Yeung, C.-L.; Yeung, T.-L.; Achreja, A.; Zhao, H.; Yip, K.-P.; Kwan, S.-Y.; Onstad, M.; Sheng, J.; Zhu, Y.; Baluya, D.L.; et al. ITLN1 Modulates Invasive Potential and Metabolic Reprogramming of Ovarian Cancer Cells in Omental Microenvironment. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3546, doi:10.1038/s41467-020-17383-2.
455. Xu, H.; Barnes, G.T.; Yang, Q.; Tan, G.; Yang, D.; Chou, C.J.; Sole, J.; Nichols, A.; Ross, J.S.; Tartaglia, L.A.; et al. Chronic Inflammation in Fat Plays a Crucial Role in the Development of Obesity-Related Insulin Resistance. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1821–1830, doi:10.1172/JCI19451.
456. Castro, A.M.; Macedo-de la Concha, L.E.; Pantoja-Meléndez, C.A. Low-Grade Inflammation and Its Relation to Obesity and Chronic Degenerative Diseases. *Rev. Médica del Hosp. Gen. México* **2017**, *80*, 101–105, doi:10.1016/j.hgmx.2016.06.011.
457. Catalán, V.; Gómez-Ambrosi, J.; Rodríguez, A.; Frühbeck, G. Adipose Tissue Immunity

- and Cancer. *Front. Physiol.* **2013**, *4 OCT*, 1–13, doi:10.3389/fphys.2013.00275.
458. Deng, T.; Lyon, C.J.; Bergin, S.; Caligiuri, M.A.; Hsueh, W.A. Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2016**, *11*, doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044359.
459. Khan, N.I.; Naz, L.; Yasmeen, G. Obesity: An Independent Risk Factor for Systemic Oxidative Stress. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2006**, *19*, 62–65.
460. Block, G. Factors Associated with Oxidative Stress in Human Populations. *Am. J. Epidemiol.* **2002**, *156*, 274–285, doi:10.1093/aje/kwf029.
461. Wolin, K.Y.; Carson, K.; Colditz, G.A. Obesity and Cancer. *Oncologist* **2010**, *15*, 556–565, doi:10.1634/theoncologist.2009-0285.
462. Stewart, S.T.; Cutler, D.M.; Rosen, A.B. Forecasting the Effects of Obesity and Smoking on U.S. Life Expectancy. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 2252–2260, doi:10.1056/NEJMsa0900459.
463. Parida, S.; Siddharth, S.; Sharma, D. Adiponectin, Obesity, and Cancer: Clash of the Bigwigs in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2519, doi:10.3390/ijms20102519.
464. Jain, N.; Soni, B.; Khetan, A.; Mishra, S.; Sharma, B.; Bhojwani, R. Duodenal Neuroendocrine Tumours in Morbidly Obese: Amalgamated Strategy to Optimise Outcome. *J. Minim. Access Surg.* **2021**, *17*, 249, doi:10.4103/jmas.JMAS_77_20.
465. Santos, A.P.; Santos, A.C.; Castro, C.; Raposo, L.; Pereira, S.S.; Torres, I.; Henrique, R.; Cardoso, H.; Monteiro, M.P. Visceral Obesity and Metabolic Syndrome Are Associated with Well-Differentiated Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Cancers (Basel)*. **2018**, *10*, doi:10.3390/cancers10090293.
466. Feola, T.; Puliani, G.; Sesti, F.; Modica, R.; Centello, R.; Minotta, R.; Cannavale, G.; Di Meglio, S.; Di Vito, V.; Lauretta, R.; et al. Risk Factors for Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms (GEP-NENs): A Three-Centric Case–Control Study. *J. Endocrinol. Invest.* **2022**, *45*, 849–857, doi:10.1007/s40618-021-01715-0.
467. Drabkin, D.L.; Austin, J.H. SPECTROPHOTOMETRIC STUDIES. *J. Biol. Chem.* **1935**, *112*, 51–65, doi:10.1016/S0021-9258(18)74965-X.
468. Misra, H.P.; Fridovich, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3170–3175, doi:10.1016/S0021-9258(19)45228-9.

469. BEERS, R.F.; SIZER, I.W. A Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase. *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 133–140.
470. Paglia, D.E.; Valentine, W.N. Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **1967**, *70*, 158–169.
471. Buege, J.A.; Aust, S.D. [30] Microsomal Lipid Peroxidation. In; 1978; pp. 302–310.
472. Esterbauer, H.; Cheeseman, K.H. [42] Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal. In; 1990; pp. 407–421.
473. Kohl, T.O.; Ascoli, C.A. Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Cold Spring Harb. Protoc.* **2017**, *2017*, pdb.prot093740, doi:10.1101/pdb.prot093740.
474. Bio-Rad No Title Available online: <https://www.bio-rad.com/en-pl/applications-technologies/bio-plex-multiplex-immunoassays?ID=LUSM0ZMNI#helptop>.
475. Singh, S.; Granberg, D.; Wolin, E.; Warner, R.; Sissons, M.; Kolarova, T.; Goldstein, G.; Pavel, M.; Öberg, K.; Leyden, J. Patient-Reported Burden of a Neuroendocrine Tumor (NET) Diagnosis: Results From the First Global Survey of Patients With NETs. *J. Glob. Oncol.* **2017**, *3*, 43–53, doi:10.1200/JGO.2015.002980.
476. Anderson, N.M.; Simon, M.C. The Tumor Microenvironment. *Curr. Biol.* **2020**, *30*, R921–R925, doi:10.1016/j.cub.2020.06.081.
477. Varga, J.; Greten, F.R. Cell Plasticity in Epithelial Homeostasis and Tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19*, 1133–1141, doi:10.1038/ncb3611.
478. Ritter, B.; Greten, F.R. Modulating Inflammation for Cancer Therapy. *J. Exp. Med.* **2019**, *216*, 1234–1243, doi:10.1084/jem.20181739.
479. Lengyel, E.; Makowski, L.; DiGiovanni, J.; Kolonin, M.G. Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors. *Trends in Cancer* **2018**, *4*, 374–384, doi:10.1016/j.trecan.2018.03.004.
480. Nuskiewicz, J.; Czuczejko, J.; Drózd, W.; Woźniak, A.; Małkowski, B.; Szewczyk-Golec, K. Concentration of Selected Adipokines and Factors Regulating Carbohydrate Metabolism in Patients with Head and Neck Cancer in Respect to Their Body Mass Index. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 3283, doi:10.3390/ijms24043283.
481. Azmanova, M.; Pitto-Barry, A. Oxidative Stress in Cancer Therapy: Friend or Enemy? *ChemBioChem* **2022**, *23*, doi:10.1002/cbic.202100641.

482. Dougan, M.; Dranoff, G. Immune Therapy for Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 83–117, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132544.
483. Arfin, S.; Jha, N.K.; Jha, S.K.; Kesari, K.K.; Ruokolainen, J.; Roychoudhury, S.; Rathi, B.; Kumar, D. Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism. *Antioxidants* **2021**, *10*, 642, doi:10.3390/antiox10050642.
484. Kangari, P.; Zarnoosheh Farahany, T.; Golchin, A.; Ebadollahzadeh, S.; Salmaninejad, A.; Mahboob, S.A.; Nourazarian, A. Enzymatic Antioxidant and Lipid Peroxidation Evaluation in the Newly Diagnosed Breast Cancer Patients in Iran. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **2018**, *19*, 3511–3515, doi:10.31557/APJCP.2018.19.12.3511.
485. Del Rio, D.; Stewart, A.J.; Pellegrini, N. A Review of Recent Studies on Malondialdehyde as Toxic Molecule and Biological Marker of Oxidative Stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2005**, *15*, 316–328, doi:10.1016/j.numecd.2005.05.003.
486. Singh, Z.; Karthigesu, I.P.; Singh, P.; Kaur, R. Use of Malondialdehyde as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Different Disease Pathologies: A Review. *Iran. J. Public Health* **2014**, *43*, 7–16.
487. RafiqKhan, M.; Sellappa, S. Serum Malondialdehyde Levels in Lung Cancer Patients. *J. Appl. Biol. Biotechnol* **2013**, *1*, 32–34.
488. Thimmulappa, R.K.; Chattopadhyay, I.; Rajasekaran, S. Oxidative Stress Mechanisms in the Pathogenesis of Environmental Lung Diseases. In *Oxidative Stress in Lung Diseases*; Springer Singapore: Singapore, 2020; pp. 103–137.
489. Topdag, S.; Aslaner, A.; Tataroglu, C.; Ilce, Z. Evaluation of Antioxidant Capacity in Lung Carcinoma. *Indian J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2005**, *21*, 269–271, doi:10.1007/s12055-005-0004-8.
490. Gonenc, A.; Ozkan, Y.; Torun, M.; Simsek, B. Plasma Malondialdehyde (MDA) Levels in Breast and Lung Cancer Patients. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2001**, *26*, 141–144, doi:10.1046/j.1365-2710.2001.00334.x.
491. Cobanoglu, U.; Demir, H.; Cebi, A.; Sayir, F.; Alp, H.H.; Akan, Z.; Gur, T.; Bakan, E. Lipid Peroxidation, DNA Damage and Coenzyme Q10 in Lung Cancer Patients--Markers for Risk Assessment? *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2011**, *12*, 1399–1403.
492. Lei, L.; Zhang, J.; Decker, E.A.; Zhang, G. Roles of Lipid Peroxidation-Derived Electrophiles in Pathogenesis of Colonic Inflammation and Colon Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, doi:10.3389/fcell.2021.665591.

493. Skrzydlewska, E. Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Colorectal Cancer. *World J. Gastroenterol.* **2005**, *11*, 403, doi:10.3748/wjg.v11.i3.403.
494. Chandramathi, S.; Suresh, K.; Anita, Z.B.; Kuppusamy, U.R. Comparative Assessment of Urinary Oxidative Indices in Breast and Colorectal Cancer Patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2009**, *135*, 319–323, doi:10.1007/s00432-008-0462-7.
495. Leung, E.Y.L.; Crozier, J.E.M.; Talwar, D.; O'Reilly, D.S.J.; McKee, R.F.; Horgan, P.G.; McMillan, D.C. Vitamin Antioxidants, Lipid Peroxidation, Tumour Stage, the Systemic Inflammatory Response and Survival in Patients with Colorectal Cancer. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 2460–2464, doi:10.1002/ijc.23811.
496. Saygili, E.I.; Konukoglu, D.; Papila, C.; Akcay, T. Levels of Plasma Vitamin E, Vitamin C, TBARS, and Cholesterol in Male Patients with Colorectal Tumors. *Biochemistry. (Mosc).* **2003**, *68*, 325–328, doi:10.1023/a:1023010418230.
497. Surinenaite, B.; Prasmickiene, G.; Milasiene, V.; Stratilatovas, E.; Didziapetriene, J. The Influence of Surgical Treatment and Red Blood Cell Transfusion on Changes in Antioxidative and Immune System Parameters in Colorectal Cancer Patients. *Medicina (Kaunas).* **2009**, *45*, 785–791.
498. Schnetz-Boutaud, N.C.; Saleh, S.; Marnett, L.J.; Stone, M.P. Structure of the Malondialdehyde Deoxyguanosine Adduct M1G When Placed Opposite a Two-Base Deletion in the (CpG)₃ Frameshift Hotspot of the Salmonella Typhimurium Hisd3052 Gene. In; 2001; pp. 513–516.
499. Piberger, A.L.; Krüger, C.T.; Strauch, B.M.; Schneider, B.; Hartwig, A. BPDE-Induced Genotoxicity: Relationship between DNA Adducts, Mutagenicity in the in Vitro PIG-A Assay, and the Transcriptional Response to DNA Damage in TK6 Cells. *Arch. Toxicol.* **2018**, *92*, 541–551, doi:10.1007/s00204-017-2003-0.
500. Feng, Z.; Hu, W.; Marnett, L.J.; Tang, M. Malondialdehyde, a Major Endogenous Lipid Peroxidation Product, Sensitizes Human Cells to UV- and BPDE-Induced Killing and Mutagenesis through Inhibition of Nucleotide Excision Repair. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2006**, *601*, 125–136, doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.06.003.
501. Braga-Neto, M.B.; Costa, D.V.S.; Queiroz, D.M.M.; Maciel, F.S.; de Oliveira, M.S.; Viana-Junior, A.B.; Santos, F.A.; Leitao, R.F.C.; Brito, G.A.C.; Vasconcelos, P.R.L.; et al. Increased Oxidative Stress in Gastric Cancer Patients and Their First-Degree Relatives: A Prospective Study from Northeastern Brazil. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, *2021*, 1–

- 9, doi:10.1155/2021/6657434.
502. Atay, A.E.; Esen, B.; Gokmen, E.S. Oxidative Stress and Gastrointestinal System Cancers. In *Gastrointestinal Tissue*; Elsevier, 2017; pp. 29–51.
503. Goroshinskaya, I.A.; Frantsiyants, E.M.; Aleynov, V.A.; Nemashkalova, L.A.; Cheryarina, N.D.; Trifanov, V.S.; Mezentsev, S.S.; Grechkin, F.N.; Duritskiy, M.N.; Kit, O.I.; et al. Parameters of Oxidative Metabolism in the Blood of Patients with Pancreatic Tumors of Different Histotypes. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, e16697–e16697, doi:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e16697.
504. Fortunati, N.; Manti, R.; Birocco, N.; Pugliese, M.; Brignardello, E.; Ciuffreda, L.; Catalano, M.; Aragno, M.; Boccuzzi, G. Pro-Inflammatory Cytokines and Oxidative Stress/Antioxidant Parameters Characterize the Bio-Humoral Profile of Early Cachexia in Lung Cancer Patients. *Oncol. Rep.* **2007**, doi:10.3892/or.18.6.1521.
505. ESME, H.; CEMEK, M.; SEZER, M.; SAGLAM, H.; DEMIR, A.; MELEK, H.; UNLU, M. High Levels of Oxidative Stress in Patients with Advanced Lung Cancer. *Respirology* **2008**, *13*, 112–116, doi:10.1111/j.1440-1843.2007.01212.x.
506. Živković, N.P.; Petrovečki, M.; Lončarić, Č.T.; Nikolić, I.; Waeg, G.; Jaganjac, M.; Žarković, K.; Žarković, N. Positron Emission Tomography-Computed Tomography and 4-Hydroxynonenal-Histidine Immunohistochemistry Reveal Differential Onset of Lipid Peroxidation in Primary Lung Cancer and in Pulmonary Metastasis of Remote Malignancies. *Redox Biol.* **2017**, *11*, 600–605, doi:10.1016/j.redox.2017.01.005.
507. Jaramillo, M.C.; Zhang, D.D. The Emerging Role of the Nrf2–Keap1 Signaling Pathway in Cancer. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 2179–2191, doi:10.1101/gad.225680.113.
508. Ścibior-Bentkowska, D.; Czczot Katedra Zakład Biochemii, H. Komórki Nowotworowe a Stres Oksydacyjny Cancer Cells and Oxidative Stress. *Postep. Hig Med Dosw.* **2009**, *63*, 2022–2031.
509. Lin, Y.; Kikuchi, S.; Yagyū, K.; Ishibashi, T.; Kurosawa, M.; Ito, Y.; Watanabe, Y.; Inaba, Y.; Tajima, K.; Nakachi, K.; et al. Serum Soluble Fas Levels and Superoxide Dismutase Activity and the Risk of Death from Pancreatic Cancer: A Nested Case-Control Study within the Japanese Collaborative Cohort Study. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2009**, *10 Suppl*, 81–85.
510. Durand, N.; Storz, P. Targeting Reactive Oxygen Species in Development and Progression of Pancreatic Cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2017**, *17*, 19–31,

doi:10.1080/14737140.2017.1261017.

511. Bedard, K.; Krause, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 245–313, doi:10.1152/physrev.00044.2005.
512. Wilkes, J.; Alexander, M.; Cullen, J. Superoxide Dismutases in Pancreatic Cancer. *Antioxidants* **2017**, *6*, 66, doi:10.3390/antiox6030066.
513. Liu, J.; Hinkhouse, M.M.; Sun, W.; Weydert, C.J.; Ritchie, J.M.; Oberley, L.W.; Cullen, J.J. Redox Regulation of Pancreatic Cancer Cell Growth: Role of Glutathione Peroxidase in the Suppression of the Malignant Phenotype. *Hum. Gene Ther.* **2004**, *15*, 239–250, doi:10.1089/104303404322886093.
514. Chio, I.I.C.; Jafarnejad, S.M.; Ponz-Sarvisse, M.; Park, Y.; Rivera, K.; Palm, W.; Wilson, J.; Sangar, V.; Hao, Y.; Öhlund, D.; et al. NRF2 Promotes Tumor Maintenance by Modulating mRNA Translation in Pancreatic Cancer. *Cell* **2016**, *166*, 963–976, doi:10.1016/j.cell.2016.06.056.
515. Glorieux, C.; Calderon, P.B. Catalase, a Remarkable Enzyme: Targeting the Oldest Antioxidant Enzyme to Find a New Cancer Treatment Approach. *Biol. Chem.* **2017**, *398*, 1095–1108, doi:10.1515/hsz-2017-0131.
516. Ho, J.C.; Zheng, S.; Comhair, S.A.A.; Farver, C.; Erzurum, S.C. Differential Expression of Manganese Superoxide Dismutase and Catalase in Lung Cancer¹. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 8578–8585.
517. Hwang, T.S.; Choi, H.K.; Han, H.S. Differential Expression of Manganese Superoxide Dismutase, Copper/Zinc Superoxide Dismutase, and Catalase in Gastric Adenocarcinoma and Normal Gastric Mucosa. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2007**, *33*, 474–479, doi:10.1016/j.ejso.2006.10.024.
518. Rainis, T.; Maor, I.; Lanir, A.; Shnizer, S.; Lavy, A. Enhanced Oxidative Stress and Leucocyte Activation in Neoplastic Tissues of the Colon. *Dig. Dis. Sci.* **2007**, *52*, 526–530, doi:10.1007/s10620-006-9177-2.
519. Zińczuk; Maciejczyk; Zaręba; Romaniuk; Markowski; Kędra; Zalewska; Pryczynicz; Matowicka-Karna; Guzińska-Ustymowicz Antioxidant Barrier, Redox Status, and Oxidative Damage to Biomolecules in Patients with Colorectal Cancer. Can Malondialdehyde and Catalase Be Markers of Colorectal Cancer Advancement? *Biomolecules* **2019**, *9*, 637, doi:10.3390/biom9100637.

520. Zalewska-Ziob, M.; Adamek, B.; Kasperczyk, J.; Romuk, E.; Hudziec, E.; Chwalińska, E.; Dobija-Kubica, K.; Rogoziński, P.; Bruliński, K. Activity of Antioxidant Enzymes in the Tumor and Adjacent Noncancerous Tissues of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 1–9, doi:10.1155/2019/2901840.
521. Wingler, K.; Müller, C.; Schmehl, K.; Florian, S.; Brigelius-Flohé, R. Gastrointestinal Glutathione Peroxidase Prevents Transport of Lipid Hydroperoxides in CaCo-2 Cells. *Gastroenterology* **2000**, *119*, 420–430, doi:10.1053/gast.2000.9521.
522. Lennicke, C.; Rahn, J.; Wickenhauser, C.; Lichtenfels, R.; Müller, A.S.; Wessjohann, L.A.; Kipp, A.P.; Seliger, B. Loss of Epithelium-Specific GPx2 Results in Aberrant Cell Fate Decisions during Intestinal Differentiation. *Oncotarget* **2018**, *9*, 539–552, doi:10.18632/oncotarget.22640.
523. Emmink, B.L.; Laoukili, J.; Kipp, A.P.; Koster, J.; Govaert, K.M.; Fatrai, S.; Verheem, A.; Steller, E.J.A.; Brigelius-Flohé, R.; Jimenez, C.R.; et al. GPx2 Suppression of H₂O₂ Stress Links the Formation of Differentiated Tumor Mass to Metastatic Capacity in Colorectal Cancer. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 6717–6730, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1645.
524. Mohameda, S.H. EVALUATION OF SERUM CHROMOGRANIN-A, ALPHA-1-FUCOSIDASE, NITRIC OXIDE AND GLUTATHIONE PEROXIDASE MARKERS IN PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA.; 2014.
525. Spadaro, A. Serum Chromogranin-A in Hepatocellular Carcinoma: Diagnostic Utility and Limits. *World J. Gastroenterol.* **2005**, *11*, 1987, doi:10.3748/wjg.v11.i13.1987.
526. Czczot, H.; Scibior, D.; Skrzycki, M.; Podsiad, M. Glutathione and GSH-Dependent Enzymes in Patients with Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Acta Biochim. Pol.* **2006**, *53*, 237–241, doi:10.18388/abp.2006_3384.
527. Kvetnoy, I.; Sandvik, A.K.; Waldum, H.L. The Diffuse Neuroendocrine System and Extrapineal Melatonin. *J. Mol. Endocrinol.* **1997**, *18*, 1–3, doi:10.1677/jme.0.0180001.
528. Bubenik, G.A. Gastrointestinal Melatonin: Localization, Function, and Clinical Relevance. *Dig. Dis. Sci.* **2002**, *47*, 2336–2348, doi:10.1023/a:1020107915919.
529. RAIKHLIN, N.T.; KVETNOY, I.M.; TOLKACHEV, V.N. Melatonin May Be Synthesised in Enterochromaffin Cells. *Nature* **1975**, *255*, 344–345, doi:10.1038/255344a0.
530. Söderquist, F.; Janson, E.T.; Rasmusson, A.J.; Ali, A.; Stridsberg, M.; Cunningham, J.L. Melatonin Immunoreactivity in Malignant Small Intestinal Neuroendocrine Tumours. *PLoS One* **2016**, *11*, e0164354, doi:10.1371/journal.pone.0164354.

531. Cheng, T.-C.; Lee, Y.-H.; Chang, Y.-P.; Lee, D.-C. Improved Urinary Melatonin Level as the Perspective Indicator That Leads to Better Sleeping Quality in Bladder Cancer Patients. *Ther. Adv. Urol.* **2020**, *12*, 175628722094087, doi:10.1177/1756287220940870.
532. Danielczyk, K.; Dziegiel, P. MT1 Melatonin Receptors and Their Role in the Oncostatic Action of Melatonin. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* **2009**, *63*, 425–434.
533. Lee, S.E.; Kim, S.J.; Youn, J.-P.; Hwang, S.Y.; Park, C.-S.; Park, Y.S. MicroRNA and Gene Expression Analysis of Melatonin-Exposed Human Breast Cancer Cell Lines Indicating Involvement of the Anticancer Effect. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 345–352, doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00896.x.
534. Sohn, E.J.; Won, G.; Lee, J.; Lee, S.; Kim, S. Upregulation of MiRNA3195 and MiRNA374b Mediates the Anti-Angiogenic Properties of Melatonin in Hypoxic PC-3 Prostate Cancer Cells. *J. Cancer* **2015**, *6*, 19–28, doi:10.7150/jca.9591.
535. Sainz, R.M.; Mayo, J.C.; Tan, D.; León, J.; Manchester, L.; Reiter, R.J. Melatonin Reduces Prostate Cancer Cell Growth Leading to Neuroendocrine Differentiation via a Receptor and PKA Independent Mechanism. *Prostate* **2005**, *63*, 29–43, doi:10.1002/pros.20155.
536. Cos, S.; Martinez-Campa, C.; Mediavilla, M.D.; Sanchez-Barcelo, E.J. Melatonin Modulates Aromatase Activity in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *J. Pineal Res.* **2005**, *38*, 136–142, doi:10.1111/j.1600-079X.2004.00186.x.
537. Grant, S.G.; Melan, M.A.; Latimer, J.J.; Witt-Enderby, P.A. Melatonin and Breast Cancer: Cellular Mechanisms, Clinical Studies and Future Perspectives. *Expert Rev. Mol. Med.* **2009**, *11*, e5, doi:10.1017/S1462399409000982.
538. LIN, C.-L.; LIU, T.-C.; WANG, Y.-N.; CHUNG, C.-H.; CHIEN, W.-C. The Association Between Sleep Disorders and the Risk of Colorectal Cancer in Patients: A Population-Based Nested Case–Control Study. *In Vivo (Brooklyn)*. **2019**, *33*, 573–579, doi:10.21873/invivo.11513.
539. Papantoniou, K.; Devore, E.E.; Massa, J.; Strohmaier, S.; Vetter, C.; Yang, L.; Shi, Y.; Giovannucci, E.; Speizer, F.; Schernhammer, E.S. Rotating Night Shift Work and Colorectal Cancer Risk in the Nurses' Health Studies. *Int. J. Cancer* **2018**, *143*, 2709–2717, doi:10.1002/ijc.31655.
540. Parent, M.-E.; El-Zein, M.; Rousseau, M.-C.; Pintos, J.; Siemiatycki, J. Night Work and the Risk of Cancer Among Men. *Am. J. Epidemiol.* **2012**, *176*, 751–759, doi:10.1093/aje/kws318.

541. Kos-Kudla, B.; Ostrowska, Z.; Kozłowski, A.; Marek, B.; Ciesielska-Kopacz, N.; Kudla, M.; Kajdaniuk, D.; Strzelczyk, J.; Staszewicz, P. Circadian Rhythm of Melatonin in Patients with Colorectal Carcinoma. *Neuroendocrinol. Lett.* **2002**, *23*, 239–242.
542. Nemeth, C.; Humpeler, S.; Kallay, E.; Mesteri, I.; Svoboda, M.; Rögelsperger, O.; Klammer, N.; Thalhammer, T.; Ekmekcioglu, C. Decreased Expression of the Melatonin Receptor 1 in Human Colorectal Adenocarcinomas. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **2011**, *25*, 531–542.
543. Nasrabadi, N.N.; Sargazi, F.; Shokrzadeh, M.; Abediankenari, S.; Hoseini, S.V.; Najafi, M.; Haghi-Aminjan, H.; Mirmajidi, S.H.; Ataee, R. Expression of MT1 Receptor in Patients with Gastric Adenocarcinoma and Its Relationship with Clinicopathological Features. *Neuro Endocrinol. Lett.* **2018**, *39*, 111–118.
544. Dillon, D.C.; Easley, S.E.; Asch, B.B.; Cheney, R.T.; Brydon, L.; Jockers, R.; Winston, J.S.; Brooks, J.S.; Hurd, T.; Asch, H.L. Differential Expression of High-Affinity Melatonin Receptors (MT1) in Normal and Malignant Human Breast Tissue. *Am. J. Clin. Pathol.* **2002**, *118*, 451–458, doi:10.1309/1T4V-CT1G-UBJP-3EHP.
545. Jablonska, K.; Pula, B.; Zemla, A.; Owczarek, T.; Wojnar, A.; Rys, J.; Ambicka, A.; Podhorska-Okolow, M.; Ugorski, M.; Dziegiel, P. Expression of Melatonin Receptor MT1 in Cells of Human Invasive Ductal Breast Carcinoma. *J. Pineal Res.* **2013**, *54*, 334–345, doi:10.1111/jpi.12032.
546. González, A.; Martínez-Campa, C.; Mediavilla, M.; Alonso-González, C.; Sánchez-Mateos, S.; Hill, S.; Sánchez-Barceló, E.; Cos, S. Effects of MT1 Melatonin Receptor Overexpression on the Aromatase-Suppressive Effect of Melatonin in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Oncol. Rep.* **2007**, doi:10.3892/or.17.4.947.
547. Jablonska; Nowinska; Piotrowska; Partynska; Katnik; Pawelczyk; Glatzel-Plucinska; Podhorska-Okolow; Dziegiel Prognostic Impact of Melatonin Receptors MT1 and MT2 in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Cancers (Basel)*. **2019**, *11*, 1001, doi:10.3390/cancers11071001.
548. Favero, G.; Moretti, E.; Bonomini, F.; Reiter, R.J.; Rodella, L.F.; Rezzani, R. Promising Antineoplastic Actions of Melatonin. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fphar.2018.01086.
549. Wang, Y.; Jin, B.; Ai, F.; Duan, C.; Lu, Y.; Dong, T.; Fu, Q. The Efficacy and Safety of Melatonin in Concurrent Chemotherapy or Radiotherapy for Solid Tumors: A Meta-

- Analysis of Randomized Controlled Trials. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2012**, *69*, 1213–1220, doi:10.1007/s00280-012-1828-8.
550. Pariente, R.; Bejarano, I.; Rodríguez, A.B.; Pariente, J.A.; Espino, J. Melatonin Increases the Effect of 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy in Human Colorectal Adenocarcinoma Cells in Vitro. *Mol. Cell. Biochem.* **2018**, *440*, 43–51, doi:10.1007/s11010-017-3154-2.
551. Futagami, M.; Sato, S.; Sakamoto, T.; Yokoyama, Y.; Saito, Y. Effects of Melatonin on the Proliferation and Cis-Diamminedichloroplatinum (CDDP) Sensitivity of Cultured Human Ovarian Cancer Cells. *Gynecol. Oncol.* **2001**, *82*, 544–549, doi:10.1006/gyno.2001.6330.
552. Hao, J.; Li, Z.; Zhang, C.; Yu, W.; Tang, Z.; Li, Y.; Feng, X.; Gao, Y.; Liu, Q.; Huang, W.; et al. Targeting NF-KB/AP-2 β Signaling to Enhance Antitumor Activity of Cisplatin by Melatonin in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 13–27.
553. Chen, X.; Wang, Z.; Ma, H.; Zhang, S.; Yang, H.; Wang, H.; Fang, Z. Melatonin Attenuates Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Cell Aggressive via Smad7/CCL20 in Glioma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 93580–93592, doi:10.18632/oncotarget.20525.
554. Migliore, L.; Coppedè, F. Genetic and Environmental Factors in Cancer and Neurodegenerative Diseases. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2002**, *512*, 135–153, doi:10.1016/S1383-5742(02)00046-7.
555. Megdal, S.P.; Kroenke, C.H.; Laden, F.; Pukkala, E.; Schernhammer, E.S. Night Work and Breast Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 2023–2032, doi:10.1016/j.ejca.2005.05.010.
556. Scully, T.; Ettela, A.; LeRoith, D.; Gallagher, E.J. Obesity, Type 2 Diabetes, and Cancer Risk. *Front. Oncol.* **2021**, *10*, doi:10.3389/fonc.2020.615375.
557. Kim, D.-S.; Scherer, P.E. Obesity, Diabetes, and Increased Cancer Progression. *Diabetes Metab. J.* **2021**, *45*, 799–812, doi:10.4093/dmj.2021.0077.
558. Liberti, M. V.; Locasale, J.W. The Warburg Effect: How Does It Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 211–218, doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001.
559. Leighton, E.; Sainsbury, C.A.; Jones, G.C. A Practical Review of C-Peptide Testing in Diabetes. *Diabetes Ther.* **2017**, *8*, 475–487, doi:10.1007/s13300-017-0265-4.
560. Novac, C.; Radulian, G.; Orzan, A.; Balgradean, M. Short Update on C-Peptide and Its Clinical Value. *Maedica (Buchar).* **2019**, *14*, 53–58, doi:10.26574/maedica.2019.14.1.53.
561. Fogar P, Basso D, Panozzo MP, et al. C-Peptide Pattern in Patients with Pancreatic

- Cancer. *Anticancer Res.* **1993**, *13*, 2577–2580.
562. Kriger, A.G.; Berelavichus, S.V.; Kaldarov, A.R.; Panteleev, V.I.; Gorin, D.S.; Dugarova, R.S.; Yukina, M.Y. Proinsulin-Secreting Neuroendocrine Tumors of the Pancreas: A Single-Centre Experience. *Gastrointest. Tumors* **2019**, *6*, 64–70, doi:10.1159/000501455.
563. Wang, M.; Vasey, Q.; Varikatt, W.; Mclean, M. Ectopic Insulin Secretion by a Large-cell Neuroendocrine Carcinoma of the Cervix. *Clin. Case Reports* **2021**, *9*, 482–486, doi:10.1002/ccr3.3562.
564. Vidal, A.C.; Lund, P.K.; Hoyo, C.; Galanko, J.; Burcal, L.; Holston, R.; Massa, B.; Omofoye, O.; Sandler, R.S.; Keku, T.O. Elevated C-Peptide and Insulin Predict Increased Risk of Colorectal Adenomas in Normal Mucosa. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 389, doi:10.1186/1471-2407-12-389.
565. Li, M.; Song, L.; Yuan, J.; Zhang, D.; Zhang, C.; Liu, Y.; Lin, Q.; Wang, H.; Su, K.; Li, Y.; et al. Association Between Serum Insulin and C-Peptide Levels and Breast Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, doi:10.3389/fonc.2020.553332.
566. Hsu, C.-N.; Chang, C.-H.; Lin, Y.-S.; Lin, J.-W.; Caffrey, J.L. Association of Serum C-Peptide Concentrations with Cancer Mortality Risk in Pre-Diabetes or Undiagnosed Diabetes. *PLoS One* **2013**, *8*, e55625, doi:10.1371/journal.pone.0055625.
567. Thota, P.; Perez-Lopez, F.R.; Benites-Zapata, V.A.; Pasupuleti, V.; Hernandez, A. V. Obesity-Related Insulin Resistance in Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Gynecol. Endocrinol.* **2017**, *33*, 179–184, doi:10.1080/09513590.2016.1273897.
568. Rahman, M.S.; Hossain, K.S.; Das, S.; Kundu, S.; Adegoke, E.O.; Rahman, M.A.; Hannan, M.A.; Uddin, M.J.; Pang, M.-G. Role of Insulin in Health and Disease: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6403, doi:10.3390/ijms22126403.
569. Vigneri, R.; Sciacca, L.; Vigneri, P. Rethinking the Relationship between Insulin and Cancer. *Trends Endocrinol. Metab.* **2020**, *31*, 551–560, doi:10.1016/j.tem.2020.05.004.
570. Reaven, G. The Metabolic Syndrome or the Insulin Resistance Syndrome? Different Names, Different Concepts, and Different Goals. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2004**, *33*, 283–303, doi:10.1016/j.ecl.2004.03.002.
571. Calle, E.E.; Kaaks, R. Overweight, Obesity and Cancer: Epidemiological Evidence and

- Proposed Mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 579–591, doi:10.1038/nrc1408.
572. Wilcox, G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin. Biochem. Rev.* **2005**, *26*, 19–39.
573. Arcidiacono, B.; Iiritano, S.; Nocera, A.; Possidente, K.; Nevolo, M.T.; Ventura, V.; Foti, D.; Chiefari, E.; Brunetti, A. Insulin Resistance and Cancer Risk: An Overview of the Pathogenetic Mechanisms. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, *2012*, 1–12, doi:10.1155/2012/789174.
574. Hursting, S.D.; Berger, N.A. Energy Balance, Host-Related Factors, and Cancer Progression. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 4058–4065, doi:10.1200/JCO.2010.27.9935.
575. Niederle, B.; Selberherr, A.; Bartsch, D.K.; Brandi, M.L.; Doherty, G.M.; Falconi, M.; Goudet, P.; Halfdanarson, T.R.; Ito, T.; Jensen, R.T.; et al. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 and the Pancreas: Diagnosis and Treatment of Functioning and Non-Functioning Pancreatic and Duodenal Neuroendocrine Neoplasia within the MEN1 Syndrome – An International Consensus Statement. *Neuroendocrinology* **2021**, *111*, 609–630, doi:10.1159/000511791.
576. Ramkumar, S.; Dhingra, A.; Jyotsna, V.; Ganie, M.A.; Das, C.J.; Seth, A.; Sharma, M.C.; Bal, C.S. Ectopic Insulin Secreting Neuroendocrine Tumor of Kidney with Recurrent Hypoglycemia: A Diagnostic Dilemma. *BMC Endocr. Disord.* **2014**, *14*, 36, doi:10.1186/1472-6823-14-36.
577. Morgello, S.; Schwartz, E.; Horwith, M.; King, M.E.; Gorden, P.; Alonso, D.R. Ectopic Insulin Production by a Primary Ovarian Carcinoid. *Cancer* **1988**, *61*, 800–805, doi:10.1002/1097-0142(19880215)61:4<800::AID-CNCR2820610426>3.0.CO;2-3.
578. Seckl, M.J.; Mulholland, P.J.; Bishop, A.E.; Teale, J.D.; Hales, C.N.; Glaser, M.; Watkins, S.; Seckl, J.R. Hypoglycemia Due to an Insulin-Secreting Small-Cell Carcinoma of the Cervix. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *341*, 733–736, doi:10.1056/NEJM199909023411004.
579. Shames, J.M.; Dhurandhar, N.R.; Blackard, W.G. Insulin-Secreting Bronchial Carcinoid Tumor with Widespread Metastases. *Am. J. Med.* **1968**, *44*, 632–637, doi:10.1016/0002-9343(68)90065-X.
580. McCaffrey, J.A.; Reuter, V.; Herr, H.W.; Macapinlac, H.A.; Russo, P.; Motzer, R.J. Carcinoid Tumor of the Kidney. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2000**, *5*, 108–111, doi:10.1016/S1078-1439(99)00050-2.
581. Habegger, K.M.; Heppner, K.M.; Geary, N.; Bartness, T.J.; DiMarchi, R.; Tschöp, M.H. The Metabolic Actions of Glucagon Revisited. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2010**, *6*, 689–697,

- doi:10.1038/nrendo.2010.187.
582. Lund, A.; Bagger, J.I.; Wewer Albrechtsen, N.J.; Christensen, M.; Grøndahl, M.; Hartmann, B.; Mathiesen, E.R.; Hansen, C.P.; Storkholm, J.H.; van Hall, G.; et al. Erratum. Evidence of Extrapancreatic Glucagon Secretion in Man. *Diabetes* 2016;65:585–597. *Diabetes* **2016**, *65*, 1752–1752, doi:10.2337/db16-er06.
583. Jiang, G.; Zhang, B.B. Glucagon and Regulation of Glucose Metabolism. *Am. J. Physiol. Metab.* **2003**, *284*, E671–E678, doi:10.1152/ajpendo.00492.2002.
584. Adeva-Andany, M.M.; Funcasta-Calderón, R.; Fernández-Fernández, C.; Castro-Quintela, E.; Carneiro-Freire, N. Metabolic Effects of Glucagon in Humans. *J. Clin. Transl. Endocrinol.* **2019**, *15*, 45–53, doi:10.1016/j.jcte.2018.12.005.
585. Wewer Albrechtsen, N.J.; Kuhre, R.E.; Pedersen, J.; Knop, F.K.; Holst, J.J. The Biology of Glucagon and the Consequences of Hyperglucagonemia. *Biomark. Med.* **2016**, *10*, 1141–1151, doi:10.2217/bmm-2016-0090.
586. Jensen, R.T.; Cadiot, G.; Brandi, M.L.; de Herder, W.W.; Kaltsas, G.; Komminoth, P.; Scoazec, J.-Y.; Salazar, R.; Sauvanet, A.; Kianmanesh, R. ENETS Consensus Guidelines for the Management of Patients with Digestive Neuroendocrine Neoplasms: Functional Pancreatic Endocrine Tumor Syndromes. *Neuroendocrinology* **2012**, *95*, 98–119, doi:10.1159/000335591.
587. Wermers, R.A.; Fatourech, V.; Wynne, A.G.; Kvols, L.K.; Lloyd, R. V. The Glucagonoma Syndrome Clinical and Pathologic Features in 21 Patients. *Medicine (Baltimore)*. **1996**, *75*, 53–63, doi:10.1097/00005792-199603000-00002.
588. Wermers, R.A.; Fatourech, V.; Kvols, L.K. Clinical Spectrum of Hyperglucagonemia Associated With Malignant Neuroendocrine Tumors. *Mayo Clin. Proc.* **1996**, *71*, 1030–1038, doi:10.4065/71.11.1030.
589. Yagi, T.; Kubota, E.; Koyama, H.; Tanaka, T.; Kataoka, H.; Imaeda, K.; Joh, T. Glucagon Promotes Colon Cancer Cell Growth via Regulating AMPK and MAPK Pathways. *Oncotarget* **2018**, *9*, 10650–10664, doi:10.18632/oncotarget.24367.
590. Godfrey, J.; Riscal, R.; Skuli, N.; Simon, M.C. Glucagon Signaling via Supraphysiologic GCGR Can Reduce Cell Viability without Stimulating Gluconeogenic Gene Expression in Liver Cancer Cells. *Cancer Metab.* **2022**, *10*, 4, doi:10.1186/s40170-022-00280-1.
591. Todd, J.; Stanley, S.; Roufosse, C.; Bishop, A.; Khoo, B.; Bloom, S.; Meeran, K. A Tumour That Secretes Glucagon-like Peptide-1 and Somatostatin in a Patient with Reactive

- Hypoglycaemia and Diabetes. *Lancet* **2003**, *361*, 228–230, doi:10.1016/S0140-6736(03)12256-8.
592. Reubi, J.C.; Waser, B. Concomitant Expression of Several Peptide Receptors in Neuroendocrine Tumours: Molecular Basis for in Vivo Multireceptor Tumour Targeting. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30*, 781–793, doi:10.1007/s00259-003-1184-3.
593. Korner, M.; Stockli, M.; Waser, B.; Reubi, J.C. GLP-1 Receptor Expression in Human Tumors and Human Normal Tissues: Potential for In Vivo Targeting. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 736–743, doi:10.2967/jnumed.106.038679.
594. Hubalewska-Dydejczyk, A.; Sowa-Staszczak, A.; Tomaszuk, M.; Stefańska, A. GLP-1 and Exendin-4 for Imaging Endocrine Pancreas. A Review. Labelled Glucagon-like Peptide-1 Analogues: Past, Present and Future. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, *59*, 152–160.
595. Guimarães, M.; Rodrigues, P.; Pereira, S.S.; Nora, M.; Gonçalves, G.; Albrechtsen, N.W.; Hartmann, B.; Holst, J.J.; Monteiro, M.P. GLP1 and Glucagon Co-Secreting Pancreatic Neuroendocrine Tumor Presenting as Hypoglycemia after Gastric Bypass. *Endocrinol. Diabetes Metab. Case Reports* **2015**, *2015*, doi:10.1530/EDM-15-0049.
596. Dirksen, C.; Jørgensen, N.B.; Bojsen-Møller, K.N.; Jacobsen, S.H.; Hansen, D.L.; Worm, D.; Holst, J.J.; Madsbad, S. Mechanisms of Improved Glycaemic Control after Roux-En-Y Gastric Bypass. *Diabetologia* **2012**, *55*, 1890–1901, doi:10.1007/s00125-012-2556-7.
597. Roberts, R.E.; Zhao, M.; Whitelaw, B.C.; Ramage, J.; Diaz-Cano, S.; le Roux, C.W.; Quaglia, A.; Huang, G.C.; Aylwin, S.J.B. GLP-1 and Glucagon Secretion from a Pancreatic Neuroendocrine Tumor Causing Diabetes and Hyperinsulinemic Hypoglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, 3039–3045, doi:10.1210/jc.2011-2005.
598. McIntosh, C.H.S.; Widenmaier, S.; Kim, S. Chapter 15 Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide (Gastric Inhibitory Polypeptide; GIP). In; 2009; pp. 409–471.
599. Waser, B.; Rehmann, R.; Sanchez, C.; Fourmy, D.; Reubi, J.C. Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Receptors in Most Gastroenteropancreatic and Bronchial Neuroendocrine Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, 482–488, doi:10.1210/jc.2011-2454.
600. Chia, C.W.; Egan, J.M. Incretins in Obesity and Diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2020**, *1461*, 104–126, doi:10.1111/nyas.14211.
601. Cesari, M.; Pahor, M.; Incalzi, R.A. REVIEW: Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1): A Key Factor Linking Fibrinolysis and Age-Related Subclinical and Clinical Conditions.

- Cardiovasc. Ther.* **2010**, *28*, e72–e91, doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00171.x.
602. Li, S.; Wei, X.; He, J.; Tian, X.; Yuan, S.; Sun, L. Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cancer Research. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *105*, 83–94, doi:10.1016/j.biopha.2018.05.119.
603. Kubala, M.H.; DeClerck, Y.A. The Plasminogen Activator Inhibitor-1 Paradox in Cancer: A Mechanistic Understanding. *Cancer Metastasis Rev.* **2019**, *38*, 483–492, doi:10.1007/s10555-019-09806-4.
604. Uhl, B.; Mittmann, L.; Dominik, J.; Hennel, R.; Smiljanov, B.; Haring, F.; Schaubächer, J.; Braun, C.; Padovan, L.; Pick, R.; et al. UPA-PAI-1 Heteromerization Promotes Breast Cancer Progression by Attracting Tumorigenic Neutrophils. *EMBO Mol. Med.* **2021**, *13*, doi:10.15252/emmm.202013110.
605. Nørsett, K.G.; Steele, I.; Duval, C.; Sammut, S.J.; Murugesan, S.V.M.; Kenny, S.; Rainbow, L.; Dimaline, R.; Dockray, G.J.; Pritchard, D.M.; et al. Gastrin Stimulates Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Gastric Epithelial Cells. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2011**, *301*, G446–G453, doi:10.1152/ajpgi.00527.2010.
606. Ibrahim Abdalla, M.M. Ghrelin – Physiological Functions and Regulation. *Eur. Endocrinol.* **2015**, *11*, 90, doi:10.17925/EE.2015.11.02.90.
607. Vu, J.P.; Wang, H.S.; Germano, P.M.; Pisegna, J.R. Ghrelin in Neuroendocrine Tumors. *Peptides* **2011**, *32*, 2340–2347, doi:10.1016/j.peptides.2011.10.006.
608. Corbetta, S.; Peracchi, M.; Cappiello, V.; Lania, A.; Lauri, E.; Vago, L.; Beck-Peccoz, P.; Spada, A. Circulating Ghrelin Levels in Patients with Pancreatic and Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors: Identification of One Pancreatic Ghrelinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *88*, 3117–3120, doi:10.1210/jc.2002-021842.
609. Hanada, T.; Toshinai, K.; Kajimura, N.; Nara-Ashizawa, N.; Tsukada, T.; Hayashi, Y.; Osuye, K.; Kangawa, K.; Matsukura, S.; Nakazato, M. Anti-Cachectic Effect of Ghrelin in Nude Mice Bearing Human Melanoma Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *301*, 275–279, doi:10.1016/S0006-291X(02)03028-0.
610. Iwakura, H.; Hosoda, K.; Doi, R.; Komoto, I.; Nishimura, H.; Son, C.; Fujikura, J.; Tomita, T.; Takaya, K.; Ogawa, Y.; et al. Ghrelin Expression in Islet Cell Tumors: Augmented Expression of Ghrelin in a Case of Glucagonoma with Multiple Endocrine Neoplasm Type I. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 4885–4888, doi:10.1210/jc.2002-020882.
611. Ekeblad, S.; Lejonklou, M.H.; Grimfjård, P.; Johansson, T.; Eriksson, B.; Grimelius, L.;

- Stridsberg, M.; Stålberg, P.; Skogseid, B. Co-Expression of Ghrelin and Its Receptor in Pancreatic Endocrine Tumours. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **2006**, 061025083200001-???, doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02695.x.
612. Wang, H.S.; Oh, D.S.; Ohning, G. V.; Pisegna, J.R. Elevated Serum Ghrelin Exerts an Orexigenic Effect That May Maintain Body Mass Index in Patients with Metastatic Neuroendocrine Tumors. *J. Mol. Neurosci.* **2007**, *33*, 225–231, doi:10.1007/s12031-007-0004-9.
613. Walter, T.; Chardon, L.; Hervieu, V.; Cohen, R.; Chayvialle, J.-A.; Scoazec, J.-Y.; Lombard-Bohas, C. Major Hyperghrelinemia in Advanced Well-Differentiated Neuroendocrine Carcinomas: Report of Three Cases. *Eur. J. Endocrinol.* **2009**, *161*, 639–645, doi:10.1530/EJE-09-0073.
614. Abou-Saif, A.; Gibril, F.; Ojeaburu, J. V.; Bashir, S.; Entsuah, L.K.; Asgharian, B.; Jensen, R.T. Prospective Study of the Ability of Serial Measurements of Serum Chromogranin A and Gastrin to Detect Changes in Tumor Burden in Patients with Gastrinomas. *Cancer* **2003**, *98*, 249–261, doi:10.1002/cncr.11473.
615. De Lorenzo, A.; Bianchi, A.; Maroni, P.; Iannarelli, A.; Di Daniele, N.; Iacopino, L.; Di Renzo, L. Adiposity Rather than BMI Determines Metabolic Risk. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *166*, 111–117, doi:10.1016/j.ijcard.2011.10.006.
616. Greenlee, H.; Unger, J.M.; LeBlanc, M.; Ramsey, S.; Hershman, D.L. Association between Body Mass Index and Cancer Survival in a Pooled Analysis of 22 Clinical Trials. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2017**, *26*, 21–29, doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-1336.
617. Zainal, A.; Akinsola, O.; Rajamani, K. Cushing Syndrome Secondary to Primary Neuroendocrine Lung Carcinoma. *Case Rep. Endocrinol.* **2019**, *2019*, 1–5, doi:10.1155/2019/1989260.
618. Shinden, Yoshiaki and Maemura, Kosei and Hashiguchi, Motoyuki and Kawasaki, Yota and Kurahara, Shinden, Yoshiaki and Maemura, Kosei and Hashiguchi, Motoyuki and Kawasaki, Yota and Kurahara, Hiroshi and Mataka, Yuko and Ino, Satoshi and Sakoda, Masahiko and, S. Preoperative Changes in Body Weight in Patients with an Insulinoma. *J. Pancreas* **2019**, *20*, 44–47.
619. Jyotsna, V.P.; Malik, E.; Birla, S.; Sharma, A. Novel MEN 1 Gene Findings in Rare Sporadic Insulinoma—a Case Control Study. *BMC Endocr. Disord.* **2015**, *15*, 44, doi:10.1186/s12902-015-0041-2.

620. Cross, A.J.; Hollenbeck, A.R.; Park, Y. A Large Prospective Study of Risk Factors for Adenocarcinomas and Malignant Carcinoid Tumors of the Small Intestine. *Cancer Causes Control* **2013**, *24*, doi:10.1007/s10552-013-0251-8.
621. Mottin, C.C.; Cruz, R.P.; Gomes Thomé, G.; Padoin, A.V. Carcinoid Tumors and Morbid Obesity. *Obes. Surg.* **2009**, *19*, 247–249, doi:10.1007/s11695-008-9541-8.
622. Zhan, H.X.; Cong, L.; Zhao, Y.P.; Zhang, T.P.; Chen, G. Risk Factors for the Occurrence of Insulinoma: A Case-Control Study. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **2013**, *12*, doi:10.1016/S1499-3872(13)60051-X.
623. Cherenfant, J.; Stocker, S.J.; Gage, M.K.; Du, H.; Thurow, T.A.; Odeleye, M.; Schimpke, S.W.; Kaul, K.L.; Hall, C.R.; Lamzabi, I.; et al. Predicting Aggressive Behavior in Nonfunctioning Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Surgery* **2013**, *154*, 785–793, doi:10.1016/j.surg.2013.07.004.
624. Hassan, M.M.; Phan, A.; Li, D.; Dagohoy, C.G.; Leary, C.; Yao, J.C. Risk Factors Associated with Neuroendocrine Tumors: A U.S.-Based Case-Control Study. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, doi:10.1002/ijc.23529.
625. Abdel-Rahman, O.; Ghosh, S.; Morrish, D. Impact of Baseline Body Mass Index on the Outcomes of Patients with Neuroendocrine Neoplasms. *J. Endocrinol. Invest.* **2022**, *45*, 1683–1688, doi:10.1007/s40618-022-01805-7.
626. Glazer, E.; Stanko, K.; Ong, E.; Guerrero, M. Decreased Inpatient Mortality in Obese Patients with Abdominal Nets. *Endocr. Pract.* **2014**, doi:10.4158/ep14203.or.
627. Marrache, F.; Vullierme, M.P.; Roy, C.; Assoued, Y. El; Couvelard, A.; O'Toole, D.; Mitry, E.; Hentic, O.; Hammel, P.; Lévy, P.; et al. Arterial Phase Enhancement and Body Mass Index Are Predictors of Response to Chemoembolisation for Liver Metastases of Endocrine Tumours. *Br. J. Cancer* **2007**, *96*, 49–55, doi:10.1038/sj.bjc.6603526.
628. Bongiovanni, A.; Riva, N.; Ricci, M.; Liverani, C.; La Manna, F.; De Vita, A.; Ibrahim, T.; Foca, F.; Mercatali, L.; Amadori, D.; et al. First-Line Chemotherapy in Patients with Metastatic Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Carcinoma. *Onco. Targets. Ther.* **2015**, *3613*, doi:10.2147/OTT.S91971.
629. Capurso, G.; Falconi, M.; Panzuto, F.; Rinzivillo, M.; Boninsegna, L.; Bettini, R.; Corleto, V.; Borgia, P.; Pederzoli, P.; Scarpa, A.; et al. Risk Factors for Sporadic Pancreatic Endocrine Tumors. *Am. J. Gastroenterol.* **2009**, *104*, 3034–3041, doi:10.1038/ajg.2009.466.

630. Halfdanarson, T.R.; Bamlet, W.R.; McWilliams, R.R.; Hobday, T.J.; Burch, P.A.; Rabe, K.G.; Petersen, G.M. Risk Factors for Pancreatic Neuroendocrine Tumors a Clinic-Based Case-Control Study. *Pancreas* **2014**, *43*, doi:10.1097/MPA.0000000000000234.
631. Ray, A.; Cleary, M.P. The Potential Role of Leptin in Tumor Invasion and Metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2017**, *38*, 80–97, doi:10.1016/j.cytogfr.2017.11.002.
632. Thrift, A.P. Determination of Risk for Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2016**, *32*, 319–324, doi:10.1097/MOG.0000000000000274.
633. Trevellin, E.; Scarpa, M.; Carraro, A.; Lunardi, F.; Kotsafti, A.; Porzionato, A.; Saadeh, L.; Cagol, M.; Alfieri, R.; Tedeschi, U.; et al. Esophageal Adenocarcinoma and Obesity: Peritumoral Adipose Tissue Plays a Role in Lymph Node Invasion. *Oncotarget* **2015**, *6*, 11203–11215, doi:10.18632/oncotarget.3587.
634. Geng, Y.; Wang, J.; Wang, R.; Wang, K.; Xu, Y.; Song, G.; Wu, C.; Yin, Y. Leptin and HER-2 Are Associated with Gastric Cancer Progression and Prognosis of Patients. *Biomed. Pharmacother.* **2012**, *66*, 419–424, doi:10.1016/j.biopha.2012.03.002.
635. Tucholski, K.; Otto-buczowska, E. The Role of Leptin in the Regulation of Carbohydrate Metabolism Leptyna i Jej Rola w Regulacji Metabolizmu Węglowodanów. *J. Endocrinol.* **2011**, *62*, 258–261.
636. Kerenidi, T.; Lada, M.; Tsaroucha, A.; Georgoulis, P.; Mystridou, P.; Gourgoulis, K.I. Clinical Significance of Serum Adipokines Levels in Lung Cancer. *Med. Oncol.* **2013**, *30*, 507, doi:10.1007/s12032-013-0507-x.
637. JUNG, H.; PARK, K.; CHO, Y.; CHUNG, S.; CHO, H.; CHO, S.; KIM, S.; KIM, S.; LEE, H.; PARK, K. Resistin Is Secreted from Macrophages in Atheromas and Promotes Atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **2006**, *69*, 76–85, doi:10.1016/j.cardiores.2005.09.015.
638. Dalamaga, M.; Sotiropoulos, G.; Karmaniolas, K.; Pelekanos, N.; Papadavid, E.; Lekka, A. Serum Resistin: A Biomarker of Breast Cancer in Postmenopausal Women? Association with Clinicopathological Characteristics, Tumor Markers, Inflammatory and Metabolic Parameters. *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 584–590, doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.01.001.
639. Jacenik, D.; Lebish, E.J.; Beswick, E.J. MK2 Promotes the Development and Progression of Pancreatic Neuroendocrine Tumors Mediated by Macrophages and Metabolomic Factors. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13561, doi:10.3390/ijms232113561.
640. Sawicka-Gutaj, N.; Waligórska-Stachura, J.; Andrusiewicz, M.; Biczysko, M.; Sowiński, J.;

- Skrobisz, J.; Ruchała, M. Nicotinamide Phosphorybosyltransferase Overexpression in Thyroid Malignancies and Its Correlation with Tumor Stage and with Survivin/Survivin DEx3 Expression. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 7859–7863, doi:10.1007/s13277-015-3506-z.
641. Sawicka-Gutaj, N.; Komarowska, H.; Gruszczyński, D.; Derwich, A.; Klimont, A.; Ruchała, M. Serum Visfatin/NAMPT as a Potential Risk Predictor for Malignancy of Adrenal Tumors. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 5563, doi:10.3390/jcm11195563.
642. Zhao, A.; Xiao, H.; Zhu, Y.; Liu, S.; Zhang, S.; Yang, Z.; Du, L.; Li, X.; Niu, X.; Wang, C.; et al. Omentin-1: A Newly Discovered Warrior against Metabolic Related Diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* **2022**, *26*, 275–289, doi:10.1080/14728222.2022.2037556.
643. Fazeli, M.S.; Dashti, H.; Akbarzadeh, S.; Assadi, M.; Aminian, A.; Keramati, M.R.; Nabipour, I. Circulating Levels of Novel Adipocytokines in Patients with Colorectal Cancer. *Cytokine* **2013**, *62*, 81–85, doi:10.1016/j.cyto.2013.02.012.
644. Aleksandrova, K.; di Giuseppe, R.; Isermann, B.; Biemann, R.; Schulze, M.; Wittenbecher, C.; Fritsche, A.; Lehmann, R.; Menzel, J.; Weikert, C.; et al. Circulating Omentin as a Novel Biomarker for Colorectal Cancer Risk: Data from the EPIC–Potsdam Cohort Study. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 3862–3871, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3464.
645. Shen, X.-D.; Zhang, L.; Che, H.; Zhang, Y.-Y.; Yang, C.; Zhou, J.; Liang, C.-Z. Circulating Levels of Adipocytokine Omentin-1 in Patients with Renal Cell Cancer. *Cytokine* **2016**, *77*, 50–55, doi:10.1016/j.cyto.2015.09.004.
646. Tahmasebpour, N.; Hosseinpour Feizi, M.A.; Ziamajidi, N.; Pouladi, N.; Montazeri, V.; Farhadian, M.; Abbasalipourkabir, R. Association of Omentin-1 with Oxidative Stress and Clinical Significances in Patients with Breast Cancer. *Adv. Pharm. Bull.* **2019**, *10*, 106–113, doi:10.15171/apb.2020.013.
647. Uyeturk, U.; Sarıcı, H.; Kın Tekce, B.; Eroglu, M.; Kemahlı, E.; Uyeturk, U.; Gucuk, A. Serum Omentin Level in Patients with Prostate Cancer. *Med. Oncol.* **2014**, *31*, 923, doi:10.1007/s12032-014-0923-6.
648. Nourbakhsh, P.; Ganji, A.; Farahani, I.; Hosseinian, R.; Yeganefard, F.; Mirzaee, R.; Mosayebi, G. Adipokine Omentin-1: A Diagnostic Tool in Breast Cancer. *Int. J. Basic Sci. Med.* **2018**, *3*, 89–93, doi:10.15171/ijbsm.2018.16.
649. Wang, J.; Li, D.; Cang, H.; Guo, B. Crosstalk between Cancer and Immune Cells: Role of Tumor-associated Macrophages in the Tumor Microenvironment. *Cancer Med.* **2019**, *8*, 4709–4721, doi:10.1002/cam4.2327.

650. Vitale, G.; Carra, S.; Ferraù, F.; Guadagno, E.; Faggiano, A.; Colao, A. Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms and Inflammation: A Complex Cross-Talk with Relevant Clinical Implications. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2020**, *146*, 102840, doi:10.1016/j.critrevonc.2019.102840.
651. Yu, J.; Refsum, E.; Perrin, V.; Helsingen, L.M.; Wieszczy, P.; Løberg, M.; Bretthauer, M.; Adami, H.O.; Ye, W.; Blom, J.; et al. Inflammatory Bowel Disease and Risk of Adenocarcinoma and Neuroendocrine Tumors in the Small Bowel. *Ann. Oncol.* **2022**, *33*, 649–656, doi:10.1016/j.annonc.2022.02.226.
652. Pavel, M.E.; Hassler, G.; Baum, U.; Hahn, E.G.; Lohmann, T.; Schuppan, D. Circulating of Angiogenic Cytokines Can Predict Tumour Progression and Prognosis in Neuroendocrine Carcinomas. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **2005**, *62*, doi:10.1111/j.1365-2265.2005.02238.x.
653. Scoazec, J.-Y. Angiogenesis in Neuroendocrine Tumors: Therapeutic Applications. *Neuroendocrinology* **2013**, *97*, 45–56, doi:10.1159/000338371.
654. Hillen, F.; Griffioen, A.W. Tumour Vascularization: Sprouting Angiogenesis and Beyond. *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 489–502, doi:10.1007/s10555-007-9094-7.
655. Li, T.; Guo, T.; Liu, H.; Jiang, H.; Wang, Y. Platelet-derived Growth Factor-BB Mediates Pancreatic Cancer Malignancy via Regulation of the Hippo/Yes-associated Protein Signaling Pathway. *Oncol. Rep.* **2020**, *45*, 83–94, doi:10.3892/or.2020.7859.
656. FIMMEL, S.; DEVERMANN, L.; HERRMANN, A.; ZOUBOULIS, C. GRO- : A Potential Marker for Cancer and Aging Silenced by RNA Interference. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1119*, 176–189, doi:10.1196/annals.1404.016.
657. Yung, M.M.-H.; Tang, H.W.-M.; Cai, P.C.-H.; Leung, T.H.-Y.; Ngu, S.-F.; Chan, K.K.-L.; Xu, D.; Yang, H.; Ngan, H.Y.-S.; Chan, D.W. GRO- α and IL-8 Enhance Ovarian Cancer Metastatic Potential via the CXCR2-Mediated TAK1/NF κ B Signaling Cascade. *Theranostics* **2018**, *8*, 1270–1285, doi:10.7150/thno.22536.
658. Cigrovski Berković, M.; Catela Ivković, T.; Marout, J.; Zjačić-Rotkvić, V.; Kapitanović, S. Interleukin 1 β Gene Single-Nucleotide Polymorphisms and Susceptibility to Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *DNA Cell Biol.* **2012**, *31*, doi:10.1089/dna.2011.1317.
659. Duerr, E.M.; Mizukami, Y.; Ng, A.; Xavier, R.J.; Kikuchi, H.; Deshpande, V.; Warshaw, A.L.; Glickman, J.; Kulke, M.H.; Chung, D.C. Defining Molecular Classifications and Targets in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors through DNA Microarray Analysis.

- Endocr. Relat. Cancer* **2008**, *15*, doi:10.1677/ERC-07-0194.
660. Schimmack, S.; Yang, Y.; Felix, K.; Herbst, M.; Li, Y.; Schenk, M.; Bergmann, F.; Hackert, T.; Strobel, O. C-Reactive Protein (Crp) Promotes Malignant Properties in Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Endocr. Connect.* **2019**, *8*, 1007–1019, doi:10.1530/EC-19-0132.
661. Chen, W.-Y.; Wen, Y.-C.; Lin, S.-R.; Yeh, H.-L.; Jiang, K.-C.; Chen, W.-H.; Lin, Y.-S.; Zhang, Q.; Liew, P.-L.; Hsiao, M.; et al. Nerve Growth Factor Interacts with CHRM4 and Promotes Neuroendocrine Differentiation of Prostate Cancer and Castration Resistance. *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 22, doi:10.1038/s42003-020-01549-1.
662. Molloy, N.; Read, D.; Gorman, A. Nerve Growth Factor in Cancer Cell Death and Survival. *Cancers (Basel)*. **2011**, *3*, 510–530, doi:10.3390/cancers3010510.
663. Bold, R.J.; Ishizuka, J.; Rajaraman, S.; Perez-Polo, J.R.; Townsend, C.M.; Thompson, J.C. Nerve Growth Factor as a Mitogen for a Pancreatic Carcinoid Cell Line. *J. Neurochem.* **2002**, *64*, 2622–2628, doi:10.1046/j.1471-4159.1995.64062622.x.
664. Buhrmann, C.; Yazdi, M.; Popper, B.; Shayan, P.; Goel, A.; Aggarwal, B.B.; Shakibaei, M. Evidence That TNF- β Induces Proliferation in Colorectal Cancer Cells and Resveratrol Can down-Modulate It. *Exp. Biol. Med.* **2019**, *244*, 1–12, doi:10.1177/1535370218824538.
665. Korse, C.M.; Taal, B.G.; Vincent, A.; van Velthuysen, M.-L.F.; Baas, P.; Buning-Kager, J.C.G.M.; Linders, T.C.; Bonfrer, J.M.G. Choice of Tumour Markers in Patients with Neuroendocrine Tumours Is Dependent on the Histological Grade. A Marker Study of Chromogranin A, Neuron Specific Enolase, Progastrin-Releasing Peptide and Cytokeratin Fragments. *Eur. J. Cancer* **2012**, *48*, 662–671, doi:10.1016/j.ejca.2011.08.012.
666. Gkolfinopoulos, S.; Tsapakidis, K.; Papadimitriou, K.; Papamichael, D.; Kountourakis, P. Chromogranin A as a Valid Marker in Oncology: Clinical Application or False Hopes? *World J. Methodol.* **2017**, *7*, 9, doi:10.5662/wjm.v7.i1.9.
667. Ardill, J.E.S.; Eriksson, B. The Importance of the Measurement of Circulating Markers in Patients with Neuroendocrine Tumours of the Pancreas and Gut. *Endocr. Relat. Cancer* **2003**, 459–462, doi:10.1677/erc.0.0100459.
668. Tsai, H.-J.; Hsiao, C.-F.; Chang, J.S.; Chen, L.-T.; Chao, Y.-J.; Yen, C.-J.; Shan, Y.-S. The Prognostic and Predictive Role of Chromogranin A in Gastroenteropancreatic

- Neuroendocrine Tumors – A Single-Center Experience. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, doi:10.3389/fonc.2021.741096.
669. Wang, Y.; Yang, Q.; Lin, Y.; Xue, L.; Chen, M.; Chen, J. Chromogranin A as a Marker for Diagnosis, Treatment, and Survival in Patients With Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasm. *Medicine (Baltimore)*. **2014**, *93*, e247, doi:10.1097/MD.0000000000000247.
670. Zhang, C.; Huang, Y.; Long, J.; Yao, X.; Wang, J.; Zang, S.; Qu, W.; Wang, F. Serum Chromogranin A for the Diagnosis of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms and Its Association with Tumour Expression. *Oncol. Lett.* **2018**, doi:10.3892/ol.2018.9795.
671. Donica, H.; Malecha-Jędraszek, A.; Strosławska, E.; Burska, A.; Szubstarski, F. Significance of Plasma Chromogranin A Determination in Neuroendocrine Tumour (NET) Diagnosis. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2011**, *48*, doi:10.2478/v10042-010-0088-x.
672. Zatelli, M.C.; Torta, M.; Leon, A.; Ambrosio, M.R.; Gion, M.; Tomassetti, P.; De Braud, F.; Delle Fave, G.; Dogliotti, L.; Uberti, E.C. degli; et al. Chromogranin A as a Marker of Neuroendocrine Neoplasia: An Italian Multicenter Study. *Endocr. Relat. Cancer* **2007**, *14*, 473–482, doi:10.1677/ERC-07-0001.
673. Massironi, S.; Zilli, A.; Cavalcoli, F.; Conte, D.; Peracchi, M. Chromogranin A and Other Enteroendocrine Markers in Inflammatory Bowel Disease. *Neuropeptides* **2016**, *58*, 127–134, doi:10.1016/j.npep.2016.01.002.
674. Sciola, V.; Massironi, S.; Conte, D.; Caprioli, F.; Ferrero, S.; Ciafardini, C.; Peracchi, M.; Bardella, M.T.; Piodi, L. Plasma Chromogranin a in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2009**, *15*, 867–871, doi:10.1002/ibd.20851.
675. Zhang, D.; Lavaux, T.; Sapin, R.; Lavigne, T.; Castelain, V.; Aunis, D.; Metz-Boutigue, M.-H.; Schneider, F. Serum Concentration of Chromogranin A at Admission: An Early Biomarker of Severity in Critically Ill Patients. *Ann. Med.* **2009**, *41*, 38–44, doi:10.1080/07853890802199791.
676. Papalou, O.; Peppas, M.; Kandaraki, E.; Diamanti-Kandarakis, E.; Nikou, G. The Diagnostic Value of Chromogranin A in Neuroendocrine Neoplasms Is Potentiated by Clinical Factors and Inflammatory Markers. *Endocrines* **2020**, *1*, 1–12, doi:10.3390/endocrines1010001.
677. Abdul, M.; Hoosein, N. RELATIONSHIP OF THE INTERLEUKIN-1 SYSTEM WITH

- NEUROENDOCRINE AND EXOCRINE MARKERS IN HUMAN COLON CANCER CELL LINES. *Cytokine* **2002**, *18*, 86–91, doi:10.1006/cyto.2001.1019.
678. Hoosein, N.M. Neuroendocrine and Immune Mediators in Prostate Cancer Progression. *Front. Biosci.* **1998**, *3*, A362, doi:10.2741/A362.
679. Zhou, Y.; Zhang, J.; Liu, Q.; Bell, R.; Muruve, D.A.; Forsyth, P.; Arcellana-Panlilio, M.; Robbins, S.; Yong, V.W. The Chemokine GRO- α (CXCL1) Confers Increased Tumorigenicity to Glioma Cells. *Carcinogenesis* **2005**, *26*, 2058–2068, doi:10.1093/carcin/bgi182.
680. Mendonca, P.; Alghamdi, S.; Messeha, S.; Soliman, K.F.A. Pentagalloyl Glucose Inhibits TNF- α -activated CXCL1/GRO- α Expression and Induces Apoptosis-related Genes in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 5649, doi:10.1038/s41598-021-85090-z.
681. Lian, S.; Zhai, X.; Wang, X.; Zhu, H.; Zhang, S.; Wang, W.; Wang, Z.; Huang, J. Elevated Expression of Growth-Regulated Oncogene-Alpha in Tumor and Stromal Cells Predicts Unfavorable Prognosis in Pancreatic Cancer. *Medicine (Baltimore)*. **2016**, *95*, e4328, doi:10.1097/MD.0000000000004328.
682. Cuff, C.A.; Schwartz, J.; Bergman, C.M.; Russell, K.S.; Bender, J.R.; Ruddle, N.H. Lymphotoxin A3 Induces Chemokines and Adhesion Molecules: Insight into the Role of LT α in Inflammation and Lymphoid Organ Development. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 6853–6860, doi:10.4049/jimmunol.161.12.6853.
683. Gubernatorova, E.O.; Polinova, A.I.; Petropavlovskiy, M.M.; Namakanova, O.A.; Medvedovskaya, A.D.; Zvartsev, R. V.; Telegin, G.B.; Drutskaya, M.S.; Nedospasov, S.A. Dual Role of TNF and LT α in Carcinogenesis as Implicated by Studies in Mice. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, 1775, doi:10.3390/cancers13081775.
684. Wang, F.; Yang, Z.; Chen, X.; Peng, Y.; Jiang, H.; Qin, S. A Novel Diagnostic Model for Insulinoma. *Discov. Oncol.* **2022**, *13*, 68, doi:10.1007/s12672-022-00534-w.
685. Torimoto, K.; Okada, Y.; Tanaka, Y.; Matsuoka, A.; Hirota, Y.; Ogawa, W.; Saisho, Y.; Kurihara, I.; Itoh, H.; Inada, S.; et al. Usefulness of the Index Calculated as the Product of Levels of Fasting Plasma Glucose and Hemoglobin A1c for Insulinoma Screening. *Endocr. J.* **2020**, *67*, 509–513, doi:10.1507/endocrj.EJ19-0357.
686. Geisler, L.; Hellberg, T.; Lambrecht, J.; Jann, H.; Knorr, J.; Eschrich, J.; Loosen, S.H.; Wree, A.; Hammerich, L.; Krieg, A.; et al. Inflammatory Cytokines Associated with Diagnosis,

Tumor Grade and Prognosis in Patients with Neuroendocrine Tumors. *J. Clin. Med.*
2022, *11*, 6191, doi:10.3390/jcm11206191.

XII. Zgoda Komisji Bioetycznej

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 423/2020

Bydgoszcz, 29.09.2020 r.

Działając na podstawie art.29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzenia Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **29.09.2020 r.** przeanalizowała wniosek, który złożyła kierownik badania:

dr hab. Karolina Szewczyk-Golec, prof. UMK
Katedra Biologii i Biochemii Medycznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie

- **prof. dr hab. n. med. Alina Woźniak, dr hab. Karolina Szewczyk-Golec, prof. UMK, mgr Marlena Markiewicz, mgr Jarosław Nuskiewicz, mgr Marta Pawłowska, dr hab. Bogdan Małkowski, lek. Marta Maruszak, dr Jolanta Czuczejko,**

w sprawie badania:

„Ocena zależności między melatoniną, sekrecją wybranych adipokin, a wykładnikami stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w przebiegu nowotworów neuroendokrynych. Nowe, potencjalne markery diagnostyczne.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania tajnego Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania na piśmie uczestników badania o celu oraz zakresie badań i uzyskania od każdego z nich osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej pozytywnej opinii o badaniu ;
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych uczestników badania, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach
- zapewnienia, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, nie są żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w zależności służbowej, dydaktycznej lub innej z prowadzącym badanie;
- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu w ramach jednego dokumentu.

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; adres zamieszkania lub PESEL lub nr historii choroby pacjenta (L.ks.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i

podpis badanej osoby, a także klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, zgodnie z obowiązującym prawem (RODO).

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

Zgoda obowiązuje od daty podjęcia uchwały (29.09.2020 r.) do końca 2022 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.



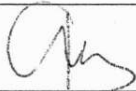
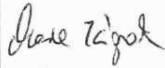
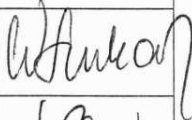

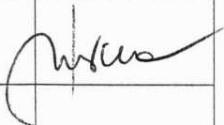
Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

dr hab. Karolina Szewczyk-Golec, prof. UMK
Katedra Biologii i Biochemii Medycznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 29.09.2020 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja/ Specjalizacja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący <i>medycyna sądowa</i>	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	Z – ca przewodniczącego <i>prawniczka</i>	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska	<i>pediatra, alergologia i gastroenterologia dziecięca</i>	
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń	<i>pediatria, nefrologia</i>	
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec	<i>położnictwo, ginekologia onkologiczna</i>	
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk	<i>chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna</i>	
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK	<i>organizacja ochrony zdrowia, otolaryngologia</i>	
8.	Prof. dr hab. n. med. Maria Kłopotka	<i>choroby wewnętrzne, gastroenterologia</i>	
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM	<i>duchowny</i>	
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska	<i>pediatria, choroby płuc</i>	
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezińska	<i>prawniczka</i>	
12.	Mgr farm. Aleksandra Adameczyk	<i>farmaceutka</i>	
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska	<i>pielęgniarska</i>	