

Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim

Doktorant: mgr Marlena Budek

Tytuł rozprawy: Ocena zależności między melatoniną, sekrecją wybranych adipokin, a wykładnikami stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w przebiegu nowotworów neuroendokrynnych. Nowe, potencjalne markery diagnostyczne.

Promotor: dr hab. n. med. Karolina Szewczyk-Golec, prof. UMK

Nowotwory neuroendokrynnne (NENs, ang. *neuroendocrine neoplasms*) stanowią niejednorodną grupę nowotworów, wywodzących się z rozsianego układu komórek neuroendokrynnych. 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 glukozeozależnego 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