Szanowni Państwo,

Do przygotowania macie plik „pracy magisterskiej”.

**Do waszych zadań należy:**

* **wstawienie strony tytułowej (wzór do pobrania ze strony internetowej uczelni)**
	+ Tytuł – **Udział komórek raka krążących we krwi w rozsiewie raka jajnika**
* **ustawienie tekstu według wymogów redakcyjnych:**
	+ czcionka – Times New Roman,
	+ rozmiar czcionki – 12,
	+ odstęp między wierszami – 1,5,
	+ usunięcie wiszących liter
	+ wcięcie pierwszego wiersza każdego akapitu na standardowe
	+ Ustaw odległość między akapitami na 12 pkt
	+ Wyjustuj tekst obustronnie
	+ szerokość marginesów – 2 cm (margines lewy można zwiększyć do 3,5 cm, aby ułatwić oprawę pracy),
	+ numeracja stron – zachowana kolejność, bez numeracji stron tytułowej;
	+ *układ piśmiennictwa powinien być zgodny z kolejnością cytowania; w wypadku artykułu mającego nie więcej niż trzech współautorów należy podać wszystkie nazwiska; w przypadku czterech lub większej liczby współautorów podaje się tylko pierwszych trzech, dopisując po nazwiskach skrót „et al.”,*
	+ tabele, wykresy i zdjęcia powinny mieć numerację w kolejności występowania pierwszego odwołania w tekście oraz krótki tytuł; jeżeli dane w tabeli, wykres lub zdjęcie zostało zaczerpnięte z innego źródła, należy podać ich pochodzenie.
* **ustawienie nagłówków:**
	+ nagłówek 1 – spisy, tytuły rozdziałów oznaczone numerami;
	+ nagłówek 2 – podrozdziały oznaczone 1.1 ect;
* **utworzenie automatycznego spisu treści**
* **podpisanie rycin –** proszę pamiętać, że podpisujemy POD ryciną; czcionka Times New Roman 10; (treść podpisu: To jest rycina [nr])
* **edycja rycin –** wyrównanie do środka
* **utworzenie automatycznego spisu rycin**
* **podpisanie tabel –** proszę pamiętać, że podpisujemy NAD tabelą; czcionka Times New Roman 10 (treść podpisu: To jest tabela [nr])
* **edycja tabel –** wyrównanie do środka
* **utworzenie automatycznego spisu tabel**
* **w tekście uzupełnić punktowanie i numerowanie w oznaczonych miejscach**

**W tym miejscu należy wstawić stronę tytułowąW tym miejscu należy utworzyć automatyczny spis treści opierający się o nagłówki w poniższym tekście**

Załącznik nr 1

**O Ś W I A D C Z E N I E**

**………………**

Imię i Nazwisko

**………………**

nr albumu

Oświadczam, że praca pt.: **Udział komórek raka krążących we krwi w rozsiewie raka jajnika**,

a. została przygotowana przeze mnie samodzielnie,

b. nie narusza praw autorskich w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 roku o prawie autorskim i prawach pokrewnych (t.j. Dz. U. 2021.1062) oraz dóbr osobistych chronionych prawem,

c. nie zawiera danych i informacji, które uzyskałem w sposób niedozwolony,

d. nie była podstawą nadania dyplomu doktorskiego lub dyplomu uczelni wyższej lub tytułu zawodowego ani mnie ani innej osobie.

Ponadto oświadczam, że treść pracy, zawarta na przekazywanym nośniku elektronicznym, jest identyczna z jej wersją drukowaną.

**Poznań**, dn. .................................. .........................................................

podpis

# Spis treści

**W tym miejscu należy utworzyć automatyczny spis treści opierający się o nagłówki w poniższym tekście**

Spis skrótów, rycin i tabel

Spis skrótów

| **Symbol** | **Znaczenie w języku angielskim** | **Znaczenie w języku polskim** |
| --- | --- | --- |
| CA125 | carcinoma antigen 125 | antygen CA125 |
| CDH1 | E-cadherin | E-kadheryna |
| CK-19 | cytokeratin-19 | cytokeratyna 19 |
| CR | concentration ratio | stosunek natężenia ekspresji genu badanego względem ekspresji genu referencyjnego |
| CTC | circulating tumour cells | komórki nowotworowe krążące we krwi |
| DTC | disseminated tumor cells | rozsiane komórki nowotworowe |
| EMT | epithelial-mesenchymal transition | przejście epitelialno-mezynchemalne |
| FDA | Food and Drug Administration | Agencja Żywności i Leków |
| HBOC | hereditary breast and ovarian cancer syndrome | zespół dziedzicznego raka piersi i jajnika |
| hCG | human chorionic gonadotropin | ludzka gonadotropina kosmówkowa |
| hCGβ | human chorionic gonadotropin beta subunit | podjednostka beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej |
| HE4 | human epididymis protein 4 | podfrakcja czwarta ludzkiego białka komórek nabłonkowych najądrza |
| HGSC | high-grade serous carcinoma | rak surowiczy o wysokim stopniu złośliwości |
| HPRT | hypoxanthine phosphoribosyltransferase | fosforybozylotransferaza hipoksantynowa |
| LGSC | low-grade serous carcinoma | rak surowiczy o niskim stopniu złośliwości |
| LOXL2 | lysyl oxidase-like 2 | homolog 2 oksydazy lizylowej |
| MAT | mesenchymal-amoeboid transition | przejście mezynchemalno-ameboidalne |
| MMP2 | matrix metallopeptidase 2 | metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej typu 2 |
| MMP9 | matrix metallopeptidase 9 | metaloproteinaza 9 |
| SNAI1 | snail family transcriptional repressor 1 | czynnik transkrypcyjny SNAI 1 |
| SNAI2 | snail family transcriptional repressor 2 | czynnik transkrypcyjny SNAI 2 |
| VIM | Vimentin | wimentyna |
|  |  |  |

Spis rycin

**W tym miejscu należy utworzyć spis rycin**

Spis tabel

**W tym miejscu należy utworzyć spis tabel**

1. Wprowadzenie

1.1. Komórki nowotworowe krążące we krwi

Komórki nowotworowe krążące we krwi (ang. *circulating tumor cells*; CTC) po raz pierwszy zostały zaobserwowane i opisane przez Thomasa Ashwortha w 1869 roku podczas badań mikroskopowych. Przebadanie próbki krwi pacjenta z obecnym przerzutem nowotworowym pozwoliło Ashworthowi na stwierdzenie, że obecne w krwi komórki podobne do tych w masie guza, musiały przedostać się drogą układu krwionośnego do oddalonej żyły, z której została pobrana próba (1,2).

Rozwój technologiczny przyczynił się do przeprowadzenia badań, które potwierdzały hipotezę Ashwortha i pozwoliły na bardziej dokładne zdefiniowanie charakteru komórek nowotworowych krążących we krwi.

Współcześnie CTC są określone jako komórki, które odrywają się od masy litej guza już we wczesnych stadiach nowotworu i przedostają się do krwioobiegu, a następnie do odległych narządów. CTC krążące we krwi cechuje heterogeniczność. Szczególną uwagę poświęca się tzw. komórkom prekursorowym, które charakteryzują się zdolnością do metastazy, a co za tym idzie, przyczyniają się do progresji choroby nowotworowej. Należy jednak zauważyć, że nawet guzy bez klinicznie zaznaczonej metastazy również mają zdolność uwalniania do krwiobiegu komórek nowotworowych (2,3).

Zdolność CTC do przetrwania w specyficznych warunkach układu krwionośnego wynika w dużej mierze z faktu, że komórki te nie muszą oddziaływać z innymi komórkami czy z macierzą zewnątrzkomórkową. Dzieje się tak, ponieważ komórki CTC posiadają zdolność ucieczki od anoikis – jednego z typów programowanej śmierci komórki, w którym podlega ona śmierci w wyniku odłączenia się od macierzy zewnątrzkomórkowej (4,5).

W badaniach na modelach zwierzęcych udowodniono, że sposób rozsiewu nowotworu przyczynia się do wystąpienia heterogeniczności komórek nowotworowych. Uprzednio sądzono, iż metastaza nowotworu odbywa się albo poprzez zasiedlenie naczyń limfatycznych i wystąpienie ognisk przerzutowych w regionalnych węzłach chłonnych, lub do odległych tkanek poprzez układ krwionośny. Wyniki badań przeprowadzonych na mysim modelu raka sutka, wskazują natomiast, że zarówno droga przez układ limfatyczny, jak i ta przez układ krwionośny mogą koegzystować (6). W badaniu tym odkryto, iż naciekanie nowotworu na sąsiadujące węzły chłonne, może przyczynić się do przedostawania się komórek nowotworowych do oplatających węzeł naczyń krwionośnych. To w konsekwencji może przyczynić się do metastazy nowotworu w odległych tkankach (6).

Przerost rozsianych komórek nowotworowych (ang. *disseminated tumor cells* – DTC) wynikający ze zmiennych warunków mikrośrodowiska panujących w danej niszy nowotworu, może się przyczynić do dostosowywania się tych komórek do dalszej kolonizacji, a co za tym idzie, wystąpienia zmian w tropizmie CTC (6).

Proces przemieszczania się CTC nie jest procesem jednokierunkowym, a komórki te mają nie tylko zdolność zasiedlania innych narządów. Dowiedziono, że w procesie rozsiewania się nowotworu CTC mogą, powrócić do pierwotnej niszy, z której się wywodzą (7). U pacjentów z rdzeniakiem zarodkowym wykryto korelację komórek nowotworowych krążących w krwi z wystąpieniem przerzutów w oponach mózgowo-rdzeniowych, potwierdzając tym samym wcześniej sugerowaną przy badaniach nad rakiem jajnika teorię, jakoby komórki CTC przyczyniały się do lokalnej metastazy. Zatem heterogeniczność nowotworów i komórek CTC może wynikać również z dwukierunkowej wymiany między masami guza usytuowanymi w oddzielnych niszach (6).

Heterogeniczność komórek nowotworowych krążących we krwi można wykazać dzięki analizie ich markerów powierzchniowych. Badania wskazują na obecność we krwi zarówno komórek o charakterze epitelialnym, jak i mezenchymalnym. Sugeruje to, że CTC posiadają zdolność do przeprowadzenia procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego (ang. *epithelial-mesenchymal transition* – EMT). W wyniku tego procesu komórki nabłonkowe nabywają fenotyp mezenchymalny, pozwalający im do nabywania zdolności do ruchu, zdolności penetracji błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej – ECM. Często dzięki temu nowemu fenotypowi CTC stają się oporne na radio- i chemioterapię (8).

Cechą charakterystyczną CTC jest zdolność do tworzenia klastrów we krwi obwodowej. Ich powstawanie może mieć miejsce zarówno w naczyniach krwionośnych, jak i uprzednio w guzie pierwotnym. We krwi obwodowej klastry występują stosunkowo rzadko, ponieważ ich rozmiar uniemożliwia im swobodne przedostawanie się z małych naczyń włosowatych; zostają one zatrzymane w wąskich naczyniach krwionośnych. Zdecydowanie częściej można obserwować we krwi pojedyncze komórki nowotworowe. Niemniej jednak, w przypadku guzów nabłonkowych odnotowuje się częste tworzenie się klastrów, pozwalające na zbiorowe przemieszczanie się komórek. Tworzeniu się klastrów sprzyja osiągnięcie częściowego fenotypu EMT (6). Fenotyp ten, inaczej zwany hybrydowym fenotypem epitelialno-mezynchemalnym w przypadku metastazy nadaje komórkom migrującym specyficzne cechy. Przede wszystkim komórki nie tracą całkowicie połączeń komórkowych i podlegają migracji zbiorczej – jako klastry. Charakterystyczne dla fenotypu częściowego jest też wzmocnienie charakteru macierzystości komórek, przyczyniającego się do zwiększonej zdolności do inicjowania przerzutów. Dodatkowo fenotyp ten ułatwia komórkom krążącym we krwi ich przeżycie następnie procesu metastazy (9).

Rycina 1 (Ryc.1) przedstawia drogi metastazy, oraz to jak wpływają one na heterogeniczny charakter CTC. Komórki mogą przerzutować lokalnie lub do odległych nisz poprzez krwioobieg oraz układ limfatyczny z węzłami chłonnymi. Mechanizmy molekularne umożliwiające tworzenie przerzutów to przejście EMT oraz przejście mezynchemalno-ameboidalne (ang. *mesenchymal-amoeboid transition* – MAT) (6).

MAT to proces, w wyniku którego dochodzi do przekształcenia sposobu migracji oraz zmiany fenotypu komórek z mezynchemalnego na ameboidalny. Taka zmiana plastyczności komórek jest zazwyczaj odpowiedzią na zmiany mikrośrodowiskowe w obrębie nowotworu, związane między innymi z działaniem inhibitorów metaloproteaz, hamujących rozkład macierzy zewnątrzkomórkowej. MAT jest zatem procesem, który jest szybką odpowiedzią na zmienne warunki panujące w niszy nowotworowej. Kolonizacja nowych miejsc może wiązać się z pojawieniem się rozsianych komórek nowotworowych DTC ( ang. *disseminated tumor cells*) (6,10).



1.2. Rak jajnika

Nowotwór jajnika należy do jednego z najczęstszych typów nowotworów dotykających kobiety. Dane Global Cancer Observatory wykazują, że współczynnik zapadalności na raka jajnika w 2020 roku wynosił 6,6 na 100 tysięcy przypadków, przy wskaźniku umieralności wynosił 4,2 na 100 tysięcy przypadków (Rycina 2) (11).

Charakterystyka raka jajnika wskazuje na obecność trzech typów nowotworu, wśród których możemy wyróżnić nowotwory zarodkowe, sznurów płciowych i podścieliska oraz najczęściej występujący – typ nabłonkowy. Około 95% diagnozowanych pacjentek choruje na nowotwór jajnika typu nabłonkowego, o różnych podtypach histologicznych, wśród których do najczęstszych zaliczyć można:

**Zrobić punktory** podtyp surowiczy; podtyp endometrioidalny; podtyp śluzowy; podtyp jasnokomórkowy (12).

Ze względu na stopień złośliwości podtyp surowiczy można rozdzielić na raki surowicze o wysokim stopniu złośliwości (ang. *high-grade serous carcinoma* – HGSC) oraz raki surowicze o niskim stopniu złośliwości (ang. *low-grade serous carcinoma* – LGSC). HGSC stanowią zdecydowanie przeważający procent przypadków nabłonkowego raka jajnika. Z uwagi na to, że HGSC i LGSC różnią się od siebie na poziomie molekularnym, jak również obrazem kliniczny, cechują je różne rokowania. Surowiczy rak jajnika o wysokim stopniu złośliwości charakteryzuje się zdecydowanie gorszymi rokowaniami, krótszym czasem przeżycia, w porównaniu do surowiczego raka jajnika o niskim stopniu złośliwości. Młodsze pacjentki częściej diagnozowane są z HGSC. Podejrzewa się, że obecność nowotworu jajnika HGSC może mieć podłoże w komórkach epitelialnych jajowodu, z kolei LGSC wywodzi się typowo z komórek jajnika (12,13).

W ostatnich latach powstała nowa teoria dotycząca pochodzenia i patogenezy raka jajnika. Uwzględniając nie tylko dane morfologiczne i immunohistochemiczne, ale także wyniki badań molekularnych wyodrębniono dwa typy raka jajnika. Zgodnie z tym paradygmatem rak surowiczy niskiego stopnia złośliwości (G1, G2), rak endometrioidalny (G1), rak jasnokomórkowy i rak śluzowy zostały zaklasyfikowane jako guzy typu I, podczas gdy rak surowiczy wysokiego stopnia złośliwości (G3), rak endometrioidalny (G3), złośliwe mieszane nowotwory mezodermy oraz niezróżnicowane nowotwory są klasyfikowane jako nowotwory typu II (14–16).

Guzy typu I stanowią 25% wszystkich zdiagnozowanych przypadków i obejmują epitelialne nowotwory jajnika, które rosną powoli i charakteryzują się poprzedzającymi guzami granicznymi. Nowotwory te są raczej stabilne genetycznie i wykazują specyficzne mutacje w genach kodujących KRAS, BRAF, PTEN i β-kateninę. Pozostałe 75% przypadków stanowią guzy typu II. Charakterystyczne dla nich są szybki wzrost i duża inwazyjność. Z tego też powodu stanowią duże wyzwanie diagnostyczne. Guzy typu II wykazują znaczącą niestabilność genetyczną. Objawia się ona poprzez wystąpienie mutacji *TP53* w ponad 95% przypadków. Około 10-20% przypadków posiada również mutację w *BRCA1* i *BRCA2*. Zaobserwowana jest też hipermetylacja promotora *BRCA1* w 10–40% przypadków guzów typu II (14–16).

Istnieje wiele czynników, które mogą przyczynić się do rozwoju nowotworu jajnika. Najczęściej wskazywanymi czynnikami ryzyka są oczywiście przypadki wystąpienia chorób genetycznych i nowotworów w rodzinie pacjentki. Mutacje w genach supresorowych *BRCA1* i *BRCA2* odpowiadają za zwiększone ryzyko wystąpienia raka jajnika, co wynika z zespołu dziedzicznego raka piersi i jajnika (ang. *hereditary breast and ovarian cancer syndrome* – HBOC). Kolejną chorobą dziedziczną, o charakterze autosomalnym dominującym, predysponującą do zachorowania na raka jajnika jest zespół Lyncha i związane z nim mutacje w genach *MLH1* i *MSH2* (12,17).

 Dowiedziono, że także endometrioza zwiększa ryzyko zachorowania na różne typy nowotworów jajnika, w tym nabłonkowy, jasnokomórkowy, endometrioidalny oraz surowiczy o niskim stopniu złośliwości. Endometrioza, definiowana jako obecność tkanek endometriopodobnych poza macicą, jest złożonym zespołem chorobowym, który cechuje się występowaniem przewlekłego procesu zapalnego zależnego od estrogenów. Taki proces zapalny dotyczy przede wszystkim miednicy, jednak często obejmuje również jajniki (18,19). Zatem odpowiednie leczenie endometriozy może przyczynić się zmniejszenia ryzyka zachorowania na raka jajnika, brakuje jednak potwierdzenia, że usunięcie zmian endometrialnych całkowicie zmniejszy szanse rozwoju nowotworu (12,17).

Jak dowodzą badania, również ilość cykli owulacyjnych w życiu kobiety jest czynnikiem ryzyka. Dokładny wpływ owulacji na zapadalność na raka jajnika nie jest znany, natomiast sugeruje się, że prozapalna reakcja dystalna jajowodów podczas owulacji, może przyczyniać się do uzłośliwienia komórek jajnika. Aktualny stan wiedzy wskazuje na pozytywny wpływ przerywania owulacji na zmniejszenie ryzyka wystąpienia raka jajnika. Do przerwania owulacji może dojść z przyczyn naturalnych takich jak wczesne wystąpienie miesiączki, zajście w ciążę, późniejsze karmienie piersią czy też wcześniejsze wystąpienie menopauzy. Dodatkowo czynnikiem przerywającym owulację mogą być środku farmakologiczne. Zależnie od czasu stosowania doustnych środków antykoncepcyjnych ryzyko zachorowania obniża się nawet o 50% (w przypadku przyjmowania środków przez okres 10 lat), również w grupie osób obciążonych mutacjami *BRCA1* i *BRCA2* (12,17,20).

Dowiedziono, iż stosowanie aspiryny, będącej lekiem przeciwzapalnym, wpływa na ryzyko zachorowania na raka jajnika. Metaanalizy potwierdzają że regularne stosowanie małych dawek aspiryny przez długi okres czasu zmniejsza ryzyko raka jajnika. Podobny wpływ zdaje się mieć stosowanie aspiryny u kobiet z zespołem Lyncha. Sugeruje się również, że stosowanie leków przeciwzapalnych takich jak aspiryna, może hamować karcynogenny proces przewlekłego zapalenia w endometriozie, zatem stosowanie takich leków mogłoby być użyte jako terapia adiuwantowa, uzupełniająca leczenie guzów (12,17).

Warto wspomnieć, że czynniki ryzyka związane są też z stylem życia pacjentek. Do najczęściej wymienianych w literaturze można zaliczyć wystąpienie otyłości, korzystanie z używek – alkoholu i papierosów – oraz dietę i poziom aktywności fizycznej (17). Wykazano, że zwiększona podaż błonnika pokarmowego w diecie oraz stosowanie produktów na bazie soi, zmniejsza częstość pojawiania się raka jajnika. Natomiast niedobór witaminy D koreluje z zwiększonym ryzykiem rozwoju nowotworu jajnika (12).

Rak jajnika należy do nowotworów o dużej inwazyjności. Jego diagnoza we wczesnych stadiach jest utrudniona ze względu na brak specyficznych objawów. Najczęstsze objawy to bóle brzucha, którym towarzyszyć mogą wzdęcia czy też trudności w wypróżnianiu. Kolejnym objawem może być częste oddawanie moczu. Może pojawiać się również obniżenie apetytu, które wynika z ciągłego uczucia sytości (12,21). Tego typu objawy często są ignorowane lub zostają powiązane z dolegliwościami związanymi z nieprawidłowym działaniem układu pokarmowego lub moczowego, co przyczynia się do opóźnionej diagnozy nowotworu (12,22).

Czynnikiem decydującym o wskaźniku przeżycia pacjentek jest przede wszystkim czas postawienia diagnozy. Najczęściej diagnoza zostaje postawiona pacjentkom, u których nowotwór znajduje się już w stadium zaawansowania III lub IV. Koreluje to ze zdecydowanie gorszymi rokowaniami. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy jest brak specyficznych objawów, a także skutecznych testów przesiewowych oraz zidentyfikowanych biomarkerów, które mogłyby pomóc w diagnozie (12,22,23).

Aktualnie jedyne zatwierdzone przez Agencję Żywności i Leków ( ang. *Food and Drug Administration* – FDA) biomarkery to antygen CA125 (ang. *carcinoma antigen 125* – CA125) i HE4 czyli podfrakcja czwarta ludzkiego białka komórek nabłonkowych najądrza (ang. *human epididymis protein 4* – HE4) (12,22,23).

Literatura wskazuje jednak na istnienie wielu potencjalnych biomarkerów opartych o oznaczanie poziomu białek lub ekspresji określonych genów. Znalezienie wiarygodnych biomarkerów raka jajnika odegrałoby kluczową rolę w leczeniu nowotworu jajnika, który cechuje się dużym, niezmiennym od lat poziomem śmiertelności (23).

1.3. CTC, a rak jajnika

Dowiedziono, że u pacjentek z rakiem jajnika obecność CTC koreluje z brakiem odpowiedzi na leczenie i obniżoną przeżywalnością. Dzieje się tak ze względu specyficzne cechy inwazyjnych CTC (ang. *invasive* *circulating tumor cells* – *iCTC*)(Rycina 3), umożliwiające komórkom przeżycie i zasiedlenie nowej niszy. Kluczową cechą iCTC jest tzw. „macierzystość”, czyli posiadanie właściwości typowych dla nowotworowych komórek macierzystych (ang. *cancer stem cells* – CSC). Jest to przede wszystkim potencjał do samoodnowy i różnicowania w wiele typów komórek, a także odporność na chemio- i radioterapię. Inną, wspomnianą już wcześniej cechą, wyróżniającą iCTC jest zdolność do przeprowadzenia procesu EMT (8,24,25).

Literatura sugeruje, że zdolność do przerzutowania posiadają jedynie komórki o zwiększonym potencjale inwazyjnym. Stąd, wykorzystanie markerów umożliwiających identyfikację tej właśnie populacji inwazyjnych CTC może stanowić przełom w diagnostyce nowotworów, monitorowaniu przerzutów nowotworowych, wyborze leczenia i ocenie skuteczności zastosowanej terapii (24,25)

2. Cel pracy

Zaplanowane badania miały na celu wykazanie czy ekspresja podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej – hCGβ może być markerem CTC o zwiększonym potencjale inwazyjnym izolowanych z krwi i płynu otrzewnowego pacjentek z rakiem jajnika.

Założony cel realizowano poprzez:

 **zrobić punktowanie** analizę ekspresji genów kodujących podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej: *CGB1-2, CGB3-9;* analizę ekspresji genów będących markerami procesu EMT: *Snai1,Snai2, MMP9, CDH1,VIM, LOXL2,CK-19*; analizę statystyczną uzyskanych wyników.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

W prowadzonych badaniach wykorzystano materiał archiwalny Katedry i Zakładu Biologii Komórki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, który stanowiło całkowite RNA wyizolowane z krwi obwodowej (n=16) i płynu otrzewnowego (n=12) pacjentek Oddziału Onkologii Ginekologicznej i Katedry Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej UMP leczonych z powodu surowiczego raka jajnika.

3.2. Metody

3.2.1. Odwrotna transkrypcja

Do syntezy cDNA użyto 1 μg RNA wyizolowanego z krwi obwodowej pacjentek leczonych z powodu surowiczego raka jajnika oraz uniwersalny starter oligo(dT) (Roche Diagnostics). Mieszaninę reakcyjną denaturowano 10 min w temperaturze 65oC, po czym schładzano na lodzie przez około 5 min. Następnie do probówki dodano mieszaninę, w skład której wchodziła: odwrotna transkryptaza (Transcriptor Reverse Transcriptase, Roche Diagnostics), bufor do odwrotnej transkrypcji (Transcriptor RT buffer, Roche Diagnostics) mieszanina deoksyrybonukleotydów (Novazym) oraz inhibitor RNaz –RNAsin (Protector RNase Inhibitor, Roche Diagnostics). Dokładny opis poszczególnych składników użytych w reakcji wraz z ich stężeniem zamieszczono w tabeli 1.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Składnik | stężenie początkowe | dodana ilość | stężenie końcowe |
| całkowity RNA | zmienne | zmienna | 1µg |
| starter oligo dT | 100pmol/μl | 1μl | 5 pmol/μl |
| bufor do odwrotnej transkrypcji | 5x stęż.(2000u) | 4 μl | 1x |
| mieszanina dNTPs | 100pmol/μl | 2 μl | 5 pmol/μl |
| inhibitor RNaz - RNase inhibitor | 40 u/μl | 0,5 μl | 20 u |
| odwrotna transkryptaza | 2u/μl | 0,25 μl | 5 u |
| H2O | ~~---~~ | zmienna | ~~---~~ |
| całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej | ~~---~~ | 20 μl | ~~---~~ |

Warunki termiczne, w których została przeprowadzona odwrotna transkrypcja były następujące:

**Zrobić numerowanie** hybrydyzacja startera: 25oC, 10 minut; reakcja enzymatycznej syntezy cDNA na matrycy RNA: 55oC, 30 min; inaktywacja enzymu: 85oC, 10 minut.

Po zakończeniu reakcji syntezy otrzymany cDNA przechowywano w temperaturze -20oC do momentu przygotowania reakcji PCR.

3.2.2. PCR w czasie rzeczywistym

Analiza względnego poziomu ekspresji obejmowała geny kodujące: podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (ang. *chorionic gonadotropin beta subunit* – *CGB*), E-kadherynę (ang. *E-cadherin* – *CDH1*), czynniki transkrypcyjne SNAI1 (ang. *Snail Family Transcriptional Repressor 1* – *SNAI1*) i SNAI2 (ang. *Snail Family Transcriptional Repressor 2* – *SNAI2*), metaloproteinazę 9 (ang. *Matrix Metallopeptidase 9* – *MMP9*), cytokeratynę 19 (*ang. cytokeratin-19* – *CK-19*), wimentynę (*ang. Vimentin* – *VIM*), oraz homolog 2 oksydazy lizylowej (*ang. lysyl oxidase-like 2* – *LOXL2*).

Podjednostka beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej kodowana jest przez osiem allelicznych genów *CGB: CGB1, CGB2, CGB3, CGB5, CGB6, CGB7, CGB, CGB9*. Geny *CGB1* i *CGB2* uważane do niedawna za pseudogeny charakteryzuje ekspresja tysiąc razy niższa niż pozostałe geny *CGB* (32,41). Dlatego ekspresja genów kodujących hCGβ badana była w dwóch odrębnych esejach: *CGB1-2* oraz *CGB3-9*.

Za matrycę do reakcji qPCR posłużyło cDNA uzyskane w reakcji odwrotnej transkrypcji. W reakcji użyto starterów specyficznych genowo.

3.2.3. Startery używane do reakcji qPCR

Względny poziom ekspresji genów: *LOXL2, SNAI1, SNAI2* i *MMP9* oceniany był w reakcji qPCR z wykorzystaniem fluorochromu SybrGreen I. Poziom ekspresji tych genów porównywano do ekspresji genu metabolizmu podstawowego – *HPRT* (kodującego fosforybozylotransferazę hipoksantynowo-guaninową) mierzonej z zastosowaniem tej samej techniki.

Ekspresję genów *CGB1-2, CGB3-9, CDH1 CK-19,*oraz *VIM* analizowano w reakcji qPCR z wykorzystaniem specyficznych sond i również porównywano z poziomem ekspresji genu referencyjnego *HPRT*, którego poziom oceniano stosując odpowiednią sondę.

Reakcje przygotowano z wykorzystaniem zestawów: LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I oraz i The LightCycler® TaqMan® Master (Roche Diagnostic).

Dla każdego z badanych genów wyznaczono krzywą wzorcową, określającą wydajność reakcji w danych warunkach. Krzywe wzorcowe dla poszczególnych genów określano na podstawie reakcji qPCR, w których matrycę stanowiły dziesiętne rozcieńczenia cDNA (w zakresie 1:1 do 1:10000) sporządzonego na bazie RNA pochodzącego z łożyska. Wszystkie reakcje prowadzono na termocyklerze LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics). Warunki i profil temperaturowy reakcji z użyciem SybrGreen przedstawiają tabele 2 i 3, natomiast warunki reakcji z użyciem sond hydrolizujących przedstawiają tabele 4 i 5. Sekwencje starterów zastosowanych w reakcjach qPCR podano w tabeli 6.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Składnik | stężenie początkowe | dodana ilość | stężenie końcowe |
| cDNA | ~~---~~ | 1,5 μl | ~~---~~ |
| mieszanina starterów sensowych i antysensowych | 5pmol/μl | 1μl | 5 pmol/μl |
| jony Mg2+ | 25mmol/μl | 0,6 μl | 15mmol/μl |
| mieszanina Light Cycler FastStart DNA zawierająca polimerazę, SybrGreen, dNTPs, MgCl2 | 10x | 1 μl | 1x |
| inhibitor RNaz - RNase inhibitor | 40 u/μl | 0,5 μl | 20 u |
| H2O | ~~---~~ | 3,5 μl | ~~---~~ |
| całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej | ~~---~~ | 10 μl | ~~---~~ |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Etap | warunki reakcji w poszczególnych etapach | liczba cykli |
| *CGB* | *SNAI2* | *MMP9* | *HPRT* |
| preinkubacja | 95oC, 10 min | 1 |
| amplifikacja | denaturacja | 95oC, 10 sek | 45 |
| hybrydyzacja starterów | 55oC, 5s | 54oC, 5s | 55oC, 5s | 54oC, 5s |
| elongacja | 72oC, 8s | 72oC, 9s | 72oC, 8s | 72oC, 9s |
| pomiar fluorescencji | 88oC, 2s |
| krzywa topnienia | od 65oC do 95oC | 1 |
| chłodzenie | 40oC, 30s | 1 |

|  |  |
| --- | --- |
| Składnik | stężenie końcowe |
| cDNA | 5 μl |
| mieszanina starterów sensowych i antysensowych | 0,5 pmol/μl |
| sonda hydrolizująca | 0,1μM |
| mieszanina LightCycler FastStart TaqMan Reaction Mix zawierająca polimerazę, dNTPs, MgCl2 | 1x |
| H2O | dopełnione do objętości 20 μl |
| całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej | 20 μl |

4. Wyniki

Możliwość wykorzystania podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej jako markera krążących komórek nowotworowych o zwiększonym potencjale inwazyjnym obecnych we krwi i płynie otrzewnowym pacjentek z nowotworami jajnika oceniono dokonując analizy względnej ekspresji genów kodujących podjednostkę beta hormonu: *CGB1-*2 i *CGB*3*-9* oraz genów markerowych procesu tranzycji epietalialno-mezenchymalnej: *CK19, CDH, LOXL2, Snai1, Snai2, VIM* i *MMP9*.

 Materiał do badań stanowił archiwalny RNA wyizolowany z komórek nowotworowych obecnych w próbkach płynu otrzewnowego pobranego od 12 pacjentek z rakiem jajnika oraz komórek krążących we krwi 16 pacjentek z tym nowotworem.

Całkowity RNA stanowił matrycę do syntezy cDNA, które wykorzystano do przeprowadzenia reakcji qPCR. Specyfikę reakcji zapewniło użycie swoistych genowo starterów i fluorochromu SYBR Green I (dla *Snai1, Snai2, LOXL2, MMP9, HPRT*), a także specyficznych sond hydrolitycznych (dla *CGB1-2, CGB3-9, CDH1, VIM, CK19, HPRT*) .

4.1. Analiza ekspresji genów *CGB* we krwi i płynie otrzewnowym pacjentek z rakiem jajnika

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że ekspresja genów kodujących hCGβ cechuje zarówno komórki izolowane z płynu otrzewnowego jak z krwi pacjentek z rakiem jajnika. Grupy te wyróżniał jednak odmienny profil ekspresji badanych genów.

4.1.1. Analiza ekspresji genów *CGB1-2*

Ekspresję genów *CGB1-2* we krwi wykazywało 5 z 16 pacjentek, natomiast w płynie otrzewnowym ekspresję wykazano u 4 z 12 analizowanych pacjentek.

Przeprowadzone badanie wykazało zróżnicowanie w poziomie ekspresji genów *CGB1-2* w poszczególnych grupach. Próby z krwi cechowała niższa aktywność transkrypcyjna w porównaniu z próbami z płynu otrzewnowego. Odnotowano, że dla krwi poziom ekspresji utrzymywał się między 0,00E+00 a 2,20E+00. Dla płynu otrzewnowego najniższa wartość relatywnego poziomu ekspresji wynosiła, tak samo jak w przypadku krwi 0,00E+00, najwyższa natomiast 5,49E+00 (Tabela 7).

Różnice w poziomie ekspresji genów *CGB1-2* zobrazowano na Rycinie 6.

Analiza statystyczna wykazała różnice w relatywnej ekspresji genów *CGB1-2*



5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski:

geny kodujące podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (*CGB1-2*, *CGB3-9*) ulegają ekspresji w komórkach obecnych w płynie otrzewnowym i we krwi chorych z rakiem jajnika i ich zwiększony poziom może być wyznacznikiem procesu nowotworzenia i rozsiewu nowotworu;

zarówno geny *CK-19,* *CDH1* jak *VIM, MMP-9* *Snai1, Snai2* i *LOXL2* będące odpowiednio markerami komórek nabłonkowych i mezenchymalnych ulegają ekspresji w komórkach raka krążących we krwi chorych z rakiem jajnika, oraz komórkach obecnych w płynie otrzewnowym, co może świadczyć, że część komórek nowotworowych ulega częściowej tranzycji epitelialno-mezenchymalnej związanej z zachowaniem właściwości adhezyjnych i migracyjnych tych komórek;

korelacja pomiędzy ekspresją *CGB1-2* i *MMP-9* u pacjentek z rakiem jajnika wskazuje, że aktywność tych genów promuje fenotyp mezenchymalny.

6. Piśmiennictwo

1. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. Aust Med J. 1869;14:146–9.

2. de Wit S, van Dalum G, Terstappen LWMM. Detection of Circulating Tumor Cells. Scientifica (Cairo). 2014;2014:1–11.

3. Castro-Giner F, Aceto N. Tracking cancer progression: From circulating tumor cells to metastasis. Genome Med. 2020;12(1):1–12.

4. Hong Y, Fang F, Zhang Q. Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). Int J Oncol. 2016;49(6):2206–16.

5. Malagobadan S, Nagoor NH. Anoikis. Encycl Cancer. 2018;1:75–84.

6. Keller L, Pantel K. Unravelling tumour heterogeneity by single-cell profiling of circulating tumour cells. Nat Rev Cancer [Internet]. 2019;19(10):553–67. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41568-019-0180-2

7. Kim M, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Xiang H, Norton L, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. Cell [Internet]. 2010;139(7):1315–26. Available from: doi:10.1016/j.cell.2009.11.025.

8. Lu W, Kang Y. Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. Dev Cell [Internet]. 2019;49(3):361–74. Available from: https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.010

9. Saxena K, Jolly MK, Balamurugan K. Hypoxia, partial EMT and collective migration: Emerging culprits in metastasis. Transl Oncol [Internet]. 2020;13(11):100845. Available from: https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100845

10. Balcerak A, Wakuła M, Trębińska A, Grzybowska EA. Migracja i inwazyjność komórek nowotworowych; rola plastyczności komórek i udział macierzy zewnątrzkomórkowej w tworzeniu przerzutów. Nowotwory. 2016;66(1):45–52.

11. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: https://gco.iarc.fr/today, accessed [02 April 2022].

12. Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. Semin Oncol Nurs [Internet]. 2019;35(2):151–6. Available from: https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.001

13. Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM. Epithelial ovarian cancer. Lancet [Internet]. 2019;393(10177):1240–53. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32552-2

14. Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: Type i and type II. Biomed Res Int. 2014;2014.

15. Kurman RJ, Shih IM. Pathogenesis of ovarian cancer: Lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. Int J Gynecol Pathol. 2008;27(2):151–60.

16. Bell D, et al. Integrated Genomic Analyses of Ovarian Carcinoma. Nature. 2011;474(7353):609–15.

17. Menon U, Karpinskyj C, Gentry-Maharaj A. Ovarian Cancer Prevention and Screening. Obstet Gynecol. 2018;131(5):909–27.

18. Zondervan KT, Becker CM, Missmer SA. Endometriosis. N Engl J Med. 2020;382(13):1244–56.

19. Bulun SE, Yilmaz BD, Sison C, Miyazaki K, Bernardi L, Liu S, et al. Endometriosis. Endocr Rev. 2019;40(4):1048–79.

20. Havrilesky LJ, Moorman PG, Lowery WJ, Gierisch JM, Coeytaux RR, Urrutia RP, et al. Oral contraceptive pills as primary prevention for ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis. Obstet Gynecol. 2013;122(1):139–47.

21. Blassl C, Kuhlmann JD, Webers A, Wimberger P, Fehm T, Neubauer H. Gene expression profiling of single circulating tumor cells in ovarian cancer – Establishment of a multi-marker gene panel. Mol Oncol [Internet]. 2016;10(7):1030–42. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2016.04.002

22. Asante DB, Calapre L, Ziman M, Meniawy TM, Gray ES. Liquid biopsy in ovarian cancer using circulating tumor DNA and cells: Ready for prime time? Cancer Lett [Internet]. 2020;468:59–71. Available from: https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.10.014

23. Bonifácio VDB. Ovarian Cancer Biomarkers: Moving Forward in Early Detection. Vol. 1219, Advances in Experimental Medicine and Biology. 2020. 355–363 p.

24. Suchorska W. Nowotworowe komórki krążące : biologia i znaczenie kliniczne. Lett Oncol Sci [Internet]. 2019;16(3):7–15. Available from: doi:10.21641/los.2019.16.3.155

25. Klymenko Y, Kim O, Stack MS. Complex determinants of epithelial: Mesenchymal phenotypic plasticity in ovarian cancer. Cancers (Basel). 2017;9(8):1–32.

26. Heidegger H, Jeschke U. Human chorionic gonadotropin (hCG)—an endocrine, regulator of gestation and cancer. Int J Mol Sci. 2018;19(5):29–31.

27. Cole LA. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. Reprod Biol Endocrinol. 2010;8:1–14.

28. Nwabuobi C, Arlier S, Schatz F, Guzeloglu-Kayisli O, Lockwood CJ, Kayisli UA. hCG: Biological functions and clinical applications. Int J Mol Sci. 2017;18(10):1–15.

29. de Medeiros SF, Norman RJ. Human choriogonadotrophin protein core and sugar branches heterogeneity: Basic and clinical insights. Hum Reprod Update. 2009;15(1):69–95.

30. Białas P, Jankowska A. Biochemical markers in breast and ovarian cancer. Polish Rev Heal Sci [Internet]. 2015;42(2):115–21. Available from: http://przeglad.amp.edu.pl/uploads/2015/2/115\_2\_43\_2015.pdf

31. Burczynska BB, Kobrouly L, Butler SA, Naase M, Iles RK. Novel insights into the expression of CGB1 1-2 genes by epithelial cancer cell lines secreting ectopic free. Anticancer Res. 2014;34(5):2239–48.

32. Kubiczak M, Walkowiak GP, Nowak-Markwitz E, Jankowska A. Human chorionic gonadotropin beta subunit genes CGB1 and CGB2 are transcriptionally active in ovarian cancer. Int J Mol Sci. 2013;14(6):12650–60.

33. Sahoo S, Singh P, Kalha B, Singh O, Pal R. Gonadotropin-mediated chemoresistance: Delineation of molecular pathways and targets. BMC Cancer [Internet]. 2015;15(1):1–14. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1938-x

34. Pond-Tor S, Rhodes RG, Dahlberg PE, Leith JT, McMichael J, Dahlberg AE. Enhancement of radiosensitivity of the MCF-7 breast cancer cell line with human chorionic gonadotropin. Breast Cancer Res Treat. 2002;72(1):45–51.

35. Jankowska A, Gunderson SI, Andrusiewicz M, Burczynska B, Szczerba A, Jarmolowski A, et al. Reduction of human chorionic gonadotropin beta subunit expression by modified U1 snRNA caused apoptosis in cervical cancer cells. Mol Cancer. 2008;7:1–9.

36. Cole LA, Butler S. Hyperglycosylated hCG, hCGβ and Hyperglycosylated hCGβ: Interchangeable cancer promoters. Mol Cell Endocrinol. 2012;349(2):232–8.

37. Liu N, Peng SM, Zhan GX, Yu J, Wu WM, Gao H, et al. Human chorionic gonadotropin β regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis in human ovarian cancer. Oncol Rep. 2017;38(3):1464–72.

38. Nastały P, Honecker F, Pantel K, Riethdorf S. Detection of Circulating Tumor Cells (CTCs) in Patients with Testicular Germ Cell Tumors. In: Testicular Germ Cell Tumors Methods in Molecular Biology In: Bagrodia, A, Amatruda, JF (eds). 2021. p. 245–261.

39. Yang MH, Imrali A, Heeschen C. Circulating cancer stem cells: The importance to select. Chinese J Cancer Res. 2015;27(5):437–49.

40. Chebouti I, Kasimir-Bauer S, Buderath P, Wimberger P, Hauch S, Kimmig R, et al. EMT-like circulating tumor cells in ovarian cancer patients are enriched by platinum-based chemotherapy. Oncotarget. 2017;8(30):48820–31.

41. Białas P, Śliwa A, Szczerba A, Jankowska A. The study of the expression of CGB1 and CGB2 in human cancer tissues. Genes (Basel). 2020;11(9):1–11.

42. Gaona-Luviano P, Adriana L, Medina-Gaona, Magaña-Pérez K. Epidemiology of ovarian cancer. Chinese Clin Oncol. 2020;9(4).

43. Orr B, Edwards RP. Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. Hematol Oncol Clin North Am [Internet]. 2018;32(6):943–64. Available from: https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.07.010

44. Nguyen VHL, Yue C, Du KY, Salem M, O’Brien J, Peng C. The role of microRNAs in epithelial ovarian cancer metastasis. Int J Mol Sci. 2020;21(19):1–39.

45. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1).

46. Głodek A, Kubiczak M, Urbaniak P, Walkowiak G, Nowak-Markwitz E, Jankowska A. Ludzka gonadotropina kosmówkowa - znany hormon o nieznanych funkcjach. Ginekol Pol. 2012;83(10):766–71.

47. Loret N, Denys H, Tummers P, Berx G. The role of epithelial-to-mesenchymal plasticity in ovarian cancer progression and therapy resistance. Cancers (Basel). 2019;11(6):1–22.

48. Zhang Y, Wang X, Chen X. Identification of core genes for early diagnosis and the EMT modulation of ovarian serous cancer by bioinformatics perspective. Aging (Albany NY). 2021;13(2):3112–45.

49. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 2009;119(6):1420–8.

50. Carey P, Low E, Harper E, Stack MS. Metalloproteinases in ovarian cancer. Int J Mol Sci. 2021;22(7):1–15.

51. Ye M, Zhou J, Gao Y, Pan S, Zhu X. The prognostic value of the lysyl oxidase family in ovarian cancer. J Clin Lab Anal. 2020;34(12):1–11.

52. Lu Q, Qu H, Lou T, Liu C, Zhang Z. CK19 promotes ovarian cancer development by impacting on wnt/β-catenin pathway. Onco Targets Ther. 2020;13:2421–31.

53. Lu ZY, Dong R, Li D, Li WB, Xu FQ, Geng Y, et al. SNAI1 overexpression induces stemness and promotes ovarian cancer cell invasion and metastasis. Oncol Rep. 2012;27(5):1587–91.

54. Padilla MAA, Binju M, Wan G, Rahmanto YS, Kaur P, Yu Y. Relationship between ovarian cancer stem cells, epithelial mesenchymal transition and tumour recurrence. Cancer Drug Resist. 2019;2(4):1127–35.

55. Zhang W, Yang HC, Wang Q, Yang ZJ, Chen H, Wang SM, et al. Clinical value of combined detection of serum matrix metalloproteinase-9, heparanase, and cathepsin for determining ovarian cancer invasion and metastasis. Anticancer Res. 2011;31(10):3423–8.

56. Szubert S, Koper K, Dutsch-Wicherek MM, Jozwicki W. High tumor cell vimentin expression indicates prolonged survival in patients with ovarian malignant tumors. Ginekol Pol. 2019;90(1):11–9.

57. Rull K, Laan M. Expression of β-subunit of HCG genes during normal and failed pregnancy. Hum Reprod. 2005;20(12):3360–8.