

## AUTOREFERAT

**1. Imię i nazwisko:** Dariusz Andrzej Waniczek

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:**

1984 - 1990 – studia na Wydziale Lekarskim Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze

20. 06. 1990 – tytuł lekarza medycyny

14. 03. 1994 – tytuł specjalisty I stopnia z chirurgii ogólnej (z wyróżnieniem).

2.12.1999 – tytuł doktora nauk medycznych w zakresie medycyny (z wyróżnieniem).  
Śląska Akademia Medyczna w Katowicach, Uchwała Rady Wydziału Lekarskiego w Zabrze. Tytuł pracy: Wykorzystanie prokalcytoniny oraz interleukiny-6 do określenia ciężkości urazu okołoperacyjnego w cholecysektomii klasycznej i laparoskopowej.

14. 04. 2000 – tytuł specjalisty II stopnia z chirurgii ogólnej (z wyróżnieniem)

10. 11. 2004 – tytuł specjalisty medycyny ratunkowej

27.04. 2010 – tytuł specjalisty z chirurgii onkologicznej

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

1.11.1999 – 1.10. 2001 – asystent - III Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Wydział Lekarsko- Dentystyczny w Zabrze, Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

2001- 2014 - asystent, adiunkt - Katedra i Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

1.10.2003 – nadal - wykładowca w Państwowej Wyższej Szkole Zawodowej w Nysie, od 2003 r. w Instytucie Pielęgniarstwa, od 2011 w Instytucie Zdrowia Publicznego, studenci specjalności pielęgniarstwo i ratownictwo medyczne.

1.10. 2014 – nadal – adiunkt, kierownik Zakładu Propedeutyki Chirurgii w Bytomiu, Katedry Chirurgii Ogólnej, Kolorektalnej i Urazów Wielonarządowych, Wydziału Nauk o Zdrowiu, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

**4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca**

**2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz.1311):**

**a) tytuł osiągnięcia naukowego:**

cykl publikacji powiązanych tematycznie pt.;

**„Badania molekularnych procesów karcynogenezy jelita grubego w poszukiwaniu nowych czynników prognostycznych, predykcyjnych i celów terapeutycznych”**

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem 5 prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR).

Łączna wartość prac objętych cyklem: **IF: 7,316, MNiSW=90.**

**b) wykaz publikacji będących podstawą do sformułowania wniosku o nadanie tytułu doktora habilitowanego w dziedzinie medycyny (autorzy, tytuł publikacji, nazwa wydawnictwa, rok wydania)**

1. **Waniczek D**, Śnietura M, Młynarczyk-Liszka J, Pigłowski W, Kopeć A, Lange D, Rudzki M, Arendt J. *PTEN expression profiles in colorectal adenocarcinoma and its precancerous lesions*. Pol.J.Pathol.2013; Vol.64, No.1, p.15-20. **IF: 0.832, MNiSW: 15**
2. **Waniczek D**, Śnietura M, Kopeć A, Ściegłińska D, Pigłowski W, Lorenc Z, Muc-Wierzoń M, Nowakowska-Zajdel E. *A novel quantitative method of pten expression assessment in tumor tissue*. J.Biol.Regul.Homeost. Agents 2016; Vol.30, No.1, p.79-90. **IF: 1.546, MNiSW: 20**
3. **Waniczek D**, Śnietura M, Lorenc Z, Nowakowska-Zajdel E, Muc-Wierzoń M. *Assessment of PI3K/AKT/PTEN signaling pathway activity in colorectal cancer using quantum dot-conjugated antibodies*. Oncol Lett. 2017; doi: 10.3892/ol.2017.73922017-13283-E185605. **IF: 1.39, MNiSW: 15**

4. Lorenc Z, **Waniczek D**, Lorenc-Podgórska K, Krawczyk W, Domagała M, Majewski M, Mazurek U. *Profile of expression of genes encoding matrix metalloproteinase 9 (MMP9), matrix metalloproteinase 28 (MMP28) and TIMP metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP1) in colorectal cancer: Assessment of the role in diagnosis and prognostication.* Med.Sci.Monitor 2017; Vol.23, p.1305-1311. **IF: 1.405, MNiSW: 15**

5. **Waniczek D**, Lorenc Z, Śnietura M, Wesecki M, Kopec A, Muc-Wierzgoń M. *Tumor-Associated Macrophages and Regulatory T Cells Infiltration and the Clinical Outcome in Colorectal Cancer.* Arch.Immunol.Ther.Exp.2017, p.1-10. **IF: 2.464, MNiSW: 25**

**c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

#### Wprowadzenie

Rak jelita grubego (RJG) to najczęstszy nowotwór złośliwy układu pokarmowego, trzeci co do częstości wśród wszystkich nowotworów u mężczyzn, drugi u kobiet. Stanowi on poważny problem społeczny z uwagi na częstość jego występowania i powodowaną przez niego stosunkowo wysoką umieralność. Transformacja nowotworowa jest bardzo złożonym i wieloetapowym procesem. Badania nad tym procesem i formułowane teorie karcynogenezy jelita grubego doprowadziły do jednego z większych sukcesów w walce z RJG, jakim są kolonoskopowe badania profilaktyczne jelita, w których usuwane są jego stany przedrakowe - polipy gruczołowe. W ostatnich latach coraz więcej danych uzyskanych dzięki osiągnięciom biologii molekularnej wskazuje, że transformacja nowotworowa jest skutkiem różnorodnych zmian genetycznych i epigenetycznych, których produkty są istotne dla zachowania równowagi metabolicznej komórki na każdym etapie jej cyklu rozwojowego. Poznanie zależności między genami i ich produktami pozwala ustalić ich faktyczną rolę w patofizjologii RJG, a w efekcie wskazać nowe cele leczenia, wobec których mogą być konstruowane nowe leki.

Aktualnie leczenie RJG oparte jest głównie na wykonaniu radykalnego zabiegu operacyjnego, wspieranego w wielu przypadkach leczeniem systemowym – chemioterapią oraz radioterapią. Terapia ukierunkowana molekularnie, niejako produkt osiągnięć biologii molekularnej, zaczyna wchodzić na stałe do terapii RJG (cetuksymab, panitumumab). Skuteczność leczenia nowotworów ściśle zależy od zaawansowania choroby w momencie jej wykrycia. Niezwykle istotne jest zatem wykrycie choroby w jak najwcześniejszym, najlepiej bezobjawowym jej stadium. Nadzieję taką dają nowoczesne techniki diagnostyczne pozwalające wcześniej odróżnić tkanki objęte procesem nowotworowym od tkanek zdrowych lub wykryć w fenotypie komórki markery późniejszej przemiany nowotworowej. Wydaje się, że te czynniki mają istotne znaczenie również w rokowaniu, predykcji, a dodatkowo jako substancje biologicznie czynne, mogą stać się celami dla nowych leków.

Fenotyp nowotworowy komórki pojawia się w następstwie nieprawidłowej ekspresji określonych genów, wyrazem tego są nieprawidłowe cząsteczki, w składzie, proporcji, kolejności. Proces inicjacji i progresji nie postrzegany jest jako układ zero – jedynkowy, a raczej model analogowy, w którym zdarzenia zachodzące na różnych ścieżkach sygnalizacyjnych wpływają w efekcie na poziom ekspresji kilku zaledwie sygnałów końcowych decydujących o losach komórki. Poszukiwanie tych właśnie wspólnych kluczowych efektorów dla działania różnych ścieżek sygnalizacyjnych nie tylko pozwala lepiej zrozumieć procesy wczesnej i późnej transformacji nowotworowej, ale także jest istotne dla postępu w terapii raka.

Na kolejny obiecujący postęp w walce z RJG daje nam nadzieję nowoczesna chemia kombinatoryczna. Odkąd została wykazana przydatność technik kombinatorycznych do w miarę prostej i taniej syntezy różnorodnych leków, naukowcy i lekarze zaczęli realizować liczne projekty badawcze umożliwiające tworzenie leków w zależności od celu, wobec którego dany produkt ma działać. Stąd tak wielka potrzeba odkrywania nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych, a przy tym także wskazywanie naukowcom chemikom/farmaceutom potencjalnych leków/celów. Wewnętrzne zróżnicowanie w biologii RJG skutkuje odmienną odpowiedzią na leczenie w grupach o podobnym stopniu ryzyka. Różnicowanie RJG na podstawie klasycznych czynników prognostycznych i predykcyjnych nie wystarcza również wobec złożoności jego terapii. Ten „przymus” naukowy i leczniczy do poszukiwań nowych czynników molekularnych może doprowadzić wręcz do przedefiniowania na nowo nowotworów jelita grubego, przede wszystkim w oparciu o techniki molekularne.

Obecnie znana jest bardzo ograniczona grupa molekularnych czynników o uznanej wartości prognostycznej lub predykcyjnej dla RJG jak: niestabilność mikrosatelitarna (MSI), stan genu kodującego białko K-RAS, ekspresja p53. Stąd stale istnieje potrzeba stwarzania lub udoskonalania nowych narzędzi diagnostycznych, które pozwoliłyby na wczesne, dokładne i pewne zakwalifikowanie konkretnego guza nowotworowego do odpowiedniej klasy, który byłby leczony zgodnie z założeniami medycyny spersonalizowanej.

Narzędzia diagnostyczne i markery pozwalają na stworzenie nowoczesnych algorytmów, które na podstawie badań molekularnych mogą zmienić przyszłość w diagnozowaniu i leczeniu chorych na nowotwory złośliwe w tym RJG.

W badaniach molekularnych podstawowe znaczenie mają badania immunohistochemiczne w różnych odmianach. Służyć temu może wykorzystywana przez nas metoda Perren i wsp.<sup>1</sup>, którą udoskonaliśmy oraz wykorzystanie specyficznych właściwości kropek kwantowych (QDs). W medycynie QDs postrzega się jako nowoczesne markery, których unikatowe właściwości związane są z ich szerokopasmową absorpcją promieniowania i wąskimi pasmami emisyjnymi. Pozwala to na wykorzystanie ich sfunkcjonalizowanych konjugatów do detekcji/obrazowania *in vitro* oraz *in vivo* praktycznie dowolnych biomolekuł, komórek i tkanek, dzięki którym można obrazować lub śledzić rozprzestrzenianie się nowotworów w ludzkim organizmie. Są one przy tym znacznie bardziej stabilnymi i precyzyjnymi znacznikami, niż stosowane dotychczas w diagnostyce medycznej barwniki organiczne. Wraz ze wzrostem średnicy jądra kropki kwantowej wydłuża się długość fali emitowanego przez nią światła. Stąd też opierając się na jednym półprzewodzącym materiale można otrzymać wyraźnie różniące się kolorami znaczniki pozwalające zobrazować kilka markerów nowotworowych jednocześnie. Warto dodać, że same QDs dają również potencjalne możliwości terapeutyczne w leczeniu nowotworów. Nowoczesną technikę z QDs wykorzystałem w jednej z publikacji osiągnięcia. Także wykorzystanie przeze mnie mikromacierzy oligonukleotydowych do porównania ekspresji genów w tkankach objętych procesem nowotworowym oraz tkankach zdrowych dało szansę na wykrycie genów, których produkty warto badać. Poznanie różnic w ekspresji genów kodujących poszczególne białka może pomóc w wyjaśnieniu mechanizmów prowadzących do powstania, a następnie rozwoju RJG, co z kolei jest kluczem do opracowania nowych możliwości

---

<sup>1</sup> Perren A, Weng LP, Boag AH, Ziebold U, Thakore K, Dahia P, Komminoth P, Lees JA, Mulligan ML, Mutter GL, Eng Ch. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol* 1999; 155(4): 1253–1260

terapeutycznych.

Gen PTEN (ang. Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome TEN) zlokalizowany jest on na chromosomie 10q23 i zaliczany do genów supresorowych. Struktura genu PTEN jest skomplikowana. Składa się on z 9 egzonów kodujących białko o masie cząsteczkowej 47 kDa zbudowane z 403 aminokwasów. Do zaburzeń funkcji genu PTEN dochodzi na wielu poziomach i z różnych przyczyn: poczynając od bardzo szerokiego spektrum mutacji, poprzez zmiany epigenetyczne jak: hypermetylacja, oksydacyjne wyłączenie, a na zwiększonej degradacji białka kończąc. Zaburzenia te blokują lub zaburzają szlak sygnalizacyjny komórki, co prowadzi do utrzymania podziałów komórki i blokady apoptozy. PTEN jest drugim po TP53 genem pod względem częstości obserwowanych mutacji. Utrata funkcjonalności białka PTEN jest jedną z najczęściej opisywanych patologii wśród nowotworów złośliwych u człowieka.

Białkowy produkt genu PTEN stanowi podwójnie specyficzną fosfatazę pełniącą kluczowe funkcje regulacyjne w przekazywaniu sygnałów z receptorów błonowych dla czynników wzrostu do wnętrza komórki. Cząsteczka białka PTEN zawiera dwie główne domeny: katalityczną o aktywności fosfatazy i domenę C2 wiążącą ją do błony komórkowej. Jedną z funkcji białka PTEN jest odłączanie reszt fosforanowych od cząsteczek lipidów błony komórkowej, drugą inhibicja szlaku kinazy tyrozynowej B (PI3K/Akt), poprzez katalizę reakcji odłączenia grupy 3'-fosforanowej od (3,4,5)-trifosforanu fosfatydyloinozytolu. Struktura przestrzenna domeny katalitycznej białka PTEN ma krytyczne znaczenie dla zachowania aktywności fosfatazowej białka. Centrum katalityczne odpowiedzialne za reakcję odszczepiania reszt fosforanowych od substratu jest geometrycznie szersze niż w innych fosfatazach, przez co PTEN wykazuje aktywność zarówno fosfatazy tyrozynowej i serynowej/treoninowej, a także fosfolipidowej (ang. dual specific phosphatase). Przy współdziałaniu PTEN funkcjonuje oś PI3K/Akt, która jest znanym i silnym regulatorem przeżycia komórek. Ma wielopoziomowe działanie antyapoptotyczne, zarówno w wyniku transkrypcyjnego hamowania genów kaspazy-9 oraz białka BAD, jak i jego fosforylacji oraz blokowania mechanizmu mitochondrialnego programowanej śmierci komórkowej. Zwiększa ona także proliferację komórek, ułatwiając przejście fazy G1/S za pośrednictwem cykliny D1 oraz hamowanie P27 – inhibitora kinaz cyklino-zależnych. Wykazano również, że bezpośrednim efektem PI3K/Akt jest szlak mTOR odpowiedzialny za zwiększenie translacji i syntezy białek. Związana z nim sieć cytokin regulująca polaryzację makrofagów M2 też wydaje się być sterowana przez szlak PTEN/PI3K/Akt. Innym

postulowanym mechanizmem supresji komórek przez PTEN jest jego oddziaływanie na kinazę aktywowaną czynnikami wzrostu MAPK (ang. mitogen activated protein kinaze) oraz kinazę związaną z komórkowymi złączami punktowymi FAK (ang. focal adhesion kinaze). Wykazano, iż PTEN dzięki swej aktywności fosfatazy fosfoproteinowej jest w stanie dezaktywować zarówno bezpośrednio FAK jak i pośrednio białka Ras, stanowiące wspólny element szlaków sygnalizacji integryn oraz czynników wzrostu. Efektem tej regulacji jest zdolność modulowania motoryki i migracji komórek. Szerokie działanie PTEN również poprzez ujemną regulację szlaku PI3K/Akt zmienia ekspresję metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) co może wpływać na inwazję i migrację różnych nowotworów. Badania in vitro i in vivo dostarczają przekonujących dowodów na to, że odporność i miejscowy stan zapalny regulowane są między innymi przez szlak PI3K/Akt/PTEN.

Kluczowa rola PTEN i osi PTEN/PI3K/Akt w supresji nowotworów oraz liczne dowody na jego dysfunkcję w wielu, zwłaszcza zaawansowanych nowotworach stanowią podstawę do przypuszczenia, iż analogicznie mogą one być ważnym elementem w patomechanizmie RJG. Doniesienia na temat roli PTEN oraz jego wartości prognostycznej, predykcyjnej w RJG są nieliczne i niejednoznaczne, chociaż istnieje wiele pośrednich przesłanek mogących sugerować jego przydatność w tym charakterze, stąd ważne są prace nad pełnym wyjaśnieniem znaczenia PTEN w RJG.

Analizując problematykę guzów litych w ogóle, w tym nowotworów przewodu pokarmowego, a w szczególności RJG, nie sposób nie zwrócić uwagi na coraz częściej pojawiające się doniesienia o udziale MMPs w jego powstawaniu i przede wszystkim rozwoju. Ich aktywność proteolityczna istotnie wpływa na skład i strukturę macierzy pozakomórkowej (EMC) poprzez degradację jej komponentów oraz regulację aktywności cząstek sygnałowych. MMPs uczestniczą w regulacji zdolności komórek do różnicowania, proliferacji, apoptozy, adhezji lub migracji i na kilku etapach mogą przygotowywać komórki nowotworowe do migracji, inwazji i rozprzestrzeniania się do odległych narządów, także MMPs biorą udział w samej transformacji nowotworowej. MMPs odgrywają więc ważną rolę właściwie na wszystkich etapach rozwoju nowotworu. Natomiast tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMPs) obok innych działań, przede wszystkim kontrolują funkcjonowanie MMPs, a zatem dążą do zminimalizowania degradacji EMC. Właściwości MMPs i TIMPs biorących udział w przebudowie EMC stanowi o możliwości ich wykorzystania w diagnostyce RJG. Obecnie w badaniach klinicznych testuje się kilka syntetycznych inhibitorów MMPs, oceniających ich zdolność do hamowania wzrostu i inwazji nowotworów złośliwych in vivo. Dostarczanie genów

TIMPs do komórek nowotworowych może być kolejnym sposobem hamowania wzrostu i inwazji nowotworu.

Proces powstania RJG analizowany również winien być w aspekcie mikrośrodowiska nowotworu rozumianego jako złożony model wzajemnych zależności i kompleks interakcji pomiędzy powstającym nowotworem, a otaczającą go tkanką, w tym układem odpornościowym. Aktywacja komórek odpornościowych powoduje zmiany w wielu śródkomórkowych szlakach sygnałowych. Dziś z całą pewnością można stwierdzić, że typ, lokalizacja oraz zagęszczenie komórek odpornościowych infiltrujących guz to wyraz odpowiedzi immunologicznej w środowisku nowotworu, więc zarówno mechanizmy odporności wrodzonej i nabytej odgrywają istotną rolę w powstaniu i progresji nowotworu, mają więc wpływ na przebieg choroby. Makrofagi towarzyszące guzom (TAMs) stanowią składnik odporności wrodzonej, natomiast subpopulacje limfocytów T regulatorowych (Treg) są elementem odporności nabytej. U chorych z RJG stwierdza się zmiany liczby subpopulacji TAMs, Treg i złożone między nimi powiązania. TAMs w mikrośrodowisku guza nowotworowego polaryzują w kierunku fenotypów promujących rozwój guza (ang.tumor-promoting phenotypes), zmieniają swój fenotyp i sposób interakcji z otoczeniem: komórkami zrębu, limfocytami, EMC i komórkami nowotworowymi. TAMs, które z czasem polaryzują w kierunku fenotypu M2 wykazują się słabą zdolnością do prezentacji antygeny i działaniem immunosupresyjnym przez uwalnianie czynników immunosupresyjnych (Il-10, TGF- $\beta$ , EGF, VEGF) uważane są za pronowotworowe dla wielu komórek. Ułatwiają one także degradację EMC oraz wspierają ruchliwość komórek nowotworowych, ułatwiając ich migrację. Jednak mimo, że TAMs o fenotypie M2 dla większości nowotworów mają działanie antagonistyczne i związane z gorszym rokowaniem to dla RJG nie jest to już tak jednoznaczne. W części prac uzyskano wyniki świadczące o korzystnym rokowaniu związanym ze wzrostem gęstości TAMs M2. Uzyskiwano takie wyniki z frontu guza a nie z samego guza. Prawdopodobnie są one wyrazem intensywnej immunoreakcji obronnej, szczególnie we wcześniejszych stadiach karcynogenezy. Jednak w późniejszych etapach obserwowano wzrost gęstości TAMs fenotypu M2 wewnątrz guza, w obszarach tkanek martwiczych guza z równoległym wzrostem TAMs fenotypu M1. Niejednoznaczność wyników wynikać może ze „zmiennego zaangażowania” TAMs w różnych lokalizacjach na różnym etapie karcynogenezy, bądź różnego rozkładu subpopulacji TAMs M2. Dopiero wypadkowa działań TAMs daje pro albo antynowotworowy wpływ na zapalno-zależny guz jakim jest RJG. TAMs o fenotypie M2, między innymi indukują powstawanie limfocytów wykazujących ekspresję czynnika transkrypcyjnego FoxP3 (ang.transcription factor



forkhead box P3). Czynniki transkrypcyjne FoxP3 odgrywa istotną rolę w regulacji rozwoju i czynności układu odpornościowego, traktowany jest jako czynnik immunosupresyjny. Uważany jest on za najbardziej specyficzny marker limfocytów T regulatorowych (Treg) o fenotypie CD4(+)/CD25(+) oraz CD8(+)/CD25(+). Limfocyty te odpowiedzialne są między innymi za tolerancję immunologiczną ustroju na guz. Ten mechanizm może stwarzać korzystne warunki dla rozwoju nowotworu i promuje jego dalszy rozwój. Tak więc badania nad rolą w RJG zarówno TAMs i Treg powinno zbliżyć nas do poznania mechanizmów powstawania nowotworu i sprzyjać wdrażaniu immunoterapii do schematów leczenia RJG.

**Celem cyklu prac są badania nad karcynogenezą jelita grubego i poszukiwanie nowych markerów diagnostycznych i celów terapeutycznych w RJG w oparciu o osiągnięcia biologii molekularnej.**

**Publikacja nr 1** cyklu służy lepszemu zrozumieniu wpływu ekspresji białka PTEN na kancerogenezę jelita grubego. Do badania włączyłem 44 chorych z polipami okrężnicy i odbytnicy, które usunięto endoskopowo oraz 32 chorych ze sporadycznym RJG, których poddano klasycznemu zabiegowi chirurgicznemu. Ekspresję PTEN oceniłem z wykorzystaniem barwienia immunohistochemicznego próbek zatopionych w parafinie. Wizualizacja PTEN opierała się na specyficznych przeciwciałach króliczych (Cell Signaling). Swoistość tego przeciwciała wobec PTEN potwierdzono uprzednio metodą Western blotting oraz technikami immunohistochemicznymi używając w tym celu kilku linii komórkowych o znanym statusie PTEN. Ocenę punktową przeprowadziłem zgodnie z metodą pół-ilościową opisaną przez Perren i wsp. Wyniki dla polipów skorelowałem z uznanymi histopatologiczno-klinicznymi czynnikami ryzyka zezłośliwienia. Dodatkowo, silną ekspresję cytoplazmatyczną i jądrową PTEN wykryto we wszystkich 20 próbkach prawidłowej śluzówki. Natomiast spośród 44 polipów, normalną ekspresję PTEN zaobserwowano w 24 przypadkach, co stanowi 54,6%; obniżoną ekspresję w 18 przypadkach (40,9%); a brak ekspresji w 2 przypadkach (4,6%). Stwierdzono statystycznie znacząco niższą ekspresję PTEN w polipach w porównaniu z prawidłową śluzówką jelita ( $p = 0,004$ ). Stwierdzono obecność korelacji pomiędzy ekspresją białka PTEN a średnicą polipa. Nieparametryczny test Spearmana potwierdził umiarkowanie silnie wyrażoną ( $R = -0,53$ ,  $p = 0,003$ ) ujemną korelację pomiędzy średnicą polipa a ekspresją białka PTEN. Przeciętna średnica polipa w grupie bez ekspresji białka PTEN wynosiła 25 mm, podczas gdy polipy wykazujące obniżoną ekspresję miały średnią 12,7 mm, a te z

normalną ekspresją tego białka średnią wielkość wynoszącą jedynie 6,5 mm. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy ekspresją PTEN w polipach a innymi cechami klinicznymi i histopatologicznymi, takimi jak wiek, płeć, kształt, lokalizacja, stopień dysplazji i typ histopatologiczny. Stwierdzona przez mnie utrata ekspresji PTEN w łagodnych stanach przednowotworowych już na wczesnym etapie onkogenezy wskazuje na istotny udział tego genu w patomechanizmie RJG. Co więcej, nasilenie tego procesu wraz ze wzrostem fizycznych wymiarów polipa uznawanych za istotny czynnik prognostyczny transformacji nowotworowej może sugerować, że dysfunkcja PTEN stanowi jeden z akumulujących się czynników inicjujących wieloetapowy proces nowotworowy. Teoria Fearona i Vogelsteina potwierdzana została przez obserwacje kliniczne, dane morfologiczne i wyniki badań biologii molekularnej. Jednak tylko niewielka liczba gruczolaków ulega tej transformacji do nowotworu złośliwego. Szczególnie znaczenie kliniczne mają decyzje dotyczące polipów o wymiarach poniżej 10 mm, są one zawsze niepewne i kontrowersyjne. Ryzyko wykrycia w nich ognisk raka jest mniejsze niż 1 %. Ryzyko to wzrasta do 10 % w przypadku polipów o średnicy 1–2 cm i do 45 proc. w polipach o średnicy powyżej 2 cm. W obliczu nowych propozycji screeningu takich, jak kolonografia metodą tomografii komputerowej należy zwrócić dodatkową uwagę na proces transformacji nowotworowej w polipach jelita grubego i odpowiedzieć na pytanie, czy z usuniętego polipa powstałby w ciągu 5 -10 lat nowotwór złośliwy? Poza tym polipy (gruczolaki) po usunięciu mogą nawracać nawet u 50 proc. chorych, a rak może wystąpić u ok. 5 proc. chorych po usunięciu gruczolaka, dlatego rodzi się kolejne kosztowne pytanie, czy i jak należy tych chorych objąć programem badań kontrolnych? Wyniki przez mnie uzyskane pomóc mogą w odpowiedzi na te pytania.

Natomiast wśród badanych 32 chorych na RJG stwierdziłem także statystycznie znacząco niższą ekspresją PTEN w porównaniu z przyległą śluzówką ( $p = 0,00001$ ) oraz polipami gruczolowymi ( $p = 0,005$ ). Brak lub spadek ekspresji PTEN zaobserwowałem w niemal 70% przypadkach gruczolakoraków. Analiza korelacji pomiędzy statusem immunohistochemicznym PTEN a niektórymi najczęstszymi parametrami kliniczno-patologicznymi, takimi jak: wiek, płeć, wielkość i lokalizacja guza, stopień dysplazji, zajęcie węzłów chłonnych oraz stopień TNM ujawniła, że wielkość guza oraz stopień jego zaawansowania są skorelowane z obniżoną lub całkowicie nieobecną immunoreaktywnością PTEN. W zgodzie z moimi spostrzeżeniami Colakoglu i wsp. obserwowali spadek cytoplazmatycznej ekspresji PTEN w 40% gruczolaków – i to częściej niż w nowotworach. Autorzy ci sformułowali hipotezę, że utrata PTEN może

mieć znaczenie dla sekwencji wydarzeń od gruczolaka do raka okrężnicy. Podobne wyniki dotyczące jądrowej ekspresji PTEN zostały opublikowane przez Hsu i wsp. Opisali oni podobnie do wyników tego badania dobrze zdefiniowane różnice ekspresji PTEN pomiędzy prawidłową śluzówką okrężnicy, polipami gruczolowymi i rakiem polipach.

Podsumowując, utrata funkcji PTEN może odgrywać istotną rolę zarówno na wczesnych, jak i późnych etapach rozwoju RJG. W przypadku polipów gruczolowych może być ona oznaką stanu przedrakowego – transformacji nowotworowej. Dane kliniczne zgromadzone w ostatnich dziesięcioleciach wskazują, że rutynowe badania przesiewowe pozwalają na wykrycie choroby we wcześniejszych etapach rozwoju, a poprzez polipektomie zmniejszają częstość jej występowania poprzez zatrzymanie progresji choroby już na jej wczesnych etapach. Określenie ekspresji białka PTEN może pomóc w decyzji o polipektomii i planowaniu terminu następnych badań kontrolnych. Białko PTEN a właściwie jego brak lub dysfunkcja odgrywa kluczową rolę we wczesnych i późnych etapach karcynogenezy w jelicie grubym. Podczas późnych etapów nowotworzenia ekspresja PTEN, jak wykazałem jest skorelowana ze stopniem zaawansowania nowotworu i może stanowić czynnik rokowniczy niepomyślnej prognozy. Biorąc pod uwagę najnowsze koncepcje dotyczące obligatoryjnej haploniewydolności PTEN zaproponowanej przez Pandolfiego i wsp. według której utrata już 20% aktywności tego białka prowadzi do zauważalnego wzrostu ryzyka rozwoju nowotworów, możliwość oceny niewielkich zmian ekspresji PTEN ma znaczenie kluczowe. Zastosowana **w pracy nr 1** metoda relatywnej oceny ekspresji daje takie możliwości, ale jest niedokładna i nieobiektywna.

**Publikacja nr 2** odpowiada na brak obiektywnych, ilościowych metod oceny ekspresji PTEN, jest w niej autorska metoda, która pozwala zmierzyć subtelne odchylenia aktywności białka w tkankach. Pierwsza półilościowa ocena ekspresji PTEN zaproponowana przez Perren i wsp. jest metodą względnej oceny jego ekspresji, przyjmującą za punkt odniesienia natężenie odczynu w otaczających prawidłowych tkankach lub macierzy łącznotkankowej. Metoda ta z dość dobrymi efektami wykorzystywana było w szeregu prac dotyczących raka sutka, jelita grubego czy głowy i szyi, nie pozbawiona jest jednak wad związanych z subiektywnością oceny przez obserwatora. Wykazany w **publikacji nr 1** wyraźny związek zmian ekspresji białka PTEN w zależności od progresji nowotworu zachęcił mnie do rozwoju tej metody diagnostycznej. W badaniu zastosowałem nowy algorytm ilościowej oceny immunohistochemicznej oparty na połączeniu dekonwolucji barwnej i względnej

intensywności sygnału chromogenicznego. Proponowany algorytm został zaimplementowany w popularnym, powszechnie dostępnym oprogramowaniu do analizy obrazu Image J wersja 1.47t opartym na programie Java. Dla systemu tego przygotowana została wtyczka (ang. plug-in) umożliwiająca wyliczenie skumulowanej energii w wybranym obszarze obrazu mikroskopowego. Prawidłowość działania algorytmu oraz wtyczki zweryfikowałem pozytywnie na zbiorze obrazów mikroskopowych na modelach komórkowych i tkankowych w liniach komórek rakowych i tkankach o znanym poziomie ekspresji PTEN wybarwionych immunohistochemicznie z wykorzystaniem przeciwciał anty PTEN. Proponowana ilościowa metoda oceny ekspresji PTEN stwarza alternatywę dla obecnie dostępnych metod subiektywnych i stanowi podstawę do badań pozwalających na rozróżnienie dyskretnych zmian w ekspresji PTEN. **Pracę nr 2** rozwinąłem poprzez badanie retrospektywne grupy chorych z RJG. Tak więc zbadałem zaproponowanym algorytmem ekspresję PTEN w grupie 60 chorych z miejscowo zaawansowanym RJG. Mogłem przez to zidentyfikować 3 grupy chorych różniących się ogólnym przeżyciem (OS) i podobną tendencją w przeżyciu bez choroby(DFS), jak wykazałem w teście log-rank ( $p = 0,071$ ). Przeżycie całkowite było najdłuższe u pacjentów z ekspresją PTEN większą niż 80% wartości w stosunku do kontroli. Średnie przeżycie w tej grupie wyniosło 1210 dni (SD = 528 dni). Natomiast zaobserwowałem nieco krótsze OS u osób z częściową utratą PTEN przy względnej intensywności zabarwienia w zakresie między 20% a 80%. Średni OS w tej grupie wyniósł 1190 dni (SD = 397 dni). Wreszcie, najkrótszy OS - 878 dni (SD = 519 dni) wiązał się z niemal całkowitą utratą ekspresji PTEN w tkance guza, charakteryzującą się mniej niż 20% intensywnością zabarwienia. Tak więc obniżona ekspresja PTEN może występować we wczesnych etapach RJG, może być już obserwowana w polipach gruczołowych jelita grubego i z coraz większą częstotliwością w bardziej zaawansowanych stadiach raka. Inni autorzy również wykazali korelację pomiędzy utratą ekspresji PTEN a złym rokowaniem, ale zauważyli również trudności w wyraźnej ocenie ekspresji PTEN i dokonywaniu porównań pomiędzy tkankami rakowymi. Użycie mojego algorytmu kwantyfikacji względnej umożliwiło odróżnienie bardziej subtelnych zmian w ekspresji PTEN i wykazało, że pogorszenie się rokowania może również wystąpić w przypadkach, w których jest tylko nieco obniżona ekspresja PTEN. To stwierdzenie pozostaje w dobrej zgodności z koncepcją quasi-niewydolności Pandolfiego. Kolejnym etapem mojego cyklu było pogłębienie wiedzy dotyczącej patomechanizmu działania PTEN w RJG i wynikające z tego inklinacje diagnostyczno-terapeutyczne. PTEN jest głównym modulatorem osi sygnałowej kinazy AKT odpowiedzialnej za

aktywność proliferacyjną komórek. W RJG w części przypadków aktywacja szlaku kinazy AKT jest początkowym elementem rozwoju choroby nowotworowej lub występuje dopiero na dalszych etapach karcynogenezy. Wykazano wcześniej, że aktywacja szlaku sygnałowego PI3K/AKT/PTEN inicjuje i promuje karcynogenezę, jest ona także związana ze złym rokowaniem i zwiększoną opornością na chemioterapię, uważa się ją przy tym za obiecujący cel terapii.

PTEN hamuje szlak sygnalizacyjny PI3K/AKT poprzez katalizę reakcji odłączenia grupy 3'-fosforanowej od (3,4,5)-trifosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP3). Ocena aktywności tej osi sygnalizacji może być wykorzystana w charakterze czynnika prognostycznego, jak i w predykcji odpowiedzi na terapię celowaną nakierowaną na poszczególne jej elementy. W celu precyzyjnego określenia przyczyny deregulacji osi sygnałowej konieczne jest określenie ekspresji i stanu fosforylacji co najmniej kilku białek na różnych jej poziomach. **W publikacji nr 3** zaproponowałem wykorzystanie QDs do oceny zaburzeń osi AKT związanych z dysfunkcją genu PTEN w RJG poprzez znakowanie kropkami jednocześnie kilku przeciwciał. Przebadałem łącznie 50 chorych na RJG w różnych lokalizacjach i różnym stopniu zaawansowania klinicznego. W guzach określiłem jednocześnie ekspresję białka PTEN oraz stężenie ufosforylowanych postaci białek sygnałowych PDK1 oraz AKT. Pozwala to na równoczesne zobrazowanie koncentracji i lokalizacji przestrzennej białek badanych w komórce. Tkanki pobierałem bezpośrednio po operacji i utrwaliałem w buforowanej formalinie z dodatkiem inhibitora fosfatazy fosforowej PhosSTOP (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) zatrzymując w ten sposób proces defosforylacji. W badaniu wykorzystałem specyficzne przeciwciała monoklonalne znakowane QDs o maksymalnym natężeniu emisji 525, 565 i 585 nm. Do koniugacji przeciwciał z QDs zastosowałem komercyjnie dostępne zestawy odczynników (QDots Antibody Labeling Kit, Molecular Probes/Invitrogen). Procedura znakowania przeciwciałami została przeprowadzona zgodnie z zaleceniami producenta i składała się z pięciu etapów. Wizualizację sygnału fluorescencyjnego przeciwciał znakowanych QDs przeprowadzono za pomocą mikroskopu epifluorescencyjnego (AxioImager M.2, Carl Zeiss, Niemcy) wyposażonego w zestaw filtrów wzbudzających / emisyjnych o właściwościach spektralnych zgodnych z użytymi QDs. Użyto kamerę monochromatyczną AxioCam MRm 1,4 megapiksela (Carl Zeiss, Niemcy). Pomiar sygnału fluorescencji przeprowadzono w co najmniej 100 ręcznie wybranych obszarach odpowiadających regionom podbłonowym lub cytoplazmatycznym poszczególnych komórek nowotworowych.

Badania wykazały, a właściwie potwierdziły podejrzenia, że właśnie w grupie chorych z

obniżoną lub całkowitą utratą aktywności PTEN w guzie nowotworowym dochodzi do wzrostu stężenia ufosforylowanych, aktywnych postaci białek fosfo-PDK1 (Ser241) oraz fosfo-AKT (Thr308) świadczących o trwałej aktywacji tej osi u części chorych. Odpowiadające im maksima emisji fluorescencji były zlokalizowane w tych samych obszarach w sąsiedztwie błony komórkowej. W grupie tej zanotowałem także znamienne statystycznie dodatnią korelację stężeń aktywnych form PDK1 oraz AKT o miernym nasileniu ( $R=0,65$ ). W komórkach z prawidłową ekspresją PTEN zanotowałem statystycznie znamienne niższe sygnały pochodzące od obu ufosforylowanych białek sygnałowych, które korelowały ujemnie z siłą sygnału fluorescencji pochodzącej od białka PTEN. Tak więc podsumowując w analizowanym materiale zaobserwowałem zależność pomiędzy obniżoną ekspresją białka PTEN a wzrostem koncentracji ufosforylowanych, aktywnych postaci PDK1 (fosfo-PDK1-Ser241) oraz AKT (fosfo-AKT-Thr308) w komórkach nowotworowych. Oba zjawiska świadczą o permanentnej aktywacji osi PI3K/AKT w wyniku nagromadzenia trójfosforanu inozytolu (PIP3) nie hydrolizowanego przez aktywność fosfatazową PTEN. W niniejszej pracy po raz pierwszy zobrazowałem te cząsteczki jednocześnie w obrębie tych samych przedziałów subkomórkowych (podbłonowo) komórek nowotworowych wykazujących obniżoną ekspresję PTEN (dodatnia kolokalizacja fosfo-PDK1 i fosfo-AKT). Tak więc zarówno ekspresja PTEN jak i aktywacja osi PI3K/AKT mogą być czynnikami prognostycznym pierwsza ujemnym, druga dodatnim. Nie wykluczone że staną się one wspólnym celem terapii molekularnej.

W związku z tym, że istniejące dane dotyczące prognostycznej roli MMPs i ich inhibitorów TIMPs jako markerów progresji RJG są niejednoznaczne to w **publikacji nr 4** dokonaliśmy analizy profilu aktywności transkrypcyjnej genów kodujących metaloproteinazy MMP9 i MMP28 oraz tkankowego inhibitora metaloproteinaz TIMP1 w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego raka okrężnicy (CC). Badanie to zmierzało do wskazania ich jako potencjalnych, uzupełniających markerów diagnostycznych i prognostycznych w tym nowotworze. Uzyskaliśmy to poprzez porównanie metodą ekspresyjnych mikromacierzy oligonukleotydowych określonych transkryptomów wraz z analizą i oceną zróżnicowania ekspresji genów kodujących w różnych stopniach zaawansowania CC. Materiał do badania stanowiły próbki z guza nowotworowego i tkanki jelita zdrowego pobrane w trakcie resekcji okrężnicy z powodu raka u 15 chorych w wieku 46-72 lat. Analizę molekularną rozpoczęto od ekstrakcji całkowitego RNA z uzyskanych w trakcie operacji fragmentów jelita grubego, który w dalszych etapach badań stanowił matrycę do wyznaczenia transkryptomu jelita metodą

mikromacierzy ekspresyjnych HG-U133A (Affymetrix) oraz walidacji wyników eksperymentu macierzowego. Do walidacji wykorzystano metodę qRT-PCR w czasie rzeczywistym na podstawie profilu stężeń mRNA: MMP9, MMP28, TIMP1 i kontroli endogennych GAPDH oraz  $\beta$ -aktyny. Po wstępnej akceptacji mikromacierzy do analizy porównawczej przeprowadzonej zgodnie z zaleceniem producenta mikromacierzy (Affymetrix) i normalizacji wyników metodą RMA, przeprowadzono grupowanie transkryptomów metodą klasteryzacji hierarchicznej. Otrzymany wynik wskazuje, że wszystkie transkrypty grupy grupowały się w trzy grupy główne różniące się stopniem zaawansowania klinicznego gruczolakoraka. C - grupa kontrolna - wycinki z prawidłowego jelita grubego, LSC – grupa chorych z guzami o niskim stopniu zaawansowania - wycinki CC w stadium zaawansowania CSI oraz HSC – grupa chorych z nowotworem o wysokim stopniu zaawansowania: wycinki z CC w stadium zaawansowania CSII, CSIII i CSIV. Wyniki tych analiz wykazały, iż profil ekspresji genów kodujących MMP9, MMP28 i TIMP1 różnicuje tkankę nowotworową od zdrowego jelita, nie wykazały natomiast istotnych statystycznie różnic w zależności od stopnia zaawansowania CC. Wynik testu Manna-Whitneya z poprawką Benjamini Hochberga, w którym typowano mRNA różnicujące wycinki jelita grubego prawidłowego i CC LSC potwierdził wynik analizy przeprowadzonej jednoczynnikowym testem ANOVA połączonej z analizą post hoc Tukeya tylko dla MMP9, natomiast w teście porównującym wycinki jelita grubego prawidłowego i CC HSC potwierdził wynik analizy ANOVA zarówno w przypadku MMP9 i MMP28, jak również dla TIMP-1. Wyniki te zostały potwierdzone metodą qRT-PCR.

Nasze badania sugerują, że MMPs i TIMPs mogą być ważnym elementem kontrolowania stanu CC, wskazując na złożoność mechanizmu proliferacji i migracji. Wydaje się, że ulegające nadekspresji MMP9 i TIMP1 oraz wyciszeniu MMP28 mogłyby stać się bezpośrednim, niezależnym celem terapii antynowotworowej. Ponieważ istnieje różnica w ekspresji genu MMP9 w tkankach nowotworowych w porównaniu do tkanek zdrowych, wykazuje on wartość diagnostyczną - może służyć jako wczesny marker transformacji nowotworowej, ponieważ dochodzi do zmian jego aktywności już na etapie inicjacji nowotworu. Natomiast zarówno wzrost ekspresji genu kodującego MMP9, jak i spadek aktywności transkrypcyjnej genu MMP28 i wzrost aktywności transkrypcyjnej genu TIMP-1 mogą stanowić potwierdzenie istnienia zmiany nowotworowej. Niestety, choć na podstawie mapy termicznej wydaje się, iż istnieją również różnice w ekspresji tych genów w porównaniu LSC, z tymi z HSC, to nie wykazują one znamienności statystycznej, tym samym nie mogą być wykorzystywane w różnicowaniu stadium zaawansowania CC. MMP-9 z kolei wydaje się brać udział w wielu kluczowych etapach

rozwoju CC, od powstawania nowych naczyń krwionośnych w trakcie nowotworzenia i rozwoju guza pierwotnego, po powstawanie przerzutów w narządach odległych. Podsumowując praca nasza wykazała, że wzrost ekspresji genów MMP9 może stanowić marker uzupełniający w diagnostyce CC, natomiast wzrost ekspresji MMP9 i TIMP1 oraz zmniejszenie MMP28 w wycinkach z jelita grubego, może stanowić potwierdzenie istnienia zmiany nowotworowej, natomiast nie wskazuje na stopień zaawansowania CC. Badane cząsteczki mogą stanowić ewentualny cel w terapii molekularnej CC. Jednak aby to potwierdzić potrzebne są dalsze badania kliniczne i podstawowe z dziedziny genomiki i proteonomiki.

W poszukiwaniu markerów diagnostycznych dla RJG w **publikacji nr 5** przedstawiłem próbę wykorzystania oceny ilościowej i fenotypowej makrofagów towarzyszących guzom i limfocytów pomocniczych, jako czynników prognostycznych u chorych, u których powszechnie stosowane czynniki prognostyczne z różnych względów zawodzą. Celem pracy była ocena intensywności nacieku makrofagów fenotypu M2 zdefiniowanych jako (CD68+/iNOS-) oraz intensywności nacieków limfocytów o fenotypie CD8+/FoxP3+ u chorych operowanych z powodu RJG, jako dodatkowych czynników prognostycznych w odniesieniu do DFS oraz OS.

Do badania zakwalifikowano 89 chorych operowanych z powodu RJG w stopniu zaawansowania pT3N0M0 (IIA) oraz pT3N1-2M0 (IIIB i IIIC). Parametrami klinicznymi ocenianymi w badaniu był DFS zdefiniowany jako czas od zabiegu operacyjnego do pojawienia się wznowy miejscowej lub przerzutów odległych oraz całkowity OS. U 45 chorych w okresie obserwacji zanotowałem nawrót choroby. U 10 z nich nawrót miał charakter wznowy miejscowej lub zlokalizowanej w powłokach brzusznych. W pozostałych 35 przypadkach zanotowałem pojawienie się przerzutów odległych najczęściej do wątroby (29 przypadków) oraz płuc (6 przypadków). U chorych ze wznową występowała tendencja do starszego przeciętnego wieku w momencie rozpoznania choroby ( $p=0.07$ ) oraz wyższego zaawansowania węzłowego ( $p=0.002$ ) oraz klinicznego choroby ( $p=0.01$ ). Do badań immunohistochemicznych wykorzystałem materiał tkankowy zgromadzony w postaci bloczków parafinowych. Z każdego bloczka zawierającego tkanki nowotworowe wykonano po 4 barwienia immunohistochemiczne wykorzystując przeciwciała: mysie przeciwciało monoklonalne CD68 klon PG-M1 (nr katalogowy: M 0876, Dako, Denmark), monoklonalne królicze przeciwciało FoxP3 klon SP97 (nr katalogowy: 506-3974, Zytomed Systems, Berlin), monoklonalne mysie przeciwciało CD8 klon C8/144B (nr katalogowy: IR623, Dako, Denmark), poliklonalne królicze przeciwciało iNOS (nr katalogowy: NB300-605 Novus Biologicals, United



Kingdom). Dla uwidocznienia reakcji antygen-pierwotne przeciwciała wykorzystano system wizualizacji EnVision™ FLEX/HRP. Dla uwidocznienia nacieków makrofagów w obrębie guza oraz w jego froncie wykorzystałem marker CD68 ulegający ekspresji we wszystkich komórkach linii makrofagowej bez względu na ich fenotyp (zarówno w podtypach M1 jak i rodzinie M2).

W obrębie makrofagów M2 opisano szereg fenotypów różniących się ekspresją swoistych markerów, dla ich uwidocznienia konieczne byłoby jednoczesne wykorzystanie co najmniej kilku przeciwciał. W związku z tym zdecydowałem się na wyznaczenie immunohistochemiczne makrofagów fenotypu M1 przy pomocy przeciwciała anty-syntetazie tlenu azotu występującej wyłącznie w makrofagach typu M1 i odjęcie ich liczby od ogólnej puli wszystkich makrofagów (CD68-pozytywnych). Pozwoliło to na uproszczenie metody i nie powinno wpłynąć na jej swoistość. W celu określenia intensywności nacieków limfocytów T regulatorowych Treg zdefiniowanych w pracy, jako wykazujące koekspresję białek CD8+/FoxP3+, w całkowitej puli limfocytów wykazujących ekspresję antygenu powierzchniowego CD8+ wykrywano obecność czynnika transkrypcyjnego FoxP3 uważanego za swoisty marker limfocytów Treg. Oceny odczynów immunohistochemicznych dokonywano w mikroskopie świetlnym marki Olympus (Tokio, Japonia) typu CX41. Badanie wykazało, że u chorych, u których w okresie obserwacji odnotowano nawrót choroby znacznie częściej występowały masywne nacieki makrofagów o fenotypie M2 (CD68+/iNOS-) przy praktycznie znikomym udziale fenotypu M1 (iNOS+). Ich intensywność w obrębie łącznotkankowej macierzy guza nowotworowego w przeważającej większości klasyfikowana była jako średnia (2+) lub duża (3+) przy praktycznie całkowitym braku intensywności dla M1 ocenianej na (0) lub (1+). Różnice te były wysoce znamienne statystycznie ( $p=0.008$ ). Obecność intensywnych nacieków makrofagów M2 w zrębie guza wiązała się z krótszym DFS (727 wobec 1397 dni) oraz krótszym OS (891 względem 1411 dni) przy poziomie istotności odpowiednio  $p=0.005$  oraz  $p=0.006$ . Względne ryzyko wznowy oraz zgonu z powodu choroby było ponad dwukrotnie wyższe w grupie pacjentów z intensywnymi naciekami makrofagów M2 w guzie w porównaniu do pacjentów bez nacieków. Współczynnik względnego ryzyka wznowy i zgonu z powodu choroby wynosił odpowiednio:  $RR=2.05$ ,  $95\% CI=1.33-3.14$ ,  $p=0.001$  oraz  $RR=2.08$ ,  $95\% CI=1.28-3.39$ ,  $p=0.003$ . W analizie wieloczynnikowej obejmującej 3 zmienne o potencjalnym znaczeniu rokowniczym: cechę N klasyfikacji TNM, intensywność nacieków makrofagów M2 oraz limfocytów CD8+/FoxP3+ (Treg) w zrębie guza nie potwierdzono roli intensywności nacieków M2 jako niezależnego czynnika prognostycznego zarówno w stosunku do DFS

jak i OS. Wykazano natomiast pozytywną korelację o średnim nasileniu pomiędzy intensywnością nacieków limfocytów Treg a TAMs M2 w zrębie guza ( $R=0.54$ ,  $p<0.0001$  w teście korelacji rang Spearmana). W przypadku nacieku makrofagów M2 we froncie guza zaobserwowano natomiast tendencję przeciwną: intensywny naciek TAMs na granicy guza i otaczających tkanek związany był z mniejszą częstością wznów - zależność ta nie osiągnęła jednak znamienności statystycznej ( $p=0.061$ ). Nacieki limfocytów T wykazujących ekspresję antygenów powierzchniowych CD8+ zaobserwowano zarówno w obrębie łącznotkankowego zrębu guza jak i wśród komórek nowotworowych. U pacjentów ze wznową w okresie obserwacji zanotowano intensywniejsze nacieki z limfocytów CD8+ przy jednoczesnym większym względnym udziale limfocytów CD8+/FoxP3+ (Treg) w puli CD8+ co wyrażało się większą liczbą limfocytów Treg obserwowanych w polu widzenia w porównaniu do pacjentów bez objawów wznowy. Różnice te były wysoce znamienne statystycznie ( $p<0.0001$ ). Obecność powyżej 11 limfocytów FoxP3+ w polu widzenia w obrębie zrębu guza nowotworowego związane było z niekorzystnym rokowaniem względem czasu wolnego od wznowy jak i całkowitego czasu przeżycia ( $p<0.0001$  w teście Log-rank). Intensywne nacieki FoxP3 korelowały z krótszym DFS- 463 dni wobec 1193 dni w grupie z mniejszą liczbą limfocytów FoxP3+ w zrębie guza. Podobnie, średni OS w grupie z liczbą limfocytów Treg powyżej mediany wynosił 682 dni w porównaniu do 1256 dni w grupie z liczbą limfocytów Treg poniżej mediany. Względne ryzyko wznowy w grupie pacjentów z intensywnymi naciekami Treg było ponad 12 razy większe niż u pacjentów z mniej intensywnymi naciekami ( $RR=12.3$ ,  $95\% CI=5.44-27.9$ ,  $p<0.0001$ ). Podobnie ryzyko zgonu z powodu choroby było znacząco wyższe w tej grupie ( $RR=12.5$ ,  $95\% CI=4.9-32.4$ ,  $p<0.0001$ ). W wieloczynnikowym modelu ryzyka Cox'a obejmującym 3 zmienne o potencjalnym znaczeniu rokowniczym: cechę N klasyfikacji TNM, intensywność nacieków makrofagów M2 oraz limfocytów CD8+/FoxP3+ (Treg), tylko liczba limfocytów Treg w polu widzenia, obok cechy N jest niezależnym czynnikiem rokowniczym.

Wyniki świadczące o korzystnym rokowaniu związanym ze wzrostem gęstości TAMs M2 uzyskiwano z frontu guza a nie z samego guza. Zwracam uwagę, że poprawa przeżycia wiąże się z wysoką infiltracją przez makrofagi frontu guza jako wyrazu silnej immunoreakcji obronnej, szczególnie we wcześniejszych stadiach karcynogenezy, później zaś obserwujemy wzrost gęstości TAMs fenotypu M2 we wewnątrz guza, w obszarach tkanek martwiczych guza z równoległym wzrostem TAMs fenotypu M1. Niejednoznaczność wcześniejszych wyników innych autorów wynikać może ze „zmiennego zaangażowania” TAMs w różnych lokalizacjach na różnym etapie

karcynogenezy, bądź różnego rozkładu subpopulacji TAMs M2. Dopiero wypadkowa działań TAMs daje pro albo antynowotworowy wpływ na zapalno-zależny guz jakim jest RJG. W tych rozważaniach należy uwzględnić, że komórki nowotworowe są w stanie nie tylko blokować aktywność TAMs w guzie, ale modyfikować działania TAMs na rzecz promowania przeżywalności i wzrostu guza. Wydaje się, że w obszarze frontu ten modulujący wpływ komórek nowotworowych jest najmniejszy i tutaj działanie TAMs jest antynowotworowe. Wewnątrz guza, szczególnie w bardziej zaawansowanych stanach wypadkowa działania mikrośrodowiska na TAMs już jest pronowotworowa. W naszym badaniu u chorych w stadiach IIA, IIIB, IIIC wysoka gęstość TAMs o fenotypie iNOS(-) w samym guzie związana jest z krótszym OS i dużym ryzykiem wznowy i koreluje w sposób znaczący z liczbą limfocytów Treg w zrębie guza przez co nie stanowi niezależnego czynnika rokowniczego. Co więcej związek ten może stanowić pośredni dowód na rolę TAMs w programowaniu immunomodulującej funkcji limfocytów FoxP3(+) w zrębie guza. W obrębie frontu guza zaobserwowałem natomiast tendencję przeciwną: wzrost intensywności nacieków TAMs iNOS(-) we froncie guza związany był z lepszym rokowaniem choć zależność ta nie osiągnęła znamienności statystycznej ( $p=0.061$ ).

Zaproponowany w niniejszej pracy sposób pośredniej oceny nacieków makrofagów o fenotypie M2 poprzez odjęcie liczby makrofagów M1 iNOS(+) z puli wszystkich makrofagów CD68(+) naciekających guz w prosty sposób pozwolił mi na wyróżnienie podtypu M2 z uwzględnieniem szeregu podtypów o zróżnicowanym profilu ekspresji swoistych markerów. Pewnym ograniczeniem przyjętej metodologii oceny odczynów IHC w korespondujących obszarach na seryjnych skrawkach jest brak możliwości wykazania jednoczesnej ekspresji markerów w konkretnych pojedynczych komórkach. Wydaje się, że to uproszczenie nie wpływa na wartość prognostyczną dla takiego oznaczenia dla TAMs M2. Na pewno jednoczesne użycie większej liczby specyficznych markerów dla TAMs M2 w tym samym skrawku wykluczyłoby pominięcie niewielkiej liczby makrofagów w tej subpopulacji, ale uniemożliwiłoby technicznie wykonanie oznaczenia in-situ i zwiększyłoby koszty, a więc i dostępność badania. Uważam, że mniejsza swoistość badania nie powinna mieć zasadniczego wpływu na jego czułość, a intensywność nacieku makrofagów fenotypu CD63+/iNOS- w zrębie guza wydaje się być dobrym czynnikiem prognostycznym w RJG.

Wyniki badań dotyczących limfocytów CD8(+)/FoxP3(+) wskazują że wzrost intensywności nacieku zrębu guza przez tak określoną subpopulację limfocytów regulatorowych może być uznany za niekorzystny i niezależny czynnik rokowniczy. Może to wynikać z ich hamującego wpływu na przeciwnowotworową aktywność układu

immunologicznego i być efektem subtelnej regulacji zachodzącej między limfocytami związanymi z guzem o fenotypie CD8(+)/FoxP3(+) a makrofagami związanymi z guzem o fenotypie CD68(+)/iNOS(-) których kolokalizację w zrębie guza wykazałem w naszym badaniu. Podobnie jak w przypadku oznaczeń dotyczących makrofagów należy mieć na uwadze, że zastosowana metoda pojedynczych barwień korespondujących obszarów na seryjnych skrawkach uniemożliwia identyfikację poszczególnych limfocytów jako CD8(+)/FoxP3(+) a jedynie całościową ocenę tych obszarów w ujęciu statystycznym.

Podsumowując w tym badaniu retrospektywnym dotyczącym 89 chorych na RJG w stadium IIA, IIIB i IIIC wykazałem, że nacieki zrębu guza przez TAMs CD68(+)/iNOS(-) i Tregs CD8(+)/FoxP3(+) są negatywnym czynnikiem prognostycznym i są ze sobą pozytywnie skorelowane. Intensywność naciekania zrębu guza przez limfocyty CD8(+)/FoxP3(+) stanowić może niezależny od innych czynnik prognostyczny w grupie chorych na RJG w stopniu zaawansowania IIA, IIIB i IIIC co wymaga jednak potwierdzenia w badaniach prospektywnych. Zaproponowana przeze mnie metodologia identyfikacji podtypów TAMs i Tregs w skrawkach histopatologicznych jest przede wszystkim nakierowana na praktyczne wykorzystanie w rutynowym postępowaniu klinicznym

#### Podsumowanie

Nowotwory jelita grubego są istotnym problemem onkologicznym w Polsce i na świecie. RJG jest nowotworem w przypadku, którego skuteczne jest prowadzenie badań przesiewowych, a w konsekwencji zmniejszenie umieralności poprzez usuwanie zmian przednowotworowych i wcześniejsze wykrywanie raka. W wielodyscyplinarnej strategii postępowania w RJG, w przypadku uogólnienia schorzenia, o wydłużeniu DFS i OS u chorych decyduje obok postępów w leczeniu chirurgicznym i radioterapii wprowadzanie nowych leków cytotoksycznych, immunoterapii oraz terapii ukierunkowanych molekularnie.

Naczelną zasadą medycyny spersonalizowanej wprowadzoną do nowoczesnego leczenia RJG jest indywidualizacja postępowania pozwalająca zwiększyć skuteczność leczenia i zminimalizować działania niepożądane. Jej sukces opiera się na optymalnym doborze chorych do wybranego, zindywidualizowanego leczenia. Służy temu rozwój wiedzy o karcynogenezie i nowych technikach badawczych z dziedziny biologii molekularnej, który dostarcza nam zarówno nowe markery diagnostyczne, jak również nowe cele terapeutyczne. Prezentowany cykl publikacji wpisuje się w ten sposób myślenia.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poza powyższym cyklem pięciu prac powiązanych tematycznie i będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego mój dorobek ze względu na tematykę poruszanych zagadnień można pogrupować **na cztery grupy tematyczne**:

### A. Cykl publikacji dotyczących różnych aspektów karcynogenezy przewodu pokarmowego.

Cykl ten dotyczy szeregu badań nad nowotworami przewodu pokarmowego w oparciu o metody immunoenzymatyczne, PCR i macierze oligonukleotydowe. Szukam w nich możliwych przyczyn, ważnych elementów transformacji nowotworowej oraz potencjalnych markerów i celów terapii raka. Patogeneza raków różnych odcinków przewodu pokarmowego jest procesem złożonym związanym z czynnikami środowiskowymi, uwarunkowaniami dziedzicznymi określającymi indywidualną predyspozycję do zachorowania oraz akumulującymi się w nabłonku wyścielającym somatycznymi uszkodzeniami genetycznymi. Jednym z czynników środowiskowych o charakterze infekcyjnym o domniemanym związku z nowotworzeniem w przewodzie pokarmowym jest wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) o wysokim potencjale onkogennym. Jego rola w patogenezie nowotworów przewodu pokarmowego jest niejasna. **Publikacja A1** próbuje odpowiedzieć na pytanie, czy wirusy HPV o wysokim potencjale onkogennym mają znaczenie w karcynogenezie jelita grubego i jakie by wynikały z tego konsekwencje kliniczne? Dane pochodzące z dostępnych publikacji wykazują dużą rozpiętość częstości wykrywania HPV w zależności od stosowanych technik detekcji, lokalizacji oraz grup badanych. Najnowsze doniesienia w oparciu o techniki PCR wykorzystujące ścisłą kontrolę i ochronę przed kontaminacją próbek wskazują na brak genomu wirusa w utkaniu wielu guzów nowotworowych, wykluczając tym samym jego udział w procesie onkogenezy. Wykorzystanie techniki PCR jako najczulszej metody detekcji DNA HPV wiąże się jednocześnie z niską swoistością prowadząc do wysokiego odsetka wyników fałszywie pozytywnych. Zastosowaliśmy więc w **pracy A1** (także A2) metodę ilościową PCR połączoną z potwierdzeniem ekspresji w guzie nowotworowym białka wirusa HPV p16(INK4a), co pozwoliło nam na wyeliminowanie ewentualnych wyników pozytywnych związanych z kontaminacją lub obecnością wirusa a nie związaną z infekcją. Algorytm taki z wykorzystaniem białka p16(INK4a) jako surogatu infekcji HPV stosowano z powodzeniem wcześniej w

przypadku raka szyjki macicy oraz HPV-zależnego raka płaskonabłonkowego gardła środkowego. Celem **pracy A1** jest wykazanie związku pomiędzy wyznacznikiem czynnej infekcji HPV białkiem p16 a wykazaną metodą PCR obecnością wirusa HPV w RJG i jego stanach przednowotworowych. W naszych badaniach nie znaleźliśmy w polipach gruczołowych i RJG DNA HPV. Tak więc nasze wyniki nie potwierdzają znaczenia HPV w karcynogenezie jelita grubego. Uczestnictwo HPV wysokiego ryzyka onkogenego (HR-HPV) w patogenezie części raków kolorektalnych, jak się wydaje, jeżeli jest możliwe, to niezwykle rzadko. Raczej dotyczyłoby to rzadkich raków płaskonabłonkowych, chociaż wykazanie tylko obecności wirusa jak wiemy nie potwierdza jeszcze jego etiologicznej roli. Celem **publikacji A2** jest podobnie wykazanie metodą ilościowego PCR obecności wirusa HPV w tkankach raka żołądka oraz pośrednie potwierdzenie aktywnej infekcji wirusem poprzez wykazanie nadekspresji białka p16(INK4a) metodą immunohistochemiczną. W przedstawionym przez nas badaniu przy oznaczeniu ponad 93% podtypów wirusów wysokiego ryzyka onkogenego, w tym uznawanych za najbardziej prawdopodobne w etiopatogenezie raka HPV16 i HPV18 oraz zastosowaniu restrykcyjnych zasad zabezpieczenia materiału przed kontaminacją wykluczaliśmy obecność wirusa HPV w raku żołądka, negując jego rolę w karcynogenezie. Raki głowy i szyi, w tym jamy ustnej i gardła umiejscowione są w górnej części układu pokarmowego i oddechowego. Udowodniono, że HR-HPV mają istotne znaczenie w patogenezie niektórych raków płaskonabłonkowych głowy i szyi oraz przewodu pokarmowego (przełyk, odbył), ale nadal mechanizmy ich wpływu nie są jasne. W publikacji **A3** wykazaliśmy, że nie ma związku między brodawczakami jamy ustnej i gardła, a zakażeniem HPV niskiego ryzyka (LR-HPV) i HR-HPV. Dodatkowo, zakażenia HR-HPV i LR-HPV wydają się wykluczać wzajemnie w brodawczakach i rakach płaskonabłonkowych jamy ustnej i gardła.

**Publikacja A4** to wstępne wyniki dotyczące znaczenia białka PTEN we wczesnej karcynogenezie jelita grubego. Celem pracy było zbadanie ekspresji białka PTEN w procesie transformacji nowotworowej polipów gruczołowych jelita grubego. Grupę badaną stanowiło 40 chorych zakwalifikowanych do zabiegu endoskopowego usunięcia polipa jelita grubego. Po utrwaleniu w roztworze 10% buforowanym PBS materiał tkankowy zatopiony został w parafinie, skrawany seryjnie i poddawany ocenie histopatologicznej oraz badaniom dodatkowym. Wizualizacja PTEN opierała się na specyficznych przeciwciałach króliczych (Cell Signaling). W sposób półilościowy oznaczono ekspresję białka PTEN w polipach okrężnicy i odbytnicy oraz podjęto próbę skorelowania uzyskanych wyników z uznanymi histopatologiczno-klinicznymi czynnikami

ryzyka zezłośliwienia. Utratę lub osłabienie ekspresji białka stwierdzono w 45% przypadków. Wykazano ponadto związek pomiędzy średnicą polipa a utratą ekspresji PTEN. Uzyskane wyniki mogą sugerować istotny udział genu PTEN we wczesnych etapach onkogenezy jelita grubego.

Surwiwina to białko antyapoptotyczne –przedstawiciel rodziny IAPs (ang. inhibitory apoptosis proteins), które hamuje apoptozę oraz reguluje podziały komórek, promując ich przeżycie i ekspansję. Ze względu na nadekspresję genu surwiwiny w wielu typach nowotworów uznano ją za marker w diagnostyce nowotworów oraz potencjalny cel w terapii przeciwnowotworowej. Jednak liczne badania mające na celu ocenę potencjalnych możliwości zastosowania surwiwiny w diagnostyce i terapii nowotworów obejmujące analizę częstości jej występowania, mechanizmów działania i udziału w procesie apoptozy i regulacji cyklu komórkowego dostarczają wielu sprzecznych danych. W przedstawionej **publikacji A5** analizowaliśmy zmiany aktywności transkrypcyjnej surwiwiny w RJG w stosunku do tkanki zdrowej. Materiał do badań molekularnych stanowiły wycinki jelita grubego ocenione na podstawie analizy histopatologicznej jako prawidłowe lub jako wycinki gruczolaka. Otrzymane wyniki wskazują, że gen kodujący surwiwinę jest aktywny transkrypcyjnie zarówno w komórkach jelita prawidłowego, jak i w komórkach gruczolaka, z wyraźną tendencją nadekspresji w raku. Podsumowując pracę można stwierdzić, że uzyskane wyniki oparte na macierzach oligonukleotydowych wskazują, że aktywność transkrypcyjna surwiwiny nie jest specyficznym markerem dla RJG. Surwiwina może stanowić cel terapeutyczny tylko w przypadku indywidualizacji leczenia, jeśli u pacjenta uda się wykryć różnice w ekspresji pomiędzy kontrolą a guzem, co nie występuje u każdego chorego.

Celem **publikacji A6** jest oszacowanie ekspresji genu adamaliny - ADAM28 i insulinoopornego czynnika wzrostu białka-3 (IGFBP-3) w tkankach RJG w odniesieniu do stanu nadwagi lub otyłości. Zastosowaliśmy tutaj także technikę mikromacierzy oligonukleotydowych. Badani chorzy podzieleni zostali na dwie grupy; chorzy z BMI $\geq$ 25 oraz osoby z prawidłowym BMI. Grupę kontrolną stanowiły tkanki zdrowe jelita grubego od osób otyłych i z prawidłowym BMI. W badaniu wykazaliśmy, że zmiana ekspresji genów ADAM28 i IGFBP-3 występuje w prawidłowej tkance u chorych z nadwagą lub otyłych z RJG. Nie znaleziono jej natomiast w tkance raka, stąd obserwowana zmienność molekularna ekspresji ADAM28 i IGFBP-3 może być wstępnym procesem powstawania raka i mieć związek z jego powstaniem u osób otyłych. Celem **pracy A7** zrealizowanej w podobnej metodologii jest wytypowanie genów kodujących białka adhezyjne grupy kadheryn, białek o potencjalnej wartości dla diagnostyki, prognostyki i

leczenia RJG. Badania przeprowadzono na próbkach tkankowych pozyskanych od chorych, u których wykonywano standardowe operacje resekcyjne z powodu RJG. Ocenę ekspresji genów przeprowadzono za pomocą mikromacierzy oligonukleotydowych z walidacją techniką qRT-PCR. Do opracowania wyników użyto dwóch niezależnych programów statystycznych. Badania pozwoliły na wytypowanie genów, które powinny być obiektem dalszych badań w tym kierunku. Potwierdzono zmiany w profilu ekspresji genów CDH1 i CDH3 kodujących kadheryny w związku z progresją RJG. Stąd mogą one potencjalnie stanowić marker diagnostyczny przydatny do wykrywania wczesnych zmian nowotworowych. Potwierdzono również potencjalną przydatność genu CDH3 jako celu dla terapii biologicznej i wytypowano inne geny kodujące kadheryny mogące być przydatne w takim postępowaniu.

1 Śnietura M., **Waniczek D.**, Nowakowska-Zajdel E., Kopec A., Muc-Wierżgoń M. (2012): Does human papilloma virus participate in colorectal carcinogenesis? *J.Biol.Regul.Homeost.Agents*; Vol.26, No.4, p.757-762 **MNiSW: 20.000**

2 Śnietura M., **Waniczek D.**, Pięłowski W., Kopec A., Nowakowska-Zajdel E., Lorenc Z., Muc-Wierżgoń M. (2014): Potential role of human papilloma virus in the pathogenesis of gastric cancer. *World J.Gastroenterol.*; Vol.20, No.21, p.6632-6637. **IF: 2.43 MNiSW: 25.000**

3 **Waniczek D.**, Śnietura M., Pięłowski W., Rdes J., Kopec A., Młynarczyk-Liszka J., Rubel-Śnietura I., Rudzki M., Hudyka K., Lange D., Arendt J. (2012): Analysis of PTEN expression in the large intestine polyps and its relation to the recognized histopathological and clinical risk factors for cancer development in this location. *Współczesna Onkologia*,119,4: 310-316. **IF: 0.21 MNiSW: 15.000.**

4 Śnietura M, Lamch R, Kopec A , **Waniczek D**, Likus W, Lange D, Markowski J. (2017): Oral and Oropharyngeal Papillomas Are Not Associated With High-Risk Human Papillomavirus Infection. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* Jun 21. DOI: 10.1007/s00405-017-4649. **IF - 1,66 MNiSW: 25.000**

5 Dudek S., Kruszniewska-Rajs C., Plato M., Stachowicz M., Nowakowska-Zajdel E., Muc-Wierżgoń M., Rudzki M., **Waniczek D.**, Arendt J., Woźniczko I., Tkacz M, Mazurek U. (2010) Survivin Gene Expression In Colorectal Cancer. *Farm. Przegł. Nauk.*; R.7, nr 3, s.46-51. **MNiSW: 6.000**

6 Nowakowska-Zajdel E., Mazurek U., Wierżgoń J., Kokot F., Fatyga E., Ziółko E., Klakla K., Błażelonis A., **Waniczek D.**, Głogowski Ł., Kozowicz A., Niedworok E., Muc-Wierżgoń M. (2013): Expression of ADAM28 and IGFBP-3 genes in patients with



colorectal cancer - a preliminary report. Int.J. Immunopathol. Pharmacol.; Vol.26, No.1, p.223-228 **IF- 2.507**

7 Lorenc Z, Opiłka MN, Kruszniewska-Rajs C, Rajs A, **Waniczek D**, Starzewska M, Lorenc J, Mazurek U. (2015): Expression level of genes coding for cell adhesion molecules of cadherin group in colorectal cancer patients. Med.Sci.Monitor 2015; Vol.21, p.2031-2040 **IF: 1.405. MNiSW: 15.000**

## **B. Cykl publikacji dotyczący prób wykorzystania markerów stanu zapalnego w diagnostyce**

Cykl ten dotyczy badań nad markerami stanu zapalnego. Markery stanu zapalnego takie jak: interleukina-6 (IL-6), prokalcytonina (PCT), neopteryna (NPT) stanowią bardzo ważne wskaźniki diagnostyczne oraz rokownicze zarówno w przebiegu zakażeń, procesów zapalnych, także po przeszczepach, różnych stanach zaburzeń homeostazy organizmu na przykład po urazie, jak i również w chorobach nowotworowych. W **pracy B1** poszukuję odpowiednio czułego i swoistego markera pozwalającego określić wielkość urazu w okresie okołoperacyjnym. Interleukina-6 to jeden z głównych i najbardziej wielokierunkowo działających cytokin prozapalnych inicjujących i regulujących ostrą reakcję zapalną, jest także markerem urazu. Celem w **pracy B1** jest porównanie wartości stężeń IL-6 w okresie okołoperacyjnym w dwóch jednolitych statystycznie grupach chorych operowanych z powodu niepowikłanej kamicy pęcherzyka żółciowego metodą klasyczną i laparoskopową. W pracy wykazałem, że w pierwszej, drugiej i trzeciej dobie zarówno po cholecystektomii klasycznej, jak i laparoskopowej wartości stężeń były znamienne wyższe w stosunku do wartości sprzed operacji [ $p < 0,001$ ]. Stwierdziłem obecność istotnych statystycznie różnic w stężeniach IL-6 w kolejnych dniach po operacji pomiędzy chorymi operowanymi metodą klasyczną, a laparoskopową. Stąd IL-6 jest czułym markerem wielkości urazu o natężeniu porównywalnym z urazem będącym wynikiem operacji usunięcia pęcherzyka żółciowego, a badania stężeń IL-6 potwierdzają mniejszą inwazyjność cholecystektomii laparoskopowej. Kontynuacją badań była ocena innego markera stanu zapalnego - PCT jako markera urazu okołoperacyjnego przedstawiona w **publikacji B2**. PCT w warunkach patologicznych jest wartościowym wskaźnikiem stanu zapalnego i urazu. Jednak wyniki stężeń PCT oznaczonych metodą immunoluminometryczną w okresie okołoperacyjnym operacji usunięcia pęcherzyka żółciowego nie wykazały zmian w jej

wartości. W przedstawionych badaniach nie stwierdziłem wzrostu stężenia prokalcytoniny powyżej normy ( $<0,5$  ng/ml). Stężenia PCT po cholecystektomii w stosunku do stężeń przed zabiegiem nie różniły się istotnie statystycznie. Wnioskować można zatem, że PCT nie jest na tyle czułym markerem by wyraźnie zareagować na zabieg operacyjny porównywalny z cholecystektomią. Wynika z tego badania także, że każdy zabieg, który spowoduje wzrost stężenia PCT w surowicy krwi powyżej normy można uznać za bardziej urazowy, niż operacja usunięcia pęcherzyka żółciowego. Przedstawione w pracy tej wyniki mogą wskazywać, że w okresie pooperacyjnym po cholecystektomii i podobnych zabiegach średniej wielkości nie dochodzi do poważniejszych zaburzeń w funkcjonowaniu mechanizmów obronnych jelit i przenikania większych ilości toksyn bakteryjnych do krążenia, a uraz powłok powstały w wyniku operacji nie powoduje istotnego wzrostu hipotetycznego czynnika uwalniającego PCT. Zabiegi o większym natężeniu urazu, większym zaburzeniu ukrwienia jelit, które powodują nawet umiarkowany wzrost PCT w surowicy powinny być wskazaniem do intensywnego przeciwdziałania uszkodzeniu jelit np. przez wczesne żywienie dojelitowe, które pozwala na utrzymanie prawidłowej funkcji śluzówkowej bariery jelitowej.

Neopteryna jest nieswoistym mediatorem odpowiedzi immunologicznej organizmu typu komórkowego. Jest cennym diagnostycznie markerem stanów zapalnych. Pewną przydatność oznaczania stężeń NPT wykazano w monitorowaniu niektórych chorób nowotworowych.

**W pracy B3** podjęliśmy próbę ustalenia faktu, czy wzrost stężenia NPT w surowicy krwi chorych, którzy zostali poddani zabiegowi operacyjnemu z powodu guza trzustki pozostaje w związku z charakterem schorzenia. W praktyce klinicznej często spotykamy się z trudnościami w ocenie charakteru guza trzustki – dość często niemożliwe jest zróżnicowanie pomiędzy przewlekłym zapaleniem trzustki a rakiem gruczołowym tego narządu. Spowodowane jest to głównie faktem, że zarówno przewlekłemu zapaleniu trzustki jak i procesowi rozrostowemu tego narządu towarzyszy włóknienie, w przypadku raka wokół guza, natomiast w przypadku przewlekłego zapalenia wewnątrz narządu. Z tego powodu spotykamy się w tych przypadkach z trudnościami diagnostycznymi w obrazowaniu radiologicznym, a nawet w rozpoznaniu histopatologicznym. Na pięćdziesięciu chorych operowanych z powodu guza trzustki, u trzydziestu osób w badaniach pooperacyjnych stwierdzono obecność komórek raka gruczołowego, u dwudziestu stan zapalny gruczołu z czego w jednym przypadku było to ostre zapalenie trzustki. U chorych z przewlekłym zapaleniem trzustki uzyskano stężenia NPT w granicach 0,95- 11,8 nmol/l, średnia 6,64(+/-3.76) nmol/l, a w przypadku raka trzustki

stężenie NPT wahało się pomiędzy 13,01 – 27,04 nmol/l, średnia 18,41 (+/-5,03)nmol/l. Poza tym w przypadku ostrego zapalenie trzustki stężenie NPT wynosiło 25,03nmol/l. Analizując nasz materiał uważamy, że oznaczanie stężenia NPT jest przydatne w guzach trzustki, w przypadkach w których nie jesteśmy pewni co do ich charakteru – ułatwia to planowanie taktyki i ewentualnej rozległości zabiegu. Stężenia NPT oznaczane w surowicy krwi chorych na nowotwór złośliwy trzustki są znamienne statystycznie wyższe niż u chorych z przewlekłym zapaleniem tego narządu. Podsumowując NPT to obiecujący wskaźnik różnicujący raka trzustki i przewlekłe zapalenie trzustki.

1. **Waniczek D.**, Żurawiński W., Sosada K., Rudzki M., Arendt J.( 2000): Ocena przydatności interleukiny (IL-6) do określenia wielkości urazu operacyjnego podczas cholecystektomii laparoskopowej i klasycznej. Videochirurgia, 1, 15: 37- 41. **MNiSW: 3.000**
2. **Waniczek D**, Rdes J, Żurawiński W, Rudzki M, Sosada K, Arendt J.(2001): Ocena przydatności prokalcytoniny jako wskaźnika wielkości urazu po operacji cholecystektomii klasycznej i laparoskopowej. Lek.Wojsk.; T.77 nr 4, s.236-238. **MNiSW: 3.000**
3. Piecuch J., Rudzki M., Orkisz W., Świętochowska E., Wielkoszyński T., **Waniczek D.**, Arendt J., Sosada K., Żurawiński W., Ładny J.R. (2008): Neopterin-a potential factor for differentiation between pancreatic cancer and chronic pancreatitis. Hepatogastroenterology; 55, 81, 258-261. **IF- 0.680 MNiSW: 20.000**

### **C. Cykl publikacji dotyczących poszerzenia skuteczności metod diagnostycznych w schorzeniach chirurgicznych**

Cykl ten powstawał w związku z moimi zainteresowaniami chirurgicznymi, zwiększającym się doświadczeniem w tej dziedzinie, dotyczy przede wszystkim proktologii i flebologii.

Jedną z metod obrazowych przydatnych w diagnostyce przetok okołodobytniczych jest fistulografia rezonansu magnetycznego (MR fistulografia) do niedawna nie stosowana praktycznie w Polsce. W **publikacji C1** przedstawiłem doświadczenie własne we wprowadzaniu MR- fistulografii do oceny wybranych trudnych diagnostycznie i

terapeutycznie przypadków przetok okołodbytnicznych. W sposób empiryczny doszedłem do sposobu przygotowania podawanego preparatu gadoliny, opracowałem sposób jej podania do przetoki. Po stworzeniu i opisanu własnego oryginalnego sposobu przeprowadzania badania, przeanalizowałem opisy przebiegu przetok u 14 chorych. Uzyskane dzięki MR- fistulografii wyniki porównałem z opisami operacyjnymi traktując je jako referencyjne. Opisy „radiologicznego” przebiegu przetoki okołodbytnicznej pokrywały się u 13 chorych z opisem sporządzonym przez chirurga. Leczenie przetok okołodbytnicznych wymaga bardzo dobrej znajomości anatomii w obrębie odbytu i odbytnicy, umiejętności prawidłowego zobrazowania sobie tej okolicy, w czym pomagają starannie przeprowadzone diagnostyczne badania obrazowe, których podstawą jest badanie MR fistulografia. W naszej Klinice przeprowadzane operacje dobierane są indywidualnie dla konkretnego chorego i w dużej mierze dla wybranego chirurga. Kładziemy duży nacisk, aby przed operacją operatorzy dokładnie wiedzieli, z jaką przetoką mają do czynienia, jak się do operacji przygotować i kto ją ma wykonać. **Praca C2** przedstawia nasze doświadczenia kliniczne w leczeniu przetok okołodbytnicznych, w których istotne znaczenie ma przedoperacyjna diagnostyka. Albowiem wybór metody operacyjnej zależy od rodzaju przetoki, jej położenia w stosunku do zwieraczy i osobistego doświadczenia chirurga, który stale pamiętać musi o podstawowych powikłaniach pooperacyjnych, jakimi są przejściowe lub trwale nietrzymanie stolca oraz nawrót przetoki. W latach 2006-2009 wśród 56 chorych leczonych z powodu przetoki okołodbytnicznej i okołodbytowej najczęściej było przetok przezzwieraczowych, a podstawowym zabiegiem operacyjnym była fistulektomia z marsupializacją, jedynie w części przypadków wykorzystaliśmy do diagnostyki MR fistulografię. Na podstawie doświadczeń własnych w wykonywaniu MR-fistulografii z zastosowaniem roztworu pierwiastka ziem rzadkich - gadolinu i na podstawie dużego doświadczenia klinicznego i wobec nieprecyzyjnych wyników w przypadku dużych rozgałęzionych przetok z ropniem i dużą objętością ziarniny lub wąskim otworem wewnętrznym przetoki zdecydowałem o próbie poszerzenia możliwości diagnostycznych tej metody poprzez dodanie do kontrastu roztworu 3% wody utlenionej (HP) zamiast roztworu soli fizjologicznej. Celem **pracy C3** jest przedstawienie nowej odmiany diagnostycznej przetok okołodbytnicznych - fistulografii rezonansu magnetycznego z wykorzystaniem jako kontrastu HP i gadoliny MRHP-fistulografii (MRIHP fistulography). Nową odmianę metody opisałem na podstawie własnych doświadczeń w obrazowaniu i ocenie nawrotowych szczególnie trudnych diagnostycznie przetok okołodbytnicznych. Ustaliłem empirycznie, w jakim rozcieńczeniu podawany będzie do światła przetoki

środek kontrastowy. Uzyskany w opisanej procedurze roztwór podałem następnie bezpośrednio do tkanki mięśniowej pochodzenia zwierzęcego, w której wypaliłem wcześniej diatermią kanały. Obraz w rezonansie magnetycznym tkanki mięśniowej z wypalonymi kanałami dał wyraźny obraz dwururki z przejaśnieniem ściany kanału i ciemniejszym światłem wytworzonej przetoki. Po zetknięciu się roztworu z tkanką mięśniową zaobserwowałem obfite pienienie i wypływ roztworu kontrastu. Wynik badania dawał prawdopodobną, większą szansę na uwidocznienie ujścia wewnętrznego przetoki i poprawę obrazu przebiegu samej przetoki w rezonansie magnetycznym. Zachęciło to mnie do zastosowania nowej odmiany MR fistulografii w praktyce klinicznej. MRHP fistulografię wykorzystuję do diagnostyki trudnych przetok od 2011 roku. Tuż przed badaniem MR sporządzam *ex tempore* roztwór gadolinu z HP w proporcji 2 krople gadolinu na 1 cm<sup>3</sup> HP. Roztwór, podaję do przetoki przez jej otwór zewnętrzny igłą-motyłkiem bez przewodnicy, od kilku do kilkunastu cm<sup>3</sup>. Następnie otwór zewnętrzny zamykam opatrunkiem plastrowym z gazikiem. Badania wykonywane są przy pomocy aparatu o indukcji pola magnetycznego 1,5 Tesli firmy GE SIGNA LX HS, z użyciem dedykowanej ośmiokanałowej cewki powierzchniowej umieszczonej na wysokości stawów biodrowych, używając sekwencji echa spinowego (SE – spin echo, TSE – turbo spin echo) uzyskując obrazy T1 i T2 zależne oraz T1 i T2 zależne z saturacją tkanki tłuszczowej w płaszczyznach poprzecznych (Ax), czołowych (Cor) i strzałkowych (Sag). Grubość warstw badania wynosiła 4mm, odstęp między warstwami - 1mm; pole badania – (FOV) 30 i 20, wartości NEX - 4 lub 3. Czasy echa i repetycji dla poszczególnych sekwencji kształtowały się następująco: T2 (TE/TR: 85/3000-4100), T1 (TE/TR: 16/525-700). Propozycja MR fistulografii z podaniem do przetoki roztworu paramagnetycznego środka kontrastowego (bezpośrednia fistulografia MR – *direct MR fistulography*) została w końcu poszerzona o połączenie jej z klasycznym badaniem MR z podaniem środka kontrastowego dożylnie (pośrednia fistulografia MR – *indirect MR fistulography*). W obu metodach wykorzystywane są cewki powierzchniowe, które przy indukcyjności pola obecnych skanerów MR (najczęściej 1,5T) umożliwiają uzyskanie obrazów o niemal porównywalnej jakości co cewki endorektalnej. Badania z zastosowaniem cewek endorektalnych charakteryzują się najwyższą rozdzielczością przestrzenną. Ograniczony technicznie zakres badania, zmniejsza jednak znacznie użyteczność tej metody przy diagnostyce przetok złożonych i wysoko położonych. Badanie jest również czasochłonne i źle tolerowane przez chorych. W mojej pracy zanalizowaliśmy wyniki 12 szczególnie trudnych diagnostycznie nawrotowych przetok, określono przebieg przetok w badaniu fizykalnym, USG transrektalnym, MRHP

fistulografii w stosunku do operacji jako wyniku referencyjnego. Moja metoda MR pozwala na bardzo dobre uwidocznienie kanałów przetok i umiejscowienie zbiorników ropnych oraz umożliwia precyzyjną ocenę otaczających tkanek miękkich w stopniu znacznie dokładniejszym niż np. EAUS. Wysoka skuteczność diagnostyczna MR w przetokach nawrotowych pozwala na wyraźną poprawę skuteczności leczenia tych trudnych postaci przetok zmniejszając odsetek nawrotów pooperacyjnych. Badanie MR nie wymaga wcześniejszego przygotowania i jest dobrze tolerowane. Zaletami są: wysoka rozdzielczość przestrzenna obrazu, możliwość obrazowania wielopłaszczyznowego oraz dowolnego modyfikowania zakresu badania w trakcie. Dzięki doskonałemu zróżnicowaniu tkankowemu dobrze widoczne są wszystkie mięśnie odbytu i miednicy, a zwłaszcza mięsień dźwigacz odbytu oraz okoliczna tkanka tłuszczowa stanowiąca dla nich tło. Już samo wypełnienie światła przetoki solą fizjologiczną i gadolina poprawia jej wizualizację w sekwencjach uwydlatniających płyn (obrazy T2 zależne lub inwersyjne). Wydaje się, że podanie dodatkowo HP podczas bezpośredniej fistulografii MR pozwala na lepszą penetrację roztworu do otworu wewnętrznego i powoduje poprawę wizualizacji samej przetoki zwiększając dodatkowo czułość metody MR. Dożylnie podanie środka kontrastowego w badaniu MR pozwala natomiast na zobrazowanie zmienionych zapalnie ścian kanałów przetok, które wzmacniając się intensywnie - są jeszcze lepiej widoczne. Niekiedy dość duże trudności interpretacyjne w tej metodzie sprawiają okoliczne spłoty naczyniowe, które wzmacniając się imitują patologiczne kanały przetok, co zmniejsza może swoistość badania metodą pośredniej fistulografii MR. Uważam, że jednoczesne wykonywanie badań metodą pośredniej i bezpośredniej fistulografii MR z zastosowaniem środka kontrastowego HP może przynieść większe korzyści diagnostyczne, niż zlecenie każdego z tych badań osobno. Nie wykluczam również możliwości wykorzystania MRHP fistulografii do diagnostyki niektórych ran postrzałowych. Brak doświadczenia w tej dziedzinie nie pozwala mi jednak na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. O swoich doświadczeniach w MR fistulografii i leczeniu przetok latach 2006-2012 roku w naszym ośrodku napisaliśmy w **pracy C4**. W okresie od 2006 do 2012 roku wykonaliśmy 134 operacje przetok odbytu u 102 mężczyzn (76,1%) i 32 kobiet (23,9%) w wieku 19-89 lat (śr. 48,56). Początkowo do diagnostyki wykorzystywaliśmy bezpośrednią fistulografię MR, gdzie środkiem kontrastowym była mieszanina preparatu paramagnetycznego w soli fizjologicznej. Od 2011 roku wprowadzono MRHP fistulografię. Sama procedura badania prawie wcale się nie zmieniła. Radiolodzy jednak podkreślają łatwiejszą ocenę przebiegu kanału przetoki ze względu na występujący 'efekt dwururki'. W 42 (31,3%) przypadkach

operowano przetokę nawrotową, w pozostałych 92 (68,7%) pierwotną. 109 (81,3%) osób leczono metodą fistulektomii z częściowym zamknięciem rany lub marsupializacją oraz w razie konieczności z częściowym przecięciem mięśnia zwieracza zewnętrznego. Fistulotomię wykonano u 4 pacjentów (3,0%), fistulektomii z przesunięciem płata śluzówkowo-mięśniowego odbytnicy (ang. *advancement flap repair*) poddano 16 (12,0%) chorych, u 5 chorych (3,7%) wykonano fistulektomię z przecięciem i zeszcieniem-rekonstrukcją mięśnia zwieracza zewnętrznego. Uważam, że należy metodę fistulografii MRHP upowszechniać i w miarę możliwości udoskonalać oraz znaleźć dla niej nowe zastosowania.

Celem **pracy C5** jest opracowanie nowatorskiej metody cyfrowej dokumentacji stanu miejscowego owrzodzeń. Umożliwia ona obiektywną łatwą i taną ocenę postępu gojenia poprzez śledzenie zmian pola powierzchni i wyglądu rany opartą na dokładnym odwzorowaniu i pomiarze pola jej powierzchni. Pozwala ona także na wygodną archiwizację materiału, co umożliwia wykorzystanie jej do celów dydaktycznych i badawczych. Do metody tej zaproponowałem dodatkowo stosowaną przez nas technikę fotografowania rany własnego pomysłu. W pracy dokonałem kontrolnej analizy dokładności odwzorowania owrzodzeń goleni oraz dokładności pomiaru pola ich powierzchni. Kontrola programem Pole wykazała wysoką precyzję pomiaru wielkości owrzodzenia tą metodą. Opracowana przez nas metoda cyfrowej dokumentacji stanu miejscowego owrzodzeń żylnych podudzi umożliwia obiektywną ocenę zmian pola powierzchni i wyglądu rany. Jest wygodna i bezpieczna, gdyż nie wymaga bezpośredniego kontaktu z raną. Pozwala na łatwą i wygodną archiwizację materiału cyfrowego, który może być wykorzystywany do celów dydaktycznych i badawczych, a także może być ważnym czynnikiem motywacyjnym dla sceptycznie nastawionych, niechętnych do współpracy chorych. Metodę tę wykorzystałem w ocenie metody leczenia owrzodzeń pochodzenia żylnego własnego pomysłu (patrz punkt D).

1. **Waniczek D.**, Adamczyk T., Kozińska-Marek E., Arendt J., Kluczevska E. (2011): Usefulness assessment of preoperative MRI fistulography in patients with perianal fistulas. *Pol Przegl. Radiol*; 76(4):40-44. **MNiSW: 2.000**
2. **Waniczek D.**, Zapotoczny S., Rudzki M., Kamiński T., Buda K., Adamczyk T., Arendt J. (2012): Doświadczenie własne w leczeniu przetok okołoodbytniczych w latach 2006- 2009. *JEcolHealth*, 16, 1: 35-39. **MNiSW: 4.000**
3. **Waniczek D.**, Adamczyk T., Kozińska-Marek E., Arendt J., Kluczevska E.(2015):

Direct MRI fistulography with hydrogen peroxide in patients with recurrent perianal fistulas: a new proposal of extended diagnostics. Med.Sci.Monitor, Vol.21, p.439-445. **IF-1.405. MNiSW: 15.000**

4. Copija A, Janiszewska J, Maruszczak P, Rażnikiewicz A, **Waniczek D**, Arendt J. (2013): Leczenie przetok odbytu w latach 2006-2012 w Katedrze i Oddziale Klinicznym Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej ŚUM w Bytomiu Nowa Med. R.20, nr 3, s.95-100 **MNiSW: 4.000**

5. **Waniczek D**, Buda K, Rudzki M, Jurkiewicz A. (2012): Własna metoda cyfrowej dokumentacji stanu miejscowego owrzodzeń żylnych podudzi. J.Ecol. Health Vol.16, nr 2, s.84-92 **MNiSW: 4.000**.

#### **D. Cykl publikacji dotyczących poprawy skuteczności leczenia wybranych schorzeń z dziedziny chirurgii**

Przedstawiony cykl prac dotyczy moich zainteresowań i osiągnięć w udoskonalaniu metod leczniczych w chirurgii ogólnej. Przedstawię doświadczenia we wprowadzaniu techniki szycia przewodu żółciowego po usunięciu złożeń z dróg żółciowych oraz oryginalne metody leczenia nieresekcyjnych raków trzustki, wrzodu samotnego odbytnicy oraz metodę biologicznej komory.

**Publikacja D1** dotyczyła zastosowania drenu T po otwarciu głównych dróg żółciowych (GDŻ). Pozostawiony dren T po operacji był przez wiele lat kanonem poczynań chirurgicznych. Wady takiego działania znaleźliśmy z własnego doświadczenia. Stąd w oparciu nie tylko o nasze doświadczenie zaproponowaliśmy technikę i określiliśmy wskazania do jej zastosowania stosowane przez nas do dnia dzisiejszego. Uważamy, że jeśli tylko jest to możliwe, to pierwotne zszycie GDŻ jest rozwiązaniem lepszym od zastosowania drenu T. Celem pracy było ustalenie kryteriów włączających i wyłączających do stosowania pierwotnego zamknięcia GDŻ oraz porównanie grup chorych, w których po wykonaniu rewizji dróg żółciowych pierwotnie zamykano GDŻ bez pozostawienia w jego świetle drenu T, z grupą, w której dren T pozostawiano. Uważamy, że w specjalistycznych ośrodkach chirurgicznych, gdzie przestrzega się ustalonych kryteriów, pierwotne zamknięcie GDŻ po rewizji dróg żółciowych jest metodą prostą i bezpieczną, obciążoną małą liczbą powikłań. Przy tym koszt pobytu w szpitalu



pacjentów, u których wykonano pierwotne zszycie GDŻ, jest o połowę niższy od kosztu hospitalizacji chorych po rewizji z pozostawieniem drenu T w świetle GDŻ.

Rak części zewnątrzwydzielniczej trzustki należy do najgorzej rokujących wśród nowotworów złośliwych przewodu pokarmowego, jest jedną z głównych przyczyn zgonów. W zaawansowanym, nieresekcyjnym raku trzustki po operacjach paliatywnych silne dolegliwości bólowe w nadbrzuszu stają się dominującym objawem postępującego nowotworu. Wydaje się, że brachyterapia HDR-Ir192 poprzez działanie hamujące rozwój nowotworu sprzyja zmniejszeniu dolegliwości bólowych u chorych w okresie terminalnym. Celem **pracy D2** jest przedstawienie własnej, oryginalnej techniki implantacji drenów do brachyterapii okołoperacyjnej HDR-Ir192 po operacjach paliatywnych u chorych z miejscowo zaawansowanym, nieresekcyjnym rakiem trzustki oraz ocena wpływu brachyterapii HDR-Ir192 na poziom odczuwania bólu w raku trzustki u chorych terminalnych. Proponowana przez nas modyfikacja implantacji drenów do brachyterapii z wykorzystaniem kaniuli własnej konstrukcji ułatwia przeprowadzenie zabiegu wprowadzenia drenu do guza skracając czas jego trwania i zmniejsza niebezpieczeństwo powikłań. Okołoperacyjna brachyterapia HDR-Ir 192 znajduje zastosowanie jako pomocniczy środek w uśmierzaniu bólu nowotworowego u chorych z zaawansowanym rakiem trzustki.

Samotny wrzód odbytnicy (SRUS) jest przewlekłym, wielopostaciowym, nienowotworowym schorzeniem odbytnicy, którego ostateczne rozpoznanie ustala się na podstawie kryteriów histopatologicznych. Często schorzenie to współistnieje z jawnym lub utajonym wypadaniem odbytnicy. Najwięcej trudności sprawia leczenie chorych z SRUS bez obecności wypadania odbytnicy. W **publikacji D3** przedstawiłem jako przypadek kazuistyczny metodę wykorzystania koagulacji w osłonie argonowej (APC) do leczenia SRUS. Przy pomocy tej metody udało się wyleczyć 62 letnią chorą, wcześniej przez 16 lat leczoną nieskutecznie zachowawczo i chirurgicznie. Chorej zaproponowano miejscowe leczenie wrzodu przy pomocy APC. W latach 2004-2006 wykonano 15 sesji APC zazwyczaj w odstępach jednomiesięcznych uzyskując stałe pomniejszanie się dużego owrzodzenia i w konsekwencji pełne wyleczenie chorej z SRUS po dwudziestu miesiącach. Czteroletnia obserwacja nie wykazała nawrotu schorzenia. Terapia miejscowa za pomocą argonowej koagulacji plazmowej wydaje się być jedną z możliwych alternatyw leczniczych SRUS bez obecności wypadania odbytnicy i warta jest zastosowania.

Owrzodzenia żyłne podudzi to rany powstałe w wyniku utrzymującego się nadciśnienia żylnego będącego skutkiem uszkodzenia aparatu zastawkowego żył powierzchownych

jak i głębokich, W wyniku tego proces naprawczy rany ulega poważnym zaburzeniom. Dominuje przewlekły proces zapalny połączony z niedoborem czynników wzrostowych. Wydaje się, że ich prosta suplementacja może pobudzić mitogenezę komórek naprawczych, stymulować angiogenezę, oraz aktywować makrofagi odpowiedzialne za oczyszczenie rany. Odpowiednie nałożenie żelu bogatopłytkowego (PRP) na rozległe rany podudzi nastręcza pewne trudności techniczne. Celem **pracy D4** jest przedstawienie oryginalnej metody leczenia owrzodzeń żylnych podudzi przez stworzenie swoistej komory biologicznej do której aplikowany jest wcześniej przygotowany PRP zawierający wysokie stężenia czynników wzrostu. Wykorzystano do tego celu pastę stomijną oraz obojętną dla skóry folię samoprzylepną. Po uprzednim przygotowaniu powierzchni rany, brzegi zostały pokryte pastą na którą naniesiono folię z zachowaniem szerszego marginesu zdrowej skóry. W warunkach sali operacyjnej do tak przygotowanej komory wprowadzano PRP w formie iniekcji aplikowanej od dna owrzodzenia. Zastosowana metoda pozwala na utrzymanie opatrunki z PRP w pełnej jałowości oraz wilgotności przez okres 3-5 dni. Leczenie u wszystkich chorych było uzupełnione kompresjoterapią, a dalsze etapy gojenia były prowadzone według jednorodnego schematu. Metodę tę zastosowano u 12 chorych z owrzodzeniami żylnymi podudzi leczonymi wcześniej nieskutecznie w warunkach ambulatoryjnych przez 12-16 miesięcy. Do oceny zmian wykorzystano własną metodę cyfrowej dokumentacji (**C5**). W badaniu uzyskano wyraźną regresję zmian a proces epitelializacji był na tyle szybki iż pełne wygojenie u chorych o różnej rozległości ubytków skóry uzyskano w okresie od 4-10 tygodni. Dzięki komorze uzyskano odpowiednie środowisko, a optymalnie długi czas działania PRP na powierzchni rany pozwala na wykorzystanie wszelkich korzystnych własności czynników wzrostu zawartych w PRP i zniemiennie skrócić czas gojenia owrzodzeń żylnych goleni. Żelowa konsystencja PRP, ograniczenie przez pastę i folie, pozwala na szczelne pokrycie owrzodzenia i stworzenie swoistej macierzy zapoczątkowującej i wzmacniającej kaskadę reakcji naprawczych w łożu rany. Umożliwia to poprawę warunków i przyspieszenie procesu gojenia. Wydaje się że tak podane PRP stanowi dodatkową opcję w leczeniu miejscowym opornych na leczenie przewlekłych owrzodzeń, a podana procedura ułatwi jej zastosowanie.

1. Piecuch J., Arendt J., Gradzik R., Sosada K., **Waniczek D.** (2004): Pierwotne zszycie przewodu żółciowego po rewizji dróg żółciowych w przebiegu kamicy żółciowej. *Wiad. Lek.*, 5-6, 241. **MNiSW: 5.000**
2. **Waniczek D.**, Piecuch J., Rudzki M., Mikusek W., Arendt J., Białas B. (2010):

Perioperative high dose rate (HDR) brachytherapy in unresectable locally advanced pancreatic tumors. J.Contemp.Brachytherapy 2011; Vol.3, No.2, p.84-90. MNiSW: 9.000.

3. **Waniczek D**, Rdes J, Rudzki M, Piecuch J, Rubicz N, Arendt J. (2014): Effective treatment of solitary rectal ulcer syndrome using argon plasma coagulation. Przegl. Gastroenterol.; T.9, nr 4, s.249-253. MNiSW: 15.000

4. **Waniczek D**, Mikusek W, Kamiński T, Wesecki M, Lorenc Z, Cieślik-Bielecka A. (2015): Metoda „biologicznej komory” - zastosowanie autologicznego osocza bogatopłytkowego w leczeniu trudno gojących się owrzodzeń podudzi i pochodzenia żylnego. Pol.Przegl.Chir. T.87, nr 6, s.513-524. MNiSW: 14.000

*Domini Waniczek*