

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Lek. Katarzyna Gąsior

**Ocena potencjalnej wartości diagnostycznej  
i prognostycznej ekspresji białek PD-1 i PD-L1  
w raku jelita grubego oraz struktury i interakcji  
nowotworu i jego środowiska  
na poziomie atomowym**

**Praca w ramach projektu „InterChemMed - Interdyscyplinarne studia  
doktoranckie łódzkich uczelni publicznych”**

współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Działania 3.2  
Studia doktoranckie Osi priorytetowej III Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju  
Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 ([1]POWR.03.02.00-00- [2]I029/16)

**Promotorzy:**

Prof. UM dr hab. n. med. Katarzyna Taran

Prof. dr hab. inż. Piotr Paneth



**Uniwersytet Medyczny w Łodzi**

**Katedra Onkologii**

**Zakład Patomorfologii**

**Pracownia Frakcjonowania Izotopowego w Procesach Patologicznych**

**Kierownik Katedry Prof. dr hab. n. med. Radziław Kordek**



**Łódź 2022**

**Serdeczne podziękowania dla:**

**Pani Prof. UM dr hab. n. med. Katarzyny Taran**  
**za inspirację, pomoc i nieustającą motywację**  
**Pana Prof. dr. hab. inż. Piotra Panetha**  
**za opiekę naukową i cenne uwagi**

**Pana Prof. dr. hab. n. med. Radzisława Kordka**  
Kierownika Katedry Onkologii Zakładu Patomorfologii UM w Łodzi  
oraz

**Pana Prof. dr. hab. n. med. Adama Dzikiego**  
Kierownika Kliniki Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej  
Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. WAM  
– Centralnego Szpitala Weteranów w Łodzi  
**za umożliwienie i pomoc w realizacji badań**

**Zespołu Katedry Onkologii Zakładu Patomorfologii UM w Łodzi**  
**Zespołu Kliniki Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej**  
**Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. WAM**  
**– Centralnego Szpitala Weteranów w Łodzi**

**Pani Dr n. med. Elżbiety Sałacińskiej-Łoś**  
z Kliniki Chirurgii i Onkologii Dziecięcej UM w Łodzi

**Pana Dr. inż. Rafała Kamińskiego**  
z Międzyresortowego Instytutu Techniki Radiacyjnej  
Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej

**Pani Dr n. med. Magdaleny Orzechowskiej**  
z Zakładu Kancerogenezy Molekularnej UM w Łodzi  
**za pomoc w realizacji badań**

**Rodzinie za cierpliwość i ogromne wsparcie**

## SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE.....	6
1.1. RAK JELITA GRUBEGO.....	6
1.1.1. Historia i współczesność nowotworów jelita grubego .....	7
1.1.2. Klasyfikacja raka jelita grubego według Światowej Organizacji Zdrowia	8
1.1.3. Czynniki ryzyka raka jelita grubego .....	9
1.1.4. Patogeneza raka jelita grubego .....	14
1.1.5. Obraz kliniczny raka jelita grubego.....	15
1.1.6. Badania przesiewowe i diagnostyka raka jelita grubego.....	20
1.1.7. Leczenie raka jelita grubego.....	24
1.1.8. Czynniki rokownicze w raku jelita grubego .....	27
1.2. BIAŁKA WYKORZYSTANE W BADANIU.....	29
1.2.1. PD-1 .....	29
1.2.2. PD-L1 .....	30
1.3. SPEKTROMETRIA MAS.....	33
1.3.1. Historia spektrometrii mas .....	33
1.3.2. Zastosowanie spektrometrii mas .....	35
1.3.3. Izotopy pierwiastków chemicznych i izotopowa spektrometria mas.....	35
1.3.3.1. Azot.....	37
1.3.3.2. Węgiel .....	37
1.3.3.3. Frakcjonowanie izotopowe.....	38
1.3.3.3.1. Zmiana składu izotopowego w środowisku naturalnym .....	39
1.3.3.3.2. Zmiana składu izotopowego w przebiegu procesów patologicznych.....	40
1.3.4. Materiał wykorzystany do badań izotopowych.....	41
1.3.5. Ograniczenia zastosowania izotopowej spektrometrii mas.....	42
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY .....	44
2.1. ZAŁOŻENIA PRACY.....	44
2.2. CELE PRACY.....	45

3. MATERIAŁY I METODY .....	46
3.1. MATERIAŁ BADANY .....	46
3.1.1. Materiał do badań immunohistochemicznych .....	46
3.1.2. Materiał do badań spektrometrycznych .....	47
3.2. METODYKA BADAŃ .....	51
3.2.1. Metodyka badań immunohistochemicznych .....	51
3.2.2. Metodyka badań z użyciem izotopowego spektrometru mas.....	54
3.2.3. Metody analizy statystycznej .....	56
4. WYNIKI .....	57
4.1. WYNIKI OCENY IMMUNOEXPRESJI BADANYCH BIAŁEK .....	57
4.1.1. Immunokspresja białka PD-1 .....	57
4.1.2. Immunokspresja białka PD-L1 .....	60
4.2. WYNIKI POMIARÓW IZOTOPOWYCH.....	63
4.2.1. Skład izotopowy azotu $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ .....	63
4.2.2. Skład izotopowy węgla $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .....	66
4.2.3. Stosunek masowy N/C .....	68
4.3. ANALIZA STATYSTYCZNA .....	69
4.3.1. Analiza statystyczna immunokspresji badanych białek.....	69
4.3.2. Analiza statystyczna wyników pomiarów izotopowych.....	86
4.3.3. Analiza statystyczna badanych parametrów z wykorzystaniem współczynnika korelacji rang Spearmana.....	124
4.3.4. Analiza statystyczna badanych parametrów z wykorzystaniem analizy składowych głównych – analiza całościowa (WARIANT A) .....	130
4.3.5. Analiza statystyczna badanych parametrów z wykorzystaniem analizy składowych głównych – WARIANT B .....	137
4.3.6. Podsumowanie wyników analizy statystycznej .....	142
5. DYSKUSJA.....	145
6. WNIOSKI .....	168
7. BIBLIOGRAFIA I NETOGRAFIA.....	169

8. ANEKS.....	191
8.1. ALFABETYCZNY WYKAZ UŻYTYCH TERMINÓW, SKRÓTÓW I AKRONIMÓW WYKORZYSTANYCH W TEKŚCIE .....	191
8.2. SPIS RYCIN.....	194
8.3. SPIS FOTOGRAFII .....	195
8.4. SPIS TABEL.....	196
8.5. SPIS DIAGRAMÓW.....	197
8.6. SPIS WYKRESÓW .....	198
9. STRESZCZENIE.....	203
9.1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM .....	203
9.2. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM - ABSTRACT .....	209

# 1. WPROWADZENIE

## 1.1. RAK JELITA GRUBEGO

Rak jelita grubego (*ang.: colorectal carcinoma, CRC*) stanowi obecnie drugą co do częstości przyczynę zgonów z powodu choroby nowotworowej, ustępując jedynie rakowi płuc. Obserwuje się zarówno wzrost samej liczby chorych, jak i śmiertelności z powodu tego nowotworu. W roku 2013 zdiagnozowano około 1,2 miliona przypadków raka jelita grubego na świecie (Brenner i in., 2014), a w roku 2018 nowotwór ten stanowił już trzecią pod względem częstości przyczynę zgonów w grupie chorób nowotworowych (Rawla i in., 2019). Zaledwie dwa lata później, w roku 2020 zdiagnozowano już blisko 1,9 miliona przypadków - co stanowiło 10% wszystkich rozpoznanych nowotworów złośliwych oraz odnotowano 915 880 zgonów z powodu raka jelita grubego (9,4% wszystkich zgonów spowodowanych chorobą nowotworową) (Sung i in., 2021).

Rak jelita grubego stanowi wyzwanie nie tylko medyczne, ale i socjoekonomiczne. Za 2-letnią terapię jednego pacjenta w Stanach Zjednoczonych w latach 1999, 2003 i 2006 płacono odpowiednio 38724 \$, 51715 \$ i 56839 \$ (Dinan, 2010). W Europie w samym 2015 roku wydano na leczenie chorych z rakiem jelita grubego 9,1 miliarda Euro (Henderson i in., 2021), a w każdym przypadku sumy te należy powiększyć o wydatki związane z opieką domową i koszty wyłączenia z życia zawodowego.

Standaryzowane względem wieku, światowe wskaźniki zachorowalności na raka jelita grubego na 100000 ludności wynoszą aktualnie u mężczyzn 22,9, a u kobiet 15,6 (Sung i in., 2021). Szacuje się, że w roku 2040 liczba nowych przypadków tego nowotworu na świecie wyniesie 3,2 miliona (Xi & Xu, 2021). Skala problemu i jej wzrostowa tendencja, czynią raka jelita grubego jednym z wiodących wyzwań naszych czasów, ujawniając potrzebę jeszcze głębszego poznania biologii tego nowotworu, a wysoka śmiertelność mająca swoją przyczynę także w późnym rozpoznawaniu tego typu zmian, wskazuje na konieczność poszukiwania nowych,

także interdyscyplinarnych metod o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym i prognostycznym.

### 1.1.1. Historia i współczesność nowotworów jelita grubego

Nowotwory złośliwe jelita grubego nie są problemem tylko naszych czasów ani tylko ludzi. Udokumentowano, że są patologią towarzyszącą człowiekowi od tysięcy lat, najstarszy artefakt - rak odbytnicy, ujawniono w strupieszalnych zwłokach z okresu ptolemejskiego (200–400 n.e.), znalezionych w oazie Dakhla (Rehemtulla, 2010). W literaturze dostępne są również badania potwierdzające występowanie raka jelita grubego także u zwierząt, m.in. u psów (Church i in., 1987), makaków królewskich (Uno i in., 1998), szczurów (Ijzermans i in., 1987) oraz kotów (Sławiński i in., 1997).

Współcześnie raka jelita grubego uznaje się za nowotwór typowy dla mieszkańców krajów wysoko rozwiniętych. Częstość występowania tego nowotworu różni się znacząco w zależności od regionu geograficznego. CRC najczęściej rozpoznawany jest w krajach europejskich, w Ameryce Północnej oraz Australii i Nowej Zelandii, a w przypadku samego raka odbytnicy również we Wschodniej Azji. Najmniej przypadków odnotowuje się w Afryce i Azji Południowo-Środkowej (Sung i in., 2021).

Rak jelita grubego, jest zdecydowanie najczęstszym nowotworem złośliwym tego narządu, a sam typ gruczolowy, stanowiący ponad 90% wszystkich zmian (Fleming i in., 2012) jest niemal synonimem CRC. W grupie nowotworów złośliwych pochodzenia nabłonkowego wyróżnia się także raki neuroendokrynne (*ang.: neuroendocrine carcinoma, NC*), jednak częstość ich występowania jest zdecydowanie niższa niż raka gruczolowego (Warsingih i in., 2020). Guzy neuroendokrynne jelita grubego (*ang.: neuroendocrine tumor, NET*) są rzadkie w porównaniu z rakami gruczolowymi, dla przykładu: NET odbytnicy stanowią mniej niż 1% wszystkich przypadków nowotworów złośliwych w tej lokalizacji (T. R. André i in., 2018).

Poza wyżej wymienionymi, w jelicie grubym opisano obecność innych, także rzadkich, nowotworów złośliwych tj.: naczyniakomięsa (Kamocki i in., 2012), mięśniakomięsa gładkokomórkowego (J. Yang, 2018), tłuszczakomięsa (Choi i in., 2010), chłoniaka (Pandey i in., 2019) oraz czerniaka (Raja i in., 2017).

Wśród nowotworów łagodnych w jelicie grubym podobnie dominują zmiany pochodzenia nabłonkowego - gruczolaki, scharakteryzowane bliżej w kolejnych rozdziałach, a rzadziej w tej lokalizacji stwierdza się guzy mezenchymalne: tłuszczaki, tłuszczakomięśniaki oraz naczyniaki, te ostatnie mogą niekiedy być przyczyną masywnych krwawień (Schofield & Jones, 1992).

### **1.1.2. Klasyfikacja raka jelita grubego według Światowej Organizacji Zdrowia**

Najnowsza Klasyfikacja Światowej Organizacji Zdrowia (*ang.: World Health Organization, WHO*) (5. edycja) złośliwych nowotworów nabłonkowych okrężnicy i odbytnicy wyróżnia trzy główne grupy nowotworów złośliwych tych narządów, tj. raki gruczołowe, NOS (*ang.: adenocarcinoma, not otherwise specified, NOS*), guzy neuroendokrynne, NOS (*ang.: neuroendocrine tumor, NOS*) oraz raki neuroendokrynne, NOS (*ang.: neuroendocrine carcinoma, NOS*). Uproszczona klasyfikacja, skupiająca się na raku gruczołowym, będącym przedmiotem niniejszej pracy, została przedstawiona w tabeli 1.

**Tabela 1.** Uproszczona klasyfikacja złośliwych nowotworów nabłonkowych okrężnicy i odbytnicy wg WHO, 5. edycja, nomenklatura oryginalna.

<b>Adenocarcinoma, NOS</b>
<i>Serrated adenocarcinoma</i>
<i>Adenoma-like adenocarcinoma</i>
<i>Micropapillary adenocarcinoma</i>
<i>Mucinous adenocarcinoma</i>
<i>Poorly cohesive carcinoma</i>
<i>Signet-ring cell carcinoma</i>
<i>Medullary adenocarcinoma</i>
<i>Adenosquamous carcinoma</i>
<i>Carcinoma undifferentiated, NOS</i>
<i>Carcinoma with sarcomatoid component</i>
<b>Neuroendocrine tumor, NOS</b>
<b>Neuroendocrine carcinoma, NOS</b>

### 1.1.3. Czynniki ryzyka raka jelita grubego

Wiedza na temat zmian i stanów patologicznych, które predysponują do rozwoju raka jelita grubego, stwarza możliwość wyłonienia pacjentów z grup ryzyka i wdrożenia postępowania mającego na celu zapobieżenie powstania choroby lub wykrycie zmian nowotworowych na jak najwcześniejszym etapie ich rozwoju.

Do czynników ryzyka raka jelita grubego zalicza się: płeć męską, wiek, obecność gruczolaków lub wcześniejszego raka jelita grubego, nieswoiste zapalenia jelit (*ang.: inflammatory bowel disease, IBD*) oraz czynniki genetyczne - zespoły polipowatości, wrodzonego niepolipowatego raka jelita grubego (zespół Lyncha), w przebiegu którego dochodzi do mutacji w obrębie homologu genu MutL E. Coli 1 (*ang.: MutL homolog 1, MLH 1*), homologu genu MutS 2 oraz 6 (*ang.: MutS homolog 2 and 6, MSH 2, MSH 6*) oraz homologu genu PMS1 2 (*ang.: PMS1 Protein Homolog 2, PMS2*). Do zespołów polipowatości zalicza się rodzinną polipowatość gruczolakowatą, w której dochodzi do mutacji genu gruczolakowatej polipowatości okrężnicy (*ang.: adenomatous poliposis coli, APC*), polipowatość związaną z genem

będącym homologiem MutY *Escherichia coli* (*ang.: Escherichia coli MutY homolog, MUTYH*) oraz zespoły polipowatości hamartomatycznej, do których należy zespół Peutza-Jeghersa, związany z mutacją genu kinazy treoninowo-serynowej 11 (*serine/threonine kinase 11, STK11*) oraz zespół polipowatości młodzieńczej, w którym dochodzi do mutacji genu receptora białka morfogenetycznego kości typu 1A (*ang.: bone morphogenetic protein receptor type 1A, BMPR1A*) lub genu matki przeciwko homologowi dekapentapletycznemu 4 (*ang.: mothers against decapentaplegic homolog 4, SMAD4*). Wśród czynników środowiskowych, do wystąpienia CRC predysponują: spożywanie czerwonego mięsa, dieta bogatotłuszczowa, niskie spożycie błonnika, otyłość, siedzący tryb życia, cukrzyca, palenie tytoniu i spożywanie alkoholu (Cunningham i in., 2010; Jassem & Kordek, 2019).

Gruźlaki jelita grubego są najczęstszymi nowotworami łagodnymi tego narządu. Częstość występowania tych zmian różni się w poszczególnych krajach, wykazując silną dodatnią korelację z zapadalnością na raka jelita grubego. Wiedza na temat gruczolaków poszerzyła się znacząco dzięki badaniom endoskopowym, podczas których nie tylko można ujawnić obecność tych przybierających postać polipów - zmian, ale i wyciąć je pozyskując materiał do badań histopatologicznych. Obecnie wyróżnia się grupę gruczolaków konwencjonalnych oraz zmiany ząbkowane. Do pierwszej z wymienionych grup należą gruczolaki cewkowe, kosmkowe oraz mieszane cewkowo-kosmkowe. Zmiany te są zróżnicowane pod względem wielkości i formy, prezentują formy płaskie, wypukłe, uszypułowane lub siedzące. Ich cechą charakterystyczną jest obecność dysplazji komórek nabłonka gruczołowego, w kierunku którego nowotwory te się różnicują, cecha ta jest oceniana w skali dwustopniowej: jako dysplazja małego (*ang.: low-grade*) lub dużego stopnia (*ang.: high-grade*). Poza gruczolakami konwencjonalnymi w jelicie grubym występują także zmiany ząbkowane, wśród których wyróżniamy tradycyjnego gruczolaka ząbkowanego (*ang.: traditional serrated adenoma, TSA*) oraz siedzące zmiany ząbkowane (*ang.: sessile serrated lesion, SSL*). SSL są częstsze i rozpoznawane w 3-9% polipów jelita grubego, natomiast TSA stanowią

jedynie ok. 0,56-1,9% wszystkich przypadków (Bettington & Chetty, 2015; Yamane i in., 2014)

Obecność zarówno konwencjonalnych gruczolaków, jak i zmian ząbkowanych wiąże się z ryzykiem rozwoju gruczolakoraka, jest ono jednak inne dla poszczególnych zmian. Wpływa na to kilka czynników, takich jak: wielkość zmiany, jej typ histologiczny oraz stopień dysplazji komórek nabłonka. Wśród konwencjonalnych gruczolaków dane prezentują się następująco: gruczolaki cewkowe stanowią 75-85% polipów gruczolakowych, a ryzyko ich zezłośliwienia szacuje się na mniej niż 5%, gruczolaki cewkowo-kosmkowe stanowią 10-15% zmian i w 20- 25% przypadków prowadzą do rozwoju raka, gruczolaki kosmkowe stanowiące 5-10% przypadków wykazują 35-40% ryzyko transformacji (Amersi i in., 2005).

Gruczolaki zwykle nie dają objawów, są ujawniane i usuwane podczas kolonoskopii wykonywanej z innych powodów. W badaniu histopatologicznym pozyskanego w ten sposób materiału rozpoznaje się charakter zmiany. Poza rutynową oceną mikroskopową, biologia gruczolaków jelita grubego jest nadal przedmiotem wielu badań, zarówno dotyczących diagnostyki (Aziz i in., 2019; Liang i in., 2020; Murakami i in., 2018), jak i ich leczenia (Bulut i in., 2019; Dumoulin & Hildenbrand, 2019).

Obecność przewlekłych chorób zapalnych jelit sprzyja karcynogenezie, a chorzy zmagają się nie tylko z objawami choroby podstawowej, ale również z udokumentowanym zagrożeniem rozwojem nowotworu złośliwego. Zarówno wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*ang.: ulcerative colitis, UC*), jak i choroba Leśniowskiego – Crohna (*ang.: Crohn disease, CD*), zwiększają ryzyko wystąpienia raka jelita grubego. Ryzyko to jest 2,4-2,7 większe niż w populacji ogólnej w UC oraz 1,9-2,6 w CD (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2019). Ponadto, wzrasta ono wraz z czasem trwania choroby, rozległością zmian oraz występowaniem innych procesów zapalnych, np. stwardniającego zapalenia dróg żółciowych (Ullman & Itzkowitz, 2011). Rak jelita grubego związany z IBD stanowi 1-2% wszystkich przypadków tego nowotworu, jednak zajęcia okrężnicy w przebiegu IBD jest jednym z trzech głównych czynników ryzyka rozwoju raka jelita

grubego (Mattar i in., 2011). Rak na tle UC pojawia się u młodszych pacjentów, zmiany są często wieloogniskowe, dominują raki śluzowe i sygnetowatokomórkowe (Yashiro, 2014). W przeciwieństwie do sporadycznych przypadków, u pacjentów z IBD nie uwidoczni się charakterystycznej patogenezы w sekwencji gruczolak – gruczolakorak. Rozwój dysplazji wiąże się w tym przypadku ze zwiększonym obrotem komórek nabłonka oraz obecnością przewlekłego procesu zapalnego (Rogler, 2014).

Dziedziczne podłoże stwierdza się w 2-5% raków jelita grubego (Jasperson i in., 2010). Najczęściej występującym zaburzeniem molekularnym jest zespół Lyncha, dziedziczony autosomalnie dominująco, w którym dochodzi do mutacji genów odpowiedzialnych za rekonstrukcję DNA - naprawę niesparowanych zasad, takich jak MLH1, MSH2, MSH6 oraz PMS2. Zespół ten wiąże się ze zwiększonym prawdopodobieństwem występowania wielu nowotworów, w tym nowotworów układu pokarmowego. CRC związany z zespołem Lyncha stanowi 2-3% przypadków tego typu zmian (Resnick i in., 2009). Chorzy z zespołem Lyncha obarczeni są 50-70% ryzykiem zachorowania na raka jelita grubego (Sehgal i in., 2014). Do powstania raka jelita grubego predysponują także zespoły polipowatości. Najważniejszym z nich jest rodzinna polipowatość gruczolakowata (*ang.: familial adenomatous polyposis, FAP*), która spowodowana jest mutacją genu APC, na chromosomie 5q21, dziedziczona autosomalnie dominująco. Częstość występowania FAP wynosi ok. 1/8300 urodzeń, jednakże rak jelita grubego z nią związany stanowi mniej niż 1% przypadków tego nowotworu (Half i in., 2009). Morfologicznie polipowatość rodzinna charakteryzuje się obecnością bardzo licznych, nawet do kilku tysięcy, gruczolaków w okrężnicy i odbytnicy, pojawiających się u nastoletnich chorych, co wiąże się z niemal 100% ryzykiem rozwoju raka jelita grubego około czterdziestego roku życia (Carr & Kasi, 2020). Kolejną grupą zaburzeń mogących prowadzić do rozwoju raka jelita grubego jest polipowatość hamartomatyczna. Do tej kategorii należy zespół Peutza – Jeghersa, w którym dochodzi do mutacji w obrębie genu STK11. Zespół ten charakteryzuje się występowaniem przebarwień skóry i błony śluzowej oraz obecnością licznych polipów hamartomatycznych żołądka i jelit. Ryzyko wystąpienia nowotworu

złośliwego nie ogranicza się jedynie do raka jelita grubego, jednak w tym przypadku jest najwyższe i wynosi 39% (M. Wu & Krishnamurthy, 2022). Zespołem polipowatości hamartomatycznej jest również polipowatość młodzieńcza (*ang.: juvenile polyposis syndrome, JPS*). Zaburzenie jest dziedziczone autosomalnie dominująco, a mutacji ulega gen BMPR1A lub gen SMAD4, czego efektem jest obecność licznych polipów młodzieńczych przewodu pokarmowego. Ryzyko wystąpienia raka jelita grubego u chorych z polipowatością tego typu ocenia się na 39% (Brosens i in., 2011). Na tle wszystkich zespołów polipowatości wyróżnia się polipowatość związana z genem MUTYH (*ang.: MUTYH-associated polyposis, MAP*) ze względu na autosomalny recesywny mechanizm dziedziczenia powiązany ze wzrostem ryzyka rozwoju raka jelita grubego. Dochodzi w niej do mutacji genu MUTYH odpowiedzialnego za naprawę kwasu deoksyrybonukleinowego (*ang.: deoxyribonucleic acid, DNA*) (Tomlinson, 2015). Ryzyko powstania CRC szacuje się w takich przypadkach na 19-43% (Kidambi i in., 2019).

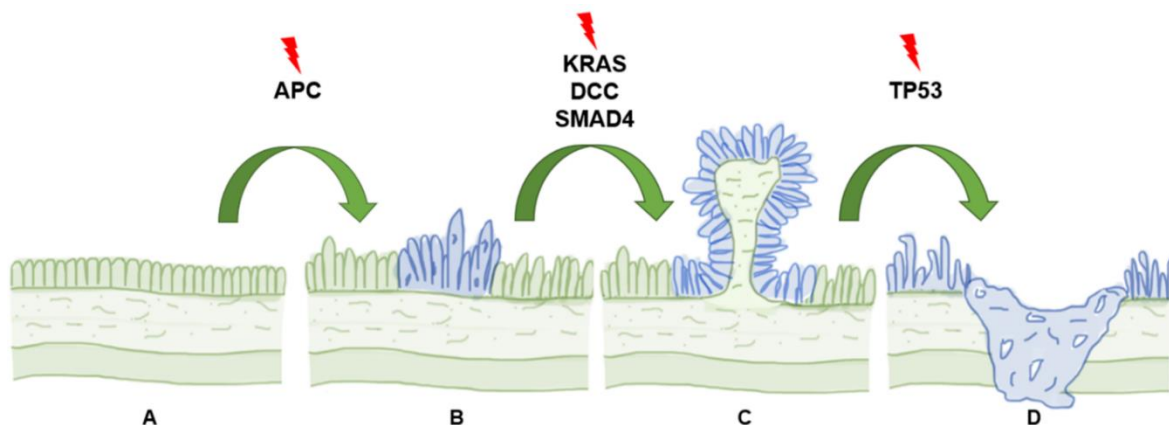
Podsumowanie dotyczące zespołów dziedzicznych zwiększających ryzyko rozwoju raka jelita grubego przedstawiono w tabeli 2.

**Tabela 2.** Podsumowanie informacji dotyczących zespołów zwiększających ryzyko rozwoju raka jelita grubego.

Nazwa zespołu		Gen ulegający mutacji	Sposób dziedziczenia	Ryzyko wystąpienia CRC
Zespół Lyncha		MLH1 MSH2 MSH6 PMS2	Autosomalny dominujący	50-70%
<b>Zespoły polipowatości</b>				
Rodzinna polipowatość gruczolakowata		APC	Autosomalny dominujący	100%
Polipowatość związana z genem MUTYH		MUTYH	Autosomalny recesywny	19-43%
Zespoły polipowatości hamartomatycznej	Zespół Peutza – Jeghersa	SKT11	Autosomalny dominujący	39%
	Polipowatość młodzieńcza	BMPR1A SMAD4	Autosomalny dominujący	39%

#### 1.1.4. Patogeneza raka jelita grubego

Patogeneza raka jelita grubego wiąże się przede wszystkim z klasyczną ścieżką gruczolak-gruczolakorak, w której w kilku mechanizmach dochodzi do zaburzenia prawidłowego rozwoju komórek, czego efektem jest powstanie i progresja nowotworu. Obserwuje się dużą heterogenność powyższego procesu. Zmiany genetyczne obserwowane są w obrębie genów supresorowych, takich jak gen APC, gen usunięty w raku jelita grubego (*ang.: deleted in colorectal carcinoma, DCC*), gen białka guza 53 (*ang.: tumor protein 53, TP53*), gen matki przeciwko homologowi dekapentapletycznemu 2 (*ang.: mothers against decapentaplegic homolog 2, SMAD2*) oraz SMAD4, protoonkogenach KRAS (*ang.: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), NRAS (*ang.: neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) oraz genach naprawy DNA, takich jak gen naprawy niesparowanych zasad (*ang.: mismatch repair, MMR*) oraz gen MUTYH (Arvelo i in., 2015). Najczęstsza sekwencja zaburzeń w patogenezie raka jelita grubego to akumulacja mutacji, obejmująca mutacje genu supresorowego APC a następnie mutacje genów KRAS, TP53, SMAD2 i SMAD4. Główną cechą tego szlaku jest niestabilność chromosomalna (*ang.: chromosomal instability, CIS*). Opisany ciąg zdarzeń ilustruje rycina 1. Drugim ze znanych szlaków jest szlak niestabilności mikrosatelitarnej (*ang.: microsatellite instability, MSI*), związany z mutacjami m.in. w obrębie homologu genu MLH 1 oraz MSH 2, odpowiedzialnych za naprawę niesparowanych zasad DNA, z następczą akumulacją mutacji, m.in. w obrębie genu BRAF (*ang.: V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*). Szlak ten jest charakterystyczny dla zmian ząbkowanych. W przypadku raka sporadycznego, większość, bo aż 85% przypadków wykazuje niestabilność chromosomalną, w pozostałe 15% niestabilnością mikrosatelitarną (Nguyen & Duong, 2018).



**Ryc. 1.** Klasyczna transformacja gruczolak-gruczolakorak w szlaku niestabilności chromosomalnej (mutacje genów APC, KRAS, DCC, SMAD4, TP53). Ilustracja wykonana przez autorkę.

**Legenda:** A – prawidłowa błona śluzowa jelita, B – początkowy okres rozwoju gruczolaka, C – zaawansowany okres rozwoju gruczolaka, D – gruczolakorak.

### 1.1.5. Obraz kliniczny raka jelita grubego

Objawy raka jelita grubego są niespecyficzne i często ujawniają się dopiero w zaawansowanej chorobie nowotworowej. Wśród dolegliwości najczęściej zgłaszanych przez pacjentów są obecność krwi w stolcu oraz ból brzucha. Inne objawy to zmiany w rytmie wypróżnień, zarówno biegunki jak i zaparcia, a w badaniach laboratoryjnych także niedokrwistość z niedoboru żelaza, klinicznie objawiającą się przewlekłym zmęczeniem i bladością wynikającą z utraty krwi (Holtedahl i in., 2021; Ploug i in., 2021). Ponadto stwierdza się różnice w objawach klinicznych CRC w zależności od pierwotnej lokalizacji zmiany. W przypadku guzów prawostronnych dominują objawy ogólne, takie jak anemia mikrocytarna, ciemne zabarwienie stolca, bóle brzucha oraz utrata masy ciała. W guzach zlokalizowanych w dystalnej części jelita grubego (lewostronnych) pacjenci zgłaszają głównie krwawienie z dolnego odcinka przewodu pokarmowego oraz zmianę rytmu wypróżnień, w rakach odbytnicy do objawów należy uczucie niepełnego wypróżniania, stolce ołówkowate oraz świeża krew w stolcu (Jassem & Kordek, 2019; J. Yang i in., 2016). Charakter objawów i ich pojawienie się w późnym okresie

choroby sprawia, że diagnoza stawiana jest dopiero w zaawansowanym stadium raka. Zjawisko to dotyczy również młodszych pacjentów (Berut i in., 2013). W takim przypadku guz może być nawet wyczuwalny podczas badania palpacyjnego jamy brzusznej. Wydaje się, że istnieje związek pomiędzy obecnością poszczególnych objawów z zaawansowaniem klinicznym nowotworu. Badania wykazały, że obecność krwi w stolcu była istotnie związana z niższym stopniem zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej (*ang.: stage*) wg systemu TNM (*ang.: Tumor-Node-Metastasis*), podczas gdy ból brzucha, objawy ogólne i stany ostre były związane z wyższym stagingiem (Alexiusdottir i in., 2012). Nie potwierdzono związku między czasem trwania objawów a lokalizacją nowotworu w obrębie jelita oraz stadium zaawansowania klinicznego choroby (Öztürk i in., 2019).

Uniwersalna ewaluacja stagingu przeprowadzana jest rutynowo w oparciu o system TNM, obejmuje ona: ocenę głębokości nacieku nowotworowego (T), zajęcia regionalnych węzłów chłonnych (N) oraz obecności przerzutów odległych (M), szczegóły przedstawiono w tabeli 3.

Elementy systemu TNM oceniane przez patomorfologa w badaniu mikroskopowym oznaczane są małą literą „p” poprzedzającą elementy akronimu (pTNM). Kategorie pT oraz pN odpowiadają tym z systemu klinicznego, natomiast w przypadku oceny przerzutów odległych, w odniesieniu do pM wyróżnia się jedynie pM1, oznaczającą przerzuty odległe potwierdzone w badaniu histopatologicznym. Ocena cech systemu TNM umożliwia określenie stopnia zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej u danego chorego, zgodnie z podziałem przedstawionym w tabeli 4.

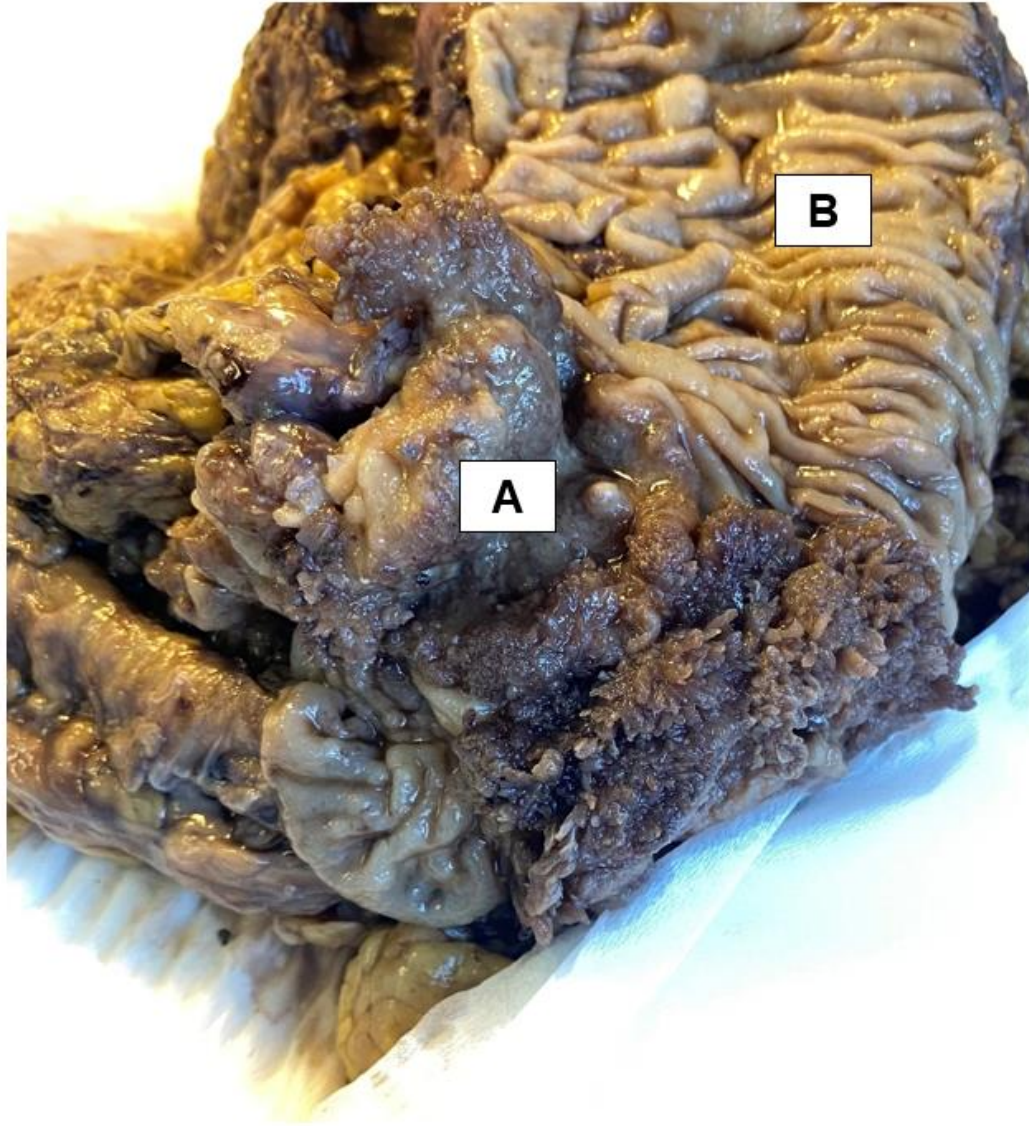
**Tabela 3.** TNM raka jelita grubego.

<b>Guz pierwotny (T)</b>		
<b>TX</b>		Guz pierwotny nie może być oceniony
<b>T0</b>		Brak cech guza pierwotnego
<b>Tis</b>		Rak in situ, wewnątrz nabłonka lub naciek blaszki właściwej błony śluzowej
<b>T1</b>		Guz nacieka warstwę podśluzówkową
<b>T2</b>		Guz nacieka mięśniówkę właściwą
<b>T3</b>		Guz nacieka warstwę podsurowiczą lub niepokryte otrzewną tkanki okołookrężnicze lub okołodbytnicze
<b>T4</b>	<b>T4a</b>	Guz powoduje perforację otrzewnej trzewnej
	<b>T4b</b>	Guz bezpośrednio nacieka inne narządy lub struktury anatomiczne
<b>Regionalne węzły chłonne (N)</b>		
<b>NX</b>		Regionalne węzły chłonne nie mogą być ocenione
<b>N0</b>		Brak przerzutu w regionalnych węzłach chłonnych
<b>N1</b>	<b>N1a</b>	Przerzut w 1 regionalnym węzle chłonnym
	<b>N1b</b>	Przerzut w 2-3 regionalnych węzłach chłonnych
	<b>N1c</b>	Depozyt nowotworowy (depozyty nowotworowe)
<b>N2</b>	<b>N2a</b>	Przerzuty w 4-6 regionalnych węzłach chłonnych
	<b>N2b</b>	Przerzuty w co najmniej 7 regionalnych węzłach chłonnych
<b>Przerzuty odległe (M)</b>		
<b>M0</b>		Przerzut odległy nieobecny
<b>M1</b>	<b>M1a</b>	Przerzuty ograniczone do jednego narządu
	<b>M1b</b>	Przerzuty w więcej niż jednym narządzie bez przerzutów do otrzewnej
	<b>M1c</b>	Przerzuty do otrzewnej z lub bez zajęcia innych narządów

**Tabela 4.** Stopnie zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej (stage) w przypadku raka jelita grubego.

Stage		Cechy TNM
0		TisN0M0
I		T1-2N0M0
II	IIA	T3N0M0
	IIB	T4aN0M0
	IIC	T4bN0M0
III	IIIA	T1-2N1M0 lub T1N2aM0
	IIIB	T3-4aN1M0 lub T2-3N2aM0 lub T1-2N2bM0
	IIIC	T4aN2aM0 lub T3-4aN2bM0 lub T4bN1-2M0
IV	IVA	Każde T, każde N, M1a
	IVB	Każde T, każde N, M1b
	IVC	Każde T, każde N, M1c

Obraz makroskopowy raka jelita grubego jest zróżnicowany. Obserwuje się guzy egzofityczne, guzy o wzroście okrężnym oraz typ wrzodziejący. Obecność nowotworu często prowadzi do zwężenia światła jelita. Guzy zlokalizowane proksymalnie częściej wykazują wzrost egzofityczny, natomiast te o lokalizacji dystalnej mają tendencję to przyjmowania form endofitycznych lub okrężnych (Aaltonen i in., 2000). Przykładowy obraz makroskopowy raka jelita grubego o wzroście egzofitycznym przedstawiono na fotografii 1.



**Fot. 1.** Obraz makroskopowy raka jelita grubego. Zdjęcie z archiwum autorki.  
**Legenda:** A – guz; B – jelito makroskopowo bez zmian.

W obrazie mikroskopowym dominuje rak gruczołowy (*adenocarcinoma NOS* wg WHO) stanowiący 90% wszystkich przypadków. W badaniu histopatologicznym oceniany jest także stopień złośliwości histologicznej nowotworu (*ang.: grade*). Uprzedni, trójstopniowy grading raka jelita grubego został obecnie zastąpiony dwustopniowym. Podział na raki o niskim stopniu złośliwości - low-grade (dawnej

określane jako dobrze i średnio zróżnicowane) oraz o wysokim stopniu złośliwości - high-grade (dawnej raki słabo zróżnicowane) dokonywany jest w oparciu o ocenę histoformatywności. Obecność struktur gruczołowych w 50% utkania nowotworu lub więcej pozwala na zakwalifikowanie zmiany jako raka o niskim stopniu złośliwości, natomiast poniżej 50% odpowiada wysokiemu stopniowi złośliwości.

#### **1.1.6. Badania przesiewowe i diagnostyka raka jelita grubego**

Głównym celem badań przesiewowych jest zmniejszenie umieralności, a kandydatami do ich przeprowadzenia pacjenci bez objawów choroby z największym ryzykiem wystąpienia raka jelita grubego (Jassem & Kordek, 2019). Screening oparty jest o wykonywane raz do roku badania na krew utajoną w kale, zalecane osobom powyżej 50. roku życia. Jest to prosty i możliwy do wykonania przez pacjenta samodzielnie w warunkach domowych test. Należy zauważyć, że badanie to daje pozytywny wynik nie tylko w przypadkach istnienia raka jelita grubego, ale także u chorych z krwawieniem w przewodzie pokarmowym na innym tle oraz w innych sytuacjach np. w związku z przyjmowaniem leków przeciwkrzepliwych. Ponadto dodatni test choć potwierdza obecność krwi, nie umożliwia lokalizacji źródła krwawienia, więc w przypadku pozytywnego wyniku konieczne są dalsze badania. Pomimo tych ograniczeń wprowadzenie testu na krew utajoną jako badania przesiewowego w kierunku raka jelita grubego zaowocowało spadkiem umieralności z powodu tego nowotworu o 16% (Jassem & Kordek, 2019).

W przypadku pojawienia się objawów nasuwających podejrzenie istnienia raka jelita grubego istotne jest jak najszybsze rozpoczęcie diagnostyki. Wykonane badania *per rectum* w podstawowej opiece zdrowotnej, u pacjentów z guzem odbytnicy, charakteryzuje się czułością 0,762 oraz swoistością 0,917 (Ang i in., 2008). Negatywnym wynikiem takiego badania nie jest jednoznaczny z brakiem procesu nowotworowego i konieczne jest wykorzystanie dodatkowych narzędzi (Jassem & Kordek, 2019).

Metodą, rutynowo wykorzystywaną w diagnostyce raka jelita grubego, jest badanie endoskopowe. Wykonanie kolonoskopii służącej ocenie zarówno odbytnicy, jak i okrężnicy, jest określane złotym standardem w diagnostyce CRC (Vega i in., 2015). Do stosowanych badań endoskopowych należą również sigmoidoskopia (ocena końcowych 60cm jelita grubego) oraz rektoskopia (ocena odbytnicy). Zaletą badań endoskopowych jest możliwość pobrania materiału do badań histopatologicznych.

W Polsce od roku 2000 istnieje „Program badań przesiewowych raka jelita grubego”, będący przykładem prewencji wtórnej, oparty na profilaktycznych badaniach kolonoskopowych, których celem jest wykrycie stanów przedrakowych oraz raka jelita grubego na wczesnym etapie rozwoju, a co za tym idzie wczesne wdrożenie leczenia i w konsekwencji poprawę wskaźników przeżywalności i zmniejszenie umieralności (Klimczak i in., 2014). Pomimo niepodważalnych korzyści, nadal co najmniej 40% osób kwalifikujących się do programu z uwagi na wiek, nie bierze udziału w badaniach przesiewowych (Bray i in., 2017). W przeprowadzonych badaniach, wśród grupy pacjentów z CRC, wykazano, że świadomość na temat dostępności badań przesiewowych jest wyższa wśród kobiet, ale maleje wraz ze wzrostem wieku wśród wszystkich pacjentów (Dziki i in., 2015). Tymczasem udokumentowano, że jednorazowe przeprowadzenie kolonoskopii zmniejsza umieralność z powodu raka jelita grubego o 80% (Jassem & Kordek, 2019).

Do badań obrazowych wykorzystywanych w diagnostyce raka jelita grubego zalicza się ultrasonografię przezodbytniczą, tomografię komputerową oraz rezonans magnetyczny miednicy, będący najdokładniejszym narzędziem oceny zaawansowania raka odbytnicy. Wykorzystuje się także badania radiologiczne metodą podwójnego kontrastu, polegające na podaniu środka kontrastującego (baryt) oraz gazu do światła jelita (Jassem & Kordek, 2019).

Do markerów raka jelita grubego zalicza się czynniki w surowicy krwi oraz markery wykrywane bezpośrednio w tkankach. Do pierwszej grupy należą antygen rakowo- płodowy (*ang.: carcinoembryonic antygen, CEA*), antygen węglowodanowy 19-9, (*ang.: carbohydrate antygen 19-9, CA19-9*), antygen węglowodanowy 72-4

(ang.: *carbohydrate antigen 72-4, CA72-4*) oraz antygen węglowodanowy 125 (ang.: *carbohydrate antigen 125, CA125*). Do markerów tkankowych zaliczamy występowanie niestabilności mikrosatelitarnej, a także mutacje genów KRAS i BRAF.

Najszerzej stosowanym markerem jest CEA, badany w surowicy krwi. Po raz pierwszy opisali i wyizolowali go z komórek raka jelita grubego Gold i Freedman w roku 1965 (Gold & Freedman, 1965). Jest to glikoproteina związana nie tylko z rozwojem płodowym, ale również występująca w komórkach nowotworowych (Gan i in., 2011). Nie jest jednak markerem specyficznym dla raka jelita grubego, jego podwyższony poziom obserwuje się również w innych nowotworach, szczególnie wywodzących się z przewodu pokarmowego, ale także w procesach zapalnych, jak np.: wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego, zapaleniu płuc wywołanym infekcją drugim koronawirusem ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang.: *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2*) oraz u palaczy papierosów (Gardner i in., 1978; Sajid i in., 2007; C. Yang i in., 2020). Z tego powodu zastosowanie CEA jest ograniczone głównie do planowania i monitorowania leczenia oraz wykrywania choroby po leczeniu u bezobjawowych pacjentów, np. pojawienia się przerzutów odległych (Duffy, 2001; Hall i in., 2019). U około 70-85% pacjentów z guzami jelita grubego to właśnie wzrost CEA jest pierwszą oznaką nawrotu nowotworu (Ballesta i in., 1995; Konishi i in., 2018). Kolejny z markerów jest głównie kojarzony z rakiem trzustki, ale pomiar jego stężenia znalazł również zastosowanie w przypadku raka jelita grubego. CA19-9 jest glikoproteina, która może wchodzić w skład błony komórki nowotworowej lub może być wydzielana do krwi. CA19-9 wykorzystywany jest do monitorowania skuteczności leczenia, jednak podobnie jak CEA, nie jest specyficzny dla konkretnego narządu lub typu histologicznego nowotworu (Partyka i in., 2010). CA19-9 może również służyć jako dodatkowy marker do śledzenia procesu chorobowego u pacjentów z rakiem jelita grubego, u których nie obserwuje się wzrostu poziomu CEA (Stiksma i in., 2014). Zarówno CEA jak i CA19-9 są antygenami nowotworowymi, które są późnymi markerami kancerogenezy, ze znacznie podwyższonymi stężeniami w surowicy w przypadku raka jelita grubego

z przerzutami (Vukobrat-Bijedic i in., 2013). Jednoczesne wykorzystanie obydwu markerów może zwiększyć czułość przeprowadzanych oznaczeń. Kolejnym ze znanych markerów jest CA72-4, będący glikoproteiną znajdującą się na powierzchni komórek nowotworowych, obecnych w licznych narządach, takich jak jelito grube, jajnik, trzustka oraz żołądek (Yanqing i in., 2018). W przypadku raka jelita grubego wzrost poziomu CA72-4 występuje w 25% przypadków (Carpelan-Holmström i in., 2002). Kolejnym z szeroko stosowanych markerów nowotworowych jest CA125, to glikoproteina głównie kojarzona z rakiem jajnika. Znalazła jednak swoje zastosowanie również w przypadku nowotworów przewodu pokarmowego, w tym raka jelita grubego. Wykorzystywana jest m. in. do oceny rozsiewu nowotworowego do otrzewnej, gdzie wydaje się być skuteczniejsza niż CEA (C.-J. Huang i in., 2016). Celowym wydaje się ustalenie, który z markerów jest najbardziej użyteczny i przyniesie najwięcej korzyści pacjentom z CRC. Badania pokazują, że przy użyciu pojedynczego markera największą czułość wykazuje CEA, przed CA72-4, CA19-9 i CA125. Przy łączeniu markerów nowotworowych na szczycie listy występuje skojarzone wykorzystanie CEA z CA72-4 (Gao i in., 2018).

Do markerów tkankowych, które znalazły zastosowanie w raku jelita grubego należy niestabilność mikrosatelitarna. Według definicji jest to zmiana zachodząca w niektórych komórkach (takich jak komórki rakowe), w których liczba powtórzonych zasad DNA w mikrosatelicie (krótka, powtórzona sekwencja DNA) różni się od tej, jaka miała miejsce w momencie dziedziczenia mikrosatelity<sup>1</sup>. Około 15-20% raków jelita grubego wykazuje niestabilność mikrosatelitarną (Nojadeh i in., 2018), a stwierdzenie jej obecności wpływa nie tylko na wybór metody leczenia, ale również na rokowanie (Halling i in., 1999; Koenig i in., 2019; Thibodeau i in., 1993). Kolejnym z markerów tkankowych jest mutacja genu KRAS, który należy do grupy onkogenów. U pacjentów z rakiem jelita grubego jest spotykana w około 30-40% przypadków. Obecność nieprawidłowego białka K-RAS prowadzi do oporności nowotworu na wybrane strategie terapeutyczne (Dinu i in., 2014). Do pozostałych

---

<sup>1</sup><https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/microsatellite-instability>,  
16.01.2021

markerów tkankowych zalicza się mutację genu BRAF, występującą u około 10% chorych i definiującą określony podtyp, charakteryzujący się złym rokowaniem, z medianą przeżycia poniżej 12 miesięcy, m. in. z powodu dużego stopnia oporności na przeciwciała monoklonalne przeciwko receptorowi nabłonkowego czynnika wzrostu (*ang.: epidermal growth factor receptor, EGFR*) (Caputo i in., 2019; Lech i in., 2016).

Poszukiwanie i oznaczanie markerów nowotworowych, zarówno tkankowych jak i obecnych w surowicy krwi pozwala wybrać odpowiednią strategię terapeutyczną, określić rokowanie oraz na wczesnym etapie wychwycić nawrót choroby. Należy jednak pamiętać, że żaden z nich nie jest narzędziem idealnym.

Proces diagnostyczny w przypadku raka jelita grubego często w praktyce jest długotrwały, a droga od zauważenia pierwszych symptomów, poprzez badanie lekarskie u lekarza podstawowej opieki zdrowotnej i specjalisty zajmującego się rakiem jelita grubego, oczekiwanie na odpowiednie procedury i testy diagnostyczne, po ocenę histopatologiczną, powinna być możliwie jak najkrótsza, aby nie powodować dodatkowych opóźnień w rozpoczęciu leczenia (Vega i in., 2015).

### **1.1.7. Leczenie raka jelita grubego**

Wybór sposobu leczenia pacjentów z rakiem jelita grubego zależy od stopnia zaawansowania choroby nowotworowej, lokalizacji guza i obecności określonych mutacji.

Złotym standardem i podstawową metodą leczenia jest operacja chirurgiczna (Matsuda i in., 2018; Rentsch i in., 2016). Radykalna procedura polega na wycięciu guza wraz z częścią prawidłowego jelita oraz krezką, a w przypadkach raka odbytnicy także mezorektum (Jassem & Kordek, 2019). Może zostać ona wykonana techniką otwartą lub metodą laparoskopową. Wykazano, że leczenie laparoskopowe sprzyja krótszej hospitalizacji, wcześniejszemu powrotowi prawidłowego rytmu wypróżnień oraz zmniejsza ryzyko zakażeń operowanej okolicy (Chung i in., 2021; Y.-M. Huang i in., 2020; Park i in., 2020). Wykorzystanie metody

laparoskopowej przez doświadczonego chirurga, przestrzegającego standardów chirurgii onkologicznej, zostało określone przez ekspertów mianem najlepszej praktyki (Lorenzon i in., 2018). Wielkość oraz lokalizacja guza wpływają na rozległość resekcji. W przypadku niewielkich zmian wystarczające może okazać się wycięcie z odpowiednim marginesem tkanek zdrowych, jednak w przypadku dużych guzów zabieg będzie zdecydowanie bardziej rozległy. Przykładem takiej operacji jest kolektomia, całkowita lub częściowa. Kolektomia całkowita polega na resekcji okrężnicy w całości, a wskazaniami do jej wykonania jest współistnienie z rakiem chorób z grupy IBD, FAP, zespołu Lyncha, guzów synchronicznych i stanów nagłych (Carlomagno i in., 2014). Do kolektomii częściowej zalicza się hemikolektomię prawostronną, w której resekcji podlega końcowa część jelita cienkiego, kątnica, wstępnica, 1/3 poprzecznicy, hemikolektomię lewostronną, która obejmuje 1/3 poprzecznicy oraz zstępicę, ponadto przeprowadza się resekcję poprzecznicy, sigmoidektomię, gdzie resekcji podlega okrężnica esowata, resekcję przednią odbytnicy oraz amputację brzuszno-kroczową odbytnicy z wyłonieniem stałej przetoki jelitowej (Jassem & Kordek, 2019). W niektórych przypadkach wskazane może być wykonanie proktokolektomii, będącej wycięciem okrężnicy wraz z odbytnicą, szczególnie u pacjentów z UC, u których wystąpił rak jelita grubego (M'Koma i in., 2011). Podczas operacji należy również usunąć regionalne węzły chłonne. Jeśli choroba nowotworowa jest rozsiana, a przerzuty znajdują się w wątrobie lub płucach podejmuje się próbę ich resekcji. Wycięcie tych zmian stanowi jedyną szansę dla chorego na przeżycie w dłuższej perspektywie. Celem operacji usunięcia przerzutów jest wycięcie wszystkich ognisk z ujemnym marginesem histologicznym przy zachowaniu wystarczającego funkcjonalnego miąższu wątroby (Akgül i in., 2014). Takie same zasady dotyczą przerzutów zlokalizowanych w płucach (Guerrera i in., 2016). W sytuacji, w której wykonanie resekcji guza nie jest możliwe, wykonywane są zabiegi paliatywne, mające na celu poprawę jakości życia pacjentów oraz zapobiegające krwawieniom i niedrożnościom.

Chemioterapia należy to metod leczenia systemowego raka jelita grubego i może być stosowana jako leczenie uzupełniające, po wykonaniu resekcji

chirurgicznej, standardowo u pacjentów w stopniu III wg TNM lub też jako terapia neoadjuwantowa. Chemioterapia uzupełniająca jest stosowana u chorych po radykalnej resekcji chirurgicznej nowotworu i ma na celu zniszczenie komórek nowotworowych, które pozostały w organizmie pacjenta i zapobiegnięciu wytworzenia przerzutów. Ze względu na szereg działań niepożądanych związanych ze stosowaniem chemioterapii, decyzja o jej włączeniu powinna być oparta na dokładnej ocenie ryzyka oraz stopnia zaawansowania nowotworu. Korzyści wynikające z chemioterapii uzupełniającej zostały wykazane u chorych z III stadium klinicznego zaawansowania choroby (T. André i in., 2004), nie jest jednak pewne, czy jej stosowanie powinno być również standardem u chorych z II stopniem klinicznego zaawansowania nowotworu (Jalaeikhoo i in., 2019). Do leków stosowanych podczas chemioterapii należą 5-fluorouracyl, kapacytabina, oksaliplatyna oraz irinotekan, podawane w ściśle określonych schematach. Chemioterapia neoadjuwantowa w przypadku miejscowo zaawansowanego raka okrężnicy może potencjalnie prowadzić do zmniejszenia guza, eradykacji mikroprzerzutów i zapobiegania złuszczeniu się komórek guza podczas operacji, a pacjenci z zaawansowaną chorobą nowotworową wykazują lepsze wskaźniki przeżycia w porównaniu z pacjentami leczonymi chemioterapią uzupełniająca (de Gooyer i in., 2020 Dehal i in., 2018; Jakobsen i in., 2015). U chorych, u których wyleczenie nie jest możliwe, stosowana jest chemioterapia paliatywna, która ma na celu wydłużenie czasu przeżycia oraz poprawę jego jakości. Zawsze konieczna jest indywidualna ocena ryzyka nawrotu choroby nowotworowej i podjęcie decyzji o wdrożeniu chemioterapii, czasie jej trwania oraz stosowanych schematach leczenia.

Kolejną z metod leczenia raka jelita grubego jest radioterapia, która wykorzystywana jest szczególnie w przypadku raka odbytnicy. Adjuwantowa radioterapia po miejscowym wycięciu może zmniejszyć ryzyko wznowy, a jednocześnie zachować korzyści płynące z miejscowego wycięcia z zachowaniem odbytnicy (Jones & Cunningham, 2019).

Ważną rolę w leczeniu raka jelita grubego odgrywa obecnie leczenie biologiczne. Ta metoda terapeutyczna bezpośrednio oddziałuje na układ

odpornościowy gospodarza, a stosowane substancje powstają dzięki wykorzystaniu inżynierii genetycznej (Eisenberg, 2012). Wśród stosowanych leków wymienić należy panitumumab, który jest przeciwciałem anty-EGFR. Jest skutecznym sposobem leczenia przerzutowego raka okrężnicy i odbytnicy KRAS wild-type (Duan & Wang, 2019). Kolejnym lekiem stosowanym u pacjentów z rakiem jelita grubego jest cetuksymab. To rekombinowane chimeryczne przeciwciało monoklonalne immunoglobuliny G1 (*ang.: immunoglobulin G1, IgG1*) jest inhibitorem receptora naskórkowego czynnika wzrostu. Jest on wdrażany u chorych z przerzutowym rakiem jelita grubego wild-type z ekspresją EGFR (Fornasier i in., 2018). Do grupy leków biologicznych należy również bewacyzumab. Odgrywa on istotną rolę w leczeniu przerzutowego raka jelita grubego. Jest to przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko czynnikowi wzrostu śródbłonna naczyniowego (*ang.: vascular endothelial growth factor, VEGF*) (Rosen i in., 2017). Badania wykazały, że zastosowanie bewacyzumabu w raku jelita grubego jest skuteczne i bezpieczne (Qu i in., 2015). Jego użycie wykazało korzyści w zakresie przeżycia po dodaniu do chemioterapii u pacjentów z przerzutowym rakiem okrężnicy (Jang i in., 2017).

Ze względu na szerokie spektrum opcji terapeutycznych, wybór odpowiedniej metody leczenia powinien być dobrany indywidualnie (Augestad i in., 2017).

### **1.1.8. Czynniki rokownicze w raku jelita grubego**

Rokowanie w przypadku raka jelita grubego opiera się przede wszystkim na ocenie klinicznego zaawansowania choroby nowotworowej według systemu TNM zgodnie ze standardami Międzynarodowej Unii do Walki z Rakiem (*ang.: Union for International Cancer Control, UICC*) i Amerykańskiego Wspólnego Komitetu ds. Raka (*ang.: American Joint Committee on Cancer, AJCC*). W ostatnim dziesięcioleciu przeżycie pacjentów z zaawansowanym, przerzutowym rakiem jelita grubego znacząco się poprawiło, co zawdzięczamy pojawieniu się nowych leków i terapii celowanych. Mediana całkowitego przeżycia wzrosła z około 12 miesięcy

w połowie lat dziewięćdziesiątych do około 30 miesięcy w latach dwutysięcznych (De Divitiis i in., 2014).

Czynnikami prognostycznymi ocenianymi w badaniu mikroskopowym są głębokość naciekania (pT), status węzłów chłonnych (pN), stopień histologicznej złośliwości guza (*grade*) oraz naciekanie naczyń (Zlobec & Lugli, 2008). W ocenie histopatologicznej znaczenie mają nie tylko typ i podtyp nowotworu oraz jego histoformatywność, ale również obecność komórek syngnetowatych, których ujawnienie pogarsza rokowanie (Makino i in., 2006). Jednym z najnowszych czynników prognostycznych ewaluowanych w badaniu mikroskopowym jest ocena radialnego marginesu resekcji chirurgicznej.

Lokalizacja guza pierwotnego ma istotne znaczenie rokownicze. Nowotwory o umiejscowieniu lewostronnym rokują lepiej niż zlokalizowane po stronie prawej (Cai i in., 2018; Zheng i in., 2019). W przypadku lokalizacji raka w prawej części jelita grubego wiek pacjentów jest wyższy, a wymiary guza większe. Stwierdzano również więcej węzłów chłonnych z przerzutami (Mik i in., 2017).

Wiele markerów obecnych w tkankach (KRAS, BRAF, niestabilność mikrosatelitarna) ocenia się z wykorzystaniem technik biologii molekularnej. Mają one istotne znaczenie i korelują z cechami histologicznymi u części chorych (Compton, 2003; Marzouk & Schofield, 2011; I. H. Song i in., 2019; Washington, 2008).

W ostatnich latach poszukiwanie potencjalnych powiązań między ekspresją białek a rozwojem nowotworów, ich odpowiedzią na stosowaną terapię i rokowaniem stało się dynamicznie rozwijającym się obszarem wiedzy. W przypadku nowotworów złośliwych, w tym także raka jelita grubego na znaczeniu zyskują badania określające ekspresję poszczególnych białek w komórkach nowotworu i tkankach go otaczających. Zbadano m. in. status ekspresji i znaczenia klinicznego białka, będącego homologiem fosfatazy i tensyny (*ang.: phosphatase and tensin homolog, PTEN*) oraz keratyny 15 (*ang.: keratin 15, KRT15*) i wykazano, że białka te mogą być przydatnym markerem prognostycznym w CRC (Rao i in., 2020; Zhang i in., 2017).

## 1.2. BIAŁKA WYKORZYSTANE W BADANIU

### 1.2.1. PD-1

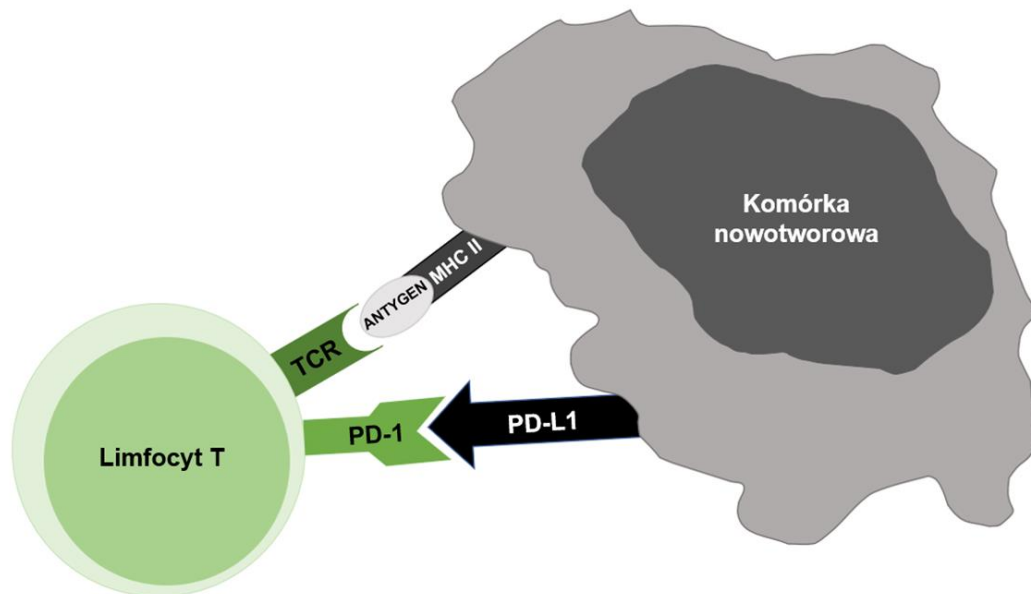
Białko programowanej śmierci – 1 (PD-1) jest immunoreceptorem należącym do rodziny antygeny różnicowania komórkowego 28 (*ang.: cluster of differentiation 28, CD28*) / antygeny - 4 cytotoksycznych limfocytów T (*ang.: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4*), kodowany jest przez gen białka programowanej śmierci komórkowej 1 (*ang.: programmed cell death protein 1, PDCD1*), o locus 2q37.3 (Ishida i in., 1992; Okazaki & Honjo, 2007; Shinohara i in., 1994). Białko PD-1 posiada dwa ligandy: ligand programowanej śmierci – 1 (*ang.: programmed death ligand-1, PD-L1*) oraz ligand programowanej śmierci – 2 (*ang.: programmed death ligand-2, PD-L2*). Jest ono odpowiedzialne za regulację odpowiedzi immunologicznej poprzez hamowanie proliferacji limfocytów T, wytwarzania interferonu gamma (*ang.: interferon gamma, INF- $\gamma$* ), interleukiny-2 (*ang.: interleukin-2, IL-2*) oraz interleukiny-10 (*ang.: interleukin-10, IL-10*). Mechanizm ten chroni przed występowaniem chorób autoimmunologicznych, a sama cząsteczka PD-1 pełni rolę immunologicznego punktu kontrolnego (Jiang i in., 2019). Szlak PD-1/PD-L1 jest wykorzystywany przez komórki nowotworowe dla osłabienia odpowiedzi immunologicznej organizmu - jego aktywacja prowadzi do utrzymania się przewlekłej infekcji i rozwoju choroby nowotworowej (Keir i in., 2008). Ekspresja białka PD-1, będącego członkiem nadrodziny białek immunoglobulinopodobnych, jest szczególnie widoczna na aktywowanych limfocytach T, limfocytach B oraz monocytach. Ekspresja PD-1 na komórkach T i B reguluje tolerancję obwodową i autoimmunizację (Kuol i in., 2018). Duże zainteresowanie wzbudzają badania roli białka PD-1 w chorobie nowotworowej oraz możliwości terapii nowotworów złośliwych za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko receptorowi PD-1. Za badania dotyczące terapii nowotworów złośliwych poprzez hamowanie negatywnej regulacji immunologicznej, w tym blokady receptora PD-1 przyznano w roku 2018 Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny Jamesowi Allisonowi oraz Tasuku Honjo.

Podwyższona ekspresja PD-1 została zaobserwowana na nieprawidłowych komórkach T, znajdujących się w mikrośrodowisku guza (Meng i in., 2018). Komórki nowotworów złośliwych mogą unikać oraz osłabiać odpowiedź immunologiczną poprzez aktywację immunologicznych białek punktów kontrolnych, w tym PD-1 oraz PD-L1. Zablokowanie aktywności tych białek przeciwciałami monoklonalnymi, a tym samym przywrócenie funkcji komórek T, przyczyniło się do powstania przełomowych terapii przeciwnowotworowych (Zak i in., 2017). Badania przeprowadzano m. in. u chorych z rakiem drobnokomórkowym płuca, czerniakiem oraz rakiem nerkowokomórkowym nerki (Topalian i in., 2012). Wykorzystanie przeciwciał w terapii przeciwnowotworowej znalazło zastosowanie w obecnej praktyce klinicznej (Meng i in., 2018; Naidoo i in., 2015). W literaturze obecne są jedynie nieliczne badania na temat roli białka PD-1 w raku jelita grubego, a ich wyniki nie są jednoznaczne (Wyss i in., 2019; Yaghoubi i in., 2019).

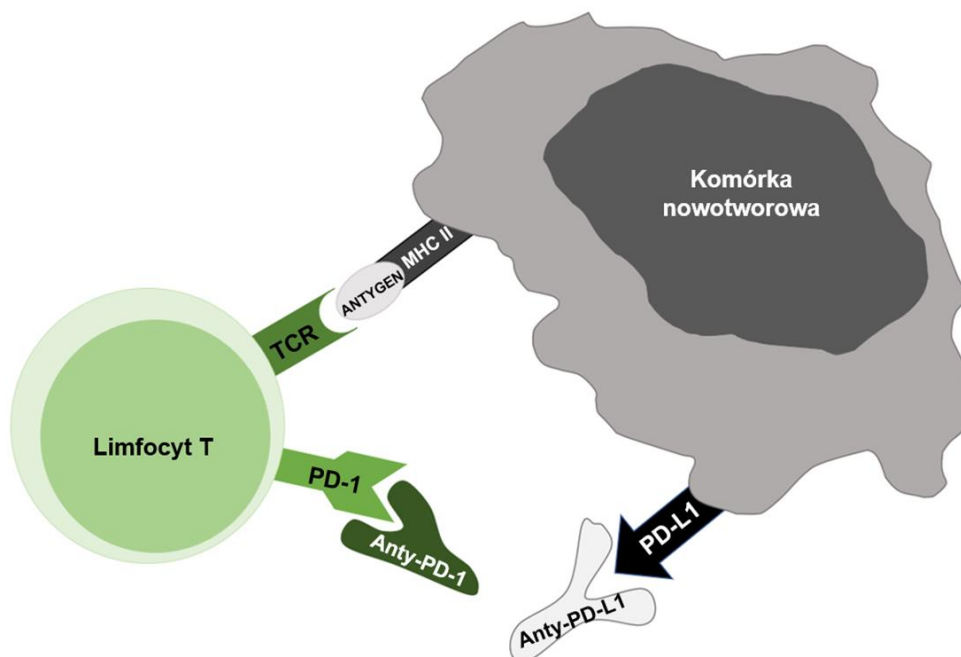
### 1.2.2. PD-L1

Ligand programowanej śmierci – 1 (*ang.: programmed death ligand-1, PD-L1*) jest najważniejszym ligandem białka PD-1 (De Sousa Linhares i in., 2019). Kodowany jest przez gen antygeny różnicowania komórkowego 274 (*ang.: cluster of differentiation 274, CD274*), o locus 9p24.1. Jest białkiem błony komórkowej, które po związaniu się z cząsteczką PD-1, prowadzi do zahamowania proliferacji limfocytów T. W warunkach fizjologicznych interakcja PD-1/PD-L1 jest kluczowa w rozwoju tolerancji immunologicznej poprzez regulację aktywności limfocytów T, która zapobiega nadmiernej aktywacji komórek układu odpornościowego, która z kolei może prowadzić do niszczenia tkanek i autoimmunizacji (Kythreotou i in., 2018). Ekspresja cząsteczki PD-L1 obserwowana jest na komórkach nowotworowych i prowadzi do unikania przez nie układu odpornościowego. Białko PD-L1 wchodzi w interakcję z cząsteczką PD-1 na limfocytach T, co sprawia, że nie atakują one komórek nowotworowych, a sam guz może wzrastać bez przeszkód (Kythreotou i in., 2018; Wei i in., 2019). Interakcję pomiędzy układem

odpornościowym a komórką nowotworową przedstawiono na rycinie 2 oraz rycinie 3. Ostatnie badania wykazały, że komórki nowotworowe wykazują wysoki poziom ekspresji PD-L1, który ma działanie immunosupresyjne i może powodować niepowodzenie terapeutyczne (Sun i in., 2020). Zrozumienie wyżej wymienionych mechanizmów umożliwiło wprowadzenie terapii opartych na stosowaniu przeciwciał przeciw cząsteczkom szlaku PD-1/PD-L1. Badania ekspresji białek szlaku PD-1/PD-L1 prowadzono w wielu nowotworach, m. in. w czaszko gardłaku, raku płaskonabłonkowym głowy i szyi związanym z infekcją wirusem brodawczaka ludzkiego (*ang.*: Human Papillomavirus, *HPV*), chłoniakach, szpiczaku mnogim, raku piersi, płuca, tarczycy, jajnika, szyjki macicy, języka i czerniaku (Abiko i in., 2015; Ahn i in., 2017; Audrito i in., 2017; Coy i in., 2018; W.-J. Li i in., 2018; Lyford-Pike i in., 2013; Saglam & Conejo-Garcia, 2018; Santini & Hellmann, 2018; Schütz i in., 2017; Tamura i in., 2020; Yoshida i in., 2018). Należy jednak pamiętać, że oś PD-1/PD-L1 nie odgrywa roli tylko i wyłącznie w chorobie nowotworowej. Badania prowadzono również w przypadku choroby Pageta (Mauzo i in., 2019) oraz autoimmunologicznych chorobach tarczycy (Álvarez-Sierra i in., 2019). Przeciwciała blokujące szlak PD-1/PD-L1 dostarczają nowych narzędzi w terapii pacjentów z bardzo zróżnicowanym spektrum zaburzeń.



**Ryc. 2.** Oś PD-1/PD-L1 na przykładzie komórki nowotworowej oraz limfocyty T. Receptor limfocyty T (ang.: *T-cell receptor*, *TCR*). Główny układ zgodności tkankowej (ang.: *major histocompatibility complex II*, *MHC II*). Ilustracja wykonana przez autorkę.



**Ryc. 3.** Zablokowanie szlaku PD-1/PD-L1 za pomocą przeciwciał przeciw PD-1 oraz PD-L1 w chorobie nowotworowej. Ilustracja wykonana przez autorkę.

## 1.3. SPEKTROMETRIA MAS

### 1.3.1. Historia spektrometrii mas

Spektrometria mas (*ang.*: *mass spectrometry, MS*) jest techniką analityczną, która opiera się na pomiarze stosunku masy do ładunku jonów. Początki spektrometrii mas sięgają drugiej połowy XIX wieku. W roku 1886 niemiecki fizyk, Eugene Goldstein, w swoim laboratorium w Berlinie, odkrył promieniowanie anodowe (kanalikowe). Odkrycie to zapoczątkowało serię dalszych badań, w tym prowadzonych przez Wilhelma Wiena, niemieckiego fizyka, laureata Nagrody Nobla w dziedzinie fizyki w 1911r. Zaobserwował on, że promieniowanie anodowe ulega odchyleniu w polu magnetycznym, co pozwala na badanie jego zachowań z wykorzystaniem efektów magnetycznych i pola elektrycznego. Badacz ten stworzył urządzenie, nazwane później separatorem Wiena, które umożliwiało rozdzielanie jonów w zależności od ich masy oraz ładunku. Kolejnym naukowcem związanym z historią spektrometrii mas jest Sir Joseph John Thomson, który przeprowadzał pomiary mas cząsteczek obdarzonych ładunkami, co zaowocowało odkryciem elektronu, a samemu naukowcowi przyniosło Nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki w roku 1906. Thomson zauważył także możliwość odchylenia wiązki elektronów przez pole elektrostatyczne, co umożliwiło stworzenie prekursora współczesnego spektrometru mas, nazwanego przez jego twórcę, spektrografem masowym. Dzięki temu urządzeniu, w roku 1913, Thomson odkrył izotopy neonu. Współpracownik Thomsona, Francis William Aston, udoskonalił spektrograf masowy, w wyniku czego powstał spektrometr mas o dużej rozdzielczości, który pozwalał na badanie izotopów oraz dokładne określenie stosunku masy do ładunku (*ang.*: *mass-to-charge ratio, m/z*). Za swoje badania Aston otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii w 1922 roku. Równoległe i niezależnie do Astona, swoje badania prowadził amerykański fizyk, Arthur Jeffrey Dempster. Udoskonalił on analizator magnetyczny w spektrografie masowym oraz opracował technikę jonizacji elektronami (*ang.*: *electron ionization, EI*).

Początkowo spektrometria mas wykorzystywana była przede wszystkim do określania izotopów pierwiastków chemicznych. Sam Aston powiedział: „Po określeniu wszystkich izotopów pierwiastków chemicznych w układzie okresowym, nie będzie już potrzeby wykorzystania spektrometrii mas” (Sparkman, 2000). Dzisiaj wiemy jednak, jak bardzo się mylił. Thomson, Aston i Dempster uważani są za ojców spektrometrii mas, jednak w kolejnych dziesięcioleciach metoda ta ulegała dalszym udoskonaleniom. W latach czterdziestych XX wieku, wprowadzono do użytku analizator czasu przelotu (*ang.: time of flight, TOF*) oraz analizator cyklotronowego rezonansu jonów (*ang.: ion cyclotron resonance, ICR*). W porównaniu do pierwotnego spektrometru mas, metody te były tańsze oraz prostsze w stosowaniu. W tym okresie rozpoczęto również komercyjne wykorzystanie spektrometru mas.

Nie można również zapomnieć o chromatografii gazowej, wynalezionym w 1952 roku przez Anthony'ego Jamesa oraz Archera Martina, którego wykorzystanie połączono ze spektrometrem mas w roku 1958. Umożliwiło to rozdzielanie złożonych mieszanin organicznych na poszczególne związki chemiczne. Ówczesnie pojawiły się także nowe techniki jonizacji, m. in. jonizacja chemiczna (*ang.: chemical ionization, CI*). Lata osiemdziesiąte i dziewięćdziesiąte XX wieku to czas powstawania nowych technik jonizacji: desorpcji laserowej z udziałem matrycy (*ang.: matrix - assisted laser desorption/ionization, MALDI*) oraz elektrorozpylania (*ang.: electrospray ionization, ESI*). Metody te umożliwiły badanie polimerów organicznych oraz biopolimerów (Sparkman, 2006). Za swoje badania Japończyk Koichi Tanaka (MALDI) oraz Amerykanin John Fenn (ESI) w roku 2002 otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii.

Podstawowym narzędziem spektrometrii mas jest spektrometr masowy. Urządzenie to zbudowane jest z pięciu głównych elementów tj. układu wprowadzającego, źródła jonów, analizatora, detektora oraz systemu przetwarzania danych. W celu wykonania pomiarów należy dokonać jonizacji cząsteczek lub atomów badanego materiału. W toku analizy z wykorzystaniem spektrometru masowego otrzymujemy wynik nazywany widmem mas. Pomiar stosunku izotopowego jest niezwykle precyzyjny (Peterson & Fry, 1987).

### 1.3.2. Zastosowanie spektrometrii mas

Wykorzystanie spektrometrii mas jako techniki analitycznej ulegało ewolucji. Początkowo do jej głównych zadań należała identyfikacja związków chemicznych z ustaleniem ich składu pierwiastkowego. Dostępne są specjalne biblioteki widm jonizacji z bazami danych, umożliwiające interpretację otrzymanego wyniku. Spektrometria mas pozwala ustalić skład izotopowy pierwiastków chemicznych, a także określić strukturę molekularną badanych związków. Ze względu na swój potencjał spektrometria mas cieszy się wielkim zainteresowaniem badaczy interdyscyplinarnych. Możliwości, które daje ta technika analityczna znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, w szczególności fizyce, chemii, biologii, a od stosunkowo niedawna również w medycynie. Spektrometria mas wykorzystywana jest w chemii klinicznej (Duncan i in., 2016), endokrynologii (Ketha i in., 2017), farmakologii (Reyzer i in., 2003) oraz badaniach lipidów (Ellis i in., 2018; Hu & Zhang, 2018). Spektrometria mas jest szeroko wykorzystywana w proteomice (Domon & Aebersold, 2006; X. Han i in., 2008). Stosuje się ją w badaniach nowotworów złośliwych (Bednarczyk i in., 2019; Caldwell i in., 2005) i podkreśla możliwość korelacji wyników z rutynowymi badaniami histopatologicznymi (Chaurand i in., 2004; Römpf i in., 2010).

### 1.3.3. Izotopy pierwiastków chemicznych i izotopowa spektrometria mas

Izotopy to odmienne formy atomów danego pierwiastka chemicznego, różniące się od siebie liczbą neutronów w jądrze atomowym, a w konsekwencji również liczbą masową. Izotopy mogą występować w formie izotopów stabilnych (nieulegających samoistnym przemianom w inne izotopy lub pierwiastki) oraz radioizotopów, których jądra atomowe spontanicznie ulegają przemianom promieniotwórczym. Od lat 90. XX wieku badania metaboliczne radioizotopów maleją, natomiast badania izotopów stabilnych wykazują tendencję wzrostową (Lehmann, 2017). Izotopy stabilne węgla, azotu, siarki oraz tlenu są częstym

obiektem badań w wielu dziedzinach nauki, w tym najszerzej obecnie wykorzystanych badaniach środowiska (Elsner, 2010; Kobayashi i in., 2021; Michener & Lajtha, 2008), a także w biologii (Ball, 2011; Barboza & Parker, 2006), paleontologii (Hedges & Reynard, 2007; M. P. Richards & Hedges, 1999), paleoklimatologii (Rozanski i in., 1997) oraz medycynie (Katzenberg & Lovell, 1999; Mekota i in., 2006). Zainteresowanie naukowców składem izotopowym obejmuje nie tylko kulę ziemską, ale także przestrzeń kosmiczną. Badano próbki pochodzące z Księżyca, Marsa, ale również mniejszych elementów, jak np. asteroidy i komety (Hoefs, 2009). W większości przypadków cięższy izotop pierwiastka chemicznego występuje rzadziej niż izotop lżejszy (Ben-David & Flaherty, 2012). Badania izotopów pierwiastków chemicznych dostarczają licznych informacji wykorzystywanych w wielu obszarach wiedzy.

Izotopowa spektrometria mas (*ang.: isotope-ratio mass spectrometry, IRMS*) jest techniką analityczną z grupy spektrometrii mas, która pozwala ustalić skład izotopowy wybranych pierwiastków chemicznych. Bazuje ona na pomiarze stosunków izotopowych pierwiastków lekkich: węgla, azotu, siarki, tlenu i wodoru, naturalnie występujących w środowisku i organizmach żywych, ale także w próbkach wzbogaconych izotopowo. Stosunek izotopowy jest stosunkiem cięższych do lżejszych izotopów w badanym materiale. W większości przypadków stosunek izotopowy ma niewielką wartość i z tego powodu stosowany jest względny typ pomiaru tj. skład izotopowy badanej próbki porównywany jest ze składem izotopowym standardu po ich naprzemiennym zmierzeniu w spektrometrze masowym. Różnica względna zwyczajowo wyrażana w promilach określana jest jako delta ( $\delta$ ). Analiza jest możliwa dla substancji w fazie gazowej. W celu uzyskania prostych pierwiastków i związków nieorganicznych, takich jak  $N_2$ ,  $CO_2$ ,  $H_2O$ ,  $SO_2$ , konieczne jest poddanie próbek organicznych procesowi spalania w wysokiej temperaturze w obecności katalizatora. W nowszych urządzeniach istnieje możliwość wykorzystania procesu pirolizy. Próbkę umieszcza się w izotopowym spektrometrze mas, gdzie cząsteczki gazów poddawane są jonizacji, a następnie rozdzielane pod względem masy, często wykorzystywanym analizatorem jest separator magnetyczny. Następnie, rozdzielone wiązki jonów dostają się do

detektora, np. puszki Faradaya, gdzie po wytworzeniu prądu następuje jego pomiar przez system komputerowy<sup>2</sup>.

### 1.3.3.1. Azot

Azot został odkryty w roku 1772 przez szkockiego fizyka i chemika Daniela Rutherforda. Jest pierwiastkiem chemicznym należącym do grupy niemetali. Jest to bezbarwny, bezwonny gaz, który jest głównym składnikiem ziemskiej atmosfery (78% objętości). Azot jest również pierwiastkiem stanowiącym 16% masy białek, wchodzących w skład organizmów żywych. Położony jest w 15 grupie układu okresowego pierwiastków chemicznych. W jądrze atomowym tego pierwiastka znajduje się 7 protonów, a jego liczba masowa wynosi 14,007. Azot występuje w postaci dwóch izotopów stabilnych:  $^{14}\text{N}$  – którego jądro atomowe składa się z 7 protonów i 7 neutronów (częstość występowania tej postaci wynosi 99,63%) oraz izotopu  $^{15}\text{N}$  – którego jądro atomowe składa się z 7 protonów i 8 neutronów (stanowi on 0,37% form izotopowych). Promieniotwórcze izotopy azotu są sztucznie wytwarzane przez człowieka i charakteryzują się krótkim okresem półtrwania<sup>3</sup>.

### 1.3.3.2. Węgiel

Węgiel jako pierwiastek chemiczny znany był już w starożytności. Jest to niemetale, położony w 14 grupie układu okresowego pierwiastków chemicznych. Liczba atomowa węgla wynosi 6, a liczba masowa - 12,011. Występują dwa stabilne izotopy węgla:  $^{12}\text{C}$ , stanowiący 98,93% oraz  $^{13}\text{C}$ , stanowiący 1,07%. Wśród radioaktywnych izotopów węgla na uwagę radioaktywnych izotopów węgla na

---

<sup>2</sup><http://www.ftj.agh.edu.pl/~Rozanski/IRMSI.pdf>, 28.11.2020

<sup>3</sup><https://www.britannica.com/science/nitrogen>, 23.11.2020

uwagę zasługuje izotop  $^{14}\text{C}$ , o czasie połowicznego rozpadu wynoszącym ok. 5730 lat. Węgiel występuje w kilku odmianach alotropowych, z których najbardziej znane to grafit, diament i fuleren. Węgiel tworzy więcej związków chemicznych niż wszystkie pozostałe pierwiastki chemiczne razem wzięte. Jest on składnikiem wielu minerałów, m. in. wapieni, marmurów oraz magnezytów. Znaleźć go można również w paliwach kopalnych, takich jak węgiel kamienny, ropa naftowa i gaz ziemny<sup>4</sup>.

### 1.3.3.3. Frakcjonowanie izotopowe

Frakcjonowanie izotopowe polega na rozdzielaniu izotopów danego pierwiastka chemicznego, pod względem różnicy masy jąder atomowych, na skutek zachodzących naturalnie procesów. Z powodu różnych właściwości fizycznych izotopów danego pierwiastka zachodzi proces frakcjonowania izotopowego. Lżejsze izotopy, które są bardziej mobilne i posiadają słabsze wiązania, są usuwane częściej w porównaniu do izotopów cięższych. Frakcjonowanie zachodzi podczas reakcji chemicznych, transportu (dyfuzja), jak również zmiany fazy (topnienie, parowanie). Wyróżnia się frakcjonowanie kinetyczne oraz równowagowe. Frakcjonowanie kinetyczne jest procesem nieodwracalnym, niekompletnym i jednokierunkowym. W tym przypadku nie możemy mówić o równowadze izotopowej. Przykładami frakcjonowania kinetycznego są m.in. absorpcja i dyfuzja gazów oraz rozkład materii organicznej. Natomiast frakcjonowanie równowagowe jest przykładem reakcji chemicznej, w której występuje wymiana izotopów. Izotopy mogą przechodzić „tam i z powrotem”, a stan równowagi zostaje osiągnięty w momencie, w którym stosunki izotopowe nie ulegają już zmianom<sup>5,6</sup>.

---

<sup>4</sup> <https://www.britannica.com/science/carbon-chemical-element>, 23.11.2020

<sup>5</sup> <https://www.encyclopedia.com/science/dictionaries-thesauruses-pictures-and-press-releases/isotope-fractionation>, 14.12.2020

<sup>6</sup> <https://www.pgi.gov.pl/psh/psh-2/baza-wiedzy-hydrogeologicznej/9066-hydrologia-i-hydrogeologia-izotopowa.html>, 14.12.2020

### 1.3.3.3.1. Zmiana składu izotopowego w środowisku naturalnym

Zmiana składów izotopowych w środowisku naturalnym jest zjawiskiem powszechnym, może być wykorzystana do pozyskiwania informacji na temat badanych substancji. Niezwykle liczne są pomiary mające określić nawyki żywieniowe badanych gatunków zwierząt. Badano zarówno gatunki wodne, jak np. rozwielitka wielka (Adams & Sterner, 2000) i tilapie nilowe (Gaye-Siessegger i in., 2003), jak i lądowe, poczynając od niewielkich owadów, jakimi są termity (Boutton i in., 1983) i chrząszcze malinowe (Scrimgeour i in., 1995), po duże ssaki np. renifery (Barboza & Parker, 2006) i szympany. U tych ostatnich, skład izotopowy szkliwa zębów oraz kolagenu kości pokazuje różnice w stosunku izotopów stabilnych węgla i azotu między osobnikami młodymi, dorosłymi, a także między samcami i samicami. U młodych samic wartości  $^{13}\text{C}$  są wyższe w porównaniu z nowo urodzonym potomstwem, co nie jest obserwowane u młodych samców. Może to wynikać z różnic w diecie osobników męskich i żeńskich, jak również z faktu, że szympany płci męskiej częściej dożywają wieku dorosłego (Smith i in., 2010). Skład izotopowy węgla i azotu pozwala nie tylko określić rodzaj spożywanych pokarmów, ale również umiejscowić siedliska badanych zwierząt oraz ich zależność od wody (Ambrose & DeNiro, 1986). Możliwość określenia rodzaju pożywienia nie dotyczy jedynie organizmów żyjących obecnie, ale również tysiące lat temu. Prowadzono badania mające na celu określenie diety ludzi żyjących w okresie mezolitycznym (M. P. Richards & Hedges, 1999), neolitycznym, aż do okresu późnorzymskiego (Hedges & Reynard, 2007).

Ocena składu izotopowego jest wykorzystywana również w ekologii (Moore & Semmens, 2008; Tieszen i in., 1983). Analiza izotopów stabilnych pozwala rozwiązywać wiele problemów natury biogeochemicznej w ekosystemie. Pierwiastki węgla, azotu, siarki i wodoru posiadają więcej niż jeden izotop, więc występują w różnych składach w środowisku naturalnym. Badania stabilnych izotopów są użyteczne w rekonstrukcji paleoklimatu (McCarroll & Loader, 2004; Rozanski i in., 1997). Analiza naturalnej zmienności składów izotopowych izotopów stabilnych w ekosystemach z łącznym wykorzystaniem paleoekologii i współczesnej wiedzy

pozwała odtworzyć przeszłość oraz śledzić procesy ekologiczne. Postęp w genetyce, profilowaniu biochemicznych i analizie przestrzennej wraz z progresem w badaniach izotopowych umożliwia poszerzenie zakresu badań w ekologii (Jb i in., 2006).

Poza izotopami węgla i azotu badano również stosunek izotopowy izotopów żelaza. Zainteresowanie geochemią izotopów stabilnych żelaza jest związane z możliwością jej wykorzystania w ustalaniu biosygnatur, szczególnie w osadach Ziemi i Marsa. Badania izotopów żelaza mogą być również wykorzystywane w oceanografii, geochemii Ziemi oraz w biomedycynie (Anbar, 2004). Poznawanie składu izotopowego nie jest domeną jedynie ludzi. Niewielki owad - muszka owocowa (*Drosophila melanogaster*), potrafi za pomocą zmysłu węchu odróżnić od siebie izotopy wodoru - deuter i prot (Ball, 2011).

#### **1.3.3.3.2. Zmiana składu izotopowego w przebiegu procesów patologicznych**

Zwrotnym punktem w historii spektrometrii mas było jej wprowadzenie w obszar medycyny. Początkowo w poszukiwaniu nowych informacji o stanach patologicznych bazowano na materiałach archeologicznych np. zbadano mumie sudańskich Nubijczyków i wykazano, że wśród chorych z osteopenią, częstą w tej populacji, kobiety miały podwyższone wartości delta  $^{15}\text{N}$  i powiązano ten fakt nie tylko z czynnikami żywieniowymi, lecz również fizjologicznymi – różnicą w wydalaniu mocznika oraz usuwaniu wapnia i fosforu drogą nerek (White & Armelagos, 1997). Z czasem badania zaczęły obejmować współczesne populacje i coraz to większe spektrum stanów patologicznych. Ocena składów izotopowych była również wykorzystana u pacjentek cierpiących na jadłowstręt psychiczny (Mekota i in., 2006), a także u dzieci wentylowanych mechanicznie, hospitalizowanych na oddziale intensywnej terapii, z zespołem ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (Boriosi i in., 2014).

W ostatnich latach zastosowano izotopową spektrometrię mas w badaniach tkanek transformowanych nowotworowo (Taran, Frączek, Kamiński, i in., 2015).

W roku 2015 po raz pierwszy udokumentowano różnice w składzie izotopowym tkanek nowotworowych i zdrowych „in vivo” oraz fakt zmiany stosunku izotopowego azotu w przebiegu choroby nowotworowej, a ponadto stwierdzono przełom w składzie izotopowym azotu w momencie uogólniania się choroby nowotworowej (Taran, 2015).

Poddano także ocenie skład izotopowy mięsaka prążkowanokomórkowego (*ang.: rhabdomyosarcoma, RMS*) oraz wątrobiaka płodowego. Zaobserwowano zwiększone występowanie izotopu  $^{15}\text{N}$  w typie zarodkowym RMS. (Taran, Frączek, Sitkiewicz, i in., 2015), a w przypadku hepatoblastoma ujawniono różnice w biologii podtypów histologicznych tego guza (Taran, Frączek, Sitkiewicz, i in., 2016).

Kolejne badania dotyczyły: u dorosłych - raka piersi (Tea i in., 2016), w grupie zmian wieku rozwojowego - guza Wilmsa (Taran i in., 2016), w których potwierdzono istnienie różnicy w składzie izotopowym pomiędzy guzem a otaczającymi tkankami oraz w przypadku guza Wilmsa także różnice w składzie izotopowym węgla i azotu zarówno pomiędzy typami histopatologicznymi tego nowotworu, jak i w kolejnych stadiach procesu nowotworowego. Badanie to pozwoliło zaobserwować nieznaną do tej pory część biologii nefroblastoma oraz może przyczynić się do odkrycia potencjalnego nowego biomarkera tego nowotworu i mieć wpływ na proces leczenia guza Wilmsa (Taran, Frączek, Sikora-Szubert, i in., 2016).

#### **1.3.4. Materiał wykorzystany do badań izotopowych**

Materiał wykorzystywany do badań izotopowych jest niezwykle różnorodny. Stanowią go mogą składniki materii nieożywionej, jak np. woda (Rozanski i in., 1997) i skały (W. Han i in., 2017; Roelofse & Horstmann, 2008) lub ożywionej: drzewa (McCarroll & Loader, 2004) i elementy organizmów zwierzęcych. W tym ostatnim przypadku, najczęściej wykorzystuje się kości (Ambrose, 1991; Ambrose & DeNiro, 1986; Hedges & Reynard, 2007; M. P. Richards & Hedges, 1999; Schoeninger & DeNiro, 1984) oraz szkliwo (Smith i in., 2010). Zarówno kości jak i zęby są to materiały bardzo trwałe i ich badania mogą dostarczyć informacji zarówno

o czasach obecnych, jak i tych minionych. Futro, mięśnie, wątroba i krew organizmów żywych również zostały wykorzystane do badań z użyciem izotopowej spektrometrii mas (Roth & Hobson, 2000). Badano także pióra ptaków (Bearhop i in., 2002). Istnieją również możliwości pozyskania materiału do badań drogą całkowicie nieinwazyjną. Przykładem jest badanie składu izotopowego wydychanego powietrza (Boriosi i in., 2014a). Również analiza stosunków izotopowych izotopów stabilnych w ludzkich włosach jest nieinwazyjną metodą, dzięki której można uzyskać informacje o długotrwałym przyjmowaniu pewnych składników odżywczych, nawykach żywieniowych, a także wykorzystać w diagnostyce chorób, w których występują zaburzenia równowagi azotowej (Petzke i in., 2010). W medycynie sądowej w celu ustalenia pochodzenia szeregu substancji, badano glebę, narkotyki, materiały wybuchowe, waluty, kość słoniową oraz róg nosorożca (Roelofse & Horstmann, 2008). W przemyśle identyfikacja obejmuje substancje spożywcze np. wino z winorośli Pinot Noir (Spangenberg i in., 2017) oraz kofeinę wyekstrahowaną z liści herbaty (C. Wu i in., 2012). Obecnie w centrum zainteresowań naukowców są materiały biologiczne w przebiegu chorób, w tym zmienione nowotworowo tkanki (Boriosi i in., 2014; Taran, 2015; Taran, Frączek, Sikora-Szubert, i in., 2016; Taran, Frączek, Sitkiewicz, i in., 2015, 2016; Tea i in., 2016).

### **1.3.5. Ograniczenia zastosowania izotopowej spektrometrii mas**

Izotopowa spektrometria mas pomimo ogromu możliwości, które oferuje, jak każda metoda ma także swoje ograniczenia. Dużym problemem, mogącym znacząco wpłynąć na uzyskane wyniki, jest zanieczyszczenie materiału. Dawniej badaniom poddawano większe próbki, więc niewielkie zanieczyszczenie przed i w trakcie przeprowadzania pomiarów, nie miało znaczącego wpływu na wynik końcowy. Obecnie, kiedy masa próbki wynosi <1mg, a materiał umieszczany jest w cynowych kapsułkach, nawet niewielkie zanieczyszczenie może istotnie wpłynąć na wyniki pomiaru. W celu wykluczenia takiego ryzyka należy poddawać analizie

przynajmniej dwie próbki z każdego materiału oraz jednocześnie analizować próbkę materiału referencyjnego (Ben-David & Flaherty, 2012). Aby dodatkowo zminimalizować ryzyko zanieczyszczenia przygotowanie próbek powinno się odbywać w przystosowanym do tego laboratorium, przez osoby posiadające odpowiednie kompetencje. Kolejnym z ograniczeń izotopowej spektrometrii mas w przypadku badania tkanek są procesy rozkładowe, które zaburzają skład izotopowy badanego materiału. W celu zapobieżenia niekorzystnym zmianom strukturalnym, tkanki powinny zostać zamrożone bezpośrednio po pobraniu, a przed oceną składu izotopowego – zostać liofilizowane. Liofilizator nie jest częścią spektrometru mas, więc konieczne jest uzyskanie do niego dostępu, co może stanowić dodatkowy problem dla badaczy. Poruszając temat dostępności urządzeń nie można zapomnieć, że sam spektrometr masowy jest narzędziem nierutynowym, kosztownym, a jego obsługa wymaga wiedzy i doświadczenia.

## 2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

### 2.1. ZAŁOŻENIA PRACY

Rola białek PD-1/PD-L1 w przebiegu choroby nowotworowej jest przedmiotem wielu badań, a wykorzystanie ich inhibitorów w procesie terapeutycznym znalazło już zastosowanie w medycynie. Literatura przedmiotu zawiera liczne prace wskazujące na istotne znaczenie obecności białek PD-1/PD-L1 dla przebiegu choroby nowotworowej. Jednakże prace na temat roli tych białek w raku jelita grubego, który jest obecnie drugą pod względem częstości przyczyną zgonów z powodu chorób nowotworowych, są nieliczne, a ich wyniki - niejednoznaczne. Praca badawcza obejmuje ocenę ekspresji białek PD-1 i PD-L1 w raku jelita grubego, w celu ujawnienia potencjalnych związków z histokliniką nowotworu o aspekcie klinicznym.

Przeprowadzanie oceny składu izotopowego tkanek nowotworowych okazało się podejściem nowatorskim w skali światowej i w ostatnich latach metoda ta jest coraz częściej wykorzystywana przez badaczy interdyscyplinarnych. Prace nadal nie są wystarczająco liczne dla przeprowadzenia pełnej oceny wartości tej techniki w badaniach nad biologią nowotworów, ale wszystkie jednoznacznie wskazują, że ocena składu izotopowego ma potencjał o implikacjach klinicznych, a wnioski takie są publikowane przez najbardziej wymagające czasopisma naukowe (Tea i in., 2016, Taran i in., 2016).

W piśmiennictwie nie odnaleziono badań składu izotopowego w raku jelita grubego, a wzrastająca częstość występowania oraz wysoka śmiertelność z powodu tego nowotworu wskazuje na celowość poszukiwania nowych metod pomocnych w diagnostyce lub nowych biomarkerów przydatnych dla oceny rokowania w indywidualnych przypadkach. Dlatego też projekt badawczy zakłada ocenę składu izotopowego pierwiastków najbardziej związanych z istnieniem komórek – węgla oraz azotu, zarówno w samych tkankach raka jelita grubego, jak i jego środowisku oraz poszukiwanie związków między stosunkiem izotopowym a biologią komórek nowotworowych i wynikających z tego potencjalnych implikacjach klinicznych.

## 2.2. CELE PRACY

1.  
Ocena ekspresji białek PD-1 oraz PD-L1 w raku jelita grubego i jego środowisku w materiale pooperacyjnym.
2.  
Poznanie struktury raka jelita grubego i jego środowiska na poziomie atomowym poprzez ustalenie wartości stosunku izotopowego stabilnych izotopów azotu i węgla w obrębie nowotworu i tkanek otaczających oraz wstępna ewaluacja wartości diagnostycznej pomiarów izotopowych.
3.  
Ocena interakcji nowotworu i jego środowiska poprzez poszukiwanie potencjalnych związków ekspresji badanych białek oraz składu izotopowego tkanki nowotworowej i jej otoczenia z wybranymi cechami histoklinicznymi oraz wstępna ewaluacja wartości prognostycznej przeprowadzonych oznaczeń.
4.  
Próba oceny potencjalnych zalet i ograniczeń praktycznego zastosowania izotopowej spektrometrii mas w raku jelita grubego.

## **3. MATERIAŁY I METODY**

### **3.1. MATERIAŁ BADANY**

Na podstawie zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr RNN/351/19/KE z dnia 10 września 2019 r. przeprowadzono prezentowane badania na materiale pochodzącym od 97 pacjentów z rakiem jelita grubego, w tym 78 przypadkach raka jelita grubego z archiwum Katedry Onkologii, Zakładu Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz 19 przypadkach bieżących tego nowotworu dla potrzeb oceny składu izotopowego pozyskanych od chorych operowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej – Centralnego Szpitala Weteranów w Łodzi. Pozyskane tkanki nie były poddawane działaniu żadnych substancji chemicznych, w tym nie były utrwalane w formalinie. Świeże tkanki były oznaczane i zamrożone natychmiast po pobraniu w temperaturze -70 °C.

#### **3.1.1. Materiał do badań immunohistochemicznych**

Do wykonania badań immunohistochemicznych wykorzystano tkanki zatopione w blokach parafinowych, pochodzące od pacjentów operowanych w latach 2013-2020, z rozpoznaniem raka jelita grubego. Łącznie wykonano i poddano ocenie 136 odczynów z dwóch lokalizacji (centrum guza oraz ściany jelita bez zmian) dla obu przeciwciał, PD-1 oraz PD-L1.

Ocena immunoekspresji białka PD-1 wykonana została w 92 skrawkach z bloków parafinowych, oznaczonych jako centrum guza, w tym 14 pochodzących od pacjentów operowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej – Centralnego Szpitala Weteranów w Łodzi oraz 78 pochodzących z archiwum Katedry Onkologii, Zakładu Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Ekspresja przeciwciała przeciw PD-1 oceniana była również w ścianie jelita bez zmian w 15 przypadkach pochodzących od pacjentów operowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej – Centralnego Szpitala Weteranów w Łodzi.

W przypadku przeciwciała przeciw PD-L1 oznaczenia przeprowadzono w skrawkach z bloczków parafinowych od pacjentów operowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej – Centralnego Szpitala Weteranów w Łodzi, w tym 14 oznaczeń z centrum guza oraz 15 oznaczeń ze ściany jelita bez zmian. Dane histokliniczne zostały zebrane w stworzonej dla celów badania bazie danych. Charakterystykę materiału do badań immunohistochemicznych przedstawiono w tabeli 5, umieszczonej na stronie 48.

### **3.1.2. Materiał do badań spektrometrycznych**

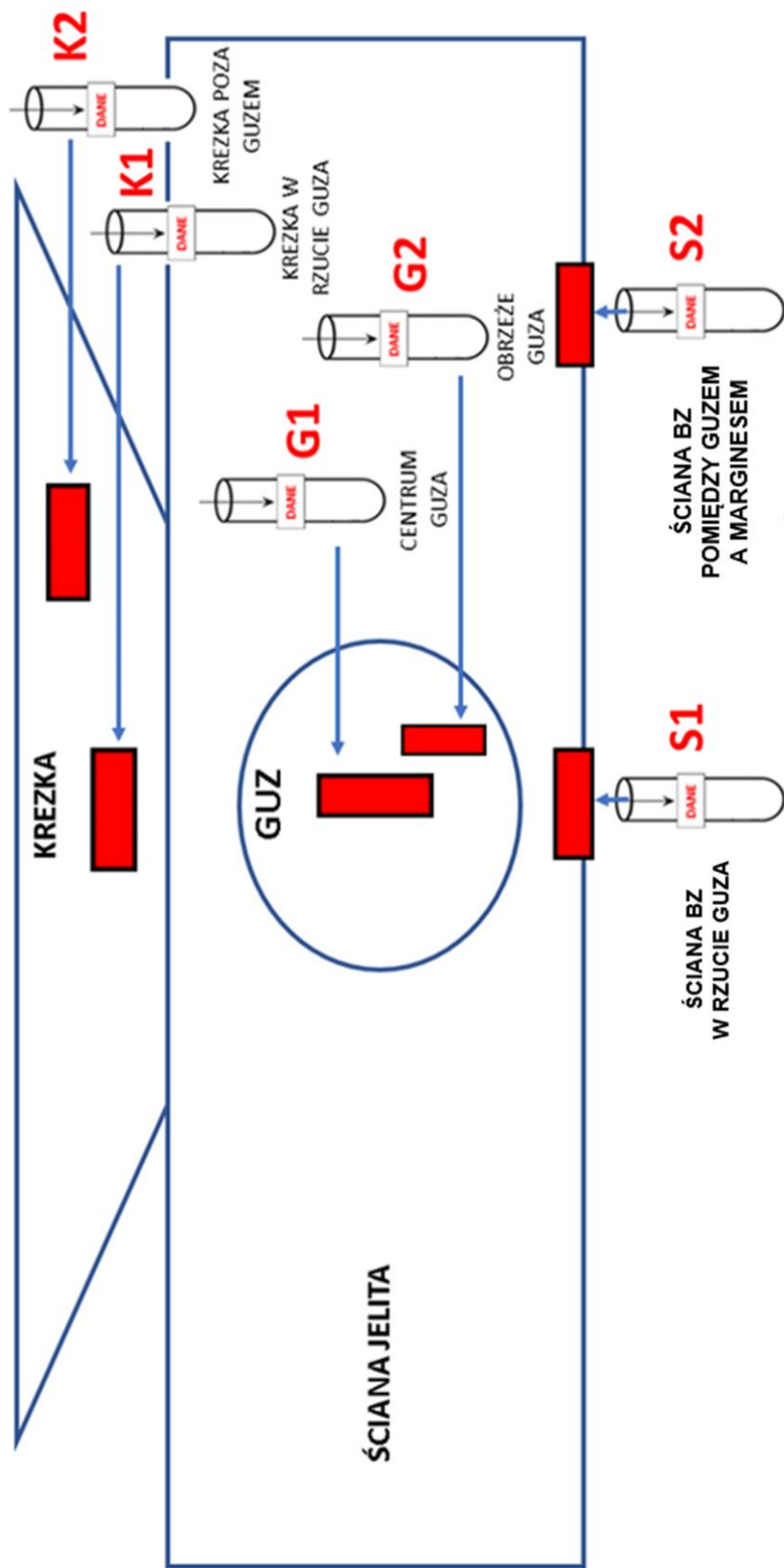
Materiał wykorzystany do badań z użyciem izotopowego spektrometru mas stanowiło 112 próbek tkanek nowotworów i ich środowiska, w których dokonano 310 oznaczeń składu izotopowego stabilnych izotopów azotu i węgla, pochodzących od pacjentów operowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej – Centralnego Szpitala Weteranów w Łodzi, z powodu raka jelita grubego. Kryteria włączenia do badania obejmowały: obecność raka jelita grubego, wiek powyżej 18 roku życia oraz świadomą zgodę na udział w badaniu. Zastosowano standardowe kryteria wykluczenia dla badań spektrometrycznych (Peterson & Fry, 1987), w tym tkanek nowotworowych (Taran, 2015). Dokładną charakterystykę materiału do badań izotopowych ukazano w tabeli 6, umieszczonej na stronie 49. Szczegółowy schemat pobrania materiałów wraz z liczbą próbek przedstawiono na rycinie 4 na stronie 50 oraz w tabeli 7, znajdującej się na stronie 51. Dane histokliniczne zostały zebrane w stworzonej dla celów badania bazie danych.

**Tabela 5.** Charakterystyka materiału do badań immunohistochemicznych.

<b>Pozyskane próbki dla oceny immunohistochemicznej</b>					
<b>Wiek (w latach)</b>	<b>Min.</b>	<b>Maks.</b>	<b>Śr.</b>	<b>SD</b>	
	32	95	69	±12	
<b>Płeć</b>	Mężczyzna				57
	Kobieta				35
<b>Lokalizacja guza</b>	Kątnica				8
	Wstępnica				6
	Zagięcie wątrobowe				5
	Poprzecznicza				2
	Zagięcie śledzionowe				9
	Zstępnica				2
	Esica				31
	Zagięcie esiczo-odbytnicze				3
	Odbytnica				24
	<b>Głębokość naciekania</b>	Tis			
T1				2	
T2				15	
T3				56	
T4a				6	
T4b				8	
<b>Liczba zajętych węzłów chłonnych</b>	N0				48
	N1a				11
	N1b				11
	N2a				4
	N2b				11
<b>Stopień histologicznej złośliwości (grade)</b>	Niższy stopień złośliwości (low-grade)				80
	Wyższy stopień złośliwości (high-grade)				9

**Tabela 6.** Charakterystyka materiału do badań izotopowych.

Pozyskane próbki dla oznaczeń IRMS					
Wiek (w latach)	Min.	Maks.	Śr.	SD	
	58	90	81	±10	
Płeć	Mężczyzna				8
	Kobieta				7
Lokalizacja guza	Wstępnicza				2
	Zagięcie wątrobowe				1
	Zagięcie śledzionowe				2
	Esica				1
	Zagięcie esiczo-odbytnicze				1
	Odbytница				7
Głębokość naciekania	Tis				1
	T2				1
	T3				11
	T4a				1
	T4b				1
Liczba zajętych węzłów chłonnych	N0				9
	N1a				2
	N1b				1
	N2a				1
	N2b				2
Stopień histologicznej złośliwości (grade)	Niższy stopień złośliwości (low-grade)				11
	Wyższy stopień złośliwości (high-grade)				3



**Ryc. 4.** Schemat pobrania materiału do oznaczeń IRMS. Ilustracja wykonana przez autorkę.

**Tabela 7.** Miejsce pobrania i liczba próbek do badań izotopowych.

Oznaczenie	Miejsce pobrania	Liczba próbek
G1	Guz centrum	19
G2	Guz obrzeże	19
S1	Ściana jelita bez zmian w rzucie guza	18
	Ściana jelita bez zmian w rzucie guza – tłuszcz	6
S2	Ściana jelita bez zmian między guzem a marginesem	16
	Ściana jelita bez zmian między guzem a marginesem – tłuszcz	4
K1	Krezka w rzucie guza	15
K2	Krezka poza guzem	15
	<b>Łącznie</b>	<b>112</b>

## 3.2. METODYKA BADAŃ

### 3.2.1. Metodyka badań immunohistochemicznych

Przed rozpoczęciem oznaczeń immunohistochemicznych ustalono doświadczalnie optymalne: stężenia przeciwciał, sposoby odsłonięcia antygenów oraz czasy inkubacji osobno dla każdego z wykorzystanych w badaniu przeciwciał na podstawie zaleceń producenta. W przypadku obu z badanych przeciwciał tkankę kontrolną stanowił węzeł chłonny. Badania immunohistochemiczne skrawków na szkiełkach adhezyjnych rozpoczynano od odparafinowania oraz odsłonięcia antygenów przy użyciu aparatu PT Link firmy Dako (z użyciem odczynników EnVision FLEX Target Retrieval Solution). Następnie skrawki były dwukrotnie płukane w buforze Wash przez 5 minut w pH 7,4-7,6. Blokowanie endogennych właściwości peroksydazy tkanki przeprowadzono przy użyciu 3% roztworu

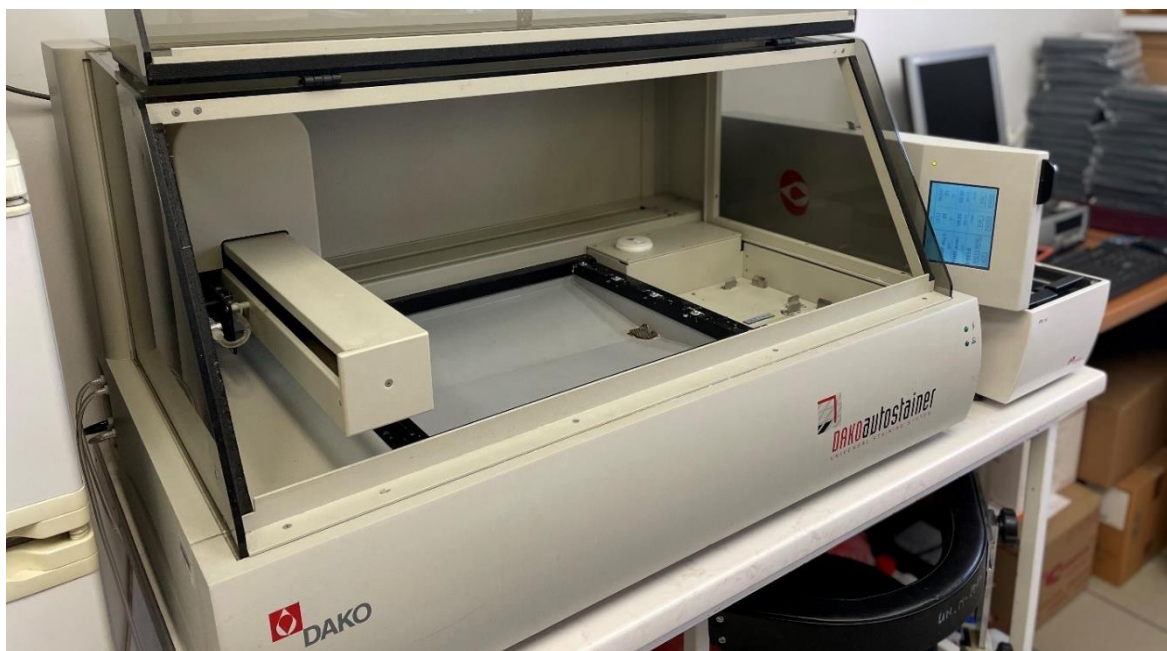
perhydrolu przez 10 minut. Skrawki ponownie płukano dwukrotnie w buforze Wash przez 5 minut. Barwienia immunohistochemiczne wykonano w aparacie Dako Autostainer (fot. 2). Wykorzystano dwa przeciwciała firmy Biorbyt, pierwotne mysie przeciwciało monoklonalne skierowane przeciw PD-1 (w rozcieńczeniu 1:100, pH 8) oraz pierwotne królicze przeciwciało poliklonalne skierowane przeciw PD-L1 (w rozcieńczeniu 1:100, pH 8). W celu rozcieńczenia użyto rozcieńczalnika blokującego tło (Dako EnVision FLEX Antibody Diluent with Background Reducing Component). Inkubację prowadzono przez 60 minut w komorze wilgotnej. Następnie dwukrotnie płukano skrawki w buforze WASH przez 5 minut. W celu uwidocznienia reakcji antygen przeciwciało zastosowano inkubację z użyciem przeciwciał wtórnych uniwersalnych zarówno dla przeciwciał mysich jak i króliczych (Dako EnVision FLEX/HRP), połączonych z peroksydazą chrzanową, przez 30 minut. Skrawki ponownie płukano dwa razy po 5 minut buforem Wash. Barwienie enzymatyczne substratem dla enzymu dwuaminobenzydyny (*ang.: diaminobenzidine, DAB*) (Dako EnVision FLEX DAB+ Chromogen) prowadzono przez 10 minut. Przygotowania roztworu DAB dokonano poprzez połączenie 1 mL buforu z jedną kroplą DAB. Skrawki kilkakrotnie płukano pod bieżącą wodą. Kolejnym etapem było podbarwienie jąder komórkowych hematoksyliną Mayera przez 3 minuty. Ponownie kilkakrotnie płukano skrawki pod bieżącą wodą i pozostawiano na 5 minut. W celu odwodnienia przeprowadzono skrawki przez szereg odczynników, 3 minuty w alkoholu, 3 minuty w acetonie oraz 3 minuty w ksylenie (powtarzano trzykrotnie). Ostatnim etapem procedury przygotowania preparatów immunohistochemicznych było ich zaklejenie bezwodnym medium zaklejającym DPX. Otrzymane w ten sposób preparaty oglądano w mikroskopie świetlnym firmy Olympus w powiększeniu 400x. Każdy z odczynów oceniany był niezależnie przez dwie osoby. Dodatkowo specjalista patomorfolog przeprowadził superwizję, ze szczególnym uwzględnieniem analizy ocen pierwotnie rozbieżnych.

Ocenę immunoekspresji PD-1 oraz PD-L1 przeprowadzono zgodnie z wzorami w literaturze, w centrum guza oraz w ścianie jelita poza guzem (ściana jelita bez zmian), biorąc pod uwagę zarówno obecność odczynu, jak i jego intensywność.

Ocena PD-1 i PD-L1 obejmowała komórki nacieku zapalnego. Jednojądrowe komórki nacieku zapalnego uznawane były za dodatnie, jeśli stwierdzano brązowe zabarwienie błon komórkowych lub cytoplazmy (odpowiednio odczyn błonowy lub cytoplazmatyczny) (Kumar i in., 2021; Mehan i in., 2021).

W każdym z badanych przypadków, w obu lokalizacjach tj.: w centrum guza oraz ścianie jelita bez zmian liczone wszystkie komórki rozproszonego nacieku zapalnego w dużym polu widzenia, a następnie komórki wykazujące odczyn dodatni, określając ich wzajemny stosunek, przedstawiany jako indeks, odpowiednio – indeks PD-1 i indeks PD-L1. Intensywność wybarwienia komórek PD-1(+) i PD-L1(+) przedstawiano w skali od 0 do 3, przyjmując: 0 jako brak odczynu, 1 jako odczyn słaby, 2 jako odczyn średni, a 3 jako odczyn silny (Noh i in., 2020; Shan i in., 2019).

W przypadku PD-L1 oprócz komórek nacieku zapalnego weryfikowano także obecność i intensywność reakcji w samych komórkach guza. Za komórki PD-L1(+) uznawano komórki guza z częściowym lub całkowitym odczynem błonowym (Mehan i in., 2021).

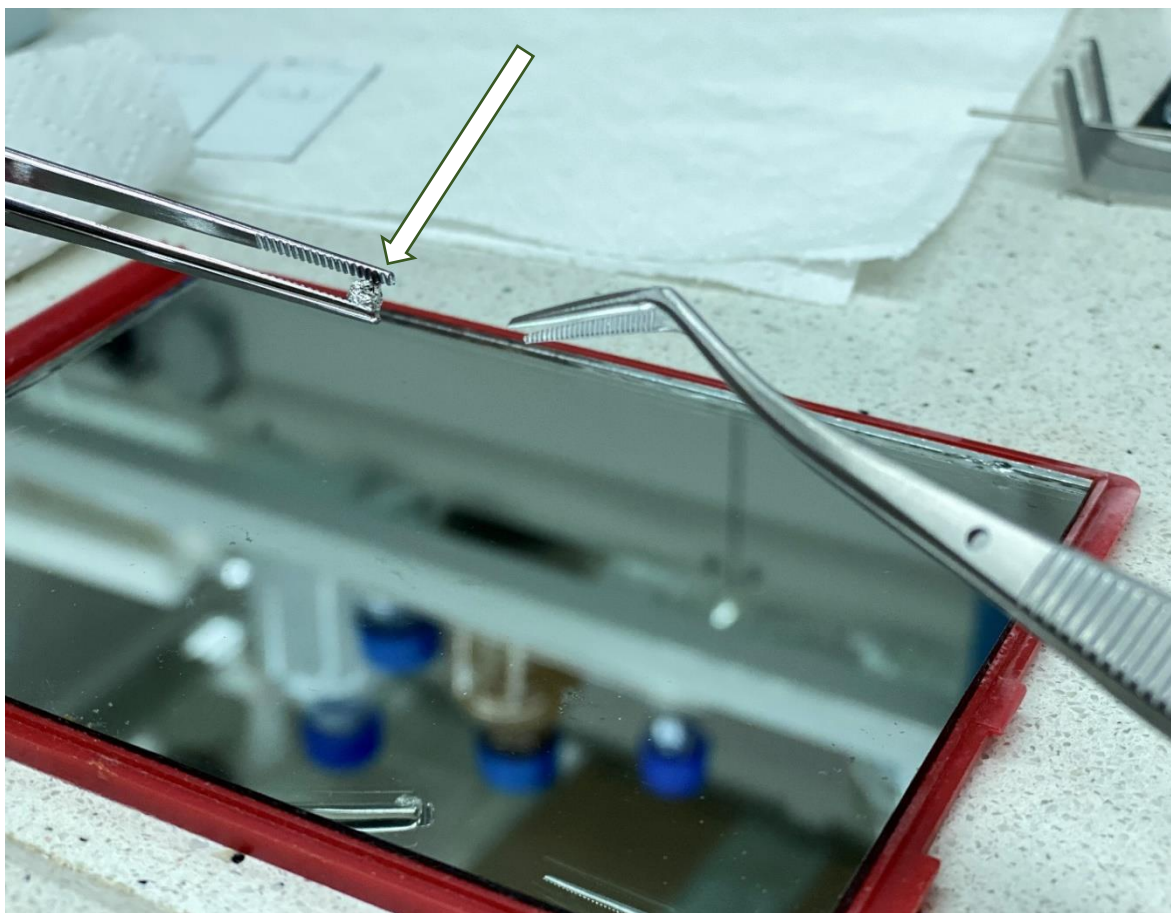


**Fot. 2.** Aparat Dako Autostainer wykorzystany do barwień immunohistochemicznych – Katedra Onkologii UM w Łodzi. Zdjęcie z archiwum autorki.

### 3.2.2. Metodyka badań z użyciem izotopowego spektrometru mas

Badania składu izotopowego poprzedzono przygotowaniem tkanek, które poddano procesowi liofilizacji w Pracowni Oznaczania Leków i Metabolitów, podlegającej pod Środowiskowe Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Z tak przygotowanych tkanek odważano na wadze analitycznej próbki do badań IRMS o masie  $2,5 \pm 1$  mg, a następnie umieszczano je w kapsułkach cynowych o wymiarach 8x5 mm i dodawano do nich ok. 1 mg pięciotlenku wanadu ( $V_2O_5$ ), spełniającego rolę utleniacza i katalizatora procesu spalania. Do próbek zawierających tłuszcze w postaci płynnej dodawano również związek rozdrobnionej krzemionki (Chromosorb W 30-60 mesh Acid Washed 10gm, firmy Sercon), w celu uzyskania pożądanej konsystencji. Następnie kapsułki wraz z materiałami w nich umieszczonymi ostrożnie zawijano, starając się nadać im kształt zbliżony do kuli (fot. 3). Dodatkowo przygotowywano próbki z użyciem kwasu tiobarbiturowego jako standardu lokalnego, które podobnie jak materiał tkankowy, umieszczano w kapsułkach cynowych. Analizę składu izotopowego azotu i węgla przeprowadzono w spektrometrze masowym stosunku izotopowego z przepływem ciągłym (*ang.: continuous flow isotope ratio mass spectrometer, CF-IRMS*) Sercon HS 20-22 sprzężonym z analizatorem elementarnym. W siedmiu kolejnych seriach pomiarowych zawarto po 15 próbek, a w serii ósmej 7 próbek wcześniej przygotowanych tkanek. Standardowa seria pomiarów składała się z 21 próbek, w tym 15 próbek badanych tkanek oraz 6 próbek kwasu tiobarbiturowego. Kolejność umieszczenia próbek przedstawiała się następująco: 1 próbka kwasu tiobarbiturowego, 3 próbki badanych tkanek, 1 próbka kwasu tiobarbiturowego, 3 próbki badanych tkanek, 1 próbka kwasu tiobarbiturowego, 3 próbki badanych tkanek, 1 próbka kwasu tiobarbiturowego, 3 próbki badanych tkanek, 1 próbka kwasu tiobarbiturowego, 3 próbki badanych tkanek, 1 próbka kwasu tiobarbiturowego, 3 próbki badanych tkanek, 1 próbka kwasu tiobarbiturowego, 3 próbki badanych tkanek, 1 próbka kwasu tiobarbiturowego. Ostatnia seria składała się z 10 próbek, tj. 1 próbka kwasu tiobarbiturowego, 3 próbki badanych tkanek, 1 próbka kwasu tiobarbiturowego, 3 próbki badanych tkanek, 1 próbka kwasu tiobarbiturowego, 1 próbka badanych

tkanek. Wartości  $\delta$  zostały obliczone względem odpowiednich standardów tj. azotu atmosferycznego w przypadku  $\delta N$  oraz względem PDB (*ang.: Pee Dee Belemnite*) w przypadku  $\delta C$ . Po wykonaniu pomiarów i analizie danych przez oprogramowanie systemu otrzymano wyniki składu izotopowego badanych próbek.



**Fot. 3.** Przygotowanie do oznaczeń izotopowych - materiał tkankowy umieszczony w kapsułce cynowej. Zdjęcie z archiwum autorki.

### 3.2.3. Metody analizy statystycznej

Wszystkie analizy przeprowadzono za pomocą pakietów języka R (v. 4.1). Analiza statystyczna została przeprowadzona w dwóch obszarach. Pierwszy uwzględniał całą grupę badaną, natomiast drugi obejmował same wyniki oznaczeń izotopowych. Obliczono i wykorzystano w analizie średnią, medianę, zakres (minimum, maksimum) oraz odchylenie standardowe. W porównywaniu danych pomiędzy grupami klinicznymi wykorzystano nieparametryczny test Manna-Whitneya-Wilcoxon dla dwóch zmiennych niezależnych oraz test Kruskala-Wallisa dla trzech i więcej zmiennych niezależnych. Nieparametryczny test Wilcoxon użyto jako test post-hoc w przypadku istotnych porównań testem Kruskala-Wallisa. Korelacje pomiędzy zmiennymi zbadano przy pomocy współczynnika korelacji rang Spearmana. Poziom istotności przyjęto na poziomie  $p < 0,05$ . Do znalezienia ewentualnych prawidłowości między cechami pacjentów przeprowadzono analizę składowych głównych (PCA).

## 4. WYNIKI

Wszystkie wyniki odkodowano i wprowadzono do przygotowanej w celu prowadzenia badań - bazy danych.

### 4.1. WYNIKI OCENY IMMUNOEKSPRESJI BADANYCH BIAŁEK

#### 4.1.1. Immunoekspresja białka PD-1

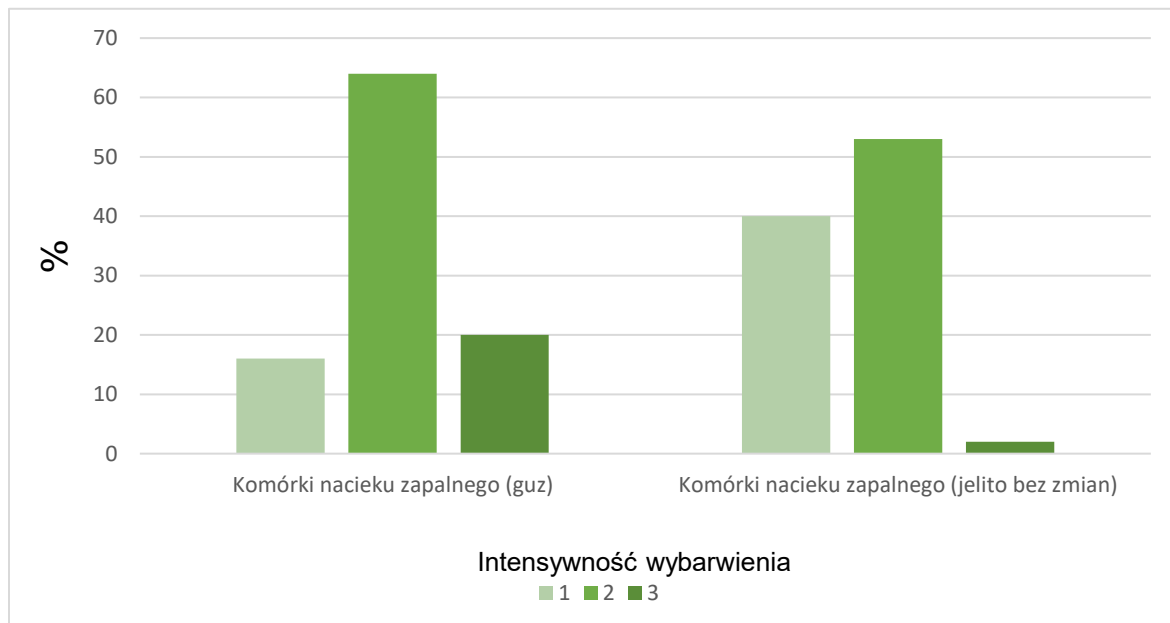
Ocenie poddano 106 odczynów z dwóch badanych lokalizacji, centrum guza oraz ściany jelita poza guzem (ściana jelita bez zmian). Wyniki oceny immunoekspresji białka PD-1 przedstawiono w tabeli 8.

**Tabela 8.** Wyniki oceny immunoekspresji białka PD-1.

Oceniane komórki	Guz centrum				Ściana jelita bez zmian			
	Min. / Maks.	Śr.	Med.	SD ±	Min. / Maks.	Śr.	Med.	SD ±
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia.	5 / 213	72	61	44	6 / 53	19	16	12
Liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia.	120 / 1076	439	404	193	148 / 564	282	264	117
Stosunek liczby komórek PD-1(+) do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia.	0,01 / 0,39	0,17	0,17	0,08	0,03 / 0,13	0,07	0,06	0,03

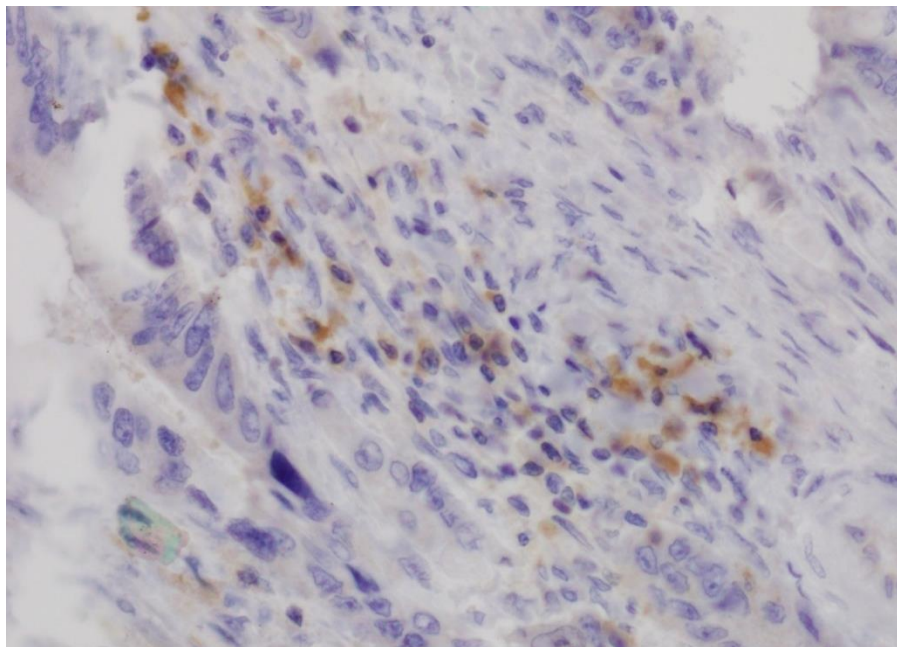
Immunoekspresję białka PD-1 stwierdzono w komórkach rozproszonego nacieku zapalnego w obu badanych lokalizacjach, w guzie oraz ścianie jelita bez zmian. Immunoekspresja białka PD-1 była wyższa w nacieku zapalnym w centrum guza niż w ścianie jelita bez zmian, odpowiednio: indeks 17 vs. 7. Ujawniono także

różnice w intensywności wybarwienia komórek PD-1(+) - zbiorcze wyniki oceny przedstawiono na wykresie 1.

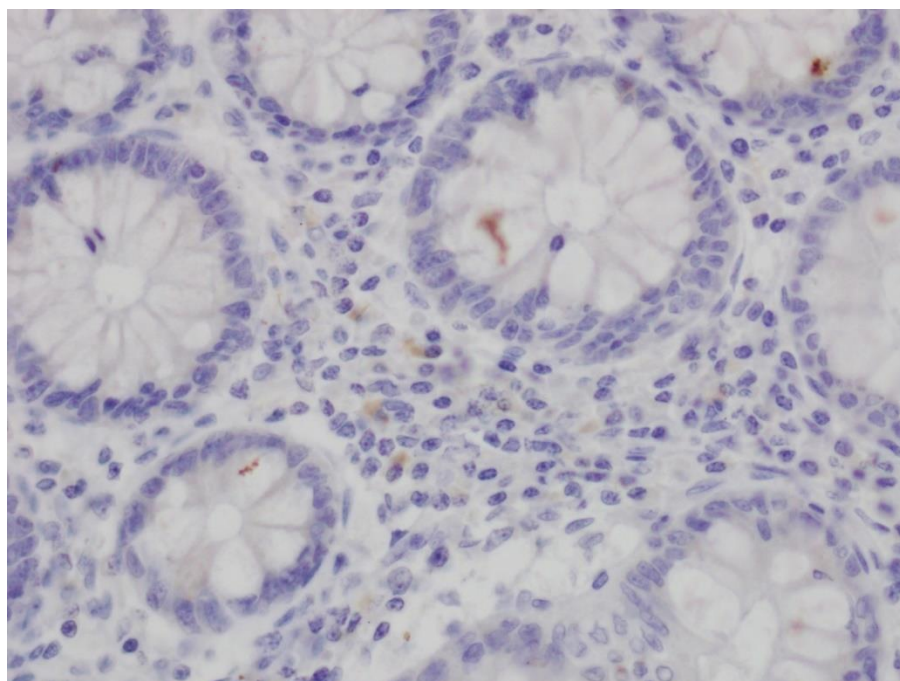


**Wykres 1.** Intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w guzie i ścianie jelita bez zmian.

Zaobserwowano, że zarówno w centrum guza, jak i ścianie jelita bez zmian dominował średni poziom intensywności wybarwienia komórek, stanowiąc odpowiednio 64% i 53% całości. Poniżej, na fotografii 4 oraz 5 przedstawiono przykłady obrazu immunoekspresji białka PD-1 w badanym materiale.



**Fot. 4.** Immunoekspresja białka PD-1 w komórkach nacieku zapalnego w obrębie raka gruczołowego jelita grubego o niższym stopniu złośliwości (low-grade), zlokalizowanym w zagięciu esiczo-odbytniczym, pow. 400x. Zdjęcie z archiwum autorki.



**Fot. 5.** Immunoekspresja białka PD-1 w komórkach nacieku zapalnego w obrębie jelita bez zmian, u pacjenta z rakiem gruczołowym o niższym stopniu złośliwości (low-grade), zlokalizowanym w zagięciu wątrobowym, pow. 400x. Zdjęcie z archiwum autorki.

#### 4.1.2. Immunoekspresja białka PD-L1

Ocenie poddano 29 odczynów z dwóch badanych lokalizacji, centrum guza oraz ściany jelita poza guzem (ściana jelita bez zmian). Wyniki oceny immunoekspresji białka PD-L1 przedstawiono w tabeli 9 oraz 10.

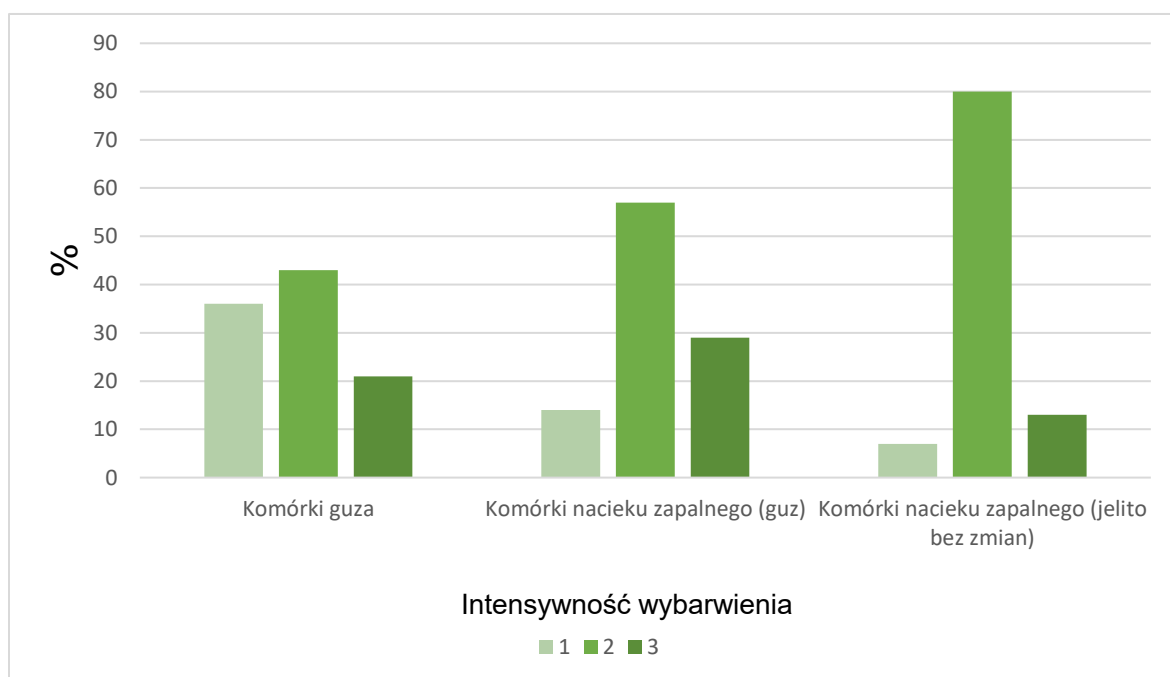
**Tabela 9.** Wyniki oceny immunoekspresji białka PD-L1 w centrum guza.

Oceniane komórki	Komórki guza				Komórki nacieku zapalnego			
	Min. / Maks.	Śr.	Med.	SD ±	Min. / Maks.	Śr.	Med.	SD ±
Liczba komórek PD-L1(+) w dużym polu widzenia.	3 / 31	14	12	9	34 / 189	130	133	51
Liczba wszystkich komórek w dużym polu widzenia.	210 / 548	357	326	117	102 / 603	351	348	131
Stosunek liczby komórek PD-L1(+) do liczby wszystkich komórek w dużym polu widzenia.	0,01 / 0,13	0,04	0,03	0,04	0,15 / 0,61	0,38	0,35	0,13

**Tabela 10.** Wyniki oceny immunoekspresji białka PD-L1 w ścianie jelita bez zmian.

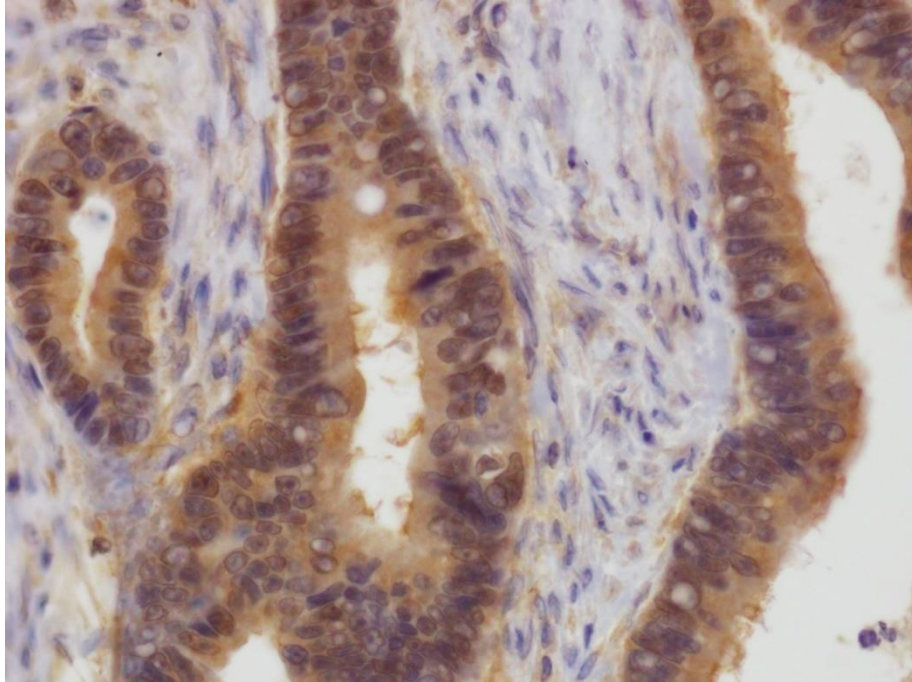
Oceniane komórki	Ściana jelita bez zmian			
	Min. / Maks.	Śr.	Med.	SD ±
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia.	67 / 139	100	89	27
Liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia.	176 / 458	276	248	77
Stosunek liczby komórek PD-L1(+) do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia.	0,29 / 0,48	0,37	0,36	0,06

Immunoekspresja białka PD-L1 została zaobserwowana w komórkach guza, w rozproszonym nacieku zapalnym w centrum guza, a także w rozproszonym nacieku zapalnym w ścianie jelita bez zmian. Najwyższą ekspresję białka PD-L1 stwierdzono w nacieku zapalnym w centrum guza indeks 38, natomiast w samych komórkach guza indeks wynosił 4. Wyniki oceny intensywności wybarwienia komórek PD-L1(+), w komórkach guza oraz w komórkach nacieku zapalnego, zarówno w guzie, jak i ścianie jelita bez zmian przedstawiono na wykresie 2.

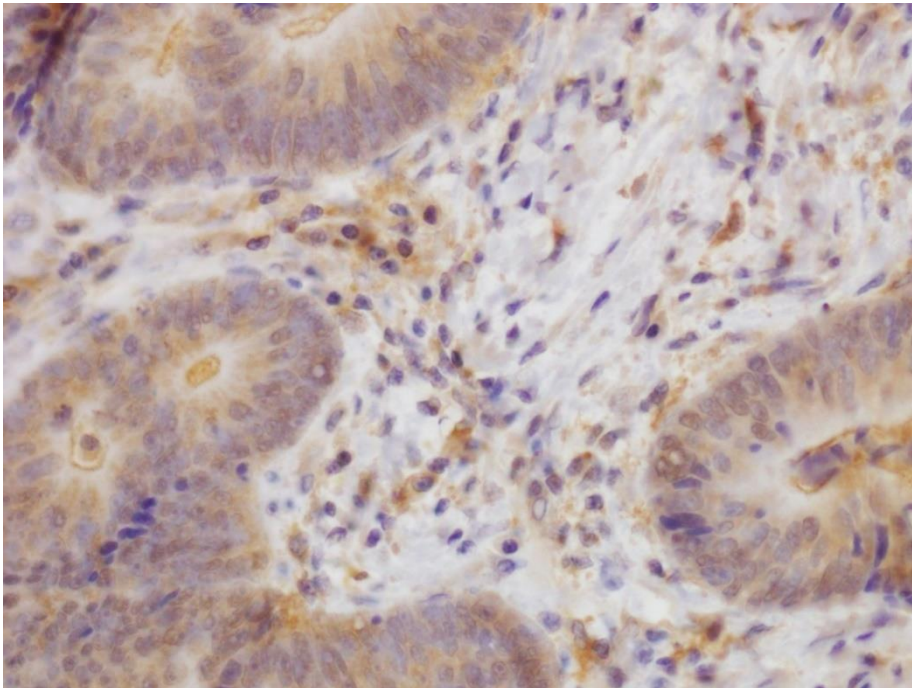


**Wykres 2.** Intensywność wybarwienia komórek PD-L1(+) w komórkach guza, komórkach nacieku zapalnego w obrębie guza oraz w komórkach nacieku zapalnego w ścianie jelita bez zmian.

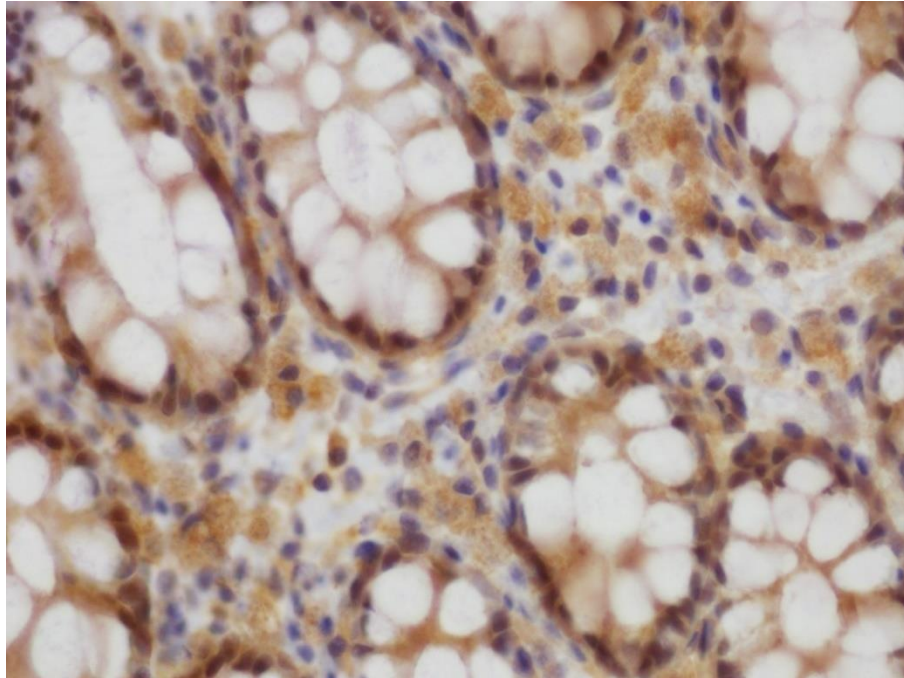
Zaobserwowano, że w przypadku PD-L1 najczęściej spotykaną intensywnością wybarwienia był stopień średni (w zastosowanej skali określany jako „2”). W komórkach rozproszonego nacieku zapalnego pochodzących ze ściany jelita bez zmian stanowił on aż 80% reakcji, a w przypadku komórek guza i komórek rozproszonego nacieku zapalnego w jego obrębie obejmował on odpowiednio 57% i 43%. Przykłady obrazu immunoekspresji białka PD-L1 w badanym materiale przedstawiono na fotografiach 6, 7 oraz 8.



**Fot. 6.** Immunoekspresja białka PD-L1 w komórkach raka gruczołowego jelita grubego o niskim stopniu złośliwości (low-grade), zlokalizowanym w esicy, pow. 400x. Zdjęcie z archiwum autorki.



**Fot. 7.** Immunoekspresja białka PD-L1 w komórkach rozproszonego nacieku zapalnego w obrębie raka gruczołowego jelita grubego o niskim stopniu złośliwości (low-grade), zlokalizowanym w odbytnicy, pow. 400x. Zdjęcie z archiwum autorki.



**Fot. 8.** Immunoekspresja białka PD-L1 w komórkach rozproszonego nacieku zapalnego w obrębie jelita bez zmian, u pacjenta z rakiem gruczołowym jelita grubego o niskim stopniu złośliwości (low-grade), zlokalizowanym w esicy, pow. 400x. Zdjęcie z archiwum autorki.

## 4.2. WYNIKI POMIARÓW IZOTOPOWYCH

W toku przeprowadzonych badań z wykorzystaniem izotopowego spektrometru mas uzyskano 310 wyników pomiarów składu izotopowego, w tym 101 dotyczących azotu  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , 109 dotyczących węgla  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  oraz 100 obrazujących stosunek masowy N/C.

### 4.2.1. Skład izotopowy azotu $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$

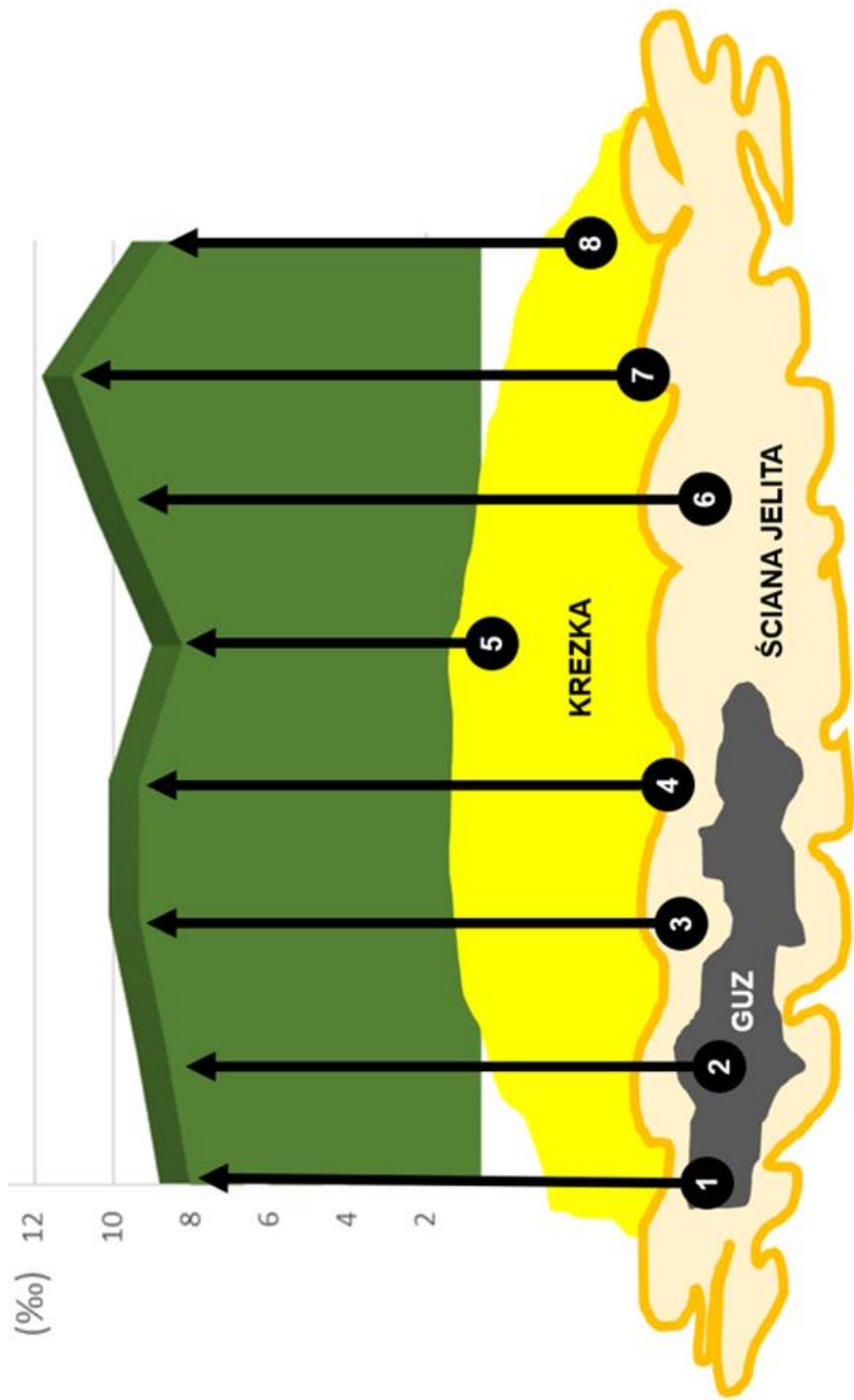
Skład izotopowy azotu  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  (delta  $^{15}\text{N}$ ) oceniany był w ośmiu lokalizacjach: centrum guza, obrzeże guza, ściana jelita bez zmian w rzucie guza, ściana jelita bez zmian w rzucie guza – tylko tłuszcz, ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem

a marginesem chirurgicznym, ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem chirurgicznym – tylko tłuszcz, krezka w rzucie guza, krezka poza guzem. Wyniki przeprowadzonych pomiarów przedstawiono w tabeli 11.

**Tabela 11.** Wartości delta  $^{15}\text{N}$  dla badanych lokalizacji.

Lokalizacja	Wartości delta $^{15}\text{N}$ (‰)				
	Min.	Maks.	Śr.	Med.	SD $\pm$
Guz centrum	6	9,8	8	7,7	$\pm 0,9$
Guz obrzeże	5,7	10,4	7,4	7,4	$\pm 1,1$
Ściana jelita bez zmian w rzucie guza	6	11,1	8,7	8,9	$\pm 1,2$
Ściana jelita bez zmian w rzucie guza – tłuszcz	6,2	11,4	8,7	8,6	$\pm 2,2$
Ściana jelita bez zmian między guzem a marginesem	5,6	11,7	9,1	8,9	$\pm 1,4$
Ściana jelita bez zmian między guzem a marginesem – tłuszcz	8,7	13,3	10,4	9,9	$\pm 2,2$
Krezka w rzucie guza	5	10	7,6	7,5	$\pm 1,7$
Krezka poza guzem	4,1	10,5	8,1	8,6	$\pm 1,9$

Wartości delta  $^{15}\text{N}$  okazały się w badanych lokalizacjach zróżnicowane. Wartość delta  $^{15}\text{N}$  była najwyższa w próbce pochodzącej z tłuszczu ze ściany jelita między guzem a marginesem (13,3‰), a najniższa w krezce poza guzem (4,1‰). Średnia wartość delta  $^{15}\text{N}$  różniła się pomiędzy poszczególnymi lokalizacjami, najwyższą stwierdzono w tłuszczu ze ściany jelita między guzem a marginesem (10,4‰), a najniższą na obrzeżu guza (7,4‰). Na rycinie 5 przedstawiono mapę izotopową badanych lokalizacji wraz ze średnimi wartościami delta  $^{15}\text{N}$  w promilach.



**Ryc. 5.** Mapa izotopowa nowotworu i jego otoczenia - delta  $^{15}\text{N}$  (‰). Ilustracja wykonana przez autorkę.  
**Legenda:** 1 – guz obrzeże, 2 – guz centrum, 3 – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, 4 – ściana jelita bez zmian w rzucie guza – tłuszcz, 5 – krezka w rzucie guza, 6 - ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, 7 – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem – tłuszcz, 8 – krezka poza guzem.

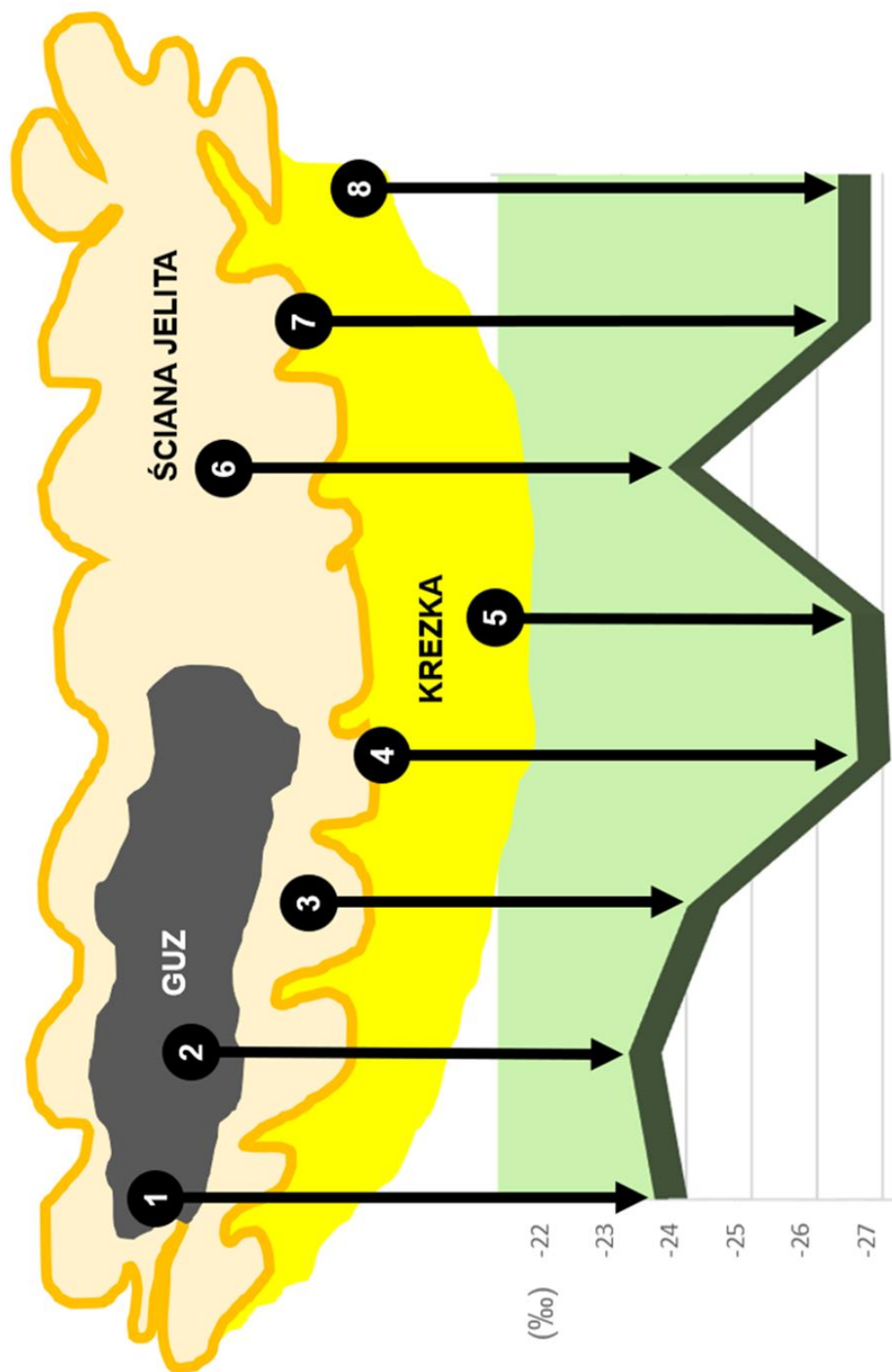
#### 4.2.2. Skład izotopowy węgla $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Skład izotopowy węgla  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , podobnie jak w przypadku azotu, oceniany był w ośmiu lokalizacjach (guz centrum, guz obrzeże, ściana jelita bez zmian w rzucie guza, ściana jelita bez zmian w rzucie guza – tylko tłuszcz, ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem – tylko tłuszcz, krezka w rzucie guza, krezka poza guzem). Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w tabeli 12.

**Tabela 12.** Wartości delta  $^{13}\text{C}$  dla badanych lokalizacji.

Lokalizacja	Wartości delta $^{13}\text{C}$ (‰)				
	Min.	Maks.	Śr.	Med.	SD ±
Guz centrum	-24,4	-22	-23	-23	±0,7
Guz obrzeże	-26,6	-21,5	-23,4	-23,5	±1,1
Ściana jelita bez zmian w rzucie guza	-26,8	-21,6	-23,9	-23,4	±1,6
Ściana jelita bez zmian w rzucie guza – tłuszcz	-26,9	-25,6	-26,5	-26,7	±0,5
Ściana jelita bez zmian między guzem a marginesem	-26,9	-21,7	-23,6	-23,2	±1,5
Ściana jelita bez zmian między guzem a marginesem – tłuszcz	-27	-25,7	-26,2	-26,1	±0,6
Krezka w rzucie guza	-27,2	-25,3	-26,4	-26,6	±0,6
Krezka poza guzem	-27,4	-25,5	-26,2	-26,1	±0,5

Wartości delta  $^{13}\text{C}$  okazały się w badanych lokalizacjach zróżnicowane. Najwyższa wartość delta  $^{13}\text{C}$  została odnotowana na obrzeżu guza (-21,5‰), natomiast najniższa w krezce poza guzem (-27,4‰). Średnia wartość delta  $^{13}\text{C}$  różniła się pomiędzy poszczególnymi lokalizacjami, najwyższą stwierdzono w centrum guza (-23‰), najniższą w krezce w rzucie guza, krezce poza guzem, ścianie jelita w rzucie guza – tłuszcz oraz ścianie jelita między guzem a marginesem – tłuszcz (od -26,5‰ do -26,2‰). Rycina 6 przedstawia mapę izotopową delta  $^{13}\text{C}$  badanych lokalizacji z średnimi wartościami delta  $^{13}\text{C}$  w promilach.



**Ryc. 6.** Mapa izotopowa nowotworu i jego otoczenia - delta  $^{13}\text{C}$  (‰). Ilustracja wykonana przez autorkę.

**Legenda:** 1 – guz obrzeże, 2 – guz centrum, 3 – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, 4 – ściana jelita bez zmian w rzucie guza – tłuszcz, 5 – krezka w rzucie guza, 6 - ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, 7 – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem – tłuszcz, 8 – krezka poza guzem.

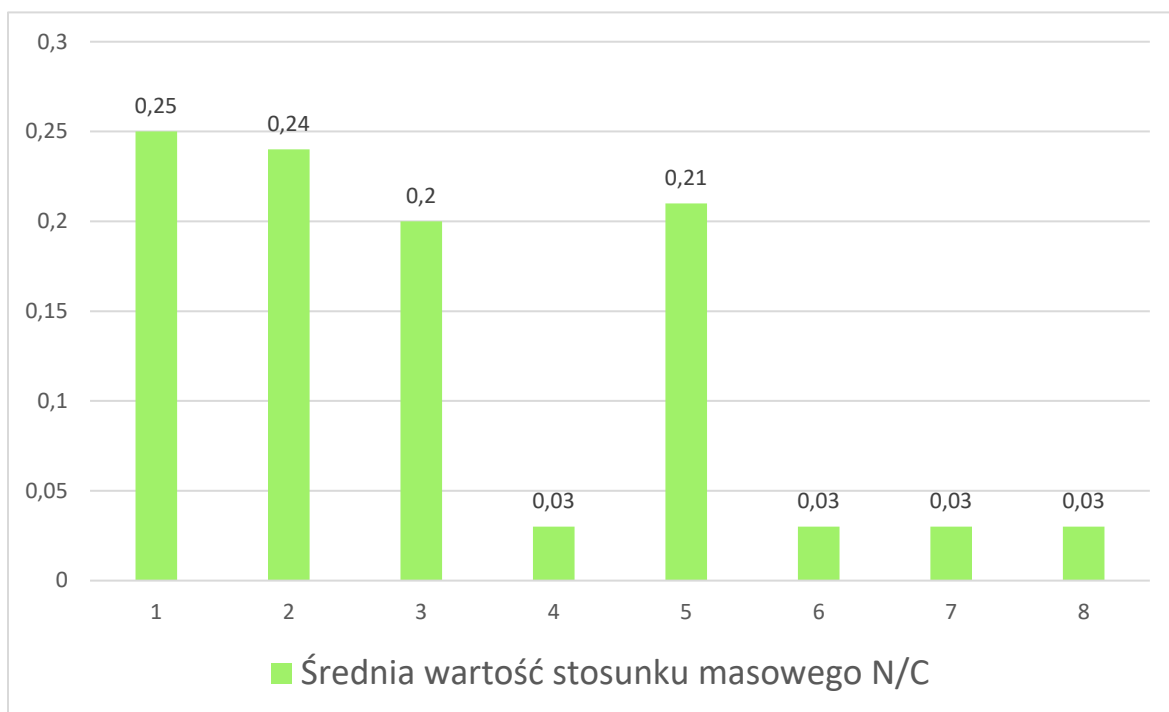
### 4.2.3. Stosunek masowy N/C

Uzyskano 100 wyników pomiarów N/C. Wyniki przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Stosunek masowy N/C dla badanych lokalizacji.

Lokalizacja	Stosunek masowy N/C				
	Min.	Maks.	Śr.	Med.	SD ±
Guz centrum	0,17	0,30	0,25	0,26	±0,03
Guz obrzeże	0,02	0,29	0,24	0,25	±0,06
Ściana jelita bez zmian w rzucie guza	0,01	0,28	0,20	0,24	±0,10
Ściana jelita bez zmian w rzucie guza – tłuszcz	0,01	0,06	0,03	0,03	±0,02
Ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem	0,02	0,29	0,21	0,24	±0,10
Ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem – tłuszcz	0,01	0,06	0,03	0,02	±0,02
Krezka w rzucie guza	0,01	0,07	0,03	0,02	±0,02
Krezka poza guzem	0,01	0,07	0,03	0,03	±0,02

Na podstawie zaobserwowanych wyników można zauważyć podobieństwo w wartościach stosunku masowego N/C w próbkach zawierających tkankę tłuszczową (krezka, tłuszcz ze ściany jelita), gdzie średnia wartość wyniosła 0,03 w każdej z wymienionych lokalizacji. Średnie wartości pomiarów stosunku masowego N/C przedstawia wykres 3.



**Wykres 3.** Średnia wartość stosunku masowego N/C dla badanych lokalizacji.

**Legenda:** 1 – guz centrum, 2 – guz obrzeże, 3 – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, 4 – ściana jelita bez zmian w rzucie guza – tłuszcz, 5 – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, 6 – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem – tłuszcz, 7 – krezka w rzucie guza, 8 – krezka poza guzem.

### 4.3. ANALIZA STATYSTYCZNA

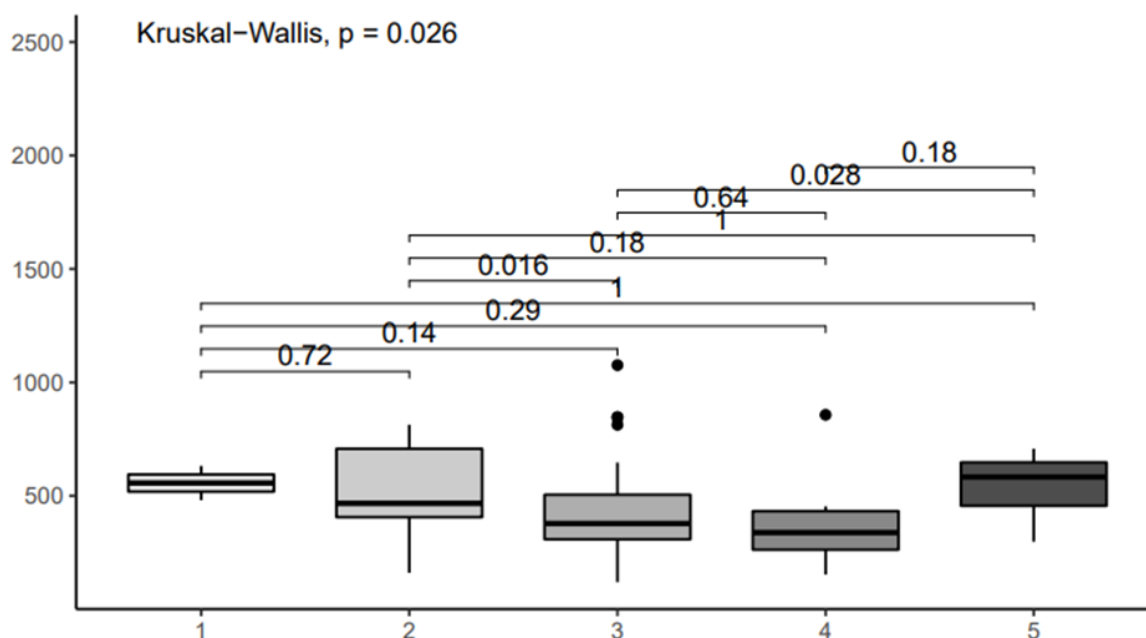
#### 4.3.1. Analiza statystyczna immunоекспresji badanych białek

#### ZNAMienne STATYSTYCZNIE RÓŻNICE W IMMUNOЕКSPRESJI BADANYCH BIAŁEK

Analiza statystyczna ujawniła znamienne statystycznie różnice w liczbie wszystkich komórek nacieku zapalnego u pacjentów z rakiem jelita grubego oraz immunоекспresji białek PD-1, PD-L1 w obrębie guza oraz ściany jelita bez zmian.

## Znamienne statystycznie różnice dotyczące liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia

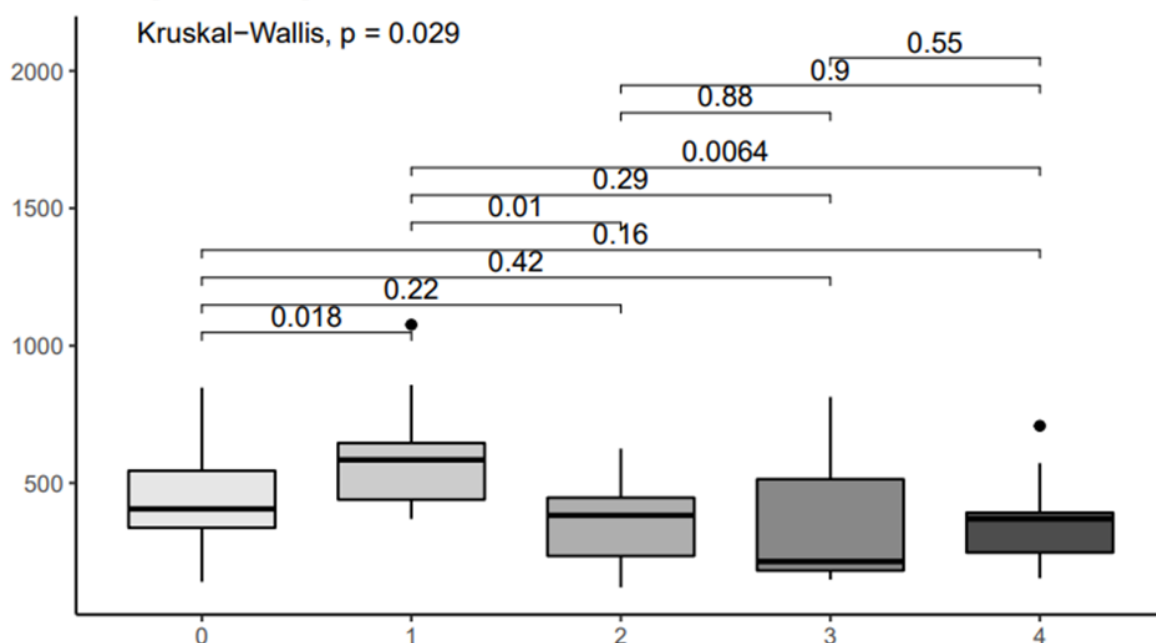
Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w liczbie wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do cechy T systemu TNM ( $p=0,026$ ). Znamienne statystycznie różnice ujawniono pomiędzy guzami T2 i T3 ( $p=0,016$ ). Wyższe wartości wykazywały guzy T2, w porównaniu do guzów T3. Znamienne statystycznie różnicę zaobserwowano także pomiędzy guzami T3 oraz T4b ( $p=0,028$ ). Liczba komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza była wyższa w guzach T4b w porównaniu z guzami T3. Wyniki przedstawia wykres 4.



**Wykres 4.** Test Kruskala – Wallisa – liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od cechy T (oś x) ( $p=0,026$ ).

**Legenda:** 1 – T1; 2 – T2; 3 – T3; 4 – T4a; 5 – T4b

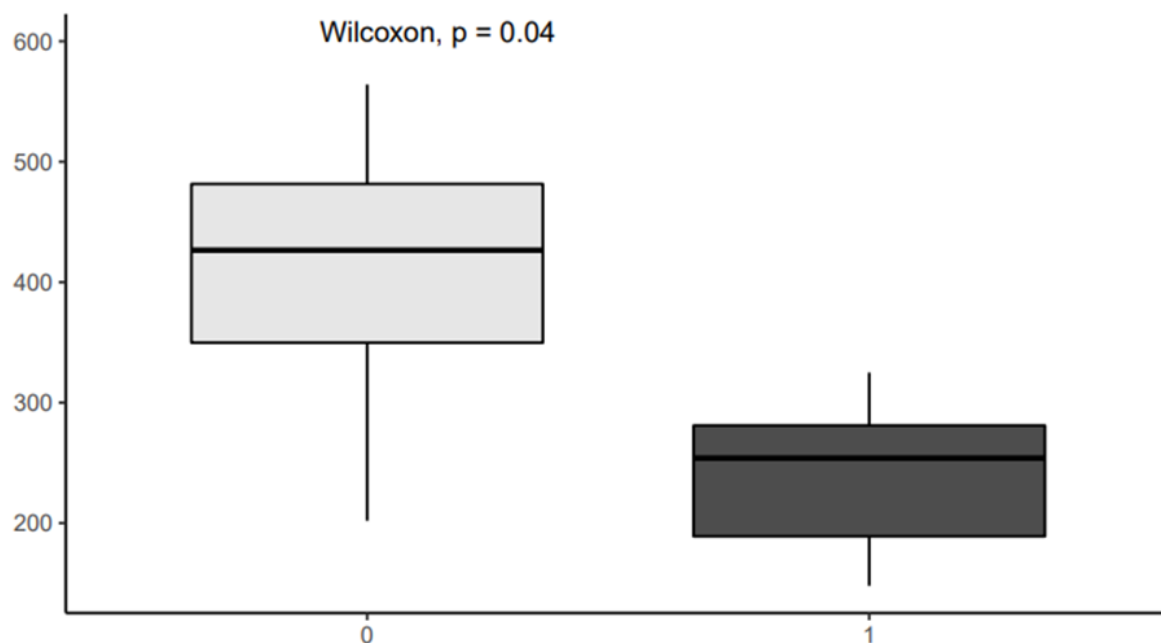
Ujawniono znamienne statystyczną różnicę w liczbie wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do cechy N systemu TNM ( $p=0,029$ ). Znamienne statystycznie różnice zaobserwowano pomiędzy guzami N0 oraz N1a ( $p=0,018$ ), N1a oraz N1b ( $p=0,01$ ), a także N1a oraz N2b ( $p=0,0064$ ). Wyższe wartości ujawniono w guzach N1a w porównaniu do guzów N0, N1b oraz N2b. Wyniki przedstawia wykres 5.



**Wykres 5.** Test Kruskala – Wallisa – liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od cechy N (oś x) ( $p=0,029$ ).

**Legenda:** 0 – N0; 1 – N1a; 2 – N1b; 3 – N2a; 4 – N2b

Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w liczbie wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian w zależności od lokalizacji guza ( $p=0,04$ ). Wyższe wartości ujawniono w guzach zlokalizowanych po stronie prawej w stosunku do guzów po stronie lewej. Wyniki przedstawia wykres 6.

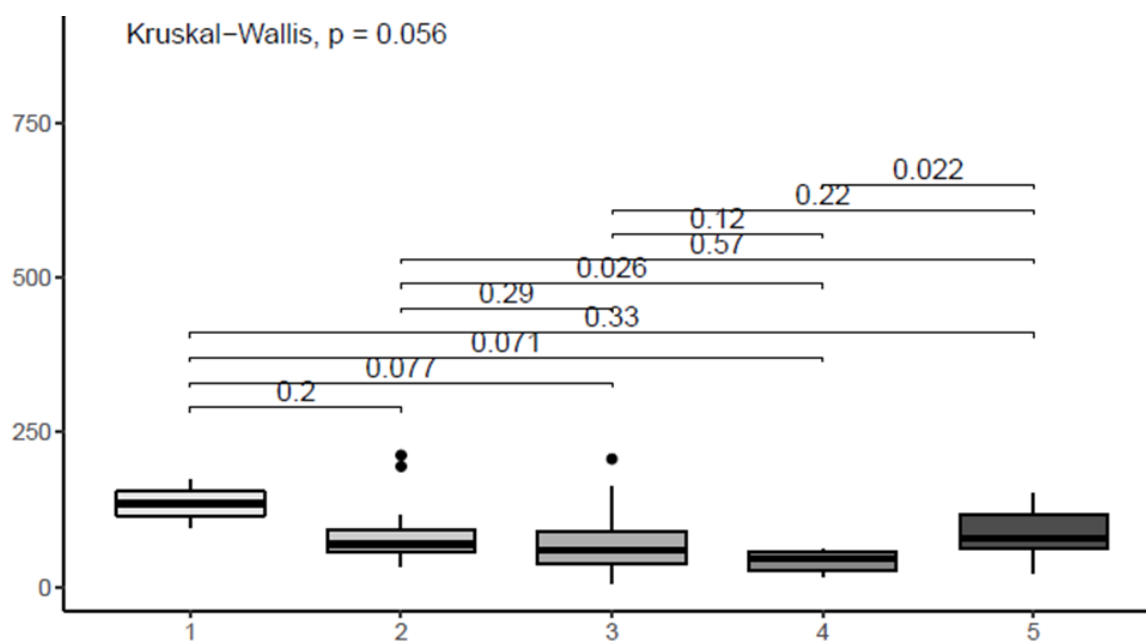


**Wykres 6.** Test Wilcoxona - liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian (oś y) w zależności od lokalizacji guza (oś x) ( $p=0,04$ ).

**Legenda:** 0 – strona prawa; 1 – strona lewa

## Znamienne statystycznie różnice dotyczące liczby komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia

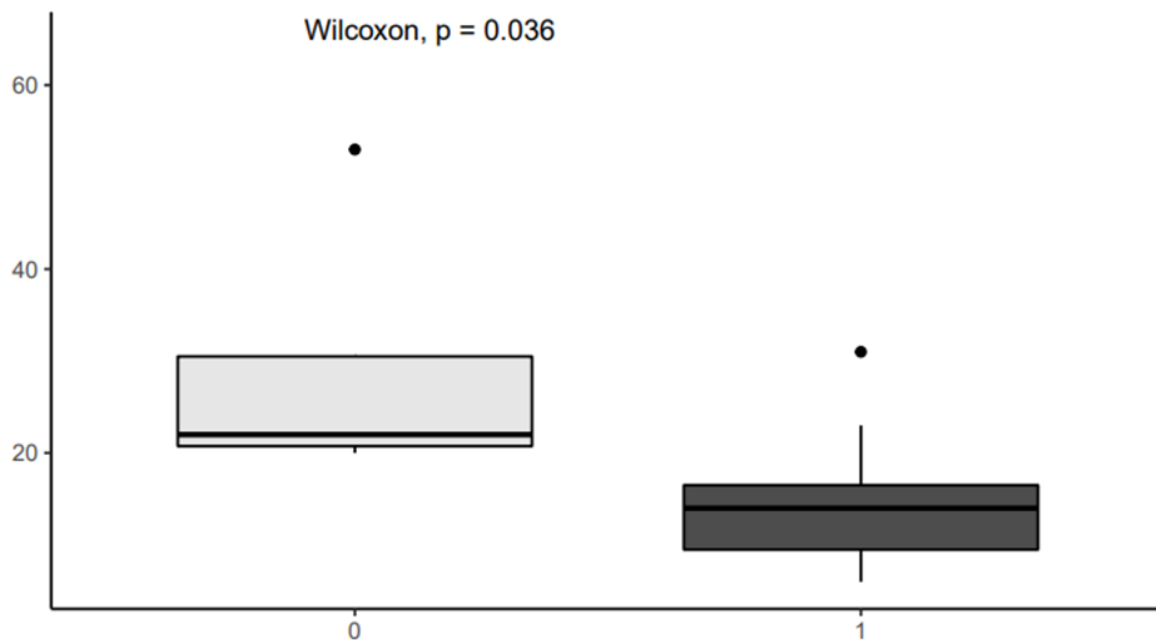
Wykazano istotne statystycznie różnice w liczbie komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do cechy T systemu TNM, pomiędzy guzami T2 a T4a ( $p=0,026$ ), a także pomiędzy guzami T4a a T4b ( $p=0,022$ ). Niższe wartości ujawniono w guzach T4a w porównaniu do guzów T2 oraz T4b. Wyniki przedstawiono na wykresie 7.



**Wykres 7.** Test Kruskala – Wallisa – liczba komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od cechy T (oś x).

**Legenda:** 1 – T1; 2 – T2; 3 – T3; 4 – T4a; 5 – T4b

Ujawniono istotne statystycznie różnice w liczbie komórek PD-1 (+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian w zależności od lokalizacji guza ( $p=0,036$ ). Wyższe wartości zaobserwowano w przypadku guzów zlokalizowanych po stronie prawej w stosunku do guzów po stronie lewej. Wyniki przedstawiono na wykresie 8.

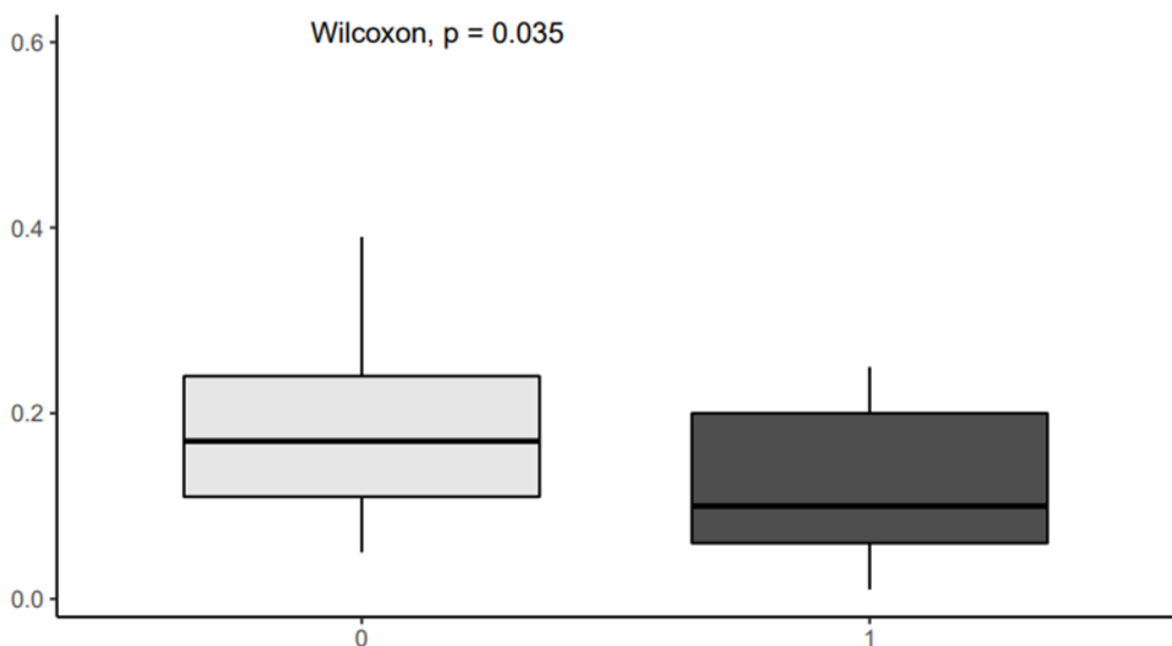


**Wykres 8.** Test Wilcoxona - liczba komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian (oś y) w zależności od lokalizacji guza (oś x) ( $p=0,036$ ).

**Legenda:** 0 – strona prawa; 1 – strona lewa

## Znamiennie statystycznie różnice dotyczące stosunku liczby komórek PD-1(+) do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia

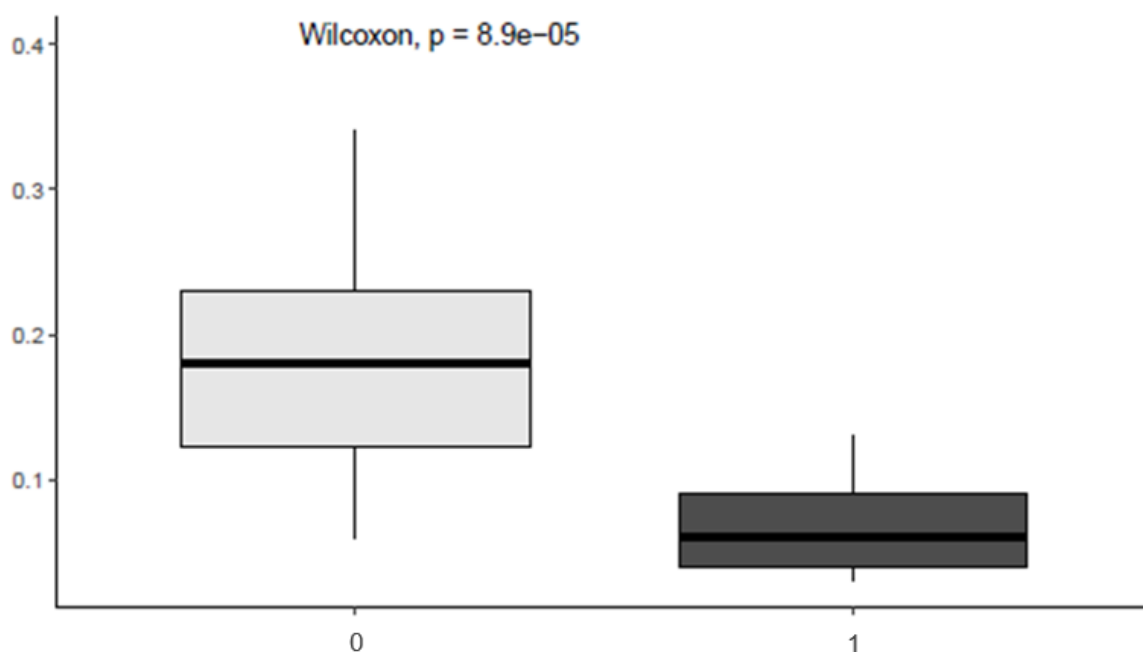
Wykazano istotne statystycznie różnice w stosunku liczby komórek PD-1(+) do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza w odniesieniu do stopnia histologicznej złośliwości nowotworu ( $p=0,035$ ). Wyższe wartości ujawniono w guzach o niższym stopniu złośliwości (low-grade) w porównaniu do guzów o wyższym stopniu złośliwości (high-grade). Wyniki przedstawia wykres 9.



**Wykres 9.** Test Wilcoxona – stosunek liczby komórek PD-1(+) do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od stopnia histologicznej złośliwości nowotworu (oś x) ( $p=0,035$ ).

**Legenda:** 0 – niższy stopień histologicznej złośliwości (low-grade); 1 – wyższy stopień histologicznej złośliwości (high-grade)

Ujawniono istotne statystycznie różnice w stosunku liczby komórek PD-1(+) do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia pomiędzy guzem a jelitem bez zmian ( $p=8,9e-05$ ). Wartość była statystycznie wyższa w obrębie guza niż w obrębie jelita bez zmian. Wyniki przedstawiono na wykresie 10.

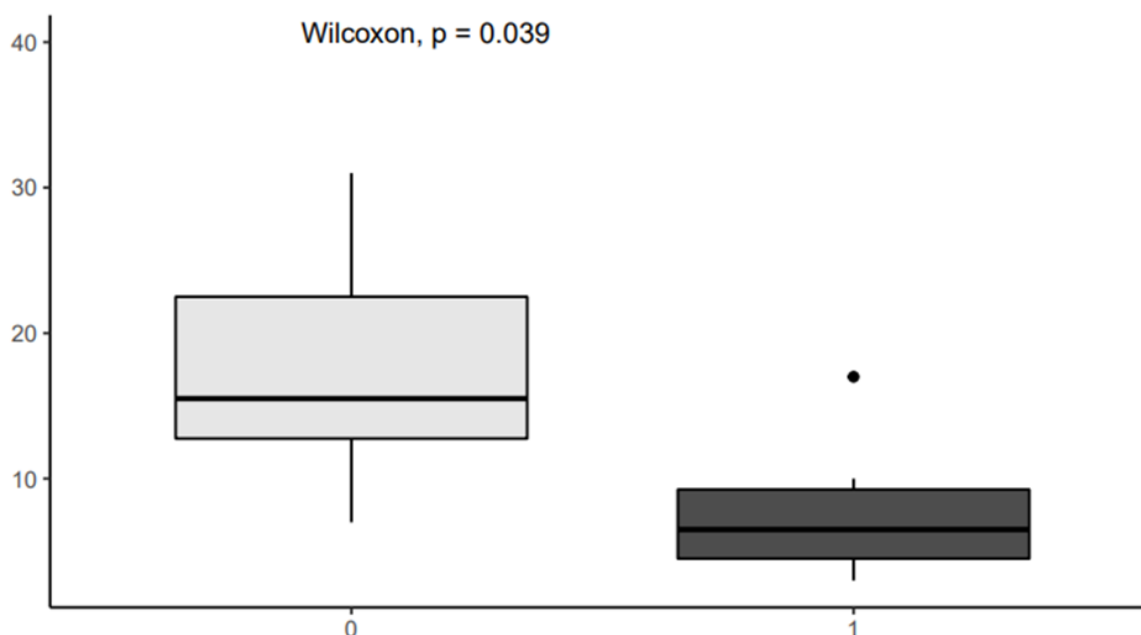


**Wykres 10.** Test Wilcoxona – stosunek liczby komórek PD-1(+) do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia (oś y) w obrębie guza i jelita bez zmian (oś x) ( $p=8,9e-05$ ).

**Legenda:** 0 – guz; 1 – jelito bez zmian

## Znamiennie statystycznie różnice dotyczące liczby komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia

Wykazano istotne statystycznie różnice w liczbie komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia pomiędzy płcią męską i żeńską ( $p=0,039$ ). Wyższe wartości ujawniono u płci męskiej. Wyniki przedstawiono na wykresie 11.



**Wykres 11.** Test Wilcoxona – liczba komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia (oś y) w zależności od płci (oś x) ( $p=0,039$ ).

**Legenda:** 0 – płeć męska; 1 – płeć żeńska

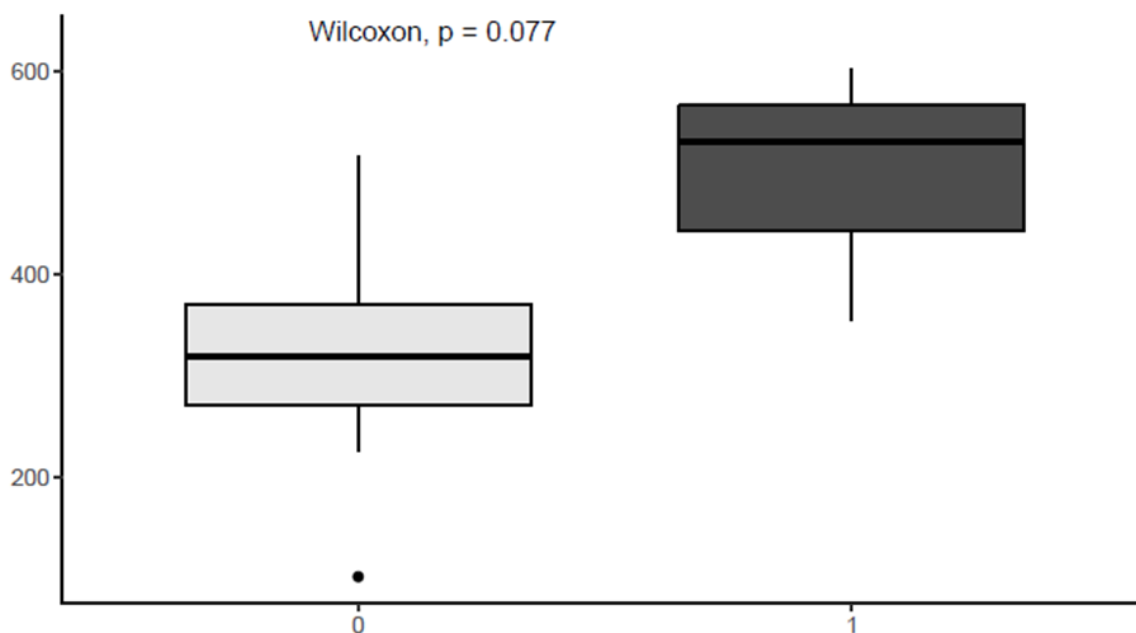
## TRENDY W IMMUNOEKSPRESJI BADANYCH BIAŁEK

Oprócz ujawnionych znamienności statystycznych zaobserwowano liczne trendy, mogące sugerować występowanie zależności pomiędzy porównywanymi parametrami, pomimo braku uzyskania istotności statystycznej w prezentowanym

badaniu. Brak uzyskania istotności statystycznej mógł wynikać z braku homogenności, małej liczebności części z badanych grup oraz występowania wartości odstających. Uzyskane wyniki wydają się jednak istotne dla potencjalnego rozważenia kontynuacji wskazanego kierunku badań na liczniejszych i bardziej homogennych grupach.

### **Trend dotyczący liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia**

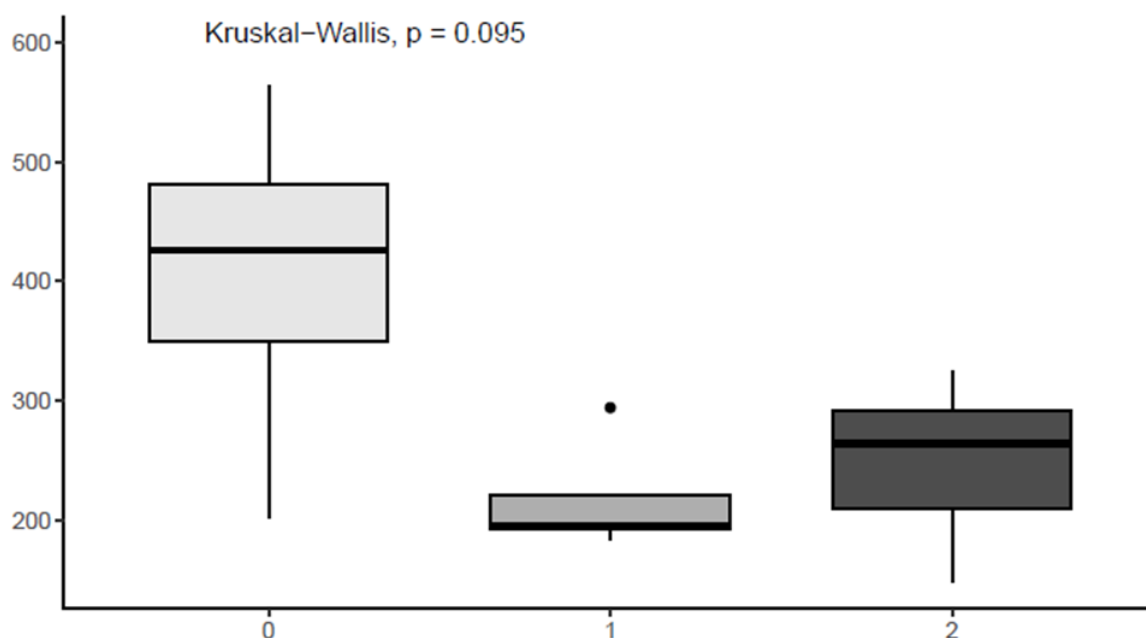
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do stopnia histologicznej złośliwości nowotworu (grade). Wyższe wartości ujawniono w guzach o wyższym stopniu histologicznej złośliwości (high-grade) w porównaniu do guzów o niższym stopniu histologicznej złośliwości (low-grade). Wyniki przedstawia wykres 12.



**Wykres 12.** Test Wilcoxona – liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od stopnia histologicznej złośliwości nowotworu (oś x).

**Legenda:** 0 – niższy stopień histologicznej złośliwości (low-grade); 1 – wyższy stopień histologicznej złośliwości (high-grade)

Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian w stosunku do lokalizacji guza wg WHO (strona prawa, strona lewa, odbytnica). Wyższe wartości ujawniono w guzach zlokalizowanych po stronie prawej w porównaniu do strony lewej oraz odbytnicy. Wyniki przedstawia wykres 13.

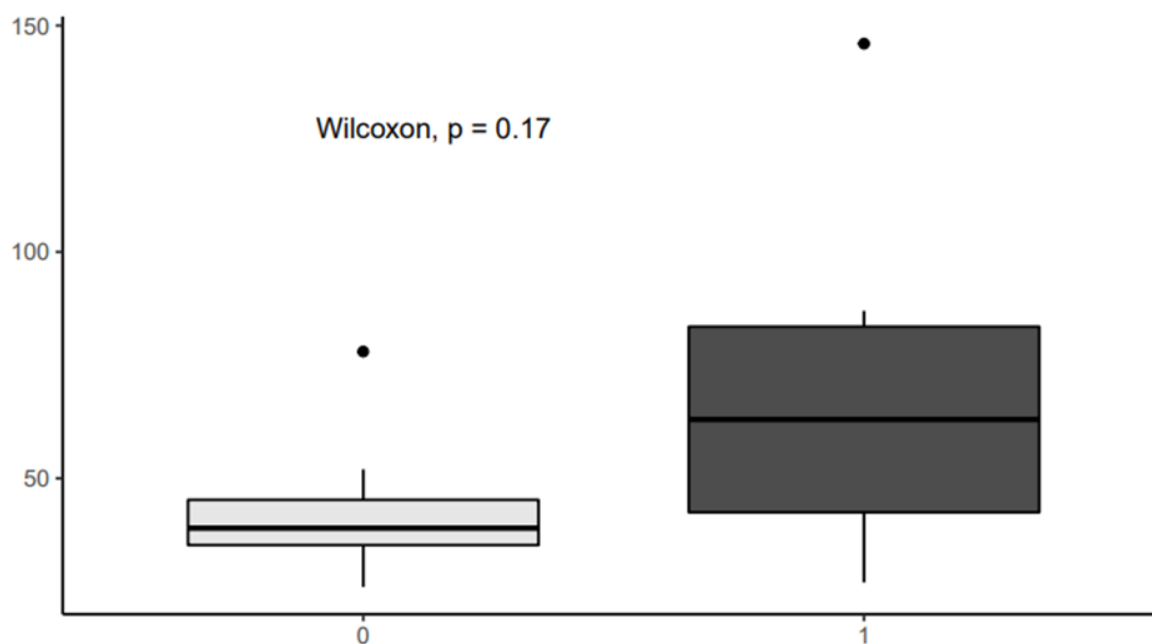


**Wykres 13.** Test Kruskala – Wallisa – liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian (oś y) w zależności od lokalizacji guza wg WHO (oś x).

**Legenda:** 0 – strona prawa; 1 – strona lewa; 2 – odbytnica

## Trend dotyczący liczby komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia

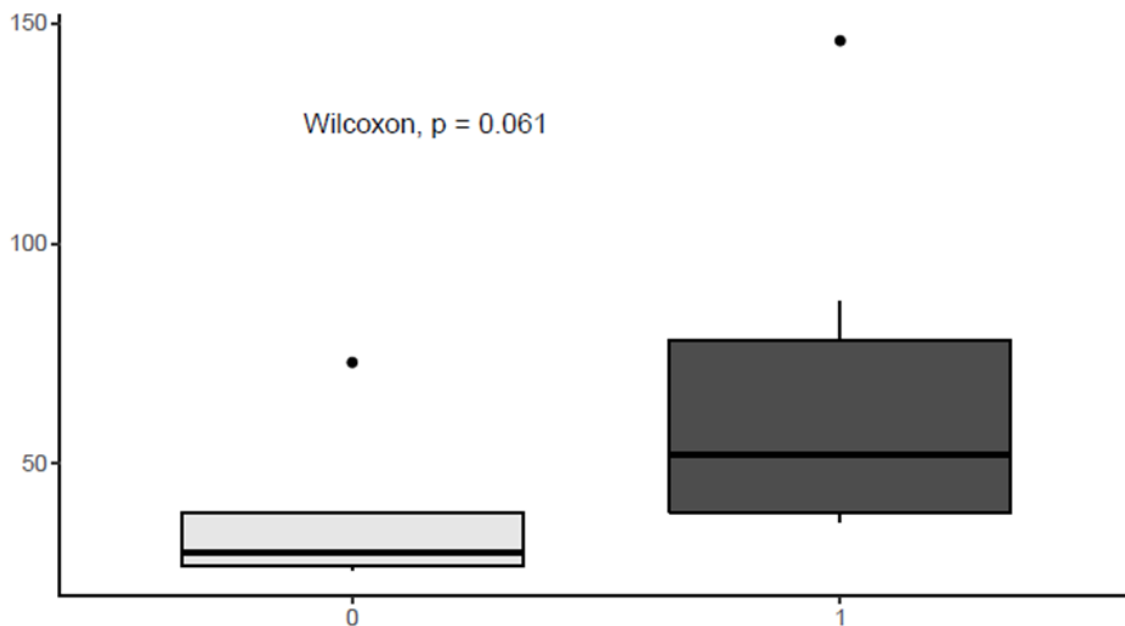
Ujawniono występowanie trendu dotyczącego liczby komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do płci. Wyższe wartości zaobserwowano u płci żeńskiej w porównaniu do płci męskiej. Wyniki zostały przedstawione na wykresie 14.



**Wykres 14.** Test Wilcoxona – liczba komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od płci (oś x).

**Legenda:** 0 – płeć męska; 1 – płeć żeńska

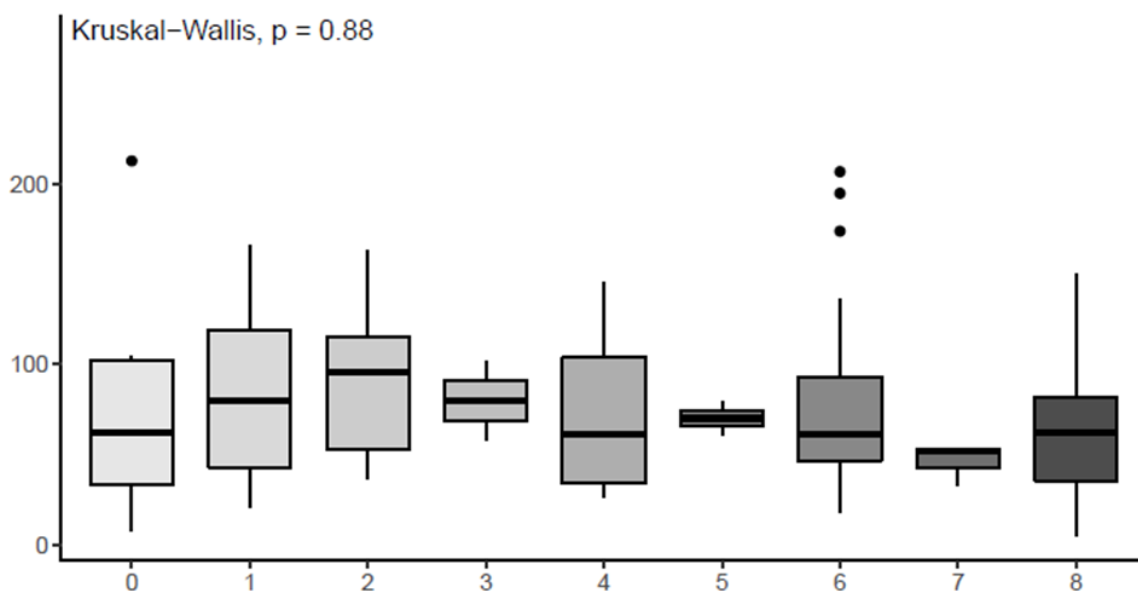
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego liczby komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do obecności owrzodzenia. Wyższe wartości ujawniono w guzach bez owrzodzenia w porównaniu z guzami z obecnością owrzodzenia. Wyniki przedstawia wykres 15.



**Wykres 15.** Test Wilcoxona – liczba komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od obecności owrzodzenia (oś x).

**Legenda:** 0 – obecność owrzodzenia; 1 – brak owrzodzenia

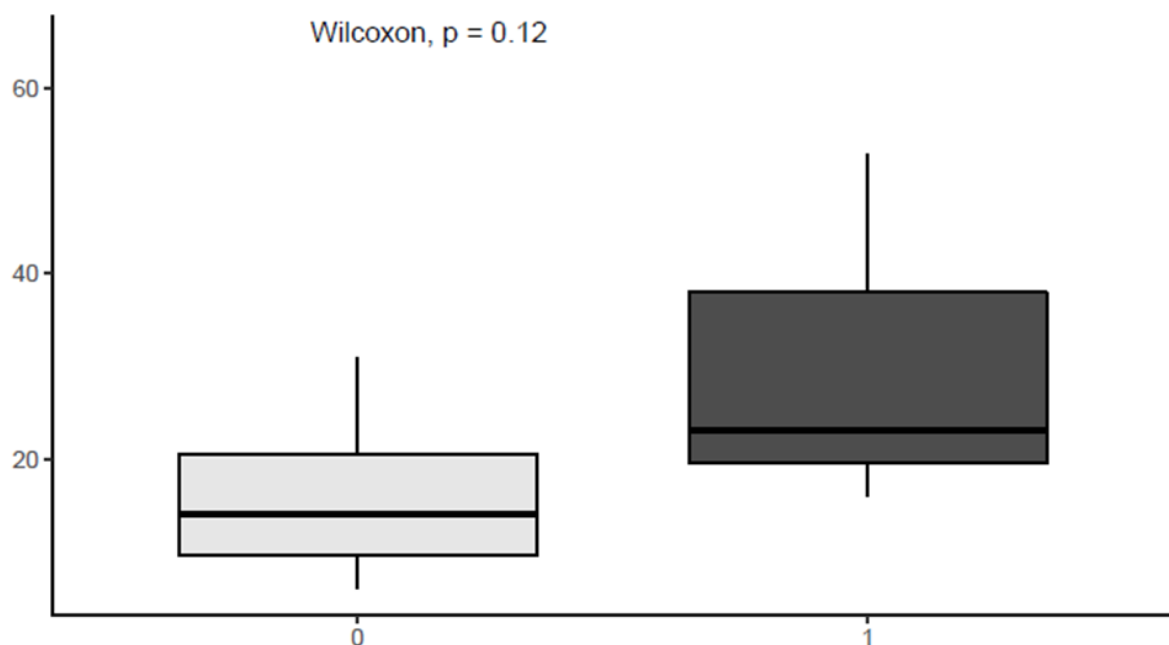
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego liczby komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do dokładnej lokalizacji (kątnica, wstępnicza, zagięcie wątrobowe, poprzecznicza, zagięcie śledzionowe, zstępnicza, esica, zagięcie esiczo-odbytnicze, odbytnica). Wyższe wartości ujawniono w guzach zlokalizowanych w wstępnicy oraz zagięciu wątrobowym w porównaniu do guzów zlokalizowanych w zagięciu esiczo-odbytnicznym oraz odbytnicy. Wyniki przedstawia wykres 16.



**Wykres 16.** Test Kruskala – Wallisa – liczba komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od dokładnej lokalizacji guza (oś x).

**Legenda:** 0 – kątnica; 1 – wstępnicza; 2 – zagięcie wątrobowe; 3 – poprzecznicza; 4 – zagięcie śledzionowe; 5 – zstępnicza; 6 – esica; 7 – zagięcie esiczo-odbytnicze; 8 – odbytnica

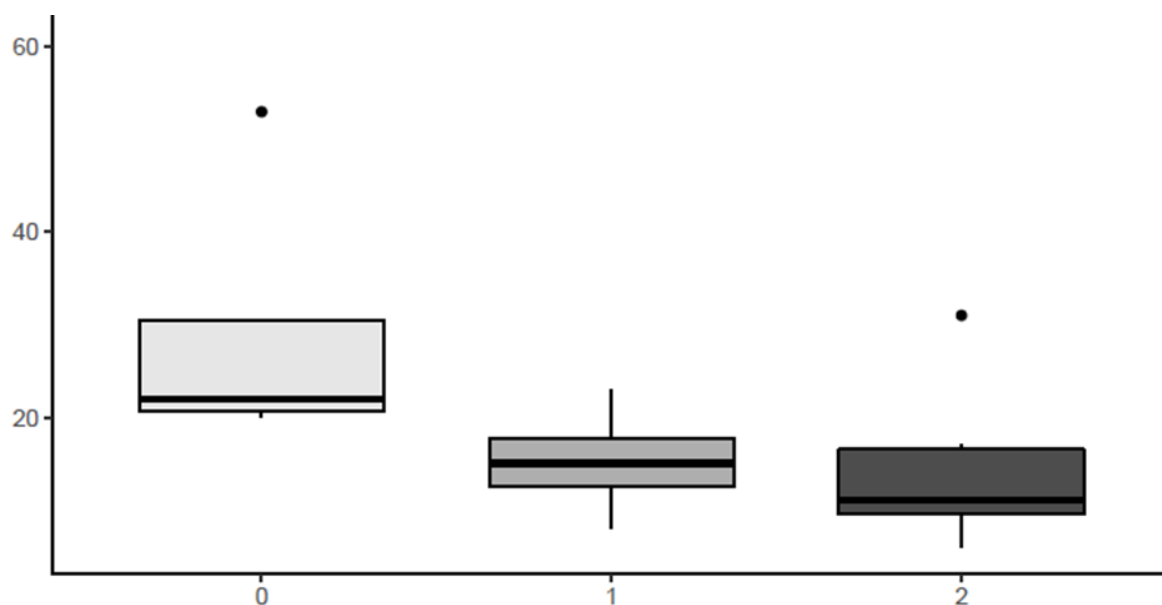
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego liczby komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian w stosunku do stopnia histologicznej złośliwości guza (grade). Wyższe wartości ujawniono w guzach o wyższym stopniu histologicznej złośliwości (high-grade) w porównaniu do guzów o niższym stopniu histologicznej złośliwości (low-grade). Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresie 17.



**Wykres 17.** Test Wilcoxon – liczba komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian (oś y) w zależności od stopnia histologicznej złośliwości guza (oś x).

**Legenda:** 0 – niższy stopień histologicznej złośliwości (low-grade); 1 – wyższy stopień histologicznej złośliwości (high-grade)

Uwidoczniono występowanie trendu dotyczącego liczby komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian w stosunku do lokalizacji guza wg WHO (strona prawa, strona lewa, odbytnica). Zaobserwowano wyższe wartości w guzach zlokalizowanych po stronie prawej w porównaniu do guzów zlokalizowanych po stronie lewej oraz w odbytnicy. Wyniki przedstawiono na wykresie 18.

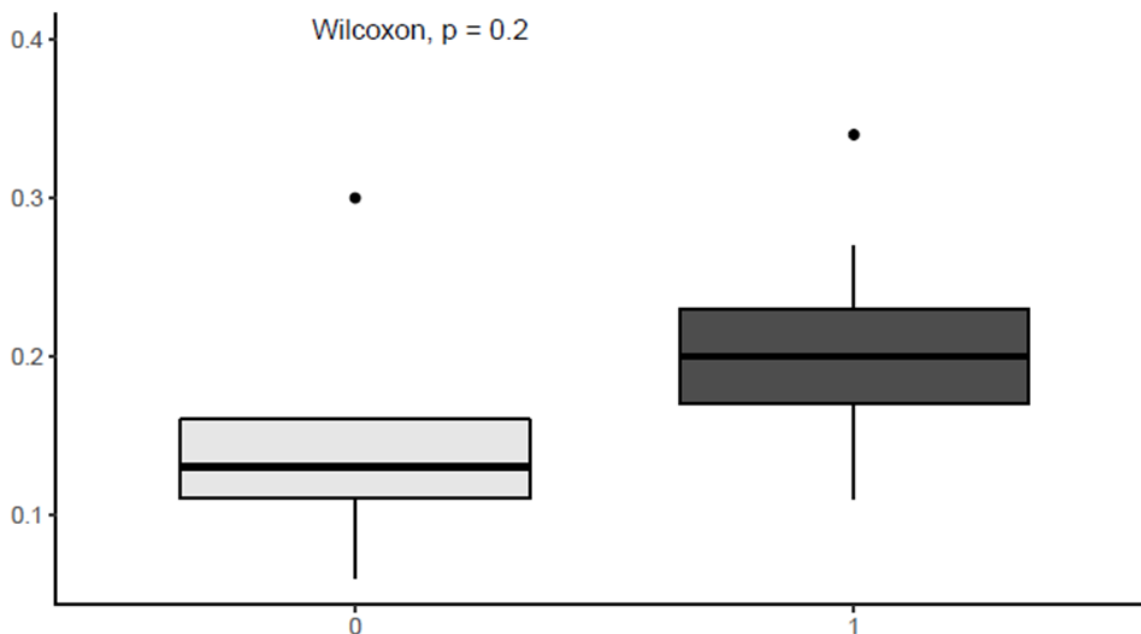


**Wykres 18.** Test Kruskala – Wallisa – liczba komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian (oś y) w zależności od lokalizacji guza wg WHO (oś x).

**Legenda:** 0 – strona prawa; 1 – strona lewa; 2 – odbytnica

## Trend dotyczący stosunku liczby komórek PD-1(+) do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia

Ujawniono występowanie trendu dotyczącego stosunku liczby komórek PD-1(+) do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do występowania owrzodzenia. Wyższe wartości zaobserwowano w guzach bez owrzodzenia w porównaniu z guzami z obecnością owrzodzenia. Wyniki przedstawia wykres 19.



**Wykres 19.** Test Wilcoxona – stosunek liczby komórek PD-1(+) do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od obecności owrzodzenia (oś x).

**Legenda:** 0 – obecność owrzodzenia; 1 – brak owrzodzenia

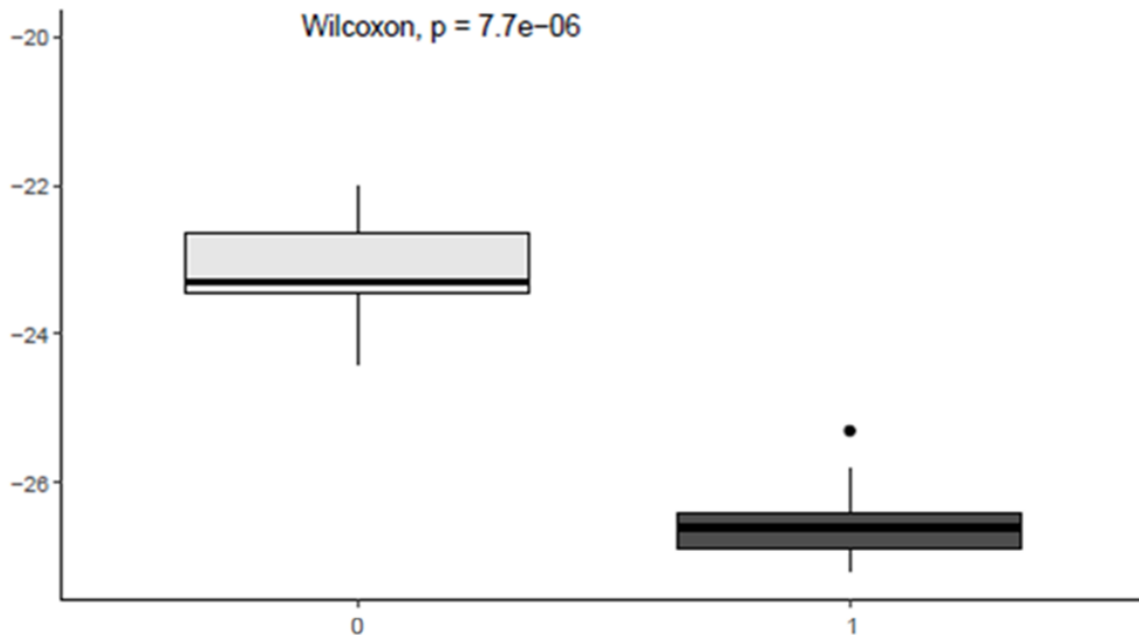
### 4.3.2. Analiza statystyczna wyników pomiarów izotopowych

#### ZNAMIENTNE STATYSTYCZNIE RÓŻNICE DOTYCZĄCE SKŁADU IZOTOPOWEGO

W przeprowadzonym badaniu ujawniono istotne statystycznie różnice dotyczące składu izotopowego zarówno węgla, jak i azotu.

#### Znamienne statystycznie różnice dotyczące składu izotopowego węgla

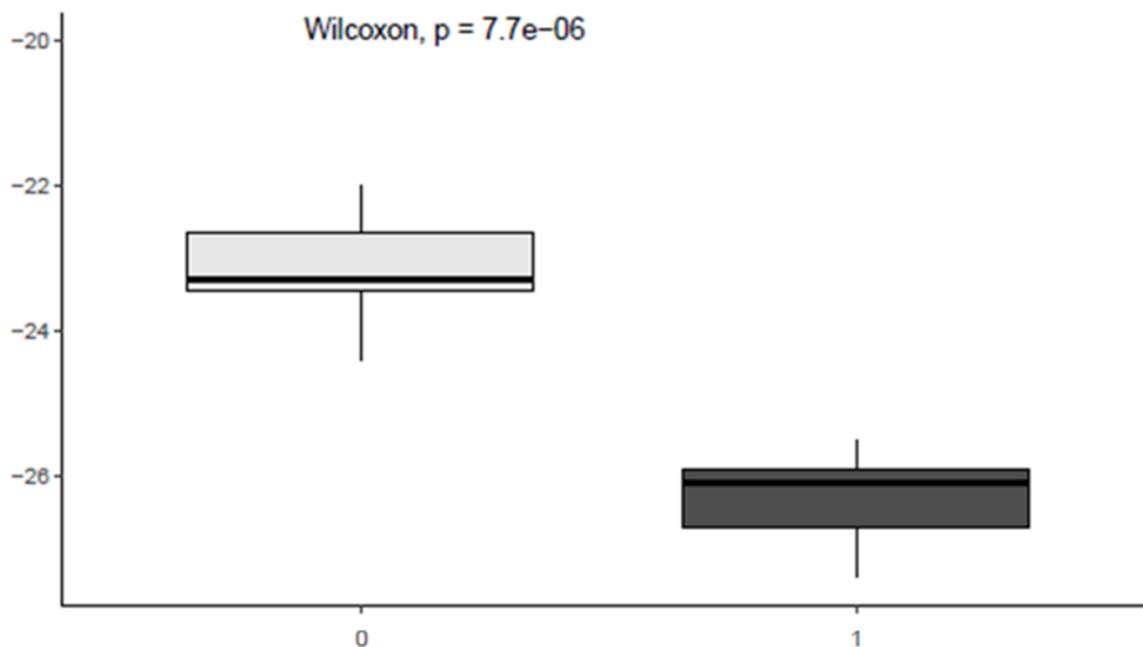
Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w wartości delta  $^{13}\text{C}$  pomiędzy centrum guza a kreską w rzucie guza ( $p=7,7\text{e-}06$ ). Wyższe wartości ujawniono w centrum guza w porównaniu do kreski w rzucie guza. Wyniki przedstawia wykres 20.



**Wykres 20.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w centrum guza oraz kresce w rzucie guza (oś x) ( $p=7,7\text{e-}06$ ).

**Legenda:** 0 – centrum guza; 1 – kreska w rzucie guza

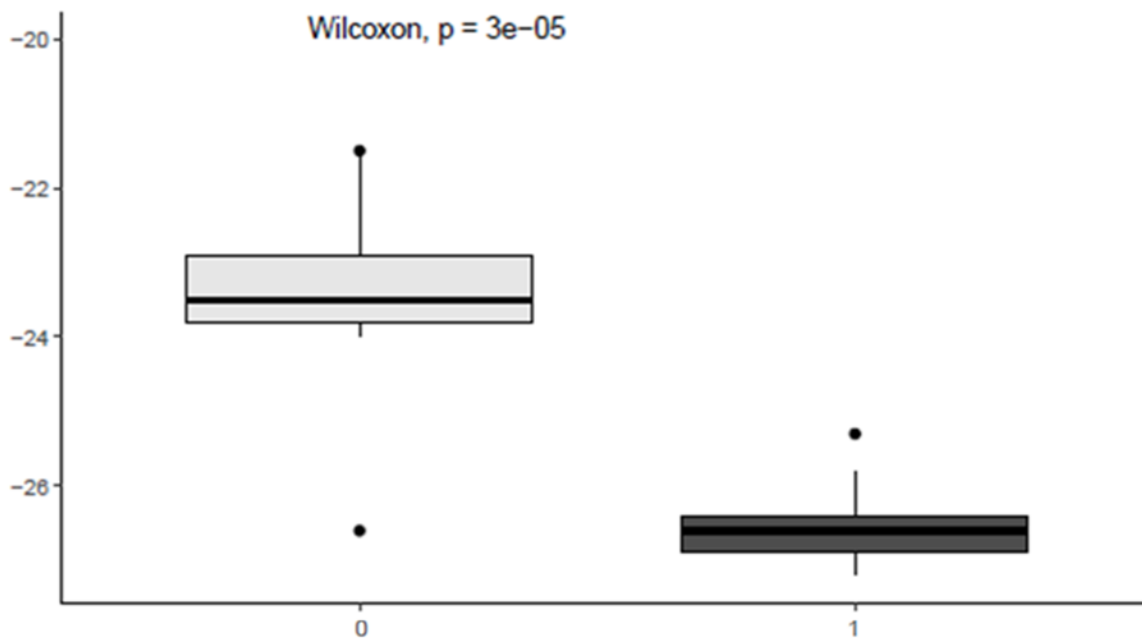
Ujawniono istotne statystycznie różnice w wartości delta  $^{13}\text{C}$  pomiędzy centrum guza a kreską także poza guzem ( $p=7,7\text{e-}06$ ). Wyższe wartości zaobserwowano w centrum guza w porównaniu do kreski poza guzem. Wyniki przedstawia wykres 21.



**Wykres 21.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w centrum guza oraz kresce poza guzem (oś x) ( $p=7,7\text{e-}06$ ).

**Legenda:** 0 – centrum guza; 1 – kreska poza guzem

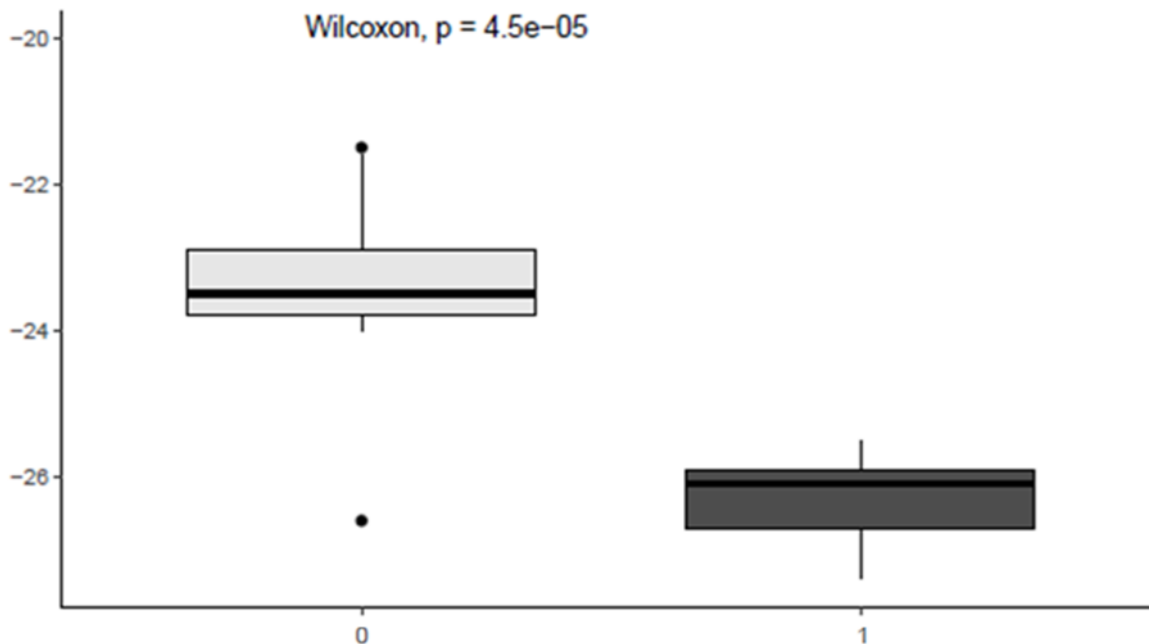
Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w wartości delta  $^{13}\text{C}$  pomiędzy obrzeżem guza a kreską w rzucie guza ( $p=3\text{e-}05$ ). Wyższe wartości ujawniono w obrzeżu guza w porównaniu z kreską w rzucie guza. Wyniki przedstawia wykres 22.



**Wykres 22.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w obrzeżu guza oraz kresce w rzucie guza (oś x) ( $p=3\text{e-}05$ ).

**Legenda:** 0 – obrzeże guza; 1 – kreska w rzucie guza

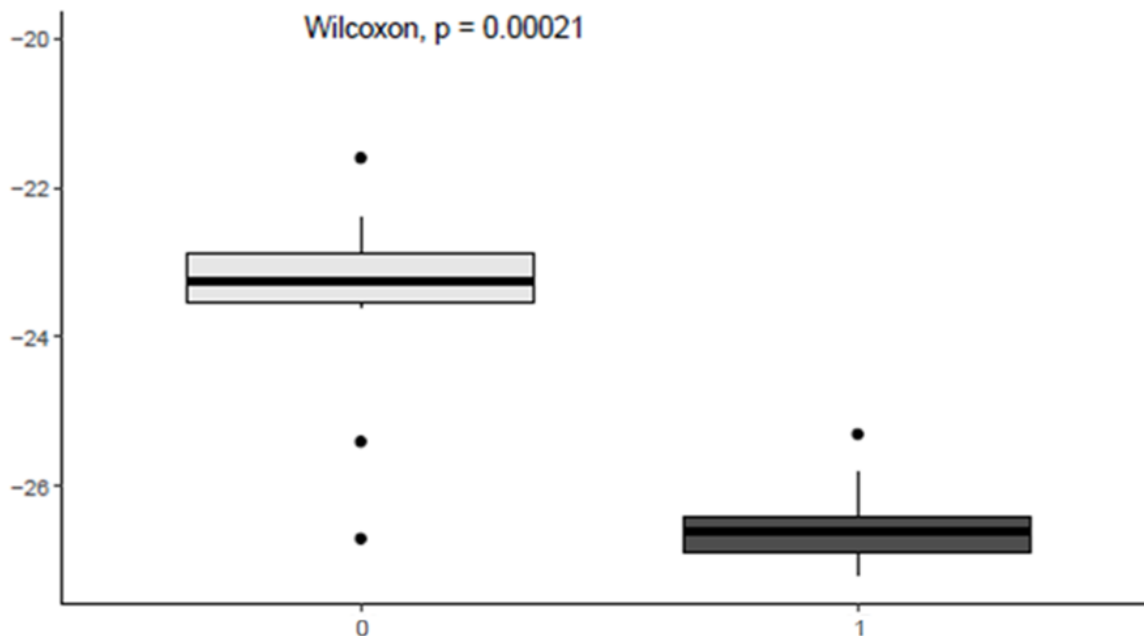
Ujawniono istotne statystycznie różnice w wartości delta  $^{13}\text{C}$  pomiędzy obrzeżem guza a kreską poza guzem ( $p=4,5e-05$ ). Wyższe wartości ujawniono w obrzeżu guza w porównaniu z kreską poza guzem. Wyniki przedstawia wykres 23.



**Wykres 23.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w obrzeżu guza oraz kresce poza guzem (oś x) ( $p=4,5e-05$ ).

**Legenda:** 0 – obrzeże guza; 1 – kreska poza guzem

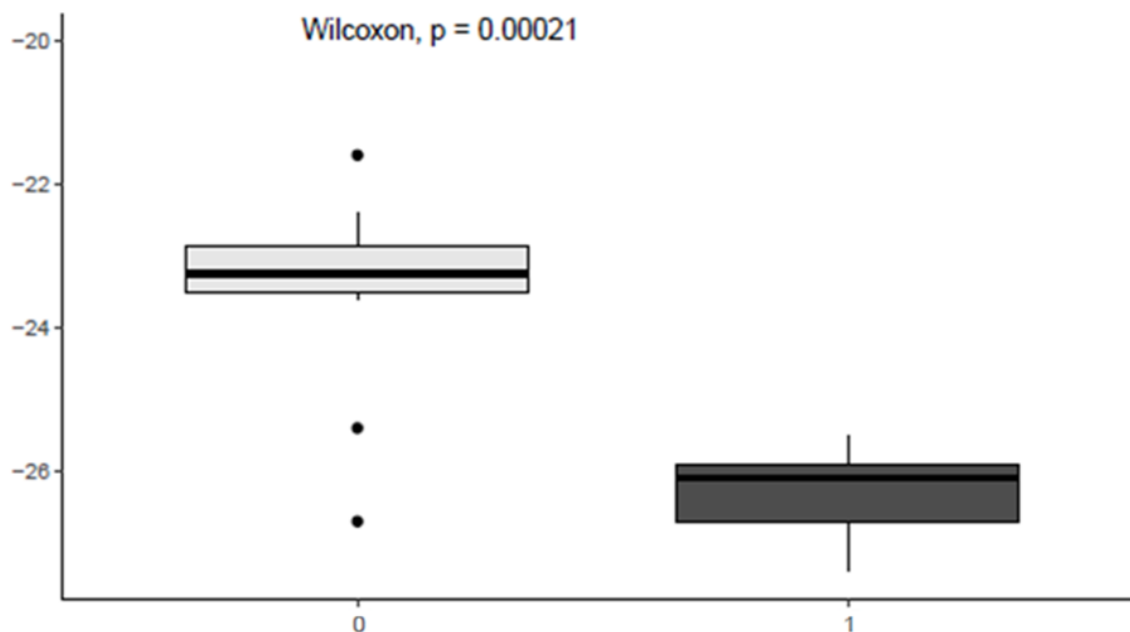
Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w wartości delta  $^{13}\text{C}$  w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza a krezce w rzucie guza ( $p=0,00021$ ). Wyższe wartości ujawniono w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza w porównaniu z kreską w rzucie guza. Wyniki przedstawiono na wykresie 24.



**Wykres 24.** Test Wilcoxon – delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz krezce w rzucie guza (oś x) ( $p=0,00021$ ).

**Legenda:** 0 – ściana jelita bez zmian w rzucie guza; 1 – krezka w rzucie guza

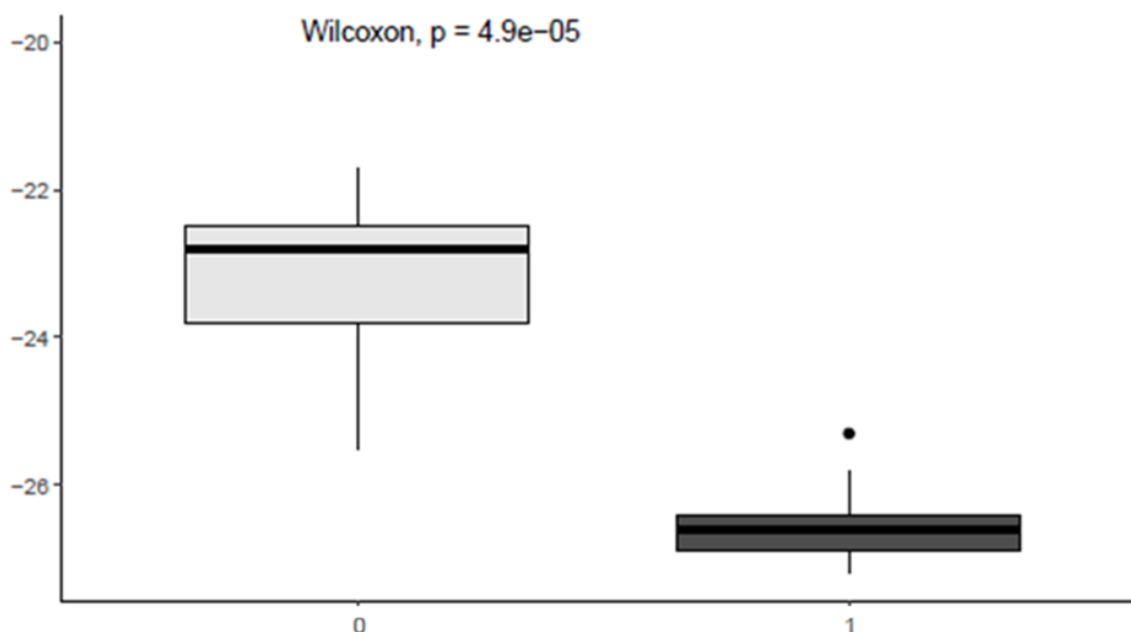
Ujawniono istotne statystycznie różnice w wartości delta  $^{13}\text{C}$  w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza a krezce poza guzem ( $p=0,00021$ ). Wyższe wartości ujawniono w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza w porównaniu z krezką poza guzem. Wyniki przedstawiono na wykresie 25.



**Wykres 25.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz krezce poza guzem (oś x) ( $p=0,00021$ ).

**Legenda:** 0 – ściana jelita bez zmian w rzucie guza; 1 – krezka poza guzem

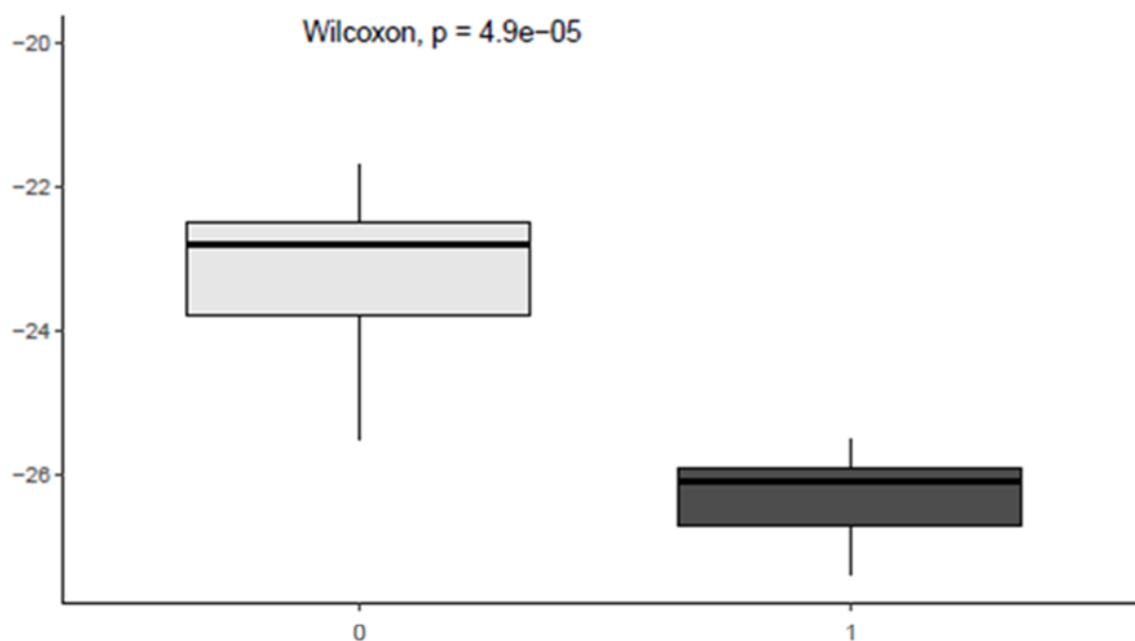
Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w wartości delta  $^{13}\text{C}$  w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem a kreską w rzucie guza ( $p=4,9\text{e-}05$ ). Wyższe wartości ujawniono w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w porównaniu do kreski w rzucie guza. Wyniki przedstawiono na wykresie 26.



**Wykres 26.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem oraz kresce w rzucie guza (oś x) ( $p=4,9\text{e-}05$ ).

**Legenda:** 0 – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem; 1 – kreska w rzucie guza

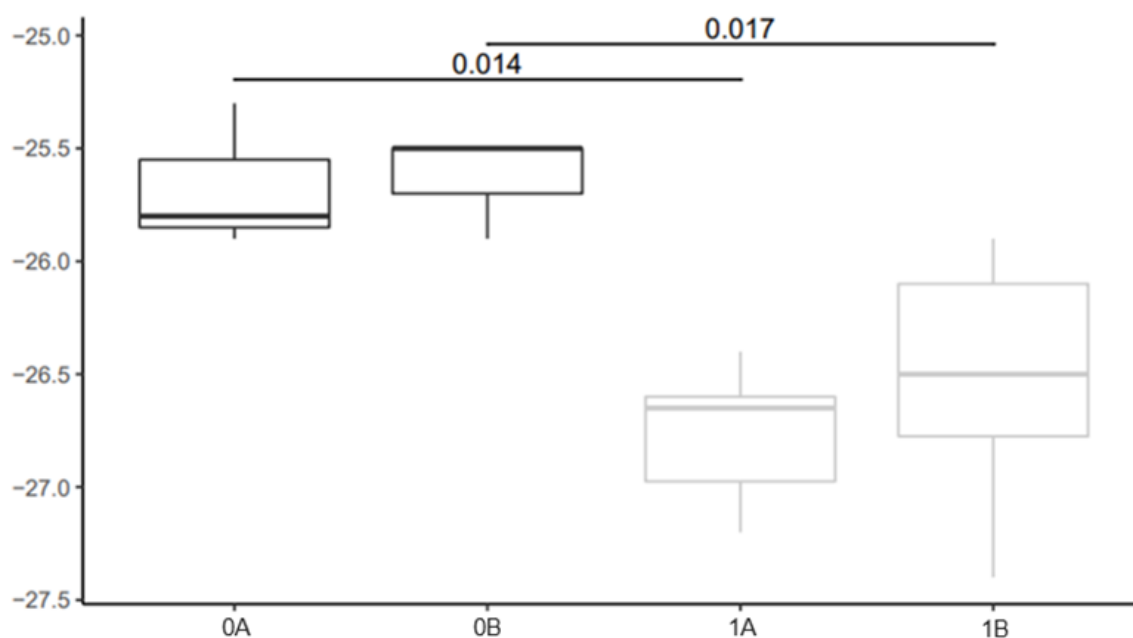
Ujawniono istotne statystycznie różnice w wartości delta  $^{13}\text{C}$  w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem a kreską poza guzem ( $p=4,9\text{e-}05$ ). Wyższe wartości ujawniono w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w porównaniu do kreski poza guzem. Wyniki przedstawiono na wykresie 27.



**Wykres 27.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem oraz kresce poza guzem (oś x) ( $p=4,9\text{e-}05$ ).

**Legenda:** 0 – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem; 1 – kreska poza guzem

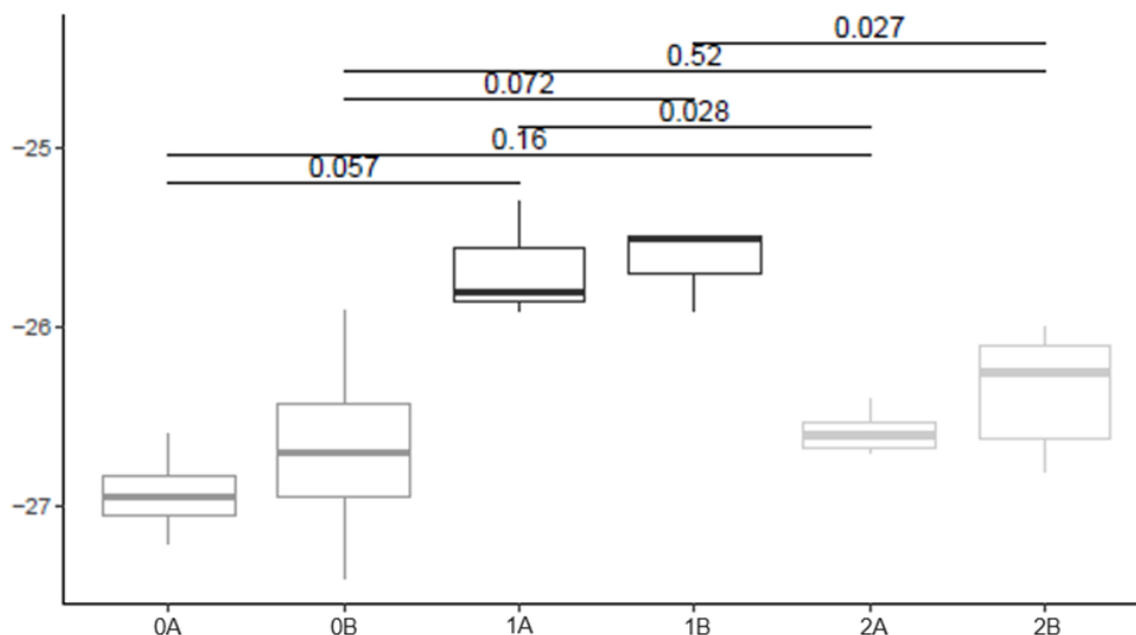
Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w wartości delta  $^{13}\text{C}$  przy zastosowaniu zmiennej grupującej – lokalizacja guza (strona prawa, strona lewa). Znamienne statystycznie różnice ujawniono w krezce w rzucie guza pomiędzy guzami zlokalizowanym po stronie prawej a guzami po stronie lewej ( $p=0,014$ ), a także w krezce poza guzem pomiędzy prawostronną a lewostronną lokalizacją guza ( $p=0,017$ ). W obu przypadkach wyższe wartości zaobserwowano w guzach zlokalizowanych po stronie prawej w porównaniu do guzów zlokalizowanych po stronie lewej. Wyniki przedstawia wykres 28.



**Wykres 28.** Test Wilcoxona - delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem w zależności lokalizacji guza (oś x).

**Legenda:** 0A – krezka w rzucie guza strona prawa; 0B – krezka poza guzem strona prawa; 1A – krezka w rzucie guza strona lewa; 1B – krezka poza guzem strona lewa

Ujawniono istotne statystycznie różnice w wartości delta  $^{13}\text{C}$  przy zastosowaniu zmiennej grupującej – dokładna lokalizacja guza wg WHO (strona prawa, strona lewa, odbytnica). Znamienne statystycznie różnice ujawniono w krezce w rzucie guza pomiędzy guzami zlokalizowanym po stronie prawej a guzami odbytnicy ( $p=0,028$ ), a także w krezce poza guzem pomiędzy guzami po stronie prawej a guzami zlokalizowanymi w odbytnicy ( $p=0,027$ ). W obu przypadkach wyższe wartości zaobserwowano w guzach zlokalizowanych po stronie prawej w porównaniu do guzów zlokalizowanych w odbytnicy. Wyniki przedstawia wykres 29.

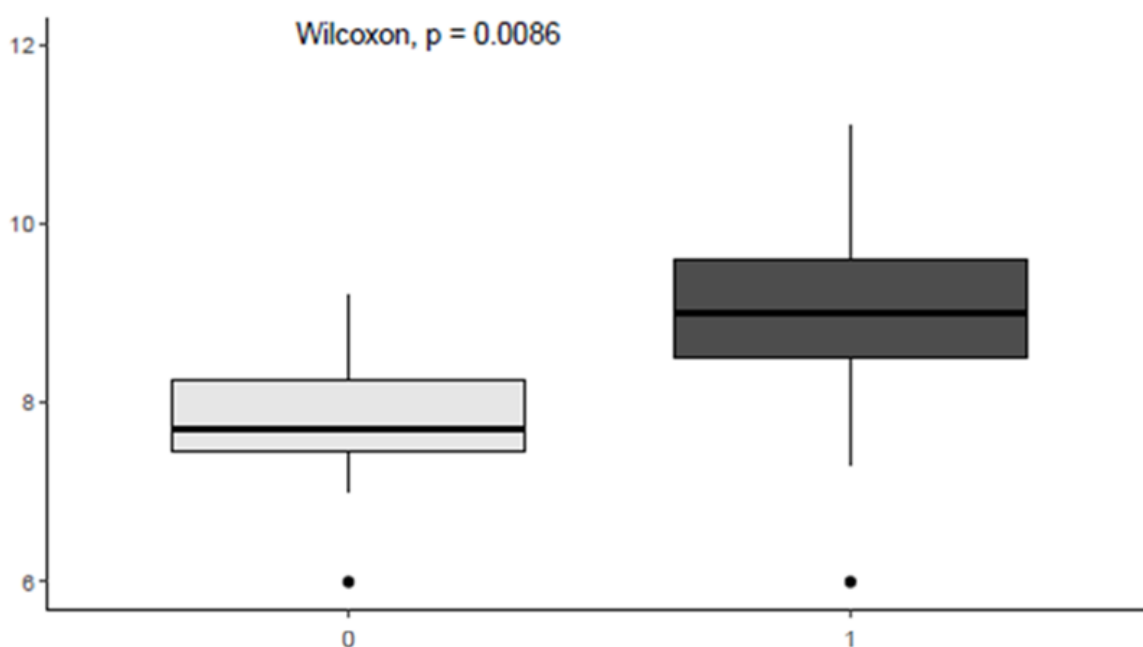


**Wykres 29.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w krezce w rzucie guza oraz w krezce poza guzem w zależności od lokalizacji guza wg WHO (oś x).

**Legenda:** 0A – krezka w rzucie guza strona lewa; 0B – krezka poza guzem strona lewa; 1A – krezka w rzucie guza strona prawa; 1B – krezka poza guzem strona prawa; 2A – krezka w rzucie guza odbytnica; 2B – krezka poza guzem odbytnica

## Znamienne statystycznie różnice dotyczące składu izotopowego azotu

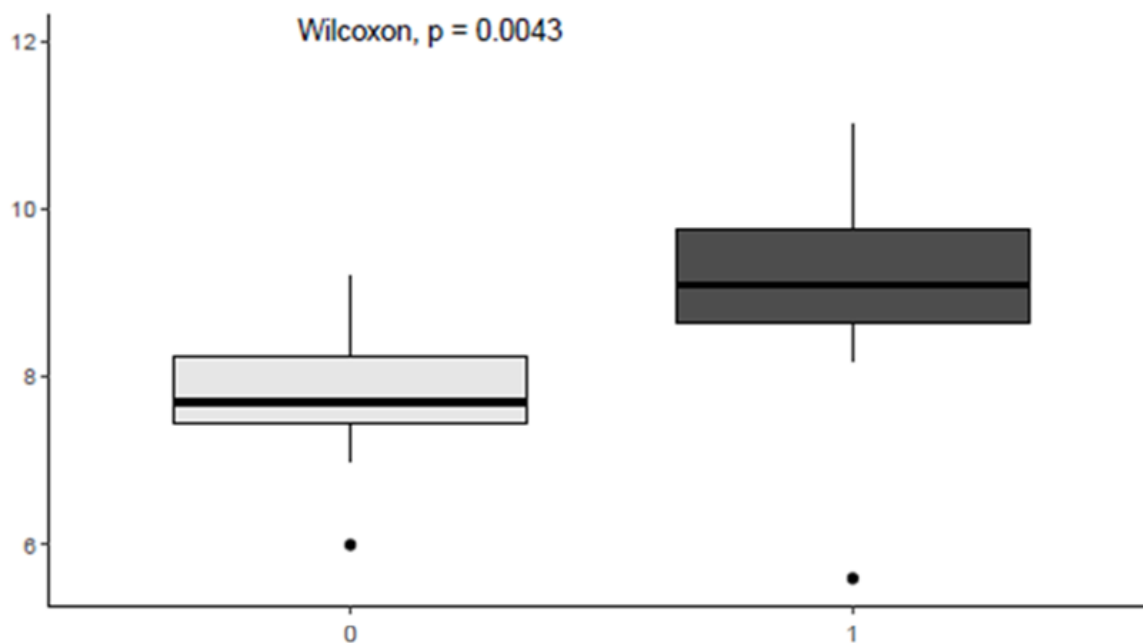
Ujawniono istotne statystycznie różnice w wartości delta  $^{15}\text{N}$  w centrum guza a ścianie jelita bez zmian w rzucie guza ( $p=0,0086$ ). Wyższe wartości zaobserwowano w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza w porównaniu do centrum guza. Wyniki przedstawiono na wykresie 30.



**Wykres 30.** Test Wilcoxona – delta  $^{15}\text{N}$  (oś y) w centrum guza oraz w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza (oś x) ( $p=0,0086$ ).

**Legenda:** 0 – centrum guza; 1 – ściana jelita bez zmian w rzucie guza

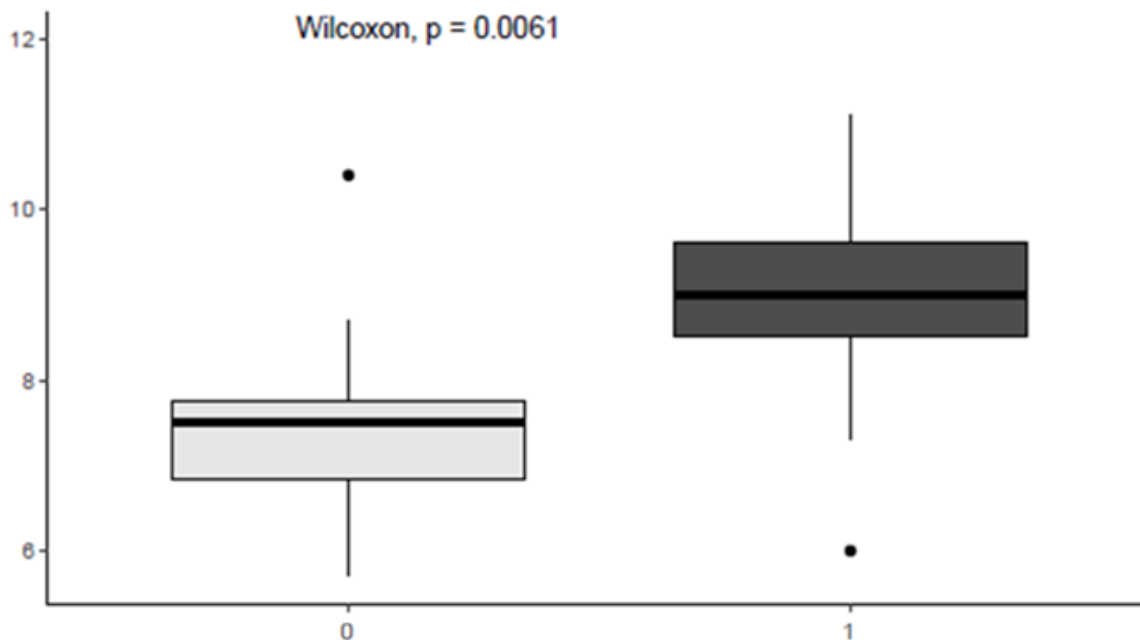
Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w wartości delta  $^{15}\text{N}$  w centrum guza a ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem ( $p=0,0043$ ). Wyższe wartości ujawniono w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w porównaniu do centrum guza. Wyniki przedstawia wykres 31.



**Wykres 31.** Test Wilcoxona – delta  $^{15}\text{N}$  (oś y) w centrum guza oraz w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem (oś x) ( $p=0,0043$ ).

**Legenda:** 0 – w centrum guza; 1 – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem

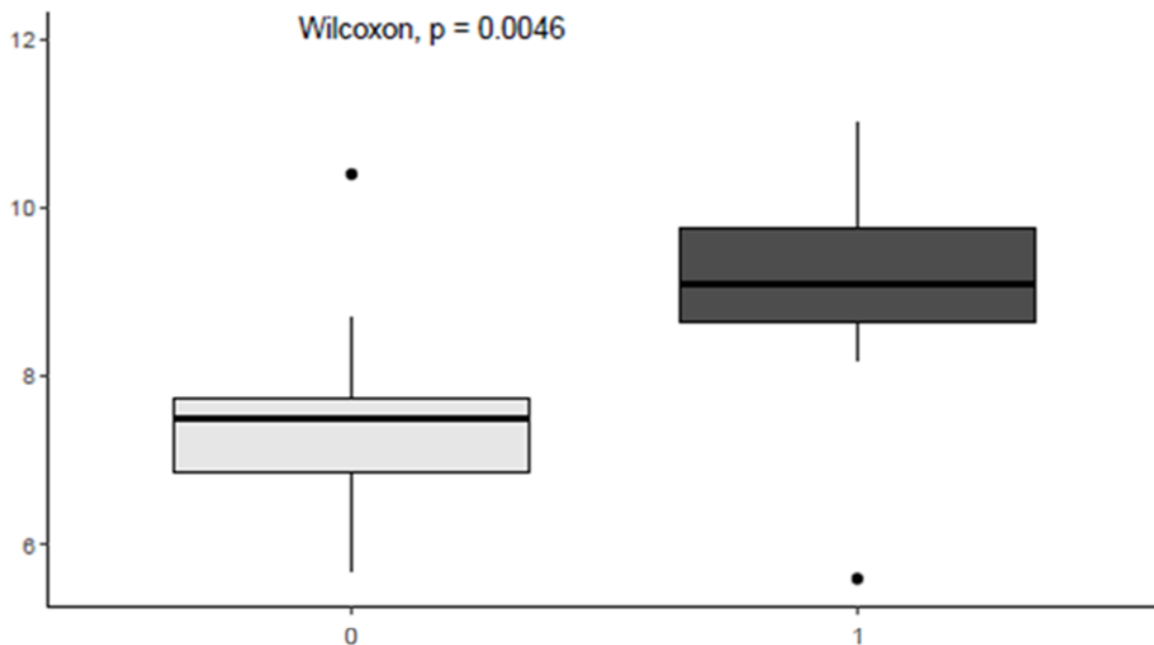
Ujawniono istotne statystycznie różnice w wartości delta  $^{15}\text{N}$  w obrzeżu guza a ścianie jelita bez zmian w rzucie guza ( $p=0,0061$ ). Wyższe wartości delta  $^{15}\text{N}$  zaobserwowano w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza w porównaniu do obrzeża guza. Wyniki przedstawiono na wykresie 32.



**Wykres 32.** Test Wilcoxona – delta  $^{15}\text{N}$  (oś y) w centrum guza oraz w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza (oś x) ( $p=0,0061$ ).

**Legenda:** 0 – obrzeże guza; 1 – ściana jelita bez zmian w rzucie guza

Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w wartości delta  $^{15}\text{N}$  w obrzeżu guza a ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem ( $p=0,0046$ ). Wyższe wartości ujawniono w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w porównaniu do obrzeża guza. Wyniki przedstawia wykres 33.



**Wykres 33.** Test Wilcoxona – delta  $^{15}\text{N}$  (oś y) w obrzeżu guza oraz w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem (oś x) ( $p=0,0046$ ).

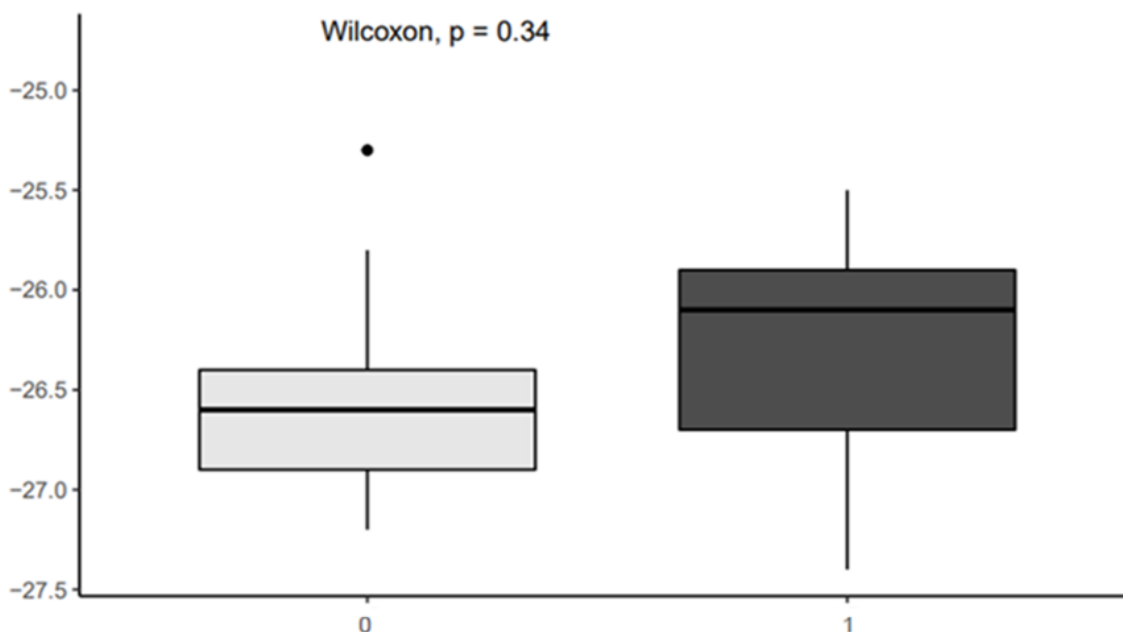
**Legenda:** 0 – obrzeże guza; 1 – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem

## TRENDY DOTYCZĄCE SKŁADU IZOTOPOWEGO

Oprócz ujawnionych znamienności statystycznych zaobserwowano liczne trendy, mogące sugerować występowanie zależności pomiędzy porównywanymi parametrami, pomimo braku uzyskania istotności statystycznej w prezentowanym badaniu. Brak uzyskania istotności statystycznej mógł wynikać z braku homogenności, małej liczebności części z badanych grup oraz występowania wartości odstających. Uzyskane wyniki wydają się jednak istotne dla potencjalnego rozważenia kontynuacji wskazanego kierunku badań na liczniejszych i bardziej homogennych grupach.

### Trendy dotyczące składu izotopowego węgla

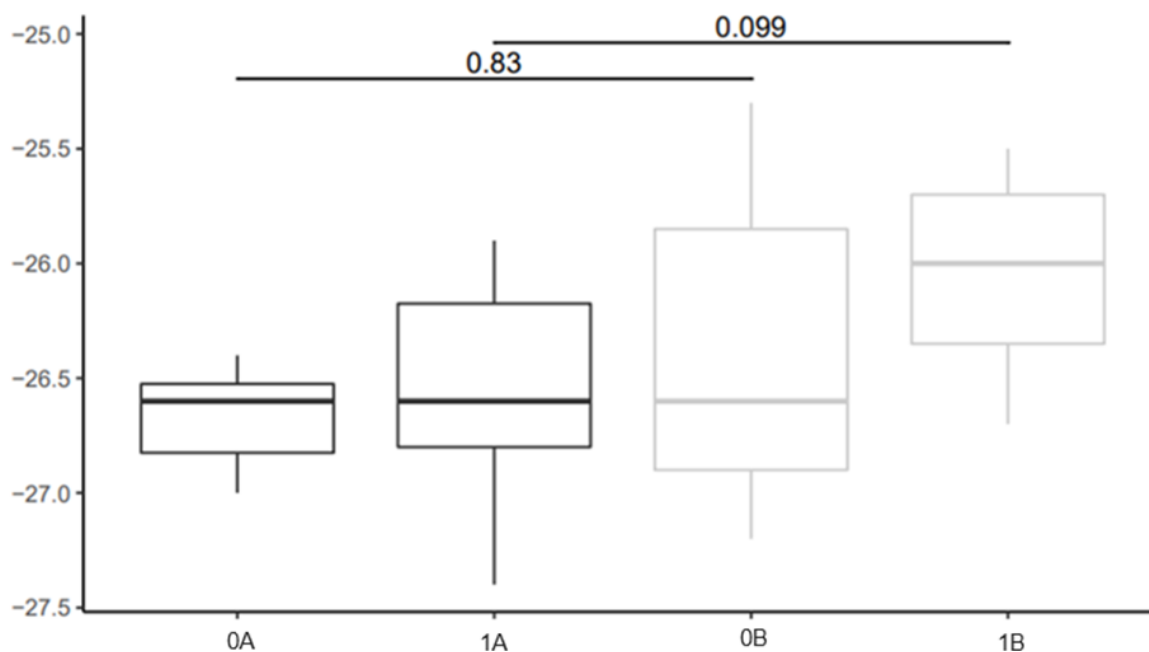
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego węgla w krezce w rzucie guza w stosunku do krezki poza guzem. Wyższe wartości ujawniono w krezce poza guzem. Wyniki przedstawiono na wykresie 34.



**Wykres 34.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem (oś x).

**Legenda:** 0 – krezka w rzucie guza; 1 – krezka poza guzem

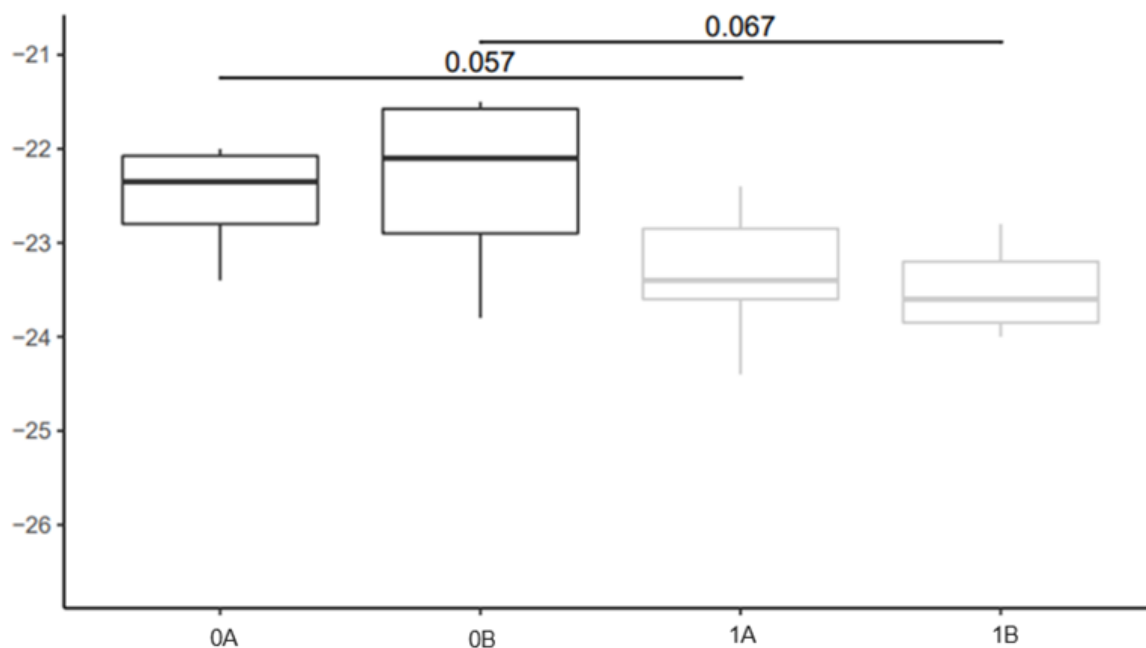
Ujawniono występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego węgla w stosunku do płci. Zaobserwowano różnice w krezce poza guzem pomiędzy płcią męską oraz żeńską. Wyższe wartości wykazano u płci męskiej. Wyniki przedstawia wykres 35.



**Wykres 35.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}C$  (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem w zależności od płci (oś x).

**Legenda:** 0A – krezka w rzucie guza u mężczyzn; 1A – krezka poza guzem u mężczyzn; 0B – krezka w rzucie guza u kobiet; 1B – krezka poza guzem u kobiet

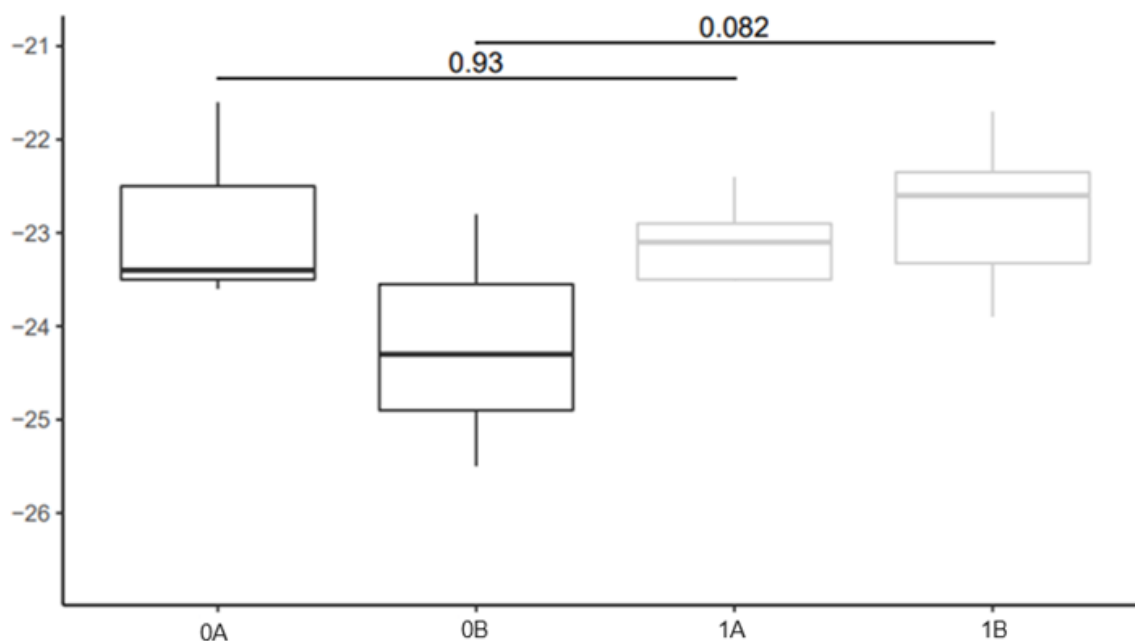
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego węgla przy zastosowaniu zmiennej grupującej – lokalizacja guza (strona prawa, strona lewa). Ujawniono różnice w centrum guza pomiędzy guzami po prawej stronie a lewej stronie oraz w obrzeżu guza pomiędzy guzami prawostronnymi a guzami lewostronnymi. Wyższe wartości występowały w guzach po stronie prawej w porównaniu do guzów po stronie lewej. Wyniki przedstawia wykres 36.



**Wykres 36.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w centrum oraz obrzeżu guza w zależności od lokalizacji guza (oś x).

**Legenda:** 0A – centrum guza, strona prawa; 0B – obrzeże guza, strona prawa; 1A – centrum guza, strona lewa; 1B – obrzeże guza, strona lewa

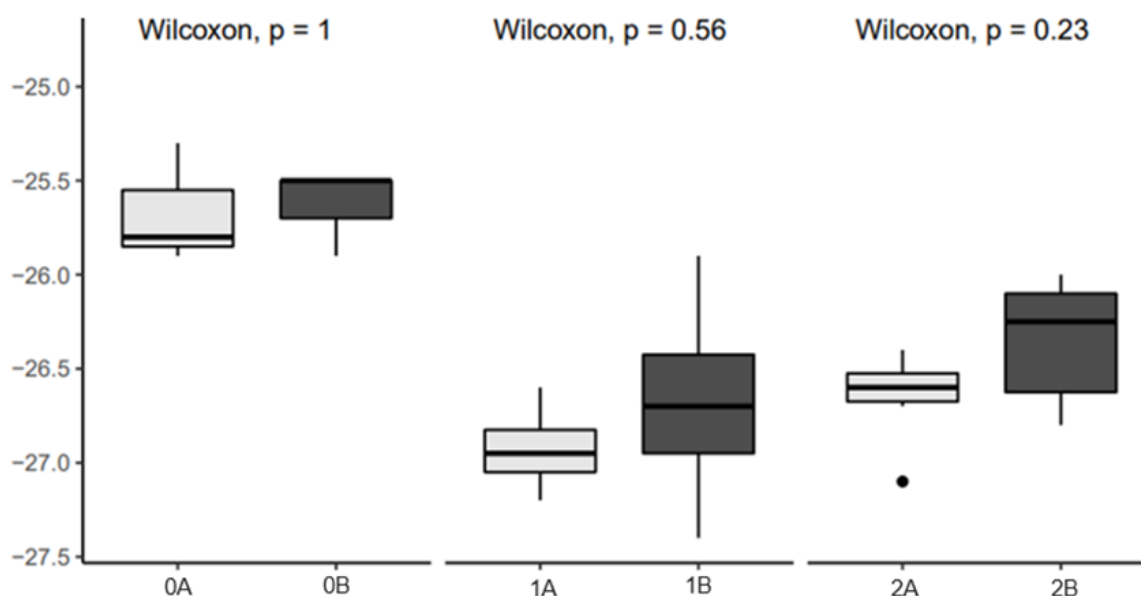
Ujawniono występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego węgla przy zastosowaniu zmiennej grupującej – lokalizacja guza (strona prawa, strona lewa). Zaobserwowano różnice w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem pomiędzy guzami zlokalizowanymi po prawej stronie a lewej stronie. Wyższe wartości występowały w guzach po stronie lewej w porównaniu do guzów po stronie prawej. Wyniki przedstawia wykres 37.



**Wykres 37.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w zależności lokalizacji guza (oś x).

**Legenda:** 0A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, strona prawa; 0B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, strona prawa; 1A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, strona lewa; 1B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, strona lewa

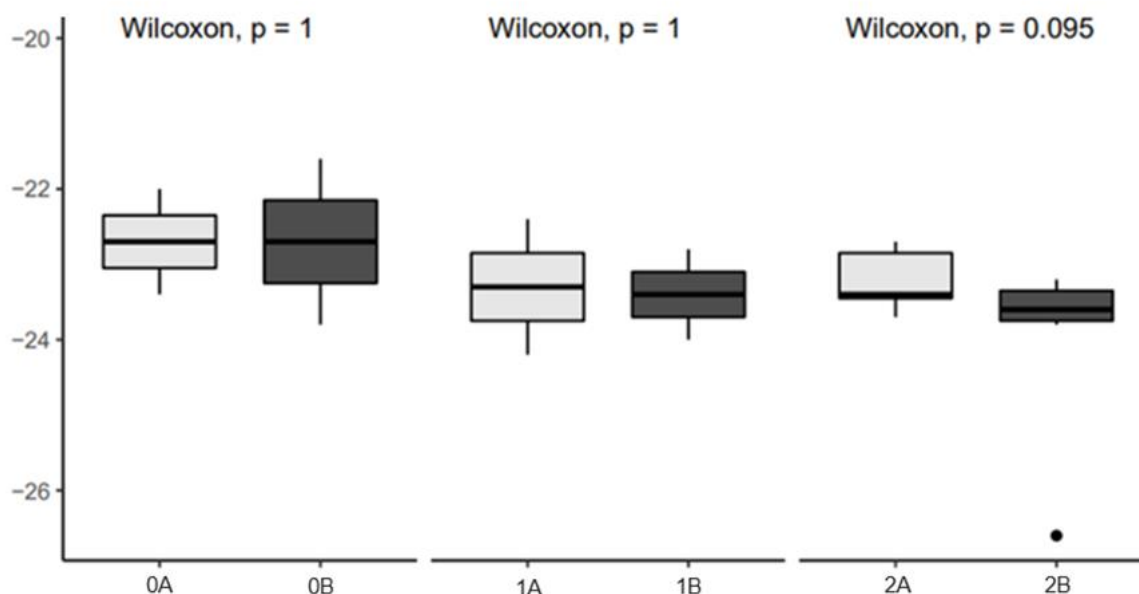
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego węgla przy zastosowaniu zmiennej grupującej – lokalizacja guza wg WHO (strona prawa, strona lewa, odbytница). Ujawniono różnice pomiędzy kreską w rzucie guza a kreską poza guzem przy lokalizacji guza po stronie prawej, po stronie lewej oraz w odbytнице. W każdym z przypadków wyższe wartości występowały w kresce poza guzem w porównaniu do kreski w rzucie guza. Wyniki przedstawia wykres 38.



**Wykres 38.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}C$  (oś y) w kresce w rzucie guza oraz kresce poza guzem w zależności lokalizacji guza wg WHO (oś x).

**Legenda:** 0A – kreska w rzucie guza, strona prawa; 0B – kreska poza guzem, strona prawa; 1A – kreska w rzucie guza, strona lewa; 1B – kreska poza guzem, strona lewa; 2A – kreska w rzucie guza, odbytница; 2B – kreska poza guzem, odbytница

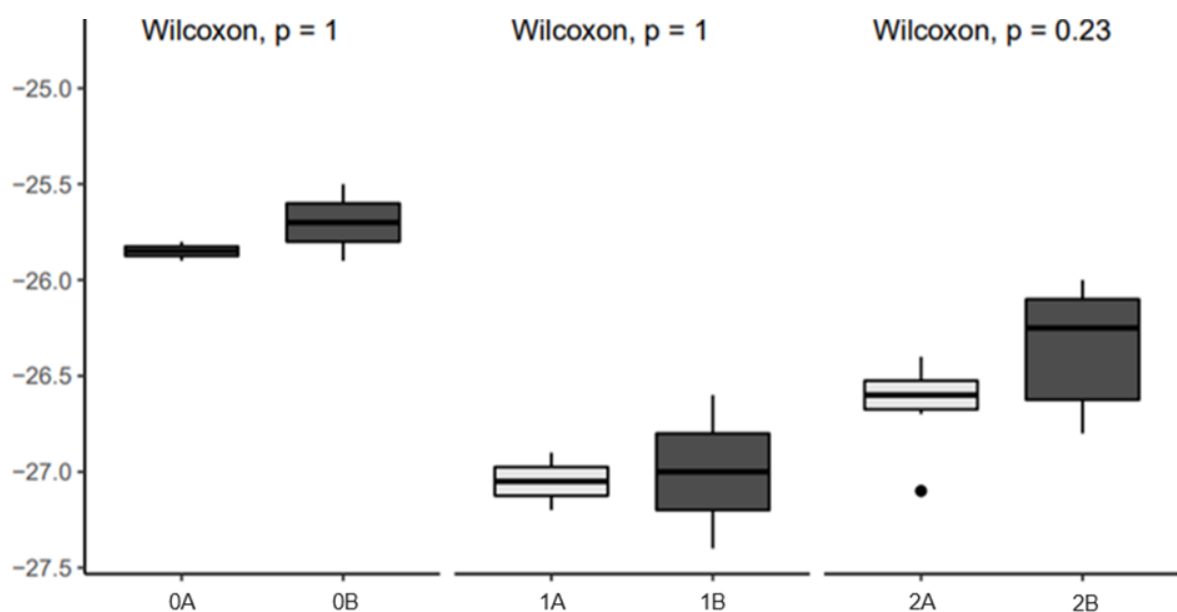
Ujawniono występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego węgla przy zastosowaniu zmiennej grupującej – dokładna lokalizacja guza (kątnica, wstępnicza, zagięcie wątrobowe, poprzecznicza, zagięcie śledzionowe, zstępnicza, esica, zagięcie esiczo-odbytnicze, odbytnica). Zaobserwowano różnice pomiędzy centrum guza a obrzeżem guza przy lokalizacji guza w odbytnicy. Wyższe wartości występowały w centrum guza w porównaniu do obrzeża guza. Wyniki przedstawia wykres 39.



**Wykres 39.** Test Wilcoxona - delta <sup>13</sup>C (oś y) w centrum guza oraz obrzeżu guza w zależności od dokładnej lokalizacji guza (oś x).

**Legenda:** 0A – centrum guza, wstępnicza; 0B – obrzeże guza, wstępnicza; 1A – centrum guza, zagięcie śledzionowe; 1B – obrzeże guza, zagięcie śledzionowe; 2A – centrum guza, odbytnica; 2B – obrzeże guza, odbytnica

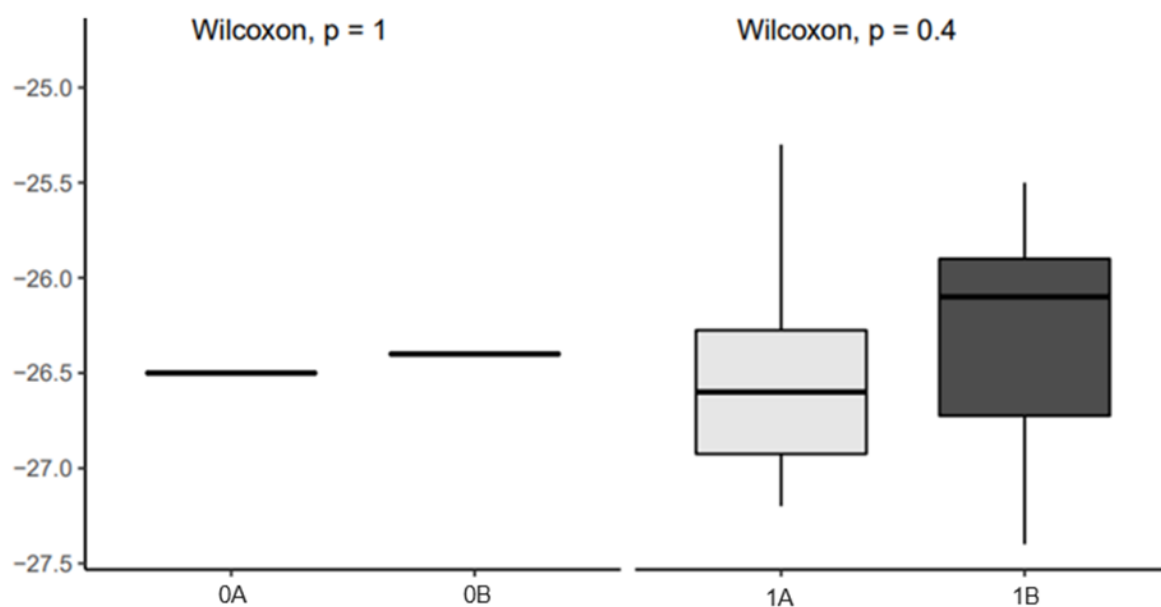
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego węgla przy zastosowaniu zmiennej grupującej – dokładna lokalizacja guza (kątnica, wstępnicza, zagięcie wątrobowe, poprzecznicza, zagięcie śledzionowe, zstępnicza, esica, zagięcie esiczo-odbytnicze, odbytnica). Ujawniono różnice pomiędzy krezką w rzucie guza a krezką poza guzem przy lokalizacji guza w odbytnicy. Wyższe wartości występowały w krezce poza guzem w porównaniu do krezki w rzucie guza. Wyniki przedstawia wykres 40.



**Wykres 40.** Test Wilcoxona - delta  $^{13}C$  (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem w zależności od dokładnej lokalizacji guza (oś x).

**Legenda:** 0A – krezka w rzucie guza, wstępnicza; 0B – krezka poza guzem, wstępnicza; 1A – krezka w rzucie, zagięcie śledzionowe; 1B – krezka poza guzem, zagięcie śledzionowe; 2A – krezka w rzucie guza, odbytnica; 2B – krezka poza guzem, odbytnica

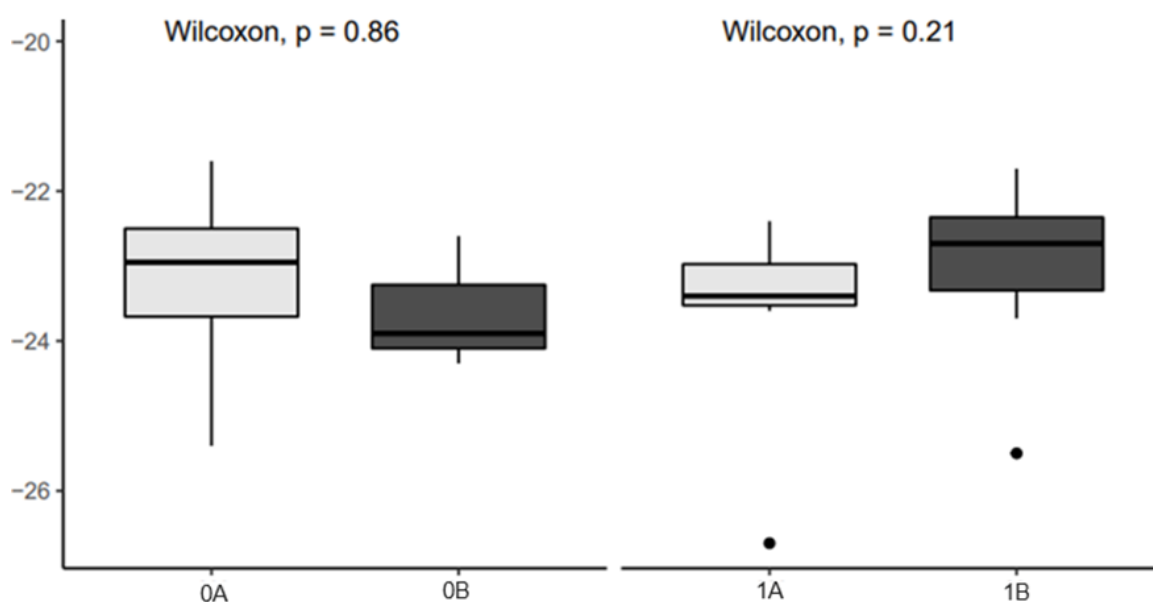
Ujawniono występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego węgla przy zastosowaniu zmiennej grupującej – produkcja śluzu przez komórki raka. Zaobserwowano różnice pomiędzy kreską w rzucie guza a kreską poza guzem w nowotworach nieprodukujących śluzu. Wyższe wartości występowały w kresce poza guzem w porównaniu do kreski w rzucie guza. Wyniki przedstawia wykres 41.



**Wykres 41.** Test Wilcoxona – delta <sup>13</sup>C (oś y) w kresce w rzucie guza oraz kresce poza guzem w zależności produkcji śluzu (oś x).

**Legenda:** 0A – kreska w rzucie guza, guz produkujący śluz; 0B – kreska poza guzem, guz produkujący śluz; 1A – kreska w rzucie guza, brak produkcji śluzu; 1B – kreska poza guzem, brak produkcji śluzu

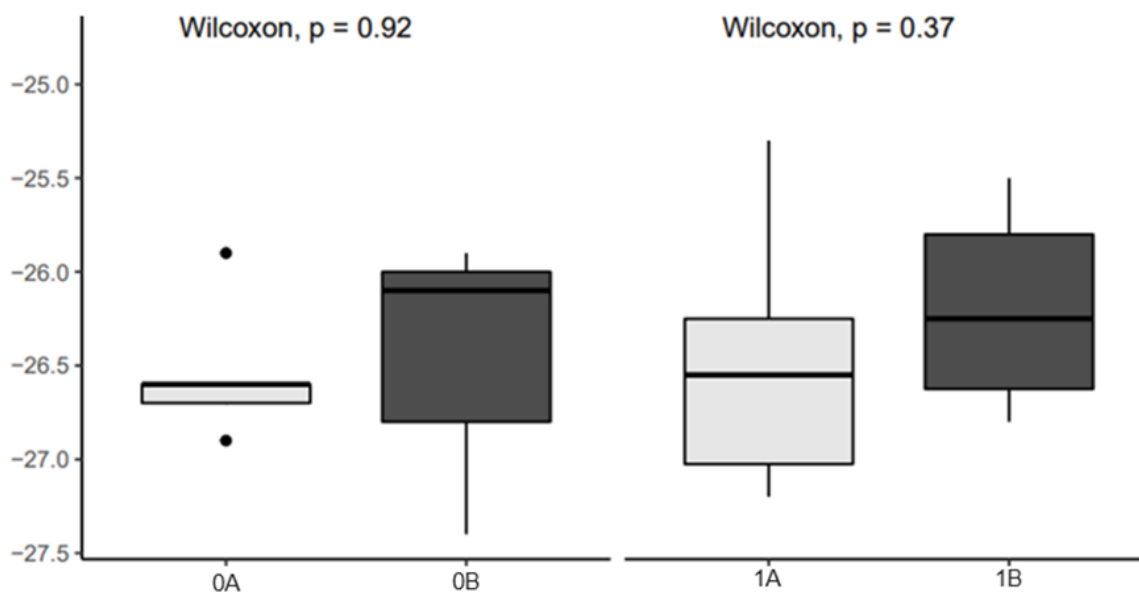
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego węgla przy zastosowaniu zmiennej grupującej – obecność owrzodzenia. Ujawniono różnice pomiędzy ścianą jelita bez zmian w rzucie guza a ścianą jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w guzach bez obecnego owrzodzenia. Wyższe wartości występowały w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w porównaniu do ściany jelita bez zmian w rzucie guza. Wyniki przedstawia wykres 42.



**Wykres 42.** Test Wilcoxona – delta <sup>13</sup>C (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w zależności od obecności owrzodzenia (oś x).

**Legenda:** 0A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, owrzodzenie obecne; 0B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, owrzodzenie obecne; 1A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, brak owrzodzenia; 1B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, brak owrzodzenia

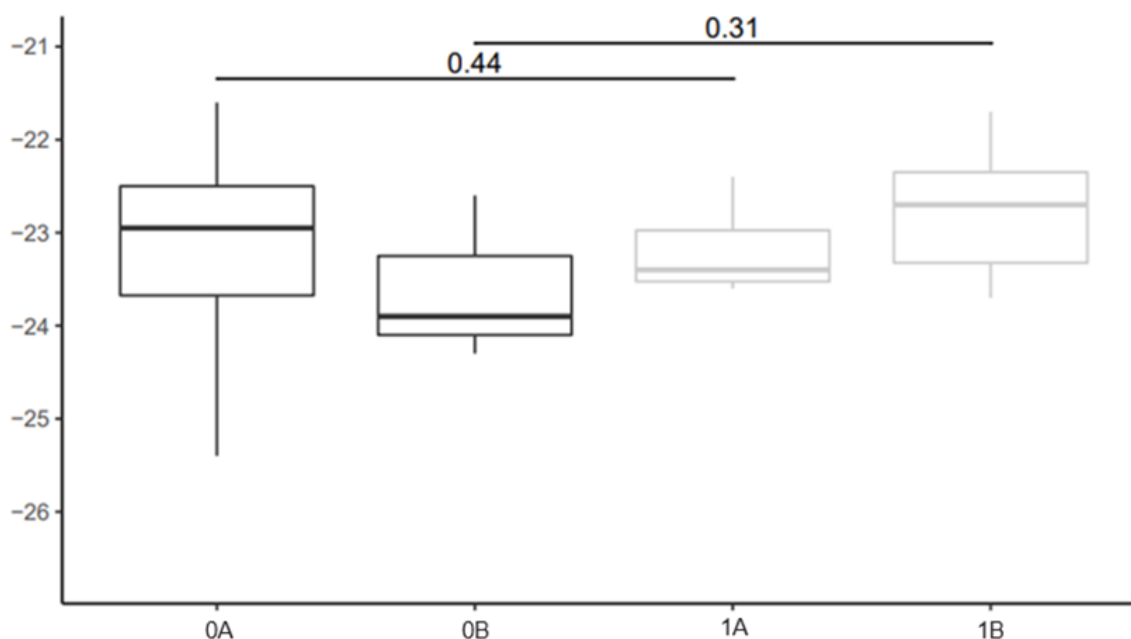
Ujawniono występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego węgla przy zastosowaniu zmiennej grupującej – obecność owrzodzenia. Zaobserwowano różnice pomiędzy kreską w rzucie guza a kreską poza guzem w guzach bez obecnego owrzodzenia. Wyższe wartości występowały w kresce poza guzem w porównaniu do kreski w rzucie guza. Wyniki przedstawia wykres 43.



**Wykres 43.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w kresce w rzucie guza oraz kresce poza guzem w zależności od obecności owrzodzenia (oś x).

**Legenda:** 0A – kreska w rzucie guza, owrzodzenie obecne; 0B – kreska poza guzem owrzodzenie obecne; 1A – kreska w rzucie guza, brak owrzodzenia; 1B – kreska poza guzem, brak owrzodzenia

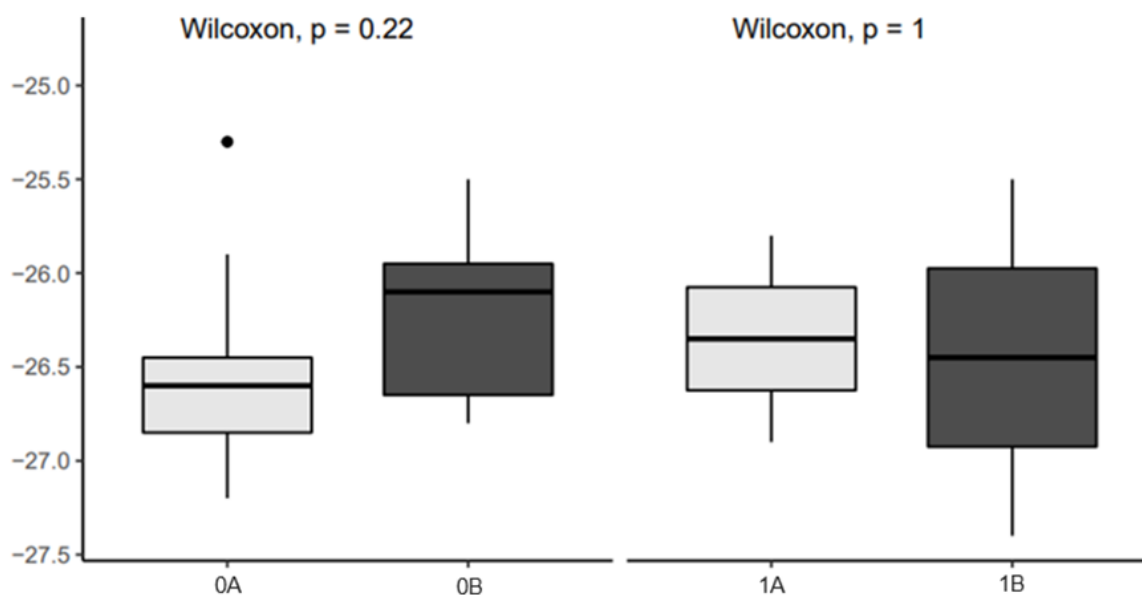
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego węgla przy zastosowaniu zmiennej grupującej – obecność owrzodzenia. Ujawniono różnice w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem pomiędzy guzami z obecnością owrzodzenia a guzami bez obecnego owrzodzenia. Wyższe wartości występowały w guzach bez obecnego owrzodzenia w porównaniu do guzów z obecnym owrzodzeniem. Wyniki przedstawia wykres 44.



**Wykres 44.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}C$  (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w zależności od obecności owrzodzenia (oś x).

**Legenda:** 0A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, owrzodzenie obecne; 0B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, owrzodzenie obecne; 1A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, brak owrzodzenia; 1B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, brak owrzodzenia

Ujawniono występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego węgla przy zastosowaniu zmiennej grupującej – stopień histologicznej złośliwości nowotworu (grade). Zaobserwowano różnice pomiędzy kreską w rzucie guza a kreską poza guzem w przypadków raków o niższym stopniu histologicznej złośliwości (low-grade). Wyższe wartości wykazano w kresce poza guzem w porównaniu do kreski w rzucie guza. Wyniki przedstawiono na wykresie 45.

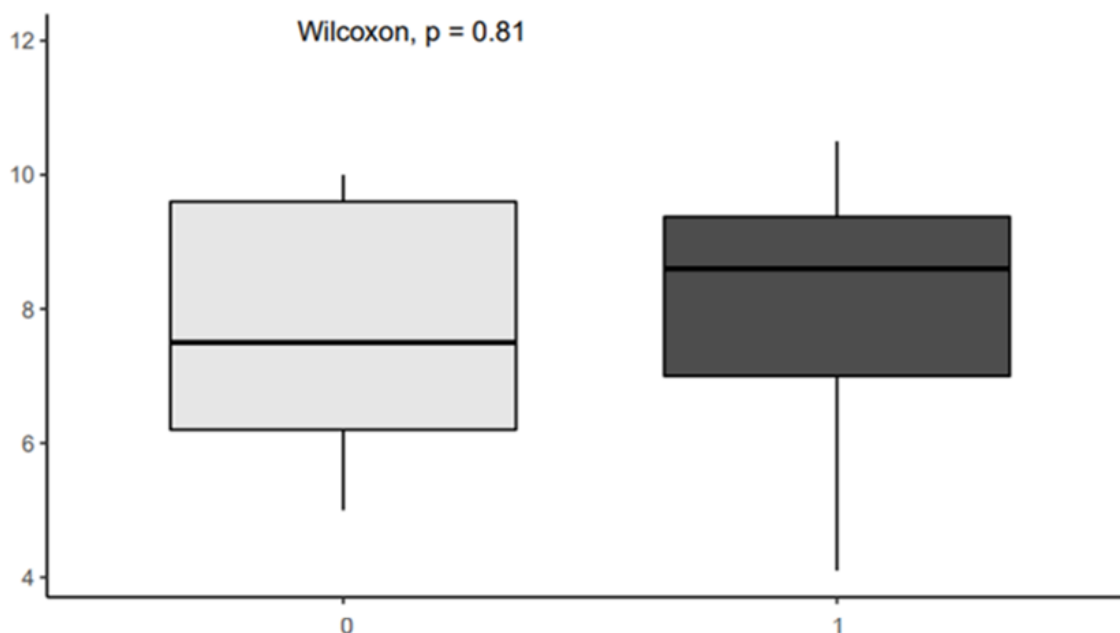


**Wykres 45.** Test Wilcoxona – delta  $^{13}\text{C}$  (oś y) w kresce w rzucie guza oraz kresce poza guzem w zależności od stopnia histologicznej złośliwości nowotworu (grade) (oś x).

**Legenda:** 0A – kreska w rzucie guza, niższy stopień histologicznej złośliwości nowotworu (low-grade); 0B – kreska poza guzem, niższy stopień histologicznej złośliwości nowotworu (low-grade); 1A – kreska w rzucie guza, wyższy stopień histologicznej złośliwości nowotworu (high-grade); 1B – kreska poza guzem, wyższy stopień histologicznej złośliwości nowotworu (high-grade)

## Trendy dotyczące składu izotopowego azotu

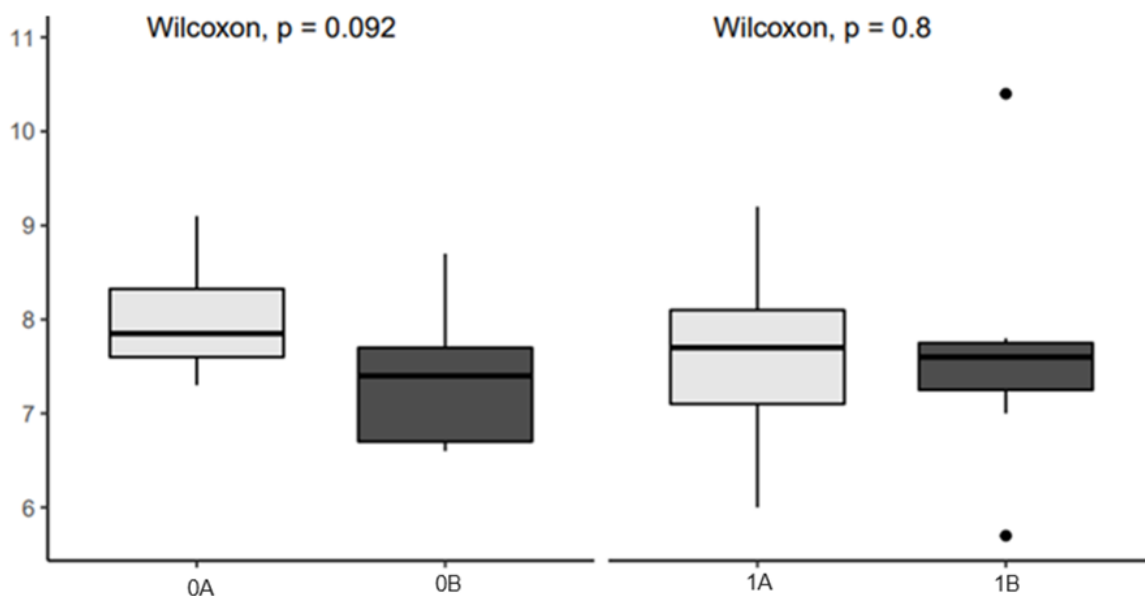
Ujawniono występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego azotu pomiędzy kreską w rzucie guza oraz kreską poza guzem. Wyższe wartości zaobserwowano w kresce poza guzem w porównaniu do kreski w rzucie guza. Wyniki przedstawiono na wykresie 46.



**Wykres 46.** Test Wilcoxona – delta  $^{15}\text{N}$  (oś y) w kresce w rzucie guza oraz kresce poza guzem (oś x).

**Legenda:** 0 – kreska w rzucie guza; 1 – kreska poza guzem

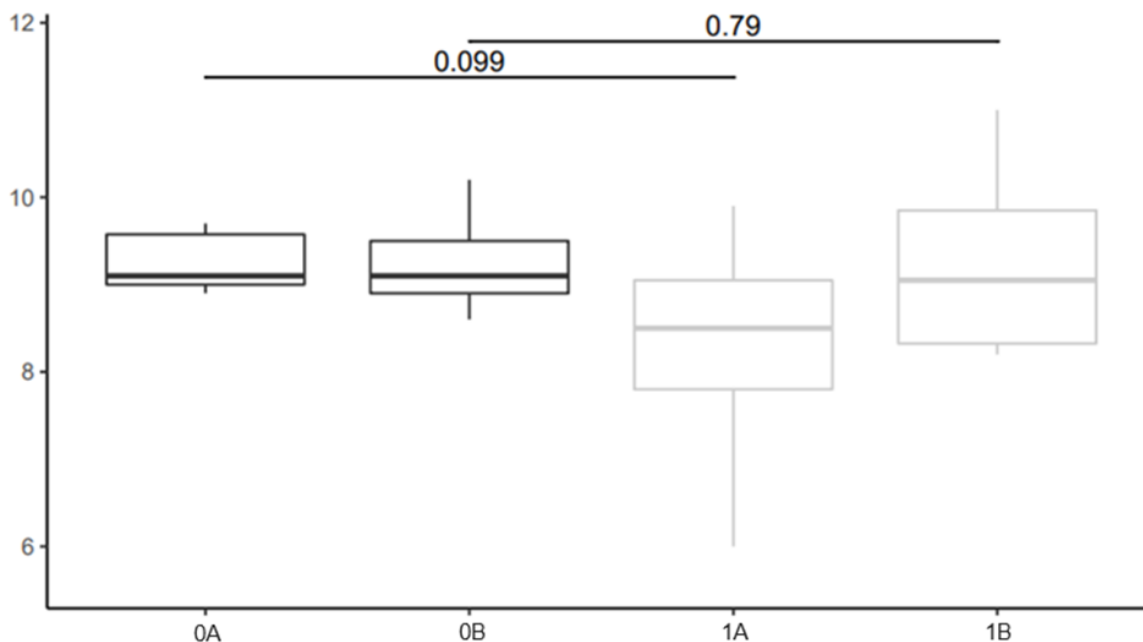
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego azotu przy zastosowaniu zmiennej grupującej – płeć. Ujawniono różnice pomiędzy centrum guza a obrzeżem guza u płci męskiej. Wyższe wartości wykazano w centrum guza w porównaniu do obrzeża guza. Wyniki przedstawiono na wykresie 47.



**Wykres 47.** Test Wilcoxona – delta  $^{15}\text{N}$  (oś y) w centrum guza oraz obrzeżu guza w zależności od płci (oś x).

**Legenda:** 0A – guz centrum, płeć męska; 0B – guz obrzeże, płeć męska; 1A – guz centrum, płeć żeńska; 1B – guz obrzeże, płeć żeńska

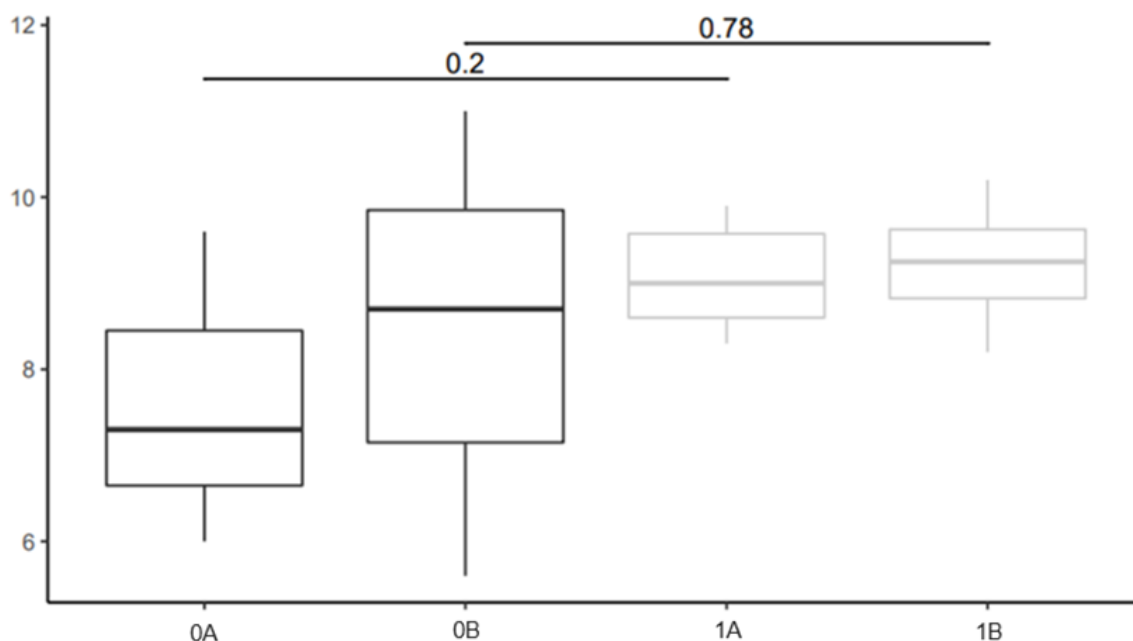
Ujawniono występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego azotu przy zastosowaniu zmiennej grupującej – płeć. Zaobserwowano różnice w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza pomiędzy płcią męską a płcią żeńską. Wyższe wartości wykazano u mężczyzn. Wyniki przedstawiono na wykresie 48.



**Wykres 48.** Test Wilcoxona – delta  $^{15}\text{N}$  (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza w zależności od płci (oś x).

**Legenda:** 0A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, płeć męska; 0B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, płeć męska; 1A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, płeć żeńska; 1B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, płeć żeńska

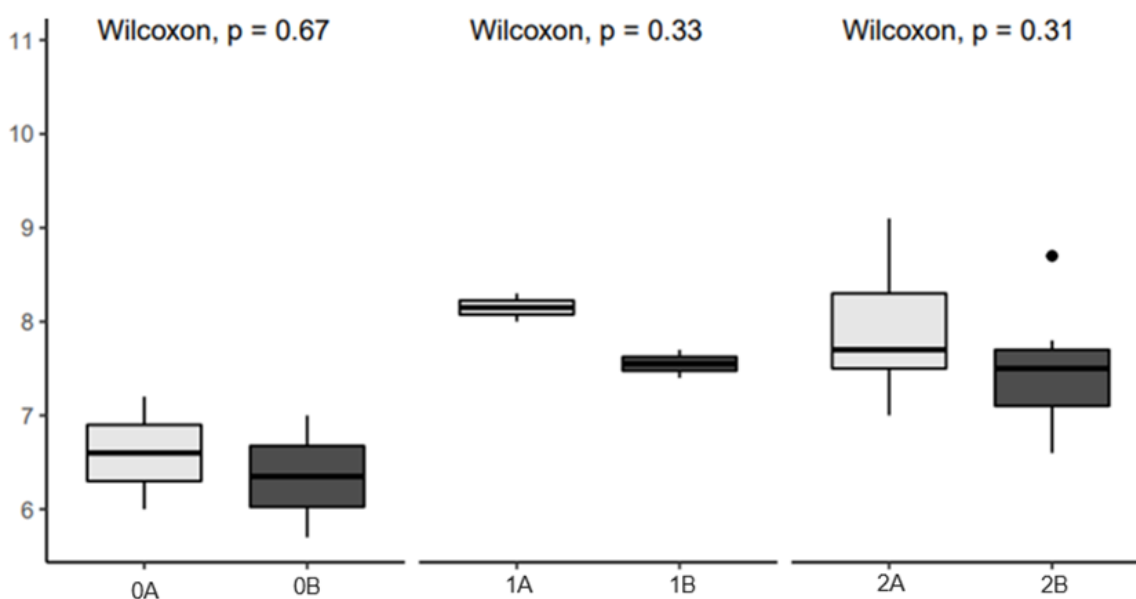
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego azotu przy zastosowaniu zmiennej grupującej – lokalizacja guza (strona prawa, strona lewa). Ujawniono różnice w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza pomiędzy guzami zlokalizowanymi po stronie prawej a guzami po stronie lewej. Wyniki przedstawiono na wykresie 49.



**Wykres 49.** Test Wilcoxon – delta  $^{15}\text{N}$  (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza w zależności od lokalizacji guza (oś x).

**Legenda:** 0A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, strona prawa; 0B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, strona prawa; 1A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, strona lewa; 1B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, strona lewa

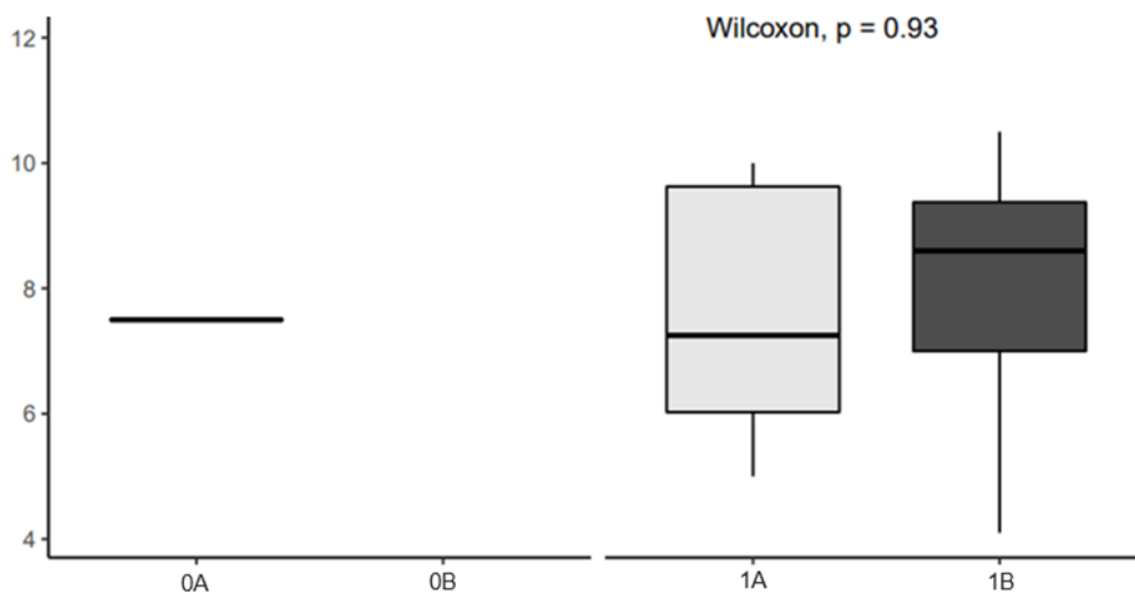
Ujawniono występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego azotu przy zastosowaniu zmiennej grupującej – dokładna lokalizacja guza (kątnica, wstępnicza, zagięcie wątrobowe, poprzecznicza, zagięcie śledzionowe, zstępnicza, esica, zagięcie esiczo-odbytnicze, odbytnica). Ujawniono różnice pomiędzy centrum guza a obrzeżem guza przy lokalizacji guza w odbytnicy. Wyższe wartości występowały w centrum guza w porównaniu do obrzeża guza. Wyniki przedstawia wykres 50.



**Wykres 50.** Test Wilcoxona – delta  $^{15}\text{N}$  (oś y) w centrum guza oraz obrzeżu guza w zależności od dokładnej lokalizacji guza (oś x).

**Legenda:** 0A – centrum guza, wstępnicza; 0B – obrzeże guza, wstępnicza; 1A – centrum guza, zagięcie śledzionowe; 1B – obrzeże guza, zagięcie śledzionowe; 2A – centrum guza, odbytnica; 2B – obrzeże guza, odbytnica

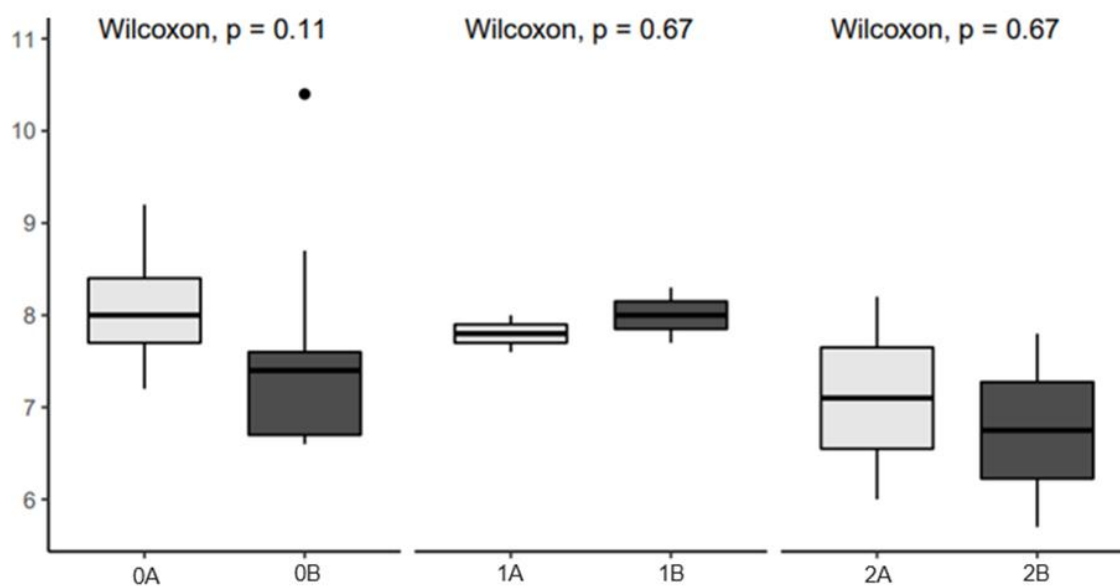
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego azotu przy zastosowaniu zmiennej grupującej – produkcja śluzu przez komórki raka. Ujawniono różnice pomiędzy kreską w rzucie guza a kreską poza guzem w nowotworach nieprodukujących śluzu. Wyższe wartości wykazano w kresce poza guzem w porównaniu do kreski w rzucie guza. Wyniki przedstawiono na wykres 51.



**Wykres 51.** Test Wilcoxona – delta  $^{15}\text{N}$  (oś y) w kresce w rzucie guza oraz kresce poza guzem w zależności produkcji śluzu (oś x).

**Legenda:** 0A – kreska w rzucie guza, guz produkujący śluz; 0B – kreska poza guzem, guz produkujący śluz; 1A – kreska w rzucie guza, brak produkcji śluzu; 1B – kreska poza guzem, brak produkcji śluzu

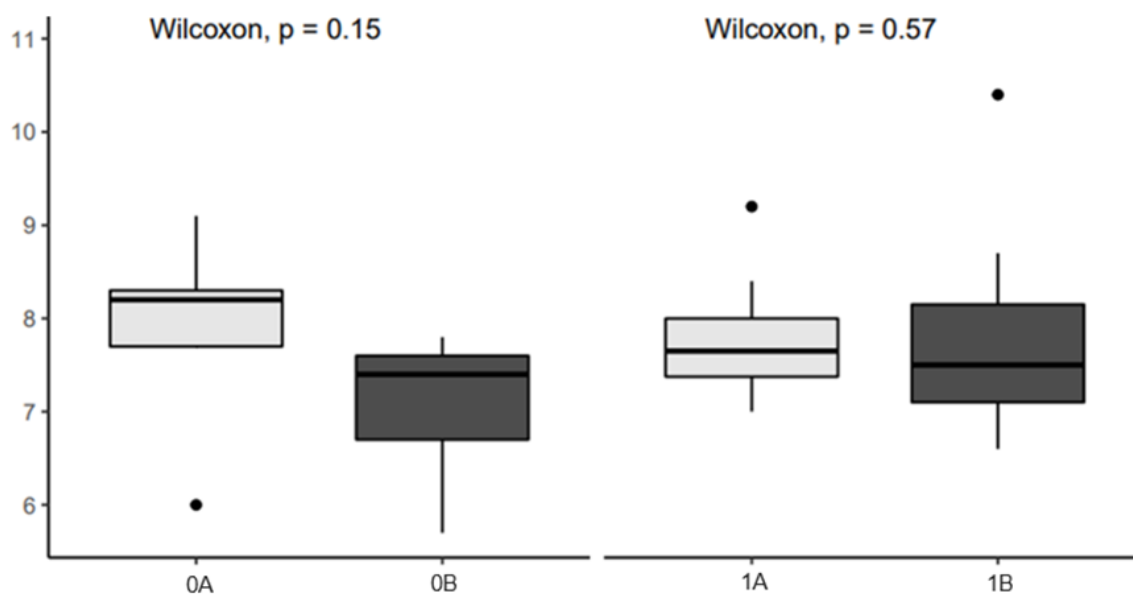
Ujawniono występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego azotu przy zastosowaniu zmiennej grupującej – cecha N systemu TNM. Zaobserwowano różnice pomiędzy centrum guza a obrzeżem guza przy guzach N0. Wyższe wartości wykazano w centrum guza w porównaniu do obrzeża guza. Wyniki przedstawiono na wykresie 52.



**Wykres 52.** Test Wilcoxona – delta  $^{15}\text{N}$  (oś y) w centrum guza oraz obrzeżu guza w zależności od cechy N (oś x).

**Legenda:** 0A – guz centrum, N0; 0B – guz obrzeże, N0; 1A – guz centrum, N1a; 1B – guz obrzeże, N1a; 2A – guz centrum, N2b; 2B – guz obrzeże, N2b

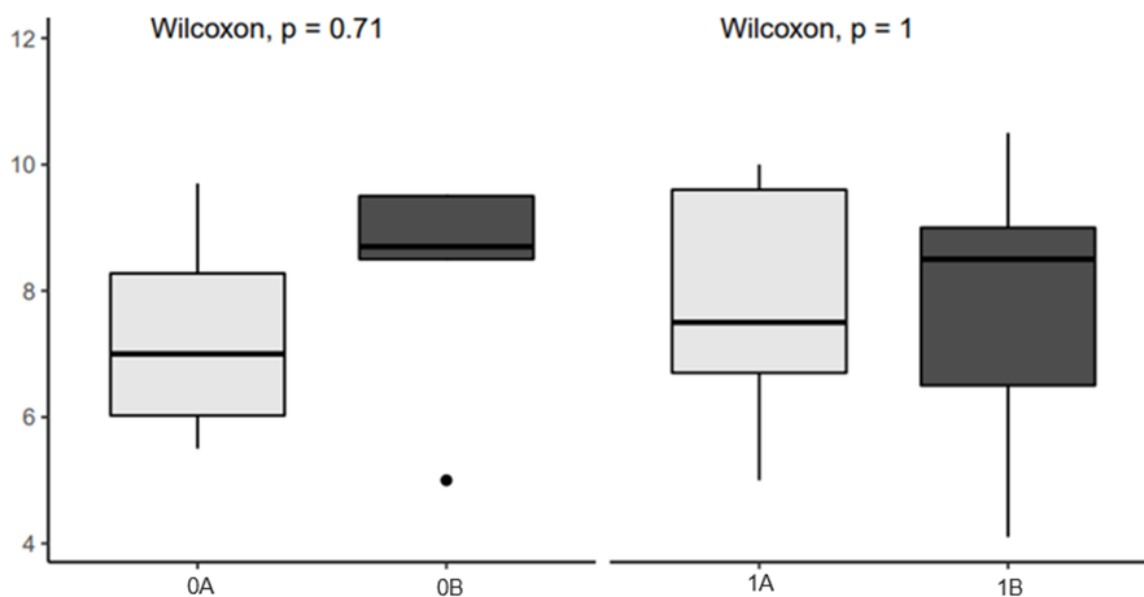
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego azotu przy zastosowaniu zmiennej grupującej – obecność owrzodzenia. Ujawniono różnice pomiędzy centrum guza a obrzeżem guza w guzach z obecnością owrzodzenia. Wyższe wartości wykazano w centrum guza w porównaniu do obrzeża guza. Wyniki przedstawia wykres 53.



**Wykres 53.** Test Wilcoxona – delta  $^{15}N$  (oś y) w centrum guza oraz obrzeżu guza w zależności od obecności owrzodzenia (oś x).

**Legenda:** 0A – guz centrum, owrzodzenie obecne; 0B – guz obrzeże, owrzodzenie obecne; 1A – guz centrum, brak owrzodzenia; 1B – guz obrzeże, brak owrzodzenia

Ujawniono występowanie trendu dotyczącego składu izotopowego azotu przy zastosowaniu zmiennej grupującej – obecność owrzodzenia. Zaobserwowano różnice pomiędzy kreską w rzucie guza a kreską poza guzem w guzach z obecnością owrzodzenia. Wyższe wartości wykazano w kresce poza guzem w porównaniu do kreski w rzucie guza. Wyniki przedstawia wykres 54.

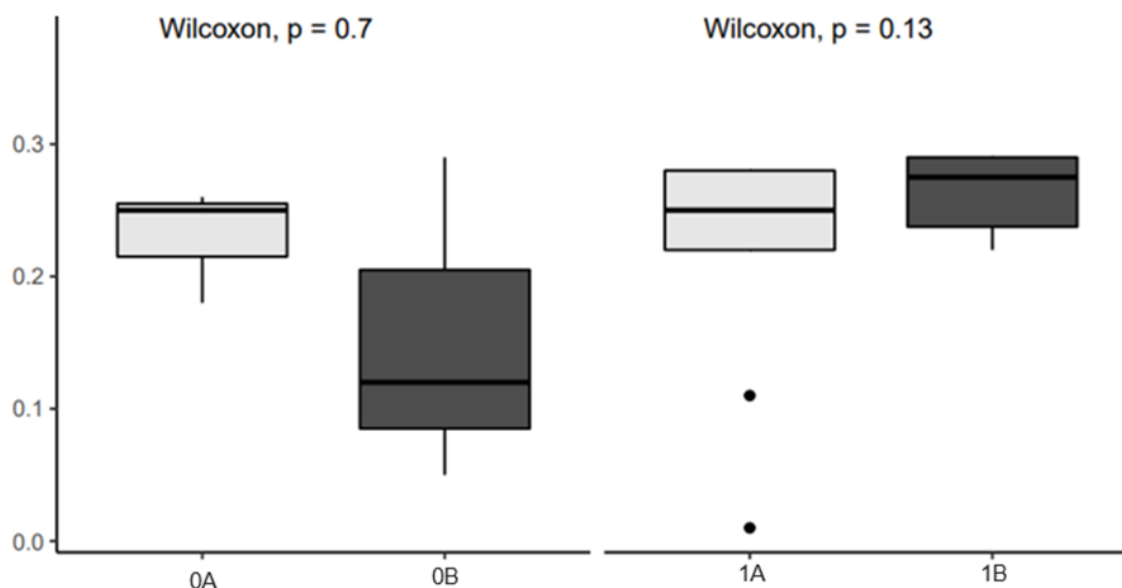


**Wykres 54.** Test Wilcoxona – delta  $^{15}\text{N}$  (oś y) w kresce w rzucie guza oraz kresce poza guzem w zależności od obecności owrzodzenia (oś x).

**Legenda:** 0A – kreska w rzucie guza, owrzodzenie obecne; 0B – kreska poza guzem, owrzodzenie obecne; 1A – kreska w rzucie guza, brak owrzodzenia; 1B – kreska poza guzem, brak owrzodzenia

## Trendy dotyczące stosunku masowego N/C

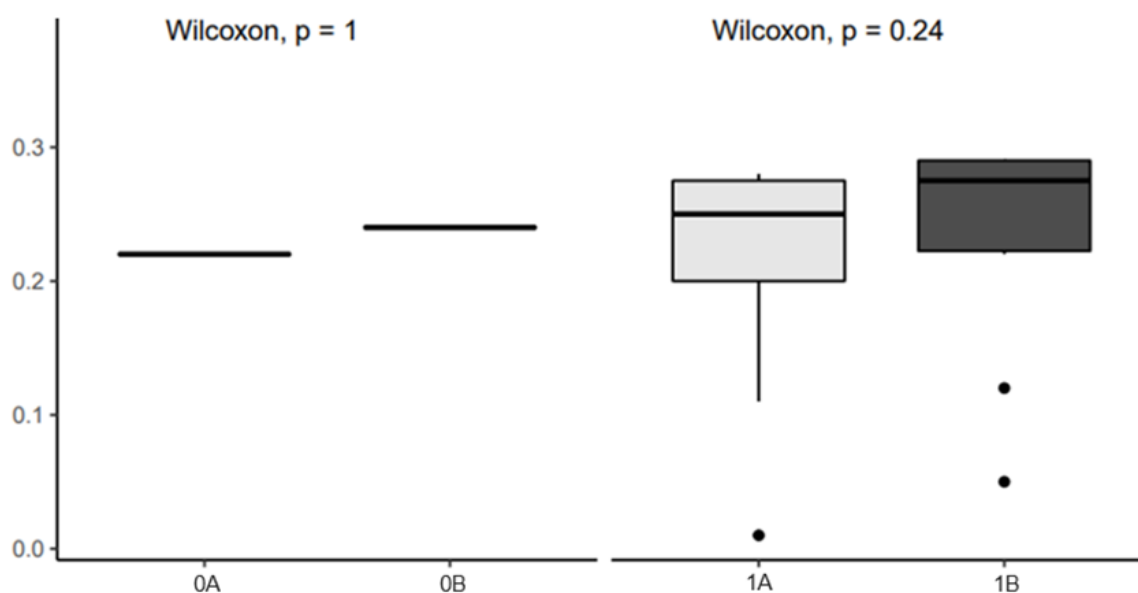
Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego wartości stosunku masowego N/C przy zastosowaniu zmiennej grupującej – lokalizacja guza (strona prawa, strona lewa). Ujawniono różnice pomiędzy ścianą jelita bez zmian w rzucie guza a ścianą jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w guzach zlokalizowanych po stronie prawej. Wyższe wartości wykazano w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza w porównaniu do ściany jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem. Wyniki przedstawiono na wykresie 55.



**Wykres 55.** Test Wilcoxona – stosunek masowy N/C (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w zależności lokalizacji guza (oś x).

**Legenda:** 0A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, strona prawa; 0B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, strona prawa; 1A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, strona lewa; 1B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, strona lewa

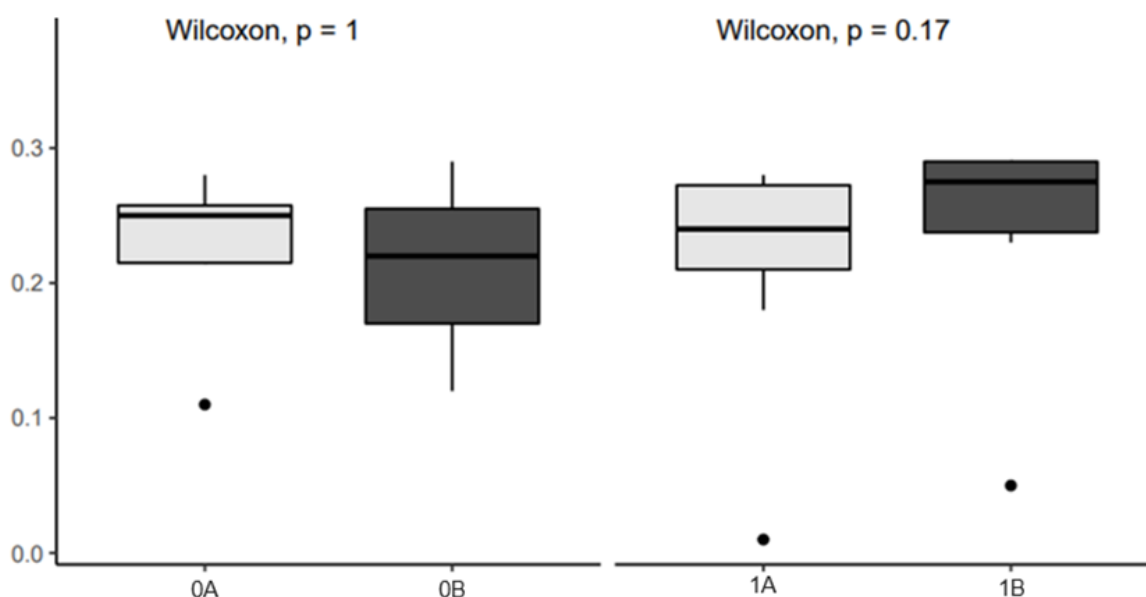
Ujawniono występowanie trendu w wartości stosunku masowego N/C przy zastosowaniu zmiennej grupującej – produkcja śluzu przez komórki raka. Zaobserwowano różnice pomiędzy ścianą jelita bez zmian w rzucie guza a ścianą jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w nowotworach nieprodukujących śluzu. Wyższe wartości wykazano w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w porównaniu do ściany jelita bez zmian w rzucie guza. Wyniki przedstawiono na wykresie 56.



**Wykres 56.** Test Wilcoxona – stosunek masowy N/C (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w zależności od produkcji śluzu (oś x).

**Legenda:** 0A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, guz produkujący śluz; 0B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, guz produkujący śluz; 1A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, brak produkcji śluzu; 1B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, brak produkcji śluzu

Zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego wartości stosunku masowego N/C przy zastosowaniu zmiennej grupującej – obecność owrzodzenia. Ujawniono różnice pomiędzy ścianą jelita bez zmian w rzucie guza a ścianą jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w guzach bez obecności owrzodzenia. Wyższe wartości wykazano w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w porównaniu do ściany jelita bez zmian w rzucie guza. Wyniki przedstawiono na wykresie 57.



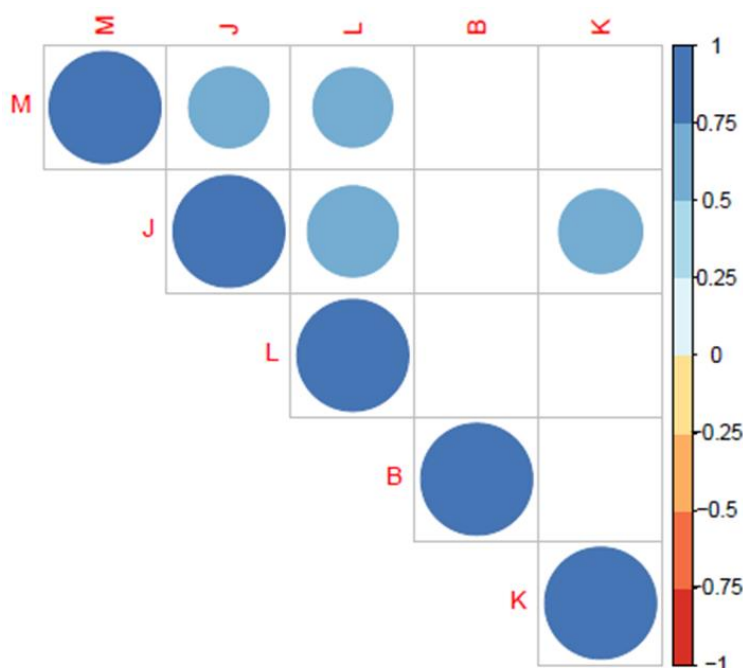
**Wykres 57.** Test Wilcoxona – stosunek masowy N/C (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem z marginesem w zależności od obecności owrzodzenia (oś x).

**Legenda:** 0A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, owrzodzenie obecne; 0B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, owrzodzenie obecne; 1A – ściana jelita bez zmian w rzucie guza, brak owrzodzenia; 1B – ściana jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, brak owrzodzenia

### 4.3.3. Analiza statystyczna badanych parametrów z wykorzystaniem współczynnika korelacji rang Spearmana

W przeprowadzonej analizie statystycznej immunoekspresji badanych białek oraz składu izotopowego ocenianych tkanek wykorzystano współczynnik korelacji rang Spearmana. Uzyskane wyniki, w formie graficznej, przedstawiono na diagramie 1, 2 oraz 3. Korelację dodatnią obrazuje kolor niebieski, a korelację ujemną kolor czerwony. Siła korelacji wyrażona została poprzez natężenie koloru, zgodnie ze skalą umieszczoną na diagramie. Ujawnione korelacje zestawiono w tabelach 14, 15 oraz 16.

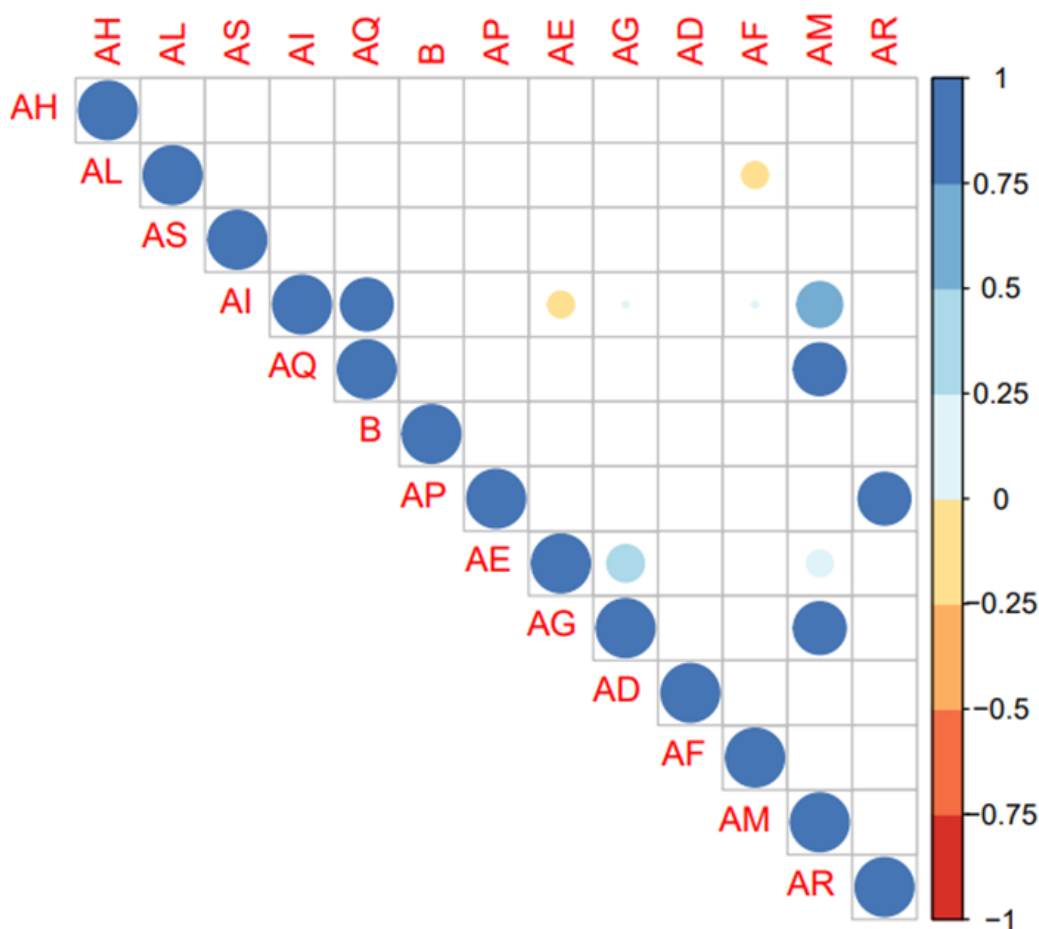
**Diagram 1.** Współczynnik korelacji rang Spearmana dla wieku oraz immunoekspresji badanych białek.



**Legenda:**

- M intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
- J liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
- L indeks PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
- B wiek pacjenta
- K liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza

**Diagram 2.** Współczynnik korelacji rang Spearmana dla wieku oraz uzyskanych wartości stosunków izotopowych.



**Legenda:**

- AH wartości delta  $^{13}\text{C}$  w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza
- AL wartości delta  $^{13}\text{C}$  w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem
- AS wartości delta  $^{15}\text{N}$  w krezce poza guzem
- AI wartości delta  $^{15}\text{N}$  w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza
- AQ wartości delta  $^{15}\text{N}$  w krezce w rzucie guza
- B wiek pacjenta
- AP wartości delta  $^{13}\text{C}$  w krezce w rzucie guza
- AE wartości delta  $^{15}\text{N}$  w centrum guza
- AG wartości delta  $^{15}\text{N}$  w obrzeżu guza
- AD wartości delta  $^{13}\text{C}$  w centrum guza
- AF wartości delta  $^{13}\text{C}$  w obrzeżu guza
- AM wartości delta  $^{15}\text{N}$  w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem
- AR wartości delta  $^{13}\text{C}$  w krezce poza guzem

**Tabela 14.** Podsumowanie ujawnionych korelacji dotyczących immunоекспresji białek w grupie badanej.

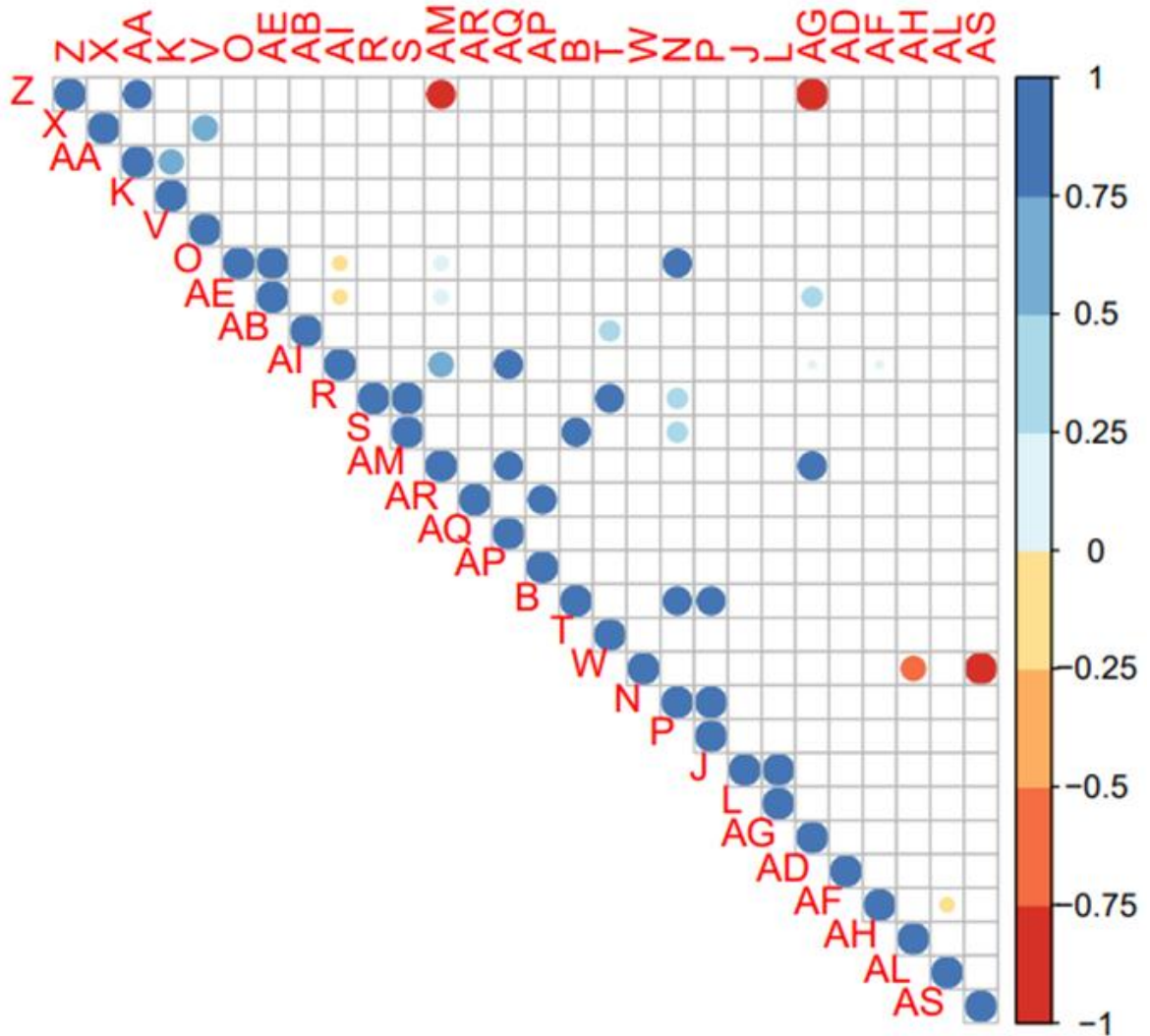
Korelacje	Typ korelacji	rho
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do indeksu PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza.	Korelacja dodatnia	0,7
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza.	Korelacja dodatnia	0,6
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do intensywności wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-1 (+) w dużym polu widzenia w obrębie guza.	Korelacja dodatnia	0,5
Indeks PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do intensywności wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza.	Korelacja dodatnia	0,5

**Tabela 15.** Podsumowanie ujawnionych korelacji dotyczących składu izotopowego w grupie badanej.

Korelacja	Typ korelacji	rho
Wartości delta <sup>13</sup> C w krezce w rzucie guza w stosunku do krezki poza guzem.	Korelacja dodatnia	0,8
Wartości delta <sup>15</sup> N w obrzeżu guza w stosunku do ściany jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem.	Korelacja dodatnia	0,8
Wartości delta <sup>15</sup> N w krezce w rzucie guza w stosunku do ściany jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem.	Korelacja dodatnia	0,8
Wartości delta <sup>15</sup> N w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza w stosunku do krezki w rzucie guza.	Korelacja dodatnia	0,8
Wartości delta <sup>15</sup> N w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza w stosunku do ściany jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem.	Korelacja dodatnia	0,6
Wartości delta <sup>15</sup> N w obrzeżu guza w stosunku do centrum guza.	Korelacja dodatnia	0,4

**Diagram 3.** Współczynnik korelacji rang Spearmana dla wybranych parametrów histoklinicznych, immunoekspresji badanych białek oraz składu izotopowego.

Legenda została umieszczona na kolejnej stronie.



## Legenda:

- Z liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian
- X stosunek liczby komórek PD-L1(+) guza do liczby wszystkich komórek guza w dużym polu widzenia
- AA liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian
- K liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza
- V liczba komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia
- O liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian
- AE wartości delta  $^{15}\text{N}$  w centrum guza
- AB indeks PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian
- AI wartości delta  $^{15}\text{N}$  w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza
- R liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
- S liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza
- AM wartości delta  $^{15}\text{N}$  w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem
- AR wartości delta  $^{13}\text{C}$  w krezce poza guzem
- AQ wartości delta  $^{15}\text{N}$  w krezce w rzucie guza
- AP wartości delta  $^{13}\text{C}$  w krezce w rzucie guza
- B wiek pacjenta
- T indeks PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
- W liczba wszystkich komórek guza w dużym polu widzenia
- N liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian
- P indeks PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian
- J liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
- L indeks PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
- AG wartości delta  $^{15}\text{N}$  w obrzeżu guza
- AD wartości delta  $^{13}\text{C}$  w centrum guza
- AF wartości delta  $^{13}\text{C}$  w obrzeżu guza
- AH wartości delta  $^{13}\text{C}$  w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza
- AL wartości delta  $^{13}\text{C}$  w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem
- AS wartości delta  $^{15}\text{N}$  w krezce poza guzem

**Tabela 16.** Podsumowanie uzyskanych korelacji pomiędzy badanymi parametrami histoklinicznymi, immunoekspresją badanych białek a składem izotopowym.

Korelacja	Typ korelacji	rho
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian w stosunku do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian.	Korelacja dodatnia	0,8
Wartości delta <sup>15</sup> N w centrum guza w stosunku do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian.	Korelacja dodatnia	1
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian w stosunku do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian.	Korelacja dodatnia	0,8
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza.	Korelacja dodatnia	1
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do indeksu PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza.	Korelacja dodatnia	0,8
Liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do wieku pacjenta.	Korelacja dodatnia	0,8
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian w stosunku do wieku pacjenta.	Korelacja dodatnia	0,8
Indeks PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian w stosunku do wieku pacjenta.	Korelacja dodatnia	0,8
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do indeksu PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza.	Korelacja dodatnia	1
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian w stosunku do indeksu PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian.	Korelacja dodatnia	1
Stosunek liczby komórek guza PD-L1(+) do liczby wszystkich komórek guza w dużym polu widzenia w stosunku do liczby komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia.	Korelacja dodatnia	0,6

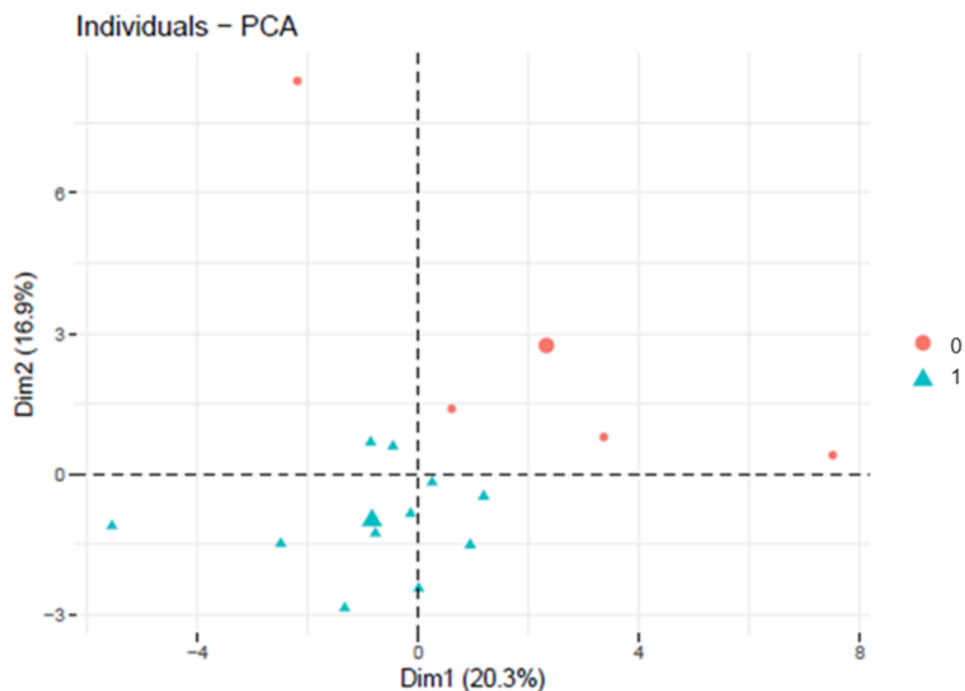
Liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian w stosunku do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza.	Korelacja dodatnia	0,6
Indeks PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do indeksu PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian.	Korelacja dodatnia	0,4
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian w stosunku do liczby komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza.	Korelacja dodatnia	0,4
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w stosunku do liczby komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian.	Korelacja dodatnia	0,4
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian w stosunku do wartości delta <sup>15</sup> N w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem.	Korelacja ujemna	-0,8
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian w stosunku do wartości delta <sup>15</sup> N w obrzeżu guza.	Korelacja ujemna	-1
Liczba wszystkich komórek guza w dużym polu widzenia w stosunku do wartości delta <sup>15</sup> N w krezce poza guzem.	Korelacja ujemna	-1
Liczba wszystkich komórek guza w dużym polu widzenia w stosunku do wartości delta <sup>13</sup> C w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza.	Korelacja ujemna	-0,6

#### 4.3.4. Analiza statystyczna badanych parametrów z wykorzystaniem analizy składowych głównych – analiza całościowa (WARIANT A)

Analiza składowych głównych ukazała przestrzenne zróżnicowanie pacjentów w aspekcie lokalizacji guza (strona prawa, strona lewa) w osiach składowej głównej 1 i 2 (PC1 i PC2). Pacjenci z guzem zlokalizowanym po stronie prawej charakteryzują się wysokimi wartościami parametrów takich jak: liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza, intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza, liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu

widzenia w jelicie bez zmian, liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian, liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza, indeks PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza, intensywność wybarwienia komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia, intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian, wartości delta  $^{13}\text{C}$  w centrum guza, obrzeżu guza, ścianie jelita bez zmian w rzucie guza, krezce w rzucie guza, krezce poza guzem, stosunek masowy N/C w centrum guza i obrzeżu guza oraz najniższymi tj. liczba komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia, stosunek liczby komórek guza PD-L1(+) do liczby wszystkich komórek guza w dużym polu widzenia, wartości delta  $^{13}\text{C}$  oraz stosunek masowy N/C w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem przeciwnie do pacjentów z guzem po stronie lewej. Sumaryczna wariancja modelu wynosi 37.2%. Uzyskane wyniki przedstawia diagram 4.

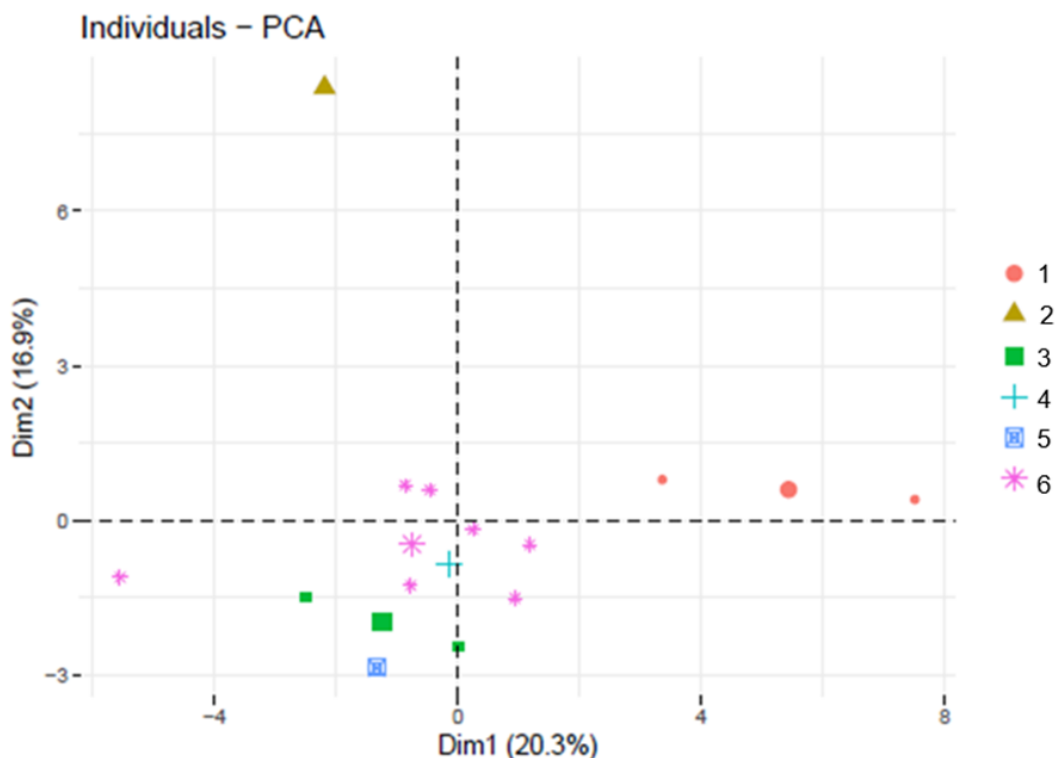
**Diagram 4.** Analiza składowych głównych w aspekcie lokalizacji guza – analiza całościowa (WARIANT A).



**Legenda:** 0 – strona prawa, 1 – strona lewa

Analiza składowych głównych ukazała przestrzenne zróżnicowanie pacjentów w aspekcie dokładnej lokalizacji guza (kątnica, wstępnicza, zagięcie wątrobowe, poprzecznicza, zagięcie śledzionowe, zstępnicza, esica, zagięcie esiczo-odbytnicze, odbytnica) w osiach składowej głównej 1 i 2 (PC1 i PC2). Pacjenci z guzem zlokalizowanym w obrębie wstępniczy charakteryzują się wysokimi wartościami parametrów takich jak liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza, intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza, liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian, liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian, liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza, indeks PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza, intensywność wybarwienia komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia, intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian, wartości delta  $^{13}\text{C}$  w centrum guza, obrzeżu guza, ścianie jelita bez zmian w rzucie guza, krezce w rzucie guza, krezce poza guzem, stosunek masowy N/C w centrum guza i obrzeżu guza oraz najniższymi tj. liczba komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia, stosunek liczby komórek guza PD-L1(+) do liczby wszystkich komórek guza w dużym polu widzenia, wartości delta  $^{13}\text{C}$  oraz stosunek masowy N/C w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem przeciwnie do pacjentów z guzem zlokalizowanym w zagięciu śledzionowym i odbytnicy. Sumaryczna wariancja modelu wynosi 37.2%. Uzyskane wyniki przedstawia diagram 5.

**Diagram 5.** Analiza składowych głównych w aspekcie dokładnej lokalizacji guza – analiza całościowa (WARIANT A).

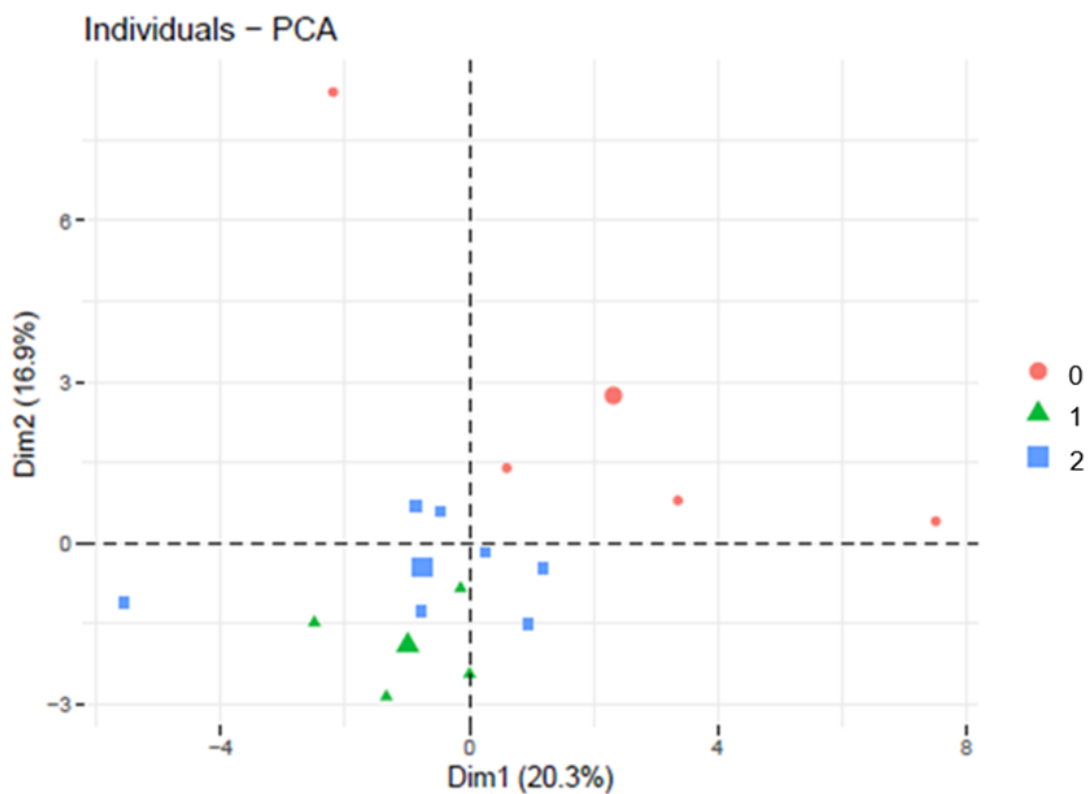


**Legenda:** 1 – wstępnica; 2 – zagięcie wątrobowe; 3 – zagięcie śledzionowe; 4 – esica; 5 – zagięcie esiczo – odbytnicze; 6 – odbytnica

Analiza składowych głównych ukazała przestrzenne zróżnicowanie pacjentów w aspekcie lokalizacji guza wg WHO (strona prawa, strona lewa, odbytnica) w osiach składowej głównej 1 i 2 (PC1 i PC2). Pacjenci z guzem zlokalizowanym po stronie prawej charakteryzują się wysokimi wartościami parametrów takich jak liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza, intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza, liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian, liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian, liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza, indeks PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza, intensywność wybarwienia komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia, intensywność wybarwienia

komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian, wartości delta  $^{13}\text{C}$  w centrum guza, obrzeżu guza, ścianie jelita bez zmian w rzucie guza, krezce w rzucie guza, krezce poza guzem, stosunek masowy N/C w centrum guza i obrzeżu guza oraz najniższymi tj. liczba komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia, stosunek liczby komórek guza PD-L1(+) do liczby wszystkich komórek guza w dużym polu widzenia, wartości delta  $^{13}\text{C}$  oraz stosunek masowy N/C w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem przeciwnie do pacjentów z guzem zlokalizowanym po stronie lewej. Pacjenci z guzem zlokalizowanym w odbytnicy nie charakteryzowali się zróżnicowaniem analizowanych parametrów w przestrzeniach PC1 i PC2. Sumaryczna wariancja modelu wynosi 37.2%. Uzyskane wyniki przedstawia diagram 6.

**Diagram 6.** Analiza składowych głównych w aspekcie lokalizacji guza wg WHO – analiza całościowa (WARIANT A).

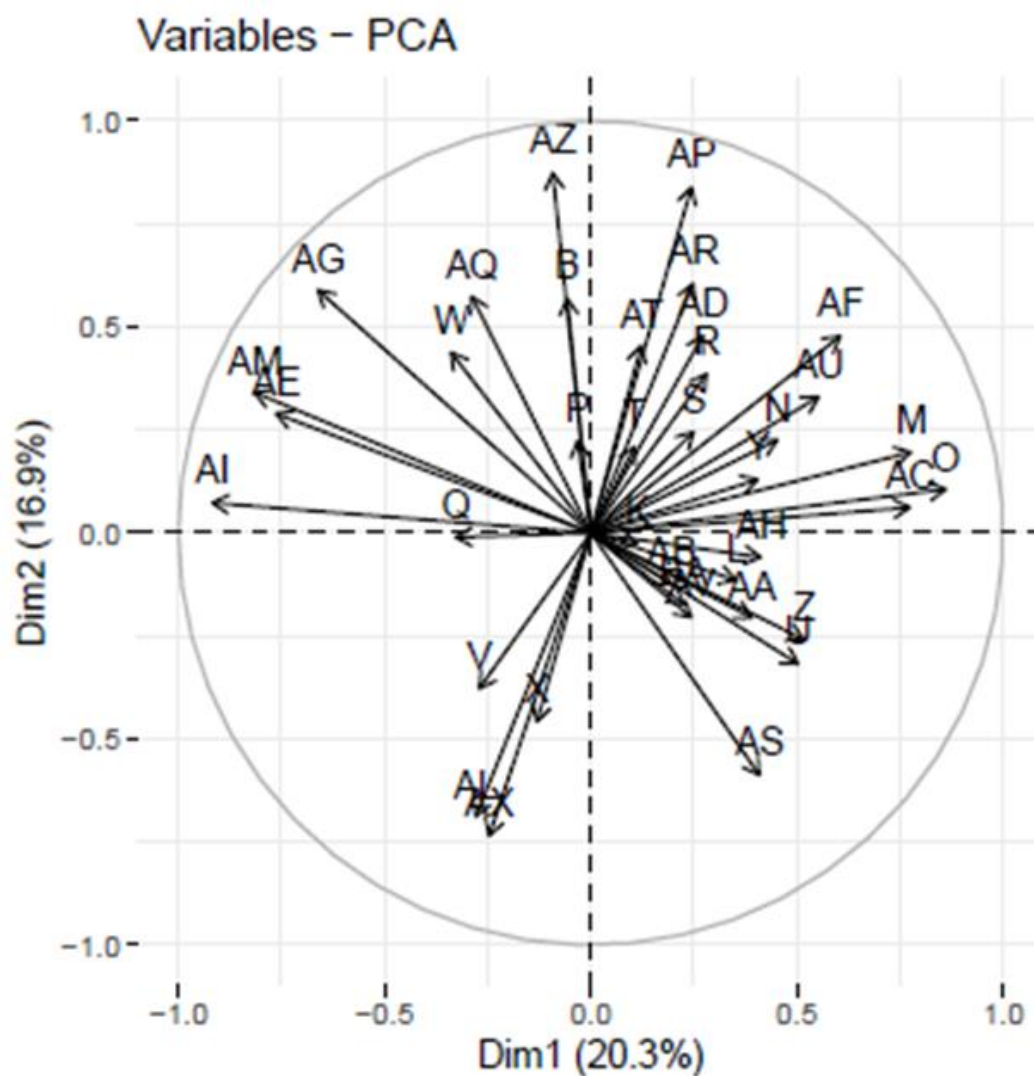


**Legenda:** 0 – strona prawa; 1 – strona lewa; 2 – odbytnica

Zmienne analizy składowych głównych dla badanych grup przedstawiono na diagramie 7.

**Diagram 7.** Diagram zmiennych analizy składowych głównych – analiza całościowa (WARIANT A).

Legenda została umieszczona na kolejnej stronie.



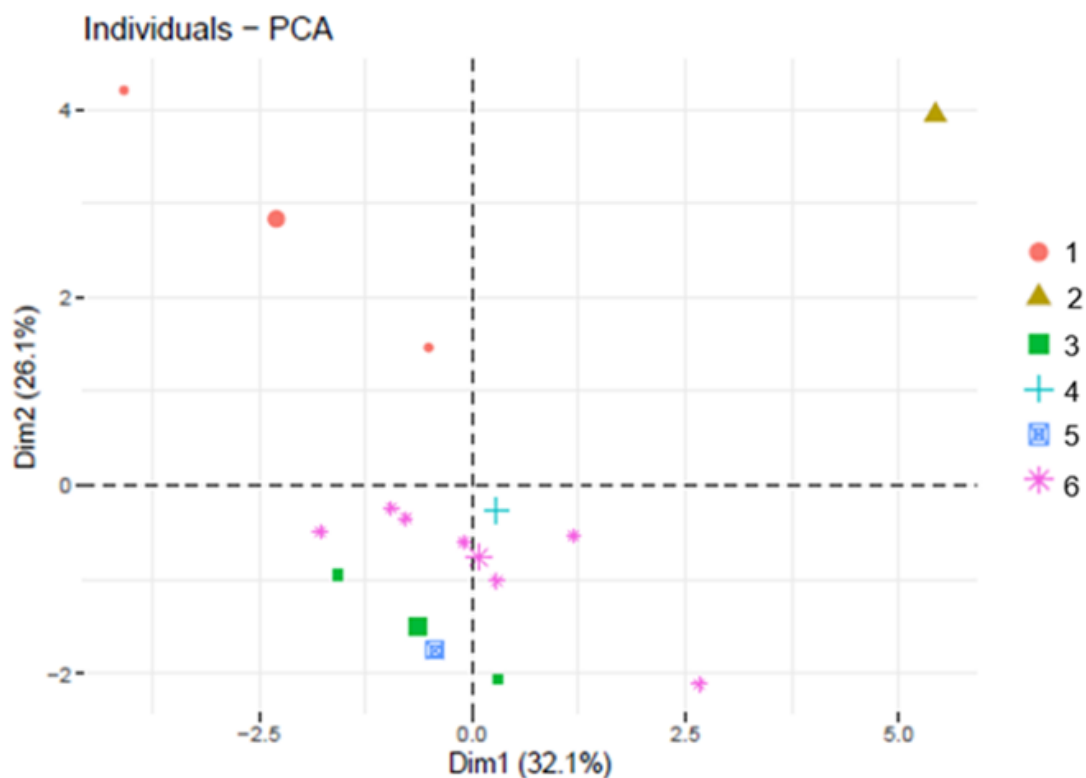
## Legenda:

B	wiek pacjenta
L	indeks PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
M	intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
N	liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian
O	liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian
P	indeks PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian
Q	intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian
R	liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
S	liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia obrębie guza
T	indeks PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
U	intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
V	liczba komórek guza PD-L1(+) w dużym w polu widzenia
W	liczba wszystkich komórek guza w dużym polu widzenia
X	stosunek liczby komórek guza PD-L1(+) do liczby wszystkich komórek guza w dużym polu widzenia
Y	intensywność wybarwienia komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia
Z	liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian
AA	liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia obrębie jelita bez zmian
AB	indeks PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian
AC	intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian
AD	wartości delta $^{13}\text{C}$ w centrum guza
AE	wartości delta $^{15}\text{N}$ w centrum guza
AF	wartości delta $^{13}\text{C}$ w obrzeżu guza
AG	wartości delta $^{15}\text{N}$ w obrzeżu guza
AH	wartości delta $^{13}\text{C}$ w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza
AI	wartości delta $^{15}\text{N}$ w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza
AL	wartości delta $^{13}\text{C}$ w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem
AM	wartości delta $^{15}\text{N}$ w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem
AP	wartości delta $^{13}\text{C}$ w krezce w rzucie guza
AQ	wartości delta $^{15}\text{N}$ w krezce w rzucie guza
AR	wartości delta $^{13}\text{C}$ w krezce poza guzem
AS	wartości delta $^{15}\text{N}$ w krezce poza guzem
AT	wartości stosunku masowego N/C w centrum guza
AU	wartości stosunku masowego N/C w obrzeżu guza
AV	wartości stosunku masowego N/C w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza
AX	wartości stosunku masowego N/C w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem
AZ	wartości stosunku masowego N/C w krezce w rzucie guza
BA	wartości stosunku masowego N/C w krezce poza guzem



Analiza składowych głównych ukazała przestrzenne zróżnicowanie pacjentów w aspekcie dokładnej lokalizacji guza (kątnica, wstępnicza, zagięcie wątrobowe, poprzecznicza, zagięcie śledzionowe, zstępnicza, esica, zagięcie esiczo-odbytnicze, odbytnica) w osiach składowej głównej 1 i 2 (PC1 i PC2). Sumaryczna wariancja modelu wynosi 58.2%. Wyniki przedstawiono na diagramie 9.

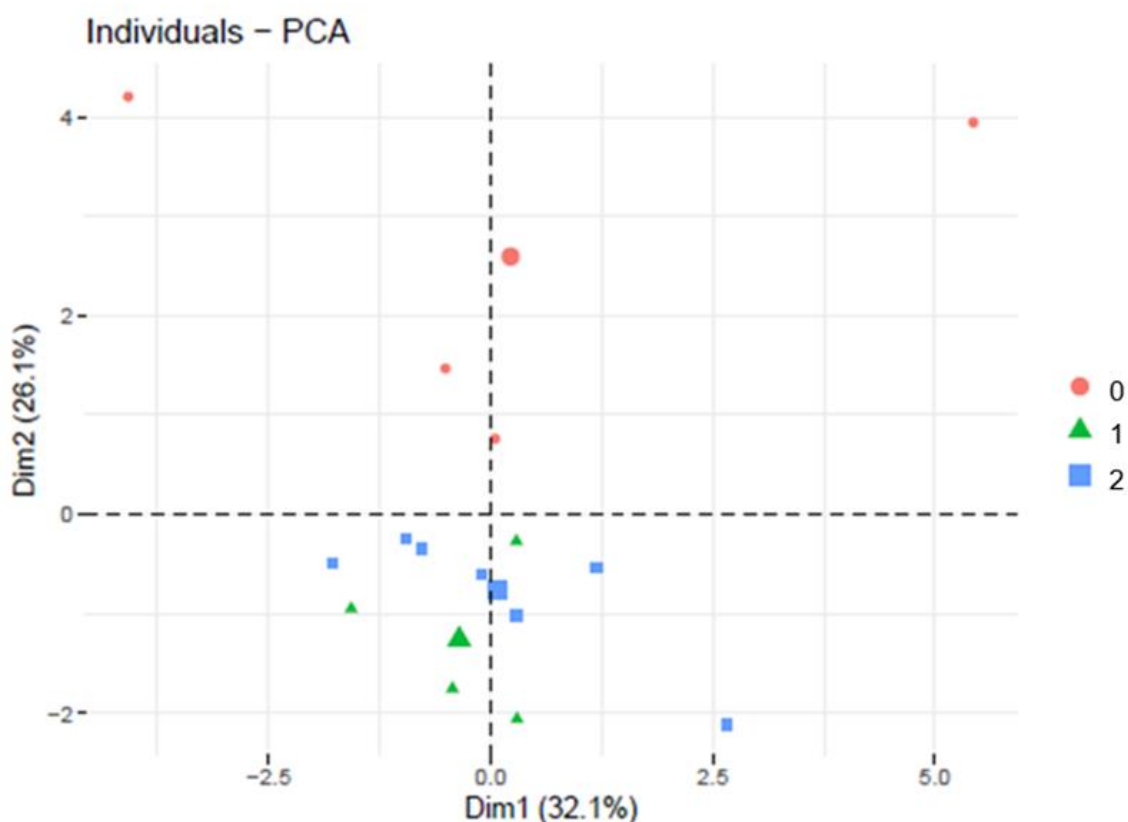
**Diagram 9.** Analiza składowych głównych w aspekcie dokładnej lokalizacji guza – WARIANT B.



**Legenda:** 1 – wstępnicza; 2 – zagięcie wątrobowe; 3 – zagięcie śledzionowe; 4 – esica; 5 – zagięcie esiczo – odbytnicze; 6 – odbytnica

Analiza składowych głównych ukazała przestrzenne zróżnicowanie pacjentów w aspekcie lokalizacji guza wg WHO (strona prawa, strona lewa, odbytnica) wzdłuż osi y. Pacjenci z guzem zlokalizowanym po stronie prawej charakteryzują się wysokimi wartościami parametrów takich jak wartości delta  $^{13}\text{C}$  w centrum i obrzeżu guza, ścianie jelita bez zmian w rzucie guza, krezce w rzucie guza, krezce poza guzem oraz najniższymi tj. wartości delta  $^{13}\text{C}$  w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem. Przeciwnie do pacjentów z guzem zlokalizowanym po stronie lewej oraz w odbytnicy. Sumaryczna wariancja modelu wynosi 58.2%. Wyniki przedstawiono na diagramie 10.

**Diagram 10.** Analiza składowych głównych w aspekcie lokalizacji guza wg WHO – WARIANT B.



**Legenda:** 0 – strona prawa; 1 – strona lewa; 2 – odbytnica



## Legenda:

- B wiek pacjenta
- L indeks PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
- M intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
- N liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian
- O liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian
- P indeks PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian
- Q intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian
- R liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
- S liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia obrębie guza
- T indeks PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
- U intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza
- V liczba komórek guza PD-L1(+) w dużym w polu widzenia
- W liczba wszystkich komórek guza w dużym polu widzenia
- X stosunek liczby komórek guza PD-L1(+) do liczby wszystkich komórek guza w dużym polu widzenia
- Y intensywność wybarwienia komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia
- Z liczba komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian
- AA liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia obrębie jelita bez zmian
- AB indeks PD-L1(+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian
- AC intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-L1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian
- AD wartości delta  $^{13}\text{C}$  w centrum guza
- AE wartości delta  $^{15}\text{N}$  w centrum guza
- AF wartości delta  $^{13}\text{C}$  w obrzeżu guza
- AG wartości delta  $^{15}\text{N}$  w obrzeżu guza
- AH wartości delta  $^{13}\text{C}$  w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza
- AI wartości delta  $^{15}\text{N}$  w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza
- AL wartości delta  $^{13}\text{C}$  w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem
- AM wartości delta  $^{15}\text{N}$  w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem
- AP wartości delta  $^{13}\text{C}$  w krezce w rzucie guza
- AQ wartości delta  $^{15}\text{N}$  w krezce w rzucie guza
- AR wartości delta  $^{13}\text{C}$  w krezce poza guzem
- AS wartości delta  $^{15}\text{N}$  w krezce poza guzem
- AT wartości stosunku masowego N/C w centrum guza
- AU wartości stosunku masowego N/C w obrzeżu guza
- AV wartości stosunku masowego N/C w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza
- AX wartości stosunku masowego N/C w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem
- AZ wartości stosunku masowego N/C w krezce w rzucie guza
- BA wartości stosunku masowego N/C w krezce poza guzem

#### 4.3.6. Podsumowanie wyników analizy statystycznej

Podsumowanie wyników analizy statystycznej przedstawiono w tabeli 17 oraz tabeli 18.

**Tabela 17.** Podsumowanie wyników analizy statystycznej immunoekspresji badanych białek.

Badane parametry	Znaleziska		Wartość p	
Liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza.	Głębokość Naciekania	1. Wyższa w guzach T2. 2. Niższa w guzach T3.	0,026	0,016
		1. Wyższa w guzach T4b. 2. Niższa w guzach T3.		0,028
Liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza.	Zajęcie węzłów chłonnych	1. Wyższa w N1a. 2. Niższa w N0.	0,029	0,018
		1. Wyższa w N1a. 2. Niższa w N1b.		0,01
		1. Wyższa w N1a. 2. Niższa w N2b.		0,0064
Liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian.	1. Wyższa w guzach prawostronnych. 2. Niższa w guzach lewostronnych.		0,04	
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza.	Głębokość naciekania	1. Wyższa w guzach T2. 2. Niższa w guzach T4a.	0,026	
		1. Wyższa w guzach T4b. 2. Niższa w guzach T4a.	0,022	
Liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian.	1. Wyższa w guzach prawostronnych. 2. Niższa w guzach lewostronnych.		0,036	
Indeks PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza.	1. Wyższy w guzach o niższym stopniu złośliwości. 2. Niższy w guzach o wyższym stopniu złośliwości.		0,035	
Indeks PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza oraz w obrębie jelita bez zmian.	1. Wyższy w obrębie guza. 2. Niższy w jelicie bez zmian.		8,9e-05	
Liczba komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia.	1. Wyższa u mężczyzn. 2. Niższa u kobiet.		0,039	

**Tabela 18.** Podsumowanie wyników analizy statystycznej składu izotopowego.

<b>Badane parametry</b>	<b>Znaleziska</b>	<b>Wartość p</b>
<b>Wartość delta <sup>13</sup>C w centrum guza oraz krezce w rzucie guza.</b>	1. Wyższa w centrum guza. 2. Niższa krezce w rzucie guza.	7,7e-06
<b>Wartość delta <sup>13</sup>C w centrum guza oraz krezce poza guzem.</b>	1. Wyższa w centrum guza. 2. Niższa w krezce poza guzem.	7,7e-06
<b>Wartość delta <sup>13</sup>C w obrzeżu guza oraz krezce w rzucie guza.</b>	1. Wyższa w obrzeżu guza. 2. Niższa w krezce w rzucie guza.	3e-05
<b>Wartość delta <sup>13</sup>C w obrzeżu guza oraz krezce w poza guzem.</b>	1. Wyższa w obrzeżu guza. 2. Niższa w krezce poza guzem.	4,5e-05
<b>Wartość delta <sup>13</sup>C w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz krezce w rzucie guza.</b>	1. Wyższa w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza. 2. Niższa w krezce w rzucie guza.	0,00021
<b>Wartość delta <sup>13</sup>C w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz krezce poza guzem.</b>	1. Wyższa w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza. 2. Niższa w krezce poza guzem.	0,00021
<b>Wartość delta <sup>13</sup>C w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem oraz krezce w rzucie guza.</b>	1. Wyższa w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem. 2. Niższa w krezce w rzucie guza.	4,9e-05
<b>Wartość delta <sup>13</sup>C w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem oraz krezce poza guzem.</b>	1. Wyższa w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem. 2. Niższa w krezce poza guzem.	4,9e-05
<b>Wartość delta <sup>13</sup>C w krezce w rzucie guza.</b>	1. Wyższa w guzach prawostronnych. 2. Niższa w guzach lewostronnych.	0,014
<b>Wartość delta <sup>13</sup>C w krezce poza guzem.</b>	1. Wyższa w guzach prawostronnych. 2. Niższa w guzach lewostronnych.	0,017
<b>Wartość delta <sup>13</sup>C w krezce w rzucie guza.</b>	1. Wyższa w guzach prawostronnych. 2. Niższa w guzach odbytnicy.	0,028
<b>Wartość delta <sup>13</sup>C w krezce poza guzem.</b>	1. Wyższa w guzach prawostronnych. 2. Niższa w guzach odbytnicy.	0,027
<b>Wartość delta <sup>15</sup>N w centrum guza oraz ścianie jelita bez zmian w rzucie guza.</b>	1. Wyższa w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza. 2. Niższa w centrum guza.	0,0086
<b>Wartość delta <sup>15</sup>N w centrum guza oraz ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem.</b>	1. Wyższa w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem. 2. Niższa w centrum guza.	0,0043

<b>Wartość delta <math>^{15}\text{N}</math> w obrzeżu guza oraz ścianie jelita bez zmian w rzucie guza.</b>	1. Wyższa w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza. 2. Niższa w obrzeżu guza.	0,0061
<b>Wartość delta <math>^{15}\text{N}</math> w obrzeżu guza oraz ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem.</b>	1. Wyższa w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem. 2. Niższa w obrzeżu guza.	0,0046

## 5. DYSKUSJA

Rak jelita grubego jest obecnie drugą najczęstszą przyczyną zgonów z powodu chorób nowotworowych na świecie, a częstość jego występowania wzrasta (Sung i in., 2021). Dane epidemiologiczne zarówno wzbudzają niepokój, jak i sprawiają, że zainteresowanie badaczy rakiem jelita grubego jest znaczące. Nieustannie poszukuje się nowych narzędzi i metod, których wykorzystanie korzystnie wpłynęłoby na diagnostykę oraz markerów ułatwiających ocenę rokowania w indywidualnych przypadkach.

Rola komórek nacieku zapalnego w procesie nowotworowym od lat jest przedmiotem licznych badań. Już Rudolf Virchow w roku 1863 zaobserwował występowanie leukocytów w tkance nowotworowej i uznał, że naciek limforetikularny wskazuje na wywodzenie się nowotworu z miejsca przewlekłego zapalenia (Balkwill & Mantovani, 2001). W literaturze przedmiotu odnaleźć można doniesienia, które wskazują na obecność komórek nacieku zapalnego w prawie każdym procesie nowotworowym, od pojedynczych komórek wykrywanych za pomocą specyficznych markerów, do obfitego nacieku zapalnego widocznego w rutynowych badaniach histopatologicznych (Pagès i in., 2010). Początkowo naciek zapalny uważano za czynnik odpowiedzialny jedynie za niszczenie komórek nowotworowych. Obecnie jednak pojawiły się liczne doniesienia wskazujące na współpracę układu odpornościowego z komórkami nowotworu i wspieranie jego progresji (Hanahan & Weinberg, 2011). Istnieją badania dokumentujące różnice w interakcji pomiędzy komórkami układu odpornościowego a guzem, wynikające z typu nacieku zapalnego. W przypadku zapaleń przewlekłych dochodzi do szybszej progresji guza i wystąpienia jego odporności na leczenie, natomiast ostry naciek zapalny związany jest z antynowotworową aktywnością ustroju (Zhao i in., 2021). Efekty obecności komórek zapalnych oceniano w wielu nowotworach złośliwych, w tym o największym znaczeniu klinicznym: raku płuc oraz raku piersi. Wykazano, że obecność komórek układu odpornościowego w przypadku raka płuca, poprzez mechanizm ucieczki immunologicznej, związana jest z progresją nowotworu oraz tworzeniem przerzutów odległych (Tan i in., 2021). W raku piersi udokumentowano,

że obecność limfocytów B wiąże się ze zwiększonym odsetkiem nawrotów choroby (Schnellhardt i in., 2020). Również obfitość komórek związanych z zapaleniem wpływa na rokowanie w przypadku nowotworów złośliwych. W rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi duża liczba komórek nacieku zapalnego związana była z lepszym rokowaniem, a 5-letnie przeżycie w grupie pacjentów z małą liczbą limfocytów naciekających guz było ponad dwukrotnie mniejsze, w porównaniu do pacjentów z dużą liczbą komórek nacieku zapalnego w obrębie nowotworu (J. Wang i in., 2016). Także w raku jelita grubego udowodniono wartość prognostyczną obecności nacieku zapalnego (Zhou i in., 2019).

W przeprowadzonym badaniu wykazano, że liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza jest istotnie statystycznie związana z elementami systemu TNM ocenianymi w badaniu mikroskopowym (zarówno z cechą pT, jak i cechą pN). Więcej komórek nacieku zapalnego obecnych było w przypadku guzów o niższym stopniu zaawansowania choroby (T2 niż T3), co może sugerować, że większa intensywność nacieku zapalnego w tkance nowotworowej jest jednym z wielu czynników związanych z lepszym rokowaniem i pozostaje w zgodności z literaturą przedmiotu (Idos i in., 2020; Mei i in., 2014). Z drugiej strony, większa liczba komórek nacieku zapalnego w prezentowanym badaniu stwierdzana była w guzach o stopniu T4b niż T3. Ze względu na obecność odczynu zapalnego w otrzewnej, prawidłowa ocena głębokości naciekania i ewentualnego przekroczenia granicy otrzewnej jest w badaniu mikroskopowym utrudniona, a nawet skutkuje niemożnością jednoznacznego zakwalifikowania guza do kategorii T3 lub T4a (Klaver i in., 2018). Według danych odnalezionych w literaturze kluczowym momentem w progresji raka jelita grubego jest naciek i uszkodzenie otrzewnej (T4a), co związane jest z większym ryzykiem wystąpienia przerzutów do otrzewnej (M1c), czynnika decydującego o najwyższym stopniu klinicznego zaawansowania choroby nowotworowej (Klaver i in., 2018; Stewart i in., 2011). Guzy T4b charakteryzują się gorszym rokowaniem niż guzy T4a, co wielokrotnie potwierdzono w badaniach i ujęto w samym systemie TNM (Lim i in., 2022; Shia i in., 2012).

Także w odniesieniu do cechy pN w przeprowadzonym badaniu wykazano istotne statystycznie zwiększenie intensywności nacieku zapalnego w obrębie guza - liczba komórek układu odpornościowego w guzach pN1a była większa w porównaniu do guzów pN2a oraz pN2b, podobnie jak podaje piśmiennictwo. W przeprowadzonym badaniu ujawniono także bardziej obfity naciek zapalny w guzach pN1a niż pN0, co wskazuje, że w raku jelita grubego zajęcie pierwszego węzła chłonnego jest momentem kluczowym dla przebiegu choroby i co pozostaje w zgodności w fundamentalną wiedzę o chorobie nowotworowej. Co niezwykle interesujące, istnieje tzw. „paradoks przeżywalności” tj.: fakt niższego wskaźnika 5-letniego przeżycia chorych w stadium zaawansowania klinicznego IIB (T4aN0M0) i IIC (T4bN0M0) w porównaniu z pacjentami w stadium choroby IIIA (T1-2N1M0 lub T1N2aM0) - odpowiednio 46-61% vs. 70% (H. Li i in., 2020). Tłumaczy się to zjawisko liczbą pobranych do badania histopatologicznego węzłów chłonnych, stosowaniem chemioterapii w stadium IIIA oraz obecnością nacieku nowotworowego w marginesach chirurgicznych, jednak autorzy badań zwracają uwagę na konieczność poszukiwania innych czynników będących przyczyną występowania opisanego paradoksu (Chu i in., 2016).

W prezentowanym badaniu wykazano także znamienne statystycznie różnicę w liczbie wszystkich komórek nacieku zapalnego w obrębie jelita bez zmian pomiędzy nowotworami zlokalizowanymi prawostronnie i lewostronnie. Większy naciek zapalny stwierdzany był w guzach po stronie prawej, w każdym z trzech podziałów dokonanych w rozprawie: lokalizacji głównej (strona prawa i strona lewa); lokalizacji wg WHO (strona prawa, strona lewa, odbytnica) oraz lokalizacji dokładnej (kątnica, wstępnica, zagięcie wątrobowe, poprzecznicza, zagięcie śledzionowe, zstępnica, esica, zagięcie esiczo-odbytnicze, odbytnica). Zjawisko to zostało uwidocznione także w analizie składowych głównych, która wykazała przestrzenne grupowanie chorych pod względem miejsca powstania guza w przypadku wszystkich wyżej wymienionych podziałów, w obu zarówno w guzie, jak i jelicie bez zmian. W dostępnej literaturze przedmiotu nie odnaleziono niestety badań oceniających intensywność nacieku zapalnego w obrębie jelita bez zmian u pacjentów z rozpoznaniem rakiem jelita grubego.

W przedstawionym badaniu wykazano również występowanie dodatnich korelacji pomiędzy liczbą komórek nacieku zapalnego w obrębie guza a: wiekiem pacjentów, liczbą wszystkich komórek nacieku zapalnego w guzie oraz jelicie bez zmian. Opublikowane w roku 2020 badanie, przeprowadzone na 848 przypadkach raka jelita grubego, ujawniło związek prawostronnej lokalizacji nowotworu z wyższą liczbą komórek nacieku zapalnego w obrębie guza. Wykazano również, że starszy wiek związany był z bardziej obfitym naciekiem zapalnym (Jimenez-Rodriguez i in., 2020). Ukazane w prezentowanym badaniu wyniki pozostają w zgodzie z tymi doniesieniami. W literaturze dostępne są liczne prace wskazujące na lepsze rokowanie w przypadku guzów zlokalizowanych po stronie lewej w porównaniu do strony prawej (Hamfjord i in., 2022; Janssens i in., 2018). Można przypuszczać, że intensywność nacieku zapalnego w obrębie guza u pacjentów z rakiem jelita grubego jest jedynie pojedynczym z wielu czynników wpływających na rokowanie i zasadnym wydaje się dalsze poszukiwanie związków pomiędzy znanymi już czynnikami prognostycznymi, poszukiwanie nowych markerów rokowniczych, a także ocena intensywności nacieku zapalnego w jelicie bez zmian, u pacjentów z rozpoznany rakiem jelita grubego.

W piśmiennictwie odnajduje się dowody na to, że wzmożona intensywność nacieku zapalnego w raku jelita grubego jest korzystnym czynnikiem. Udokumentowano, że obecność intensywnego nacieku zapalnego z limfocytów T u pacjentów z rakiem jelita grubego związana była z przedłużeniem czasu przeżycia, w związku z działaniem przeciwnowotworowym wykazywanym przez komórki nacieku zapalnego, (C. H. Richards i in., 2014; Rumba i in., 2018; Väyrynen i in., 2013). W literaturze odnaleźć można również pracę wskazującą na istotną rolę makrofagów w obrębie guza. Wykazano, że u pacjentów z makrofagami obecnymi w centrum guza czas przeżycia wolnego od choroby był dłuższy (Jakubowska i in., 2019). Zwiększona gęstość komórek przewlekłego nacieku zapalnego była istotnie związana z ogólną poprawą przeżycia oraz przeżyciem bez nawrotów (Turner i in., 2016). Wpływ makrofagów oraz ich interakcja z komórkami raka jelita grubego jest nadal słabo poznana, a wyniki badań pozostają ze sobą w sprzeczności (Norton i in., 2015) - istnieją również doniesienia sugerujące negatywny wpływ obecności

makrofagów w guzie na rokowanie, jednak uważane są one za kontrowersyjne (Biswas & Mantovani, 2010).

Na podstawie metaanalizy, obejmującej 67 badań, zasugerowano, że to sama liczba komórek nacieku zapalnego wpływa na rokowanie, a nie rodzaj komórek nacieku zapalnego, czy ich konkretna lokalizacja w obrębie guza (Alexander i in., 2020). Wskazuje się także, że ocena intensywności nacieku zapalnego może zostać wykorzystana do poprawy prognozowania w połączeniu z systemem TNM, będącym powszechnie wykorzystywanym narzędziem (Rumba i in., 2018).

Białko programowanej śmierci – 1 (PD-1) jest cząsteczką występującą głównie na powierzchni komórek nacieku zapalnego, najczęściej limfocytów T i odpowiada za regulację adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej. PD-1 wraz ze swoimi ligandami PD-L1 i PD-L2 transdukuje sygnał, który prowadzi do zahamowania proliferacji komórek T, produkcji cytokin oraz ich funkcji cytolitycznej (Riley, 2009). Oprócz silnego działania hamującego na komórki T, PD-1 odgrywa również rolę w regulacji odpowiedzi komórek B i monocytów (Salmaninejad i in., 2018). Udokumentowane jest powiązanie białka PD-1 z układem immunologicznym, dostępne są również prace dowodzące ekspresji cząsteczki PD-1 w komórkach nowotworowych. Dodatkowo, w różnych nowotworach powiązано ekspresję PD-1 z rokowaniem. W badaniu z roku 2018 dowiedziano, że immunosupresja białka PD-1 w komórkach raka płuca promowała ich proliferację (Yao i in., 2018).

Badanie roli osi PD-1/PD-L1 jest ważnym przedmiotem zainteresowania współczesnej onkologii. Można odnaleźć liczne badania na temat funkcji białek PD-1 i PD-L1 oraz ich roli w procesie nowotworzenia. Badania sugerują, że komórki nowotworowe modyfikują odporność gospodarza w celu tzw. ucieczki immunologicznej. Jednym z jej najważniejszych elementów jest immunologiczny punkt kontrolny, w którym pośredniczy receptor PD-1 oraz jego ligand PD-L1, unikanie nadzoru immunologicznego przez komórki nowotworowe następuje poprzez interakcje molekularne białek immunologicznych punktów kontrolnych (Hamanishi i in., 2016; Lee i in., 2019), takich jak szlak PD-1/PD-L1 (Brody i in., 2017). Dostępne w literaturze badania wskazują na wpływ immunosupresji na

progresję i inwazyjność raka jelita grubego (Grady & Carethers, 2008), a tym samym podkreślają znaczenie immunologicznego punktu kontrolnego i ucieczki immunologicznej w rozwoju i przebiegu tego nowotworu.

Wprowadzenie terapii immunologicznych jest kluczowym osiągnięciem współczesnej onkologii. Badacze podkreślają fakt, iż ocena ilościowa najważniejszych białek, które kontrolują łączenie komórek guza z układem odpornościowym, jest jednym z najważniejszych wyzwań analitycznych w immunoterapeutyce (Morales-Betanzos i in., 2017). W ostatnim dziesięcioleciu znacznie wzrosło zainteresowanie tematem immunologicznych punktów kontrolnych, a wykorzystanie ich blokady w leczeniu nowotworów złośliwych jest obiektem licznych prac naukowych. Nowotwory złośliwe mogą przyjmować normalne fizjologiczne punkty nadzoru immunomodulacji, co prowadzi do zaburzenia równowagi między wzrostem guza a nadzorem ze strony organizmu gospodarza. Przeciwciała skierowane przeciw osi PD-1/PD-L1 prowadzą do trwałej regresji nowotworu, co może skutkować ponownym pojawieniem się stanu równowagi między wzrostem guza a kontrolą ze strony gospodarza (Sunshine & Taube, 2015). Badacze podkreślają, że zastosowanie przeciwciał monoklonalnych anty-PD-1/anty-PD-L1 w praktyce klinicznej stanowi przełom w leczeniu nowotworów złośliwych, w tym czerniaka, niedrobnokomórkowego raka płuc, chłoniaka Hodgkina oraz raka jelita grubego (Gordon i in., 2017). Ich główną zaletą jest wysokie powinowactwo wiązania i specyficzność docelowa. Wśród wad wymienić należy toksyczność związaną z odpornością, nieodpowiednią farmakokinetykę, wnikanie w utkanie guza oraz wysokie koszty, zarówno dla producentów jak i chorych (J. Yang & Hu, 2019). Szlak białka PD-1 zyskał zainteresowanie naukowców ze względu na jego rolę w wywoływaniu odpowiedzi immunologicznej w punktach kontrolnych komórek T, w wyniku czego komórki T są w stanie uniknąć nadzoru immunologicznego i są wysoce odporne na konwencjonalną chemioterapię. Zastosowanie przeciwciał PD-1/PD-L1 jako inhibitorów punktów kontrolnych staje się obiecującym podejściem terapeutycznym w leczeniu nowotworów, a niektóre z nich zostały z powodzeniem wprowadzone na rynek w ciągu ostatnich kilku lat. Terapia immunologiczna oparta na blokadzie

ścieżki PD-1/PD-L1 znalazła również zastosowanie w przypadku pacjentów z rakiem jelita grubego (Ooki i in., 2021; M. J. Overman i in., 2018; Yaghoubi i in., 2019). Jednakże nie wszyscy pacjenci wykazują pełną odpowiedź na leczenie, co sugeruje konieczność lepszego zrozumienia mechanizmów immunosupresji szlaku PD-1 (Cristescu i in., 2018; X. Wu i in., 2019).

W dostępnych w literaturze przedmiotu badaniach, podkreślane jest, że ekspresja białka PD-1 w tkance nowotworowej nie ogranicza się do limfocytów T, ale także obserwowana jest na limfocytach B, komórkach dendrytycznych, makrofagach, komórkach mieloidalnych oraz samych komórkach nowotworowych. Natomiast rola i mechanizm ekspresji badanego białka na konkretnym typie komórek pozostaje nie w pełni wyjaśniony (Kim & Ha, 2021; Zha i in., 2021).

Znaczenie białek PD-1 i PD-L1 w raku jelita grubego wydaje się być kwestią bardzo złożoną. W piśmiennictwie są obecne badania na ten temat, jednakże ich liczba nadal nie jest wystarczająco duża dla wyciągnięcia jednoznacznych wniosków, jak i niekiedy ich wyniki nie pozostają ze sobą w zgodności.

W prezentowanym badaniu zaobserwowano znamienne statystycznie zależność pomiędzy liczbą komórek nacieku zapalnego PD-1 (+) w dużym polu widzenia w obrębie guza, a głębokością nacieku (cecha pT). Wyższe wartości ujawniono w guzach pT2 w porównaniu do guzów pT4a. Ujawniono także wyższe wartości ekspresji białka PD-1 w guzach T4b w porównaniu do guzów T4a. Niestety wyniki badań dotyczących tego zagadnienia, dostępnych w piśmiennictwie, nie są jednoznaczne. Odnaleziono dwa artykuły dotyczące raka jelita grubego i związku immunoekspresji białka PD-1 w komórkach nacieku zapalnego z głębokością nacieku nowotworowego. W pierwszym z nich wskazano, iż ekspresja PD-1 w komórkach nacieku zapalnego była istotnie związana z niższą cechą T (Berntsson i in., 2018). W drugim z odnalezionych badań nie ujawniono znamienne statystycznych różnic w ekspresji białka PD-1 w zależności od cechy T (Wyss i in., 2019).

W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano znamienne statystycznie różnice w immunoekspresji białka PD-1 w komórkach nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian, pomiędzy guzami po stronie prawej w porównaniu

do guzów po stronie lewej. Prawostronna lokalizacja nowotworu związana była z wyższą ekspresją białka PD-1 w jelicie bez zmian. Dodatkowo zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego liczby komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian w zależności od lokalizacji guza wg WHO (strona prawa, strona lewa, odbytnica). Przy prawostronnej lokalizacji guza liczba komórek PD-1 (+) była wyższa, jednak wynik ten nie okazał się znamienny statystycznie. Pomimo braku istotności statystycznej ujawniono występowanie trendu dotyczącego liczby komórek PD-1 (+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w zależności od dokładnej lokalizacji nowotworu (kątnica, wstępnicza, zagięcie wątrobowe, poprzecznicza, zagięcie śledzionowe, zstępnicza, esica, zagięcie esiczo-odbytnicze, odbytnica). Guzy zlokalizowane we wstępnicy oraz zagięciu wątrobowym cechowały się wyższymi wartościami immunоекспresji PD-1(+) w porównaniu do guzów zagięcia esiczo-odbytniczego i odbytnicy. Dodatkowo w prezentowanym badaniu, w wyniku przeprowadzenia analizy składowych głównych ujawniono, że nowotwory zlokalizowane po stronie prawej, we wszystkich przyjętych podziałach: lokalizacji głównej (strona prawa, strona lewa), lokalizacji wg WHO (strona prawa, strona lewa, odbytnica) oraz dokładnej lokalizacji guza (kątnica, wstępnicza, zagięcie wątrobowe, poprzecznicza, zagięcie śledzionowe, zstępnicza, esica, zagięcie esiczo-odbytnicze, odbytnica) cechowały się wyższymi wartościami immunоекспresji białka PD-1 w obrębie jelita bez zmian. W odniesieniu do dokładnej lokalizacji guza, we wstępnicy wyższe wartości komórek nacieku zapalnego PD-1(+) obserwowane były również w obrębie guza.

Odnaleziono w literaturze badanie porównujące ekspresję białka PD-1 w komórkach nacieku zapalnego różnych lokalizacjach, tj. jelicie bez zmian, centrum guza, obrzeżu guza, obszarze najgłębszego naciekania oraz przerzutach do węzłów chłonnych. Immunоекспresja PD-1 była znamienne statystycznie wyższa jedynie w przypadku przerzutów do węzłów chłonnych (Ágoston i in., 2022).

W piśmiennictwie istnieją nieliczne badania oceniające immunоекспresję białka PD-1 w raku jelita grubego w obrębie guza, w zależności od lokalizacji głównej nowotworu (strona prawa, strona lewa) oraz lokalizacji wg WHO (strona prawa, strona lewa, odbytnica). W jednym z nich udokumentowano, że liczba

komórek PD-1 (+) w obrębie guza była istotnie statystycznie wyższa w guzach zlokalizowanych po stronie prawej (Ágoston i in., 2022). W badaniu z roku 2018 wykazano, że wysoka ekspresja PD-1 swoista dla komórek odpornościowych była powiązana z dłuższym przeżyciem całkowitym, w całej grupie badanej oraz w guzach zlokalizowanych po stronie prawej, ale nie po stronie lewej lub w odbytnicy (Berntsson i in., 2018). W trzecim z odnalezionych badań nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w prawostronnej lub lewostronnej lokalizacji nowotworu (Wyss i in., 2019).

W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano występowanie trendu dotyczącego związku liczby komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza z płcią chorych. Większą liczbę komórek PD-(+) stwierdzono wśród kobiet. Jest udokumentowanym, że pomimo wyższej częstości występowania raka jelita grubego u mężczyzn, rokowanie jest gorsze niż u płci żeńskiej (Majek i in., 2013). W dostępnej literaturze odnaleziono nieliczne badania oceniające ekspresję białka PD-1 w raku jelita grubego w zależności od płci pacjentów. W żadnym z nich nie wykazano znamienych statystycznie różnic w liczbie komórek PD-1 (+) w zależności od płci (Ágoston i in., 2022; Y. Li i in., 2016; Wyss i in., 2019).

W przedstawionym badaniu ujawniono także występowanie trendu dotyczącego związku liczby komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza z obecnością owrzodzenia. W przypadku guzów bez owrzodzenia liczba komórek nacieku zapalnego PD-1(+) była wyższa. Istnieją prace poświęcone znaczeniu rokownicemu owrzodzenia w nowotworach złośliwych, w tym w raku jelita grubego - wykazano, iż obecność owrzodzenia guza, w porównaniu ze wzrostem egzofitycznym, jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym (Dai i in., 2017), jednakże nie odnaleziono badań dokumentujących relacje pomiędzy charakterem wzrostu a immunoekspresją białka PD-1 do szczegółowego porównania.

W przeprowadzonym badaniu wykazano dodatnią korelację pomiędzy liczbą komórek nacieku zapalnego PD-1 (+) w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian a wiekiem chorego, a ponadto dodatnią korelację pomiędzy indeksem PD-1

(+) a wiekiem chorych. W przypadku raka jelita grubego starszy wiek związany jest z gorszym rokowaniem (Hayes i in., 2019; McKay i in., 2014). W literaturze nie odnaleziono badań immunoekspresji białka PD-1 w jelicie bez zmian u pacjentów z rakiem jelita grubego, natomiast w badaniach immunoekspresji PD-1 w obrębie guza, w żadnym z odnalezionych badań nie ujawniono istotności statystycznej związku z wiekiem pacjentów (Berntsson i in., 2018; Y. Li i in., 2016; Wyss i in., 2019). W przeprowadzonym badaniu ujawniono występowanie trendu dotyczącego związku indeksu PD-1 (+) w dużym polu widzenia w obrębie guza z obecnością owrzodzenia. Podobnie jak w przypadku liczby komórek nacieku zapalnego PD-1 (+), wyższe wartości zaobserwowano w guzach bez owrzodzenia.

W przedstawianym badaniu ujawniono występowanie dodatnich korelacji pomiędzy liczbą komórek nacieku zapalnego PD-1 (+) w dużym polu widzenia w obrębie guza oraz jelita bez zmian a liczbą wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza. Nie odnaleziono w piśmiennictwie prac oceniających potencjalny związek immunoekspresji białka PD-1 z liczbą komórek nacieku zapalnego w tkankach niezmiennych, u pacjentów z rozpoznaniem nowotworem złośliwym. Istnieje jednakże badanie dokumentujące korelacje między ekspresją PD-1 a naciekiem z limfocytów T i B, najbardziej widoczne w prawostronnych rakach jelita grubego (Berntsson i in., 2018). Pośrednio znalezisko to pozostaje w zgodności z przytoczonym już badaniem (Jimenez-Rodriguez i in., 2020), wskazującym na występowanie bardziej obfitego nacieku zapalnego przy prawostronnej lokalizacji raka. Biorąc pod uwagę, zaprezentowane wcześniej doniesienia i fakt, że w raku sutka już potwierdzono, że liczba komórek nacieku zapalnego PD-1 (+) jest istotnie skorelowana z wyższą liczbą wszystkich limfocytów naciekających guz (Kitano i in., 2017) – wydaje się zasadnym przyjąć, że istnieje potencjalny związek ekspresji białka PD-1 z lepszym rokowaniem, jednak koniecznym także wydają się dalsze badania tej zależności.

Silna ekspresja PD-1 w guzie korelowała z mniej agresywnym przebiegiem nowotworu, w tym rzadziej występującymi angioinwazją, przerzutami do węzłów chłonnych oraz pączkowaniem guza (*ang.: tumor budding*). Silna immunoekspresja znamienne statystycznie związana była z przeżyciem wolnym od choroby, nie

wykazano jednak zależności pomiędzy ekspresją PD-1 a przeżyciem całkowitym. Dodatkowo immunoekspresja PD-1 w podścielisku guza silnie korelowała z immunoekspresją PD-L1, zarówno w podścielisku, jak i komórkach guza (Wyss i in., 2019). W kolejnym z odnalezionych badań wyższa ekspresja PD-1 wiązała się z lepszym rokowaniem w raku jelita grubego. Immunoekspresja PD-1 była niezależnym czynnikiem prognostycznym (Y. Li i in., 2016). Z drugiej jednak strony, w badaniu z roku 2018 stwierdzono, że ekspresja PD-1 w komórkach odpornościowych nie była istotnie związana z przeżyciem u chorych z rakiem jelita grubego (Berntsson i in., 2018).

W przedstawionym badaniu wykazano znamienne statystycznie różnice w indeksie PD-1 (+) w dużym polu widzenia w obrębie guza w zależności od stopnia histologicznej złośliwości nowotworu (grade). Wyższe wartości obserwowano w guzach o niższym stopniu histologicznej złośliwości nowotworu (low-grade). Ponadto ujawniono występowanie trendu dotyczącego związku liczby komórek nacieku zapalnego PD-1 (+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian ze stopniem histologicznej złośliwości nowotworu. Wyższe wartości obserwowano w raku o wyższym stopniu histologicznej złośliwości (high-grade). W tym wypadku jednak nie odnaleziono w piśmiennictwie badań oceniających immunoekspresję białka PD-1 w jelicie bez zmian u pacjentów z rakiem jelita grubego, co uniemożliwia szerszą interpretację tego znaleziska.

W obecnych w literaturze przedmiotu badaniach dotyczących immunoekspresji białka PD-1 w komórkach układu immunologicznego w obrębie guza, w jednym z badań ujawniano znamienne statystycznie różnice w ekspresji białka PD-1, która okazała się silniejsza w guzach o wyższym stopniu histologicznej złośliwości (high-grade), jednak jedynie w przypadku lokalizacji guza w odbytnicy (Berntsson i in., 2018). W pozostałych badaniach nie wykazano znamiennych statystycznie różnic w ekspresji badanego białka w zależności od stopnia złośliwości histologicznej nowotworu (Y. Li i in., 2016; Wyss i in., 2019). W raku urotelialnym pęcherza moczowego ekspresję wykazano w 32,7% (38/116 przypadków) i stwierdzono wyższą ekspresję przy wyższym stopniu histologicznej złośliwości (Kumar i in., 2021). W dotychczas przeprowadzonych pracach

badawczych odnaleźć można także ocenę immunоекспресји бiałка PD-1 w komórkach nacieku zapalnego u pacjentek z rakiem piersi. Ekspresję ujawniono w 69,9% przypadków, nie udokumentowano jednak statystycznie istotnych związków z cechami klinicznymi. Wykazano natomiast znamienne zależności pomiędzy ekspresją PD-1 a ekspresją PD-L1, zarówno w komórkach guza, jak i nacieku zapalnego (Mehan i in., 2021). Ewaluacja immunоекспресји cząsteczki PD-1 przeprowadzona została również w przypadku raka gruczołu łojowego powieki, gdzie wysoki poziom ekspresji obecny był w 53,3% (16/30 przypadków). Nie ujawniono jednak znamienne statystycznych różnic w obecności badanego białka w związku z żadnym z ewaluowanych parametrów klinicznych, tj. wiekiem, płcią, stopniem histologicznej złośliwości nowotworu, stopniem zaawansowania klinicznego guza, wielkością guza, rozsiewem pagetoidalnym czy przerzutami w węzłach chłonnych (Jayaraj & Sen, 2019). Odnaleziono także pracę oceniającą immunоекспресję białka PD-1 w raku przewodu ślinowego. Immunоекспресję ujawniono w 66% przypadków, a obecność PD-1-dodatnich komórek nacieku zapalnego wiązała się z poprawą przeżycia niezależnie od poziomu ekspresji (Xu i in., 2019).

W prezentowanym badaniu zaobserwowano znamienne statystycznie różnice w indeksie PD-1 (+) w dużym polu widzenia w guzie w porównaniu do jelita bez zmian. Wyższe wartości ujawniono w obrębie guza. W literaturze przedmiotu nie odnaleziono badań porównujących ekspresję białka PD-1 w komórkach nacieku zapalnego pomiędzy guzem a jelitem bez zmian u pacjentów z rakiem jelita grubego. Jak wspomniano już we wcześniejszej części dyskusji, może to wskazywać na potencjalną potrzebę nowego kierunku dalszych badań nad białkiem PD-1 - różnic w jego ekspresji pomiędzy nowotworem a tkankami prawidłowymi.

PD-L1, ligand białka PD-1, często ulega nadekspresji na komórkach nowotworowych, co ułatwia ucieczkę przed mechanizmami immunologicznymi (Gordon i in., 2017). Różne typy nowotworów złośliwych wykazują wysoką ekspresję białka PD-L1 i wykorzystują szlak PD-1/PD-L1 w celu uniknięcia limfocytów T (Cha i in., 2019). Komórki nowotworowe, które wykazują ekspresję ligandu PD-L1, hamują aktywację immunomodulującą komórek T, tym samym

ułatwiający postęp choroby. Wykazano użyteczność badania ekspresji PD-1/PD-L1 jako potencjalnie ukierunkowanych immunologicznych białek punktów kontrolnych w znacznej części guzów litych (Gatalica i in., 2014). Sama ekspresja PD-L1 w komórkach nowotworowych często uważana jest za niekorzystny czynnik prognostyczny. Natomiast jej wystąpienie jest wyraźnie związane z pozytywnym wynikiem leczenia przeciwciałami blokującymi szlak PD-1/PD-L1, niezależnie od poziomu ekspresji PD-L1 (Balar & Weber, 2017; Weng i in., 2018). Terapeutyczne wykorzystanie osi PD-1/PD-L1 może doprowadzić do przywrócenia odporności gospodarza na nowotwory. Sugeruje się, że chorzy z guzami z nadekspresją PD-L1, uzyskują lepsze wyniki terapii immunologicznej, jednak badania nie są w pełni jednoznaczne (Patel & Kurzrock, 2015). Ocena znaczenia ekspresji białka PD-L1 przeprowadzona została w przypadku raka płuc, raka prostaty oraz nowotworów hematologicznych, takich jak chłoniak rozlany z dużych limfocytów B (*ang.: diffuse large B cell lymphoma, DLBCL*) (Isaacsson Velho & Antonarakis, 2018; M.-K. Song i in., 2019; Yu i in., 2016). Występowanie immunoekspresji PD-L1 w raku żołądka, raku wątrobowokomórkowym, raku nerkowokomórkowym, raku przetyku, raku trzustki, raku jajnika i raku pęcherza związane jest z gorszymi wynikami terapii. Z drugiej strony wykazanie obecności białka PD-L1 w raku piersi oraz raku z komórek Merkla poprawia rokowanie pacjentów.

W raku jelita grubego rola białka PD-L1 w pozostaje niejednoznaczna (X. Wang i in., 2016). W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano znamienne statystycznie różnice w liczbie komórek guza PD-L1 (+) w zależności od płci pacjentów. Wyższe wartości ujawniono u mężczyzn. Nie odnaleziono w literaturze badań ekspresji PD-L1 w raku jelita grubego prezentujących związek ekspresji tego białka z płcią chorych. Dostępne są jednak badania raka niedrobnokomórkowego płuca, w których wykazano, że silniejsza ekspresja PD-L1 (+) występuje u mężczyzn (Okita i in., 2017). W raku jelita grubego płeć męska jest negatywnym czynnikiem prognostycznym, może to więc sugerować potencjalny związek ekspresji białka PD-L1 na komórkach nowotworowych z niekorzystnym rokowaniem i wydaje się celowym pogłębienie badań w tym obszarze.

Liczne badania powiązały nadekspresję PD-L1 z niekorzystnymi rokującymi cechami kliniczno-patologicznymi, takimi jak: niskie różnicowanie nowotworu, zajęcie naczyń limfatycznych i gorszy czas przeżycia całkowitego chorych z rakiem jelita grubego (Ntomi i in., 2021). W jednej z prac ujawniono, że w przypadku raka jelita grubego wysoka ekspresja PD-L1 w związana była także z innymi źle rokującymi czynnikami, takimi jak duży rozmiar guza, obecność perforacji oraz z zaawansowanym stopniem pT w systemie (Mohamed i in., 2021). W pracy z roku 2020 zaobserwowano związek immunoekspresji białka PD-L1 z limfocytami naciekającymi guz, wysokim indeksem mitotycznym oraz słabszym przeżyciem (Hacking i in., 2021). Zaobserwowano, że ekspresja PD-L1 na komórkach guza związana jest wyższym stopniem histologicznej złośliwości nowotworu i bardziej agresywnym przebiegiem raka, w tym z większą liczbą przerzutów w węzłach chłonnych. Ujawniono także występowanie korelacji pomiędzy immunoekspresją białka PD-L1 a prawostronną lokalizacją guza, płcią żeńską i starszym wiekiem. Nie stwierdzono wpływu ekspresji PD-L1 w komórkach guza na przeżycie całkowite chorych, jednak w grupie badanej można było zaobserwować tendencję do dłuższego przeżycia bez objawów choroby (bez znamienności statystycznej) (Wyss i in., 2019).

W odniesieniu do innych cech histoklinicznych ewaluowanych w prezentowanym badaniu w aspekcie PDL-1 dane dostępne w literaturze nie wydają się także kompletne.

Nie udokumentowano różnic w ekspresji tego białka pomiędzy poszczególnymi lokalizacjami (jelito bez zmian, guz centrum, guz obrzeże, najgłębszy obszar nacieku i przerzuty do węzłów chłonnych) (Ágoston i in., 2022). Ekspresja PD-L1 na komórkach guza nie wykazała wartości rokowniczej pomimo wielu ocenianych lokalizacji (Berntsson i in., 2018), natomiast zaobserwowano, że ekspresja PD-L1 w komórkach nowotworowych była znamienne statystycznie związana z młodszym wiekiem i wyższym stopniem histologicznej złośliwości nowotworu (high-grade), u chorych z guzem prawostronnym. W kolejnej pracy zaobserwowano, że poziom ekspresji PD-L1 w stadiach zaawansowania klinicznego I-II był istotnie niższy niż w stadiach III i IV. Ekspresja PD-L1 wykazała

także dodatnią korelację ze stopniem zaawansowania wg TNM, przerzutami do węzłów chłonnych i przerzutami odległymi. W tym przypadku nie wykazano jednak istotnie statystycznych różnic w przypadku wieku, płci, stopnia histologicznego zaawansowania nowotworu oraz wielkości guza. Autorzy badania podkreślają, że ekspresja PD-L1 jest podwyższona w raku jelita grubego i jest ściśle związana z wyższym stadium TNM, przerzutami do węzłów chłonnych i złym rokowaniem (Shan i in., 2019). Ujawniono również, że przeżycie całkowite było istotnie wyższe w przypadku braku ekspresji PD-L1 w raku jelita grubego (Srivastava i in., 2021). W przeprowadzonej metaanalizie wykazano, że ekspresja PD-L1 w komórkach nowotworowych była istotnie statystycznie związana ze krótszym całkowitym i wolnym od objawów choroby czasem przeżycia. Guzy wykazujące ekspresję PD-L1 były częściej zlokalizowane po stronie prawej oraz wykazywały wyższy stopień złośliwości histologicznej nowotworu. W tej ewaluacji nie wykazano zależności ekspresji badanego białka od płci, wieku, wielkości guza, stadium klinicznego zaawansowania guza, przerzutów do węzłów chłonnych (Y. Li i in., 2019). W kolejnej z przeprowadzonych metaanaliz, uwzględniającej dwanaście badań z udziałem 4344 chorych, ujawniono że nadekspresja PD-L1 była istotna związana z krótszym całkowitym i wolnym od objawów choroby czasem przeżycia, ale nie wykazywała związku z wiekiem, płcią, lokalizacją i różnicowaniem guza, stadium pT ani stadium pN (L. Yang i in., 2019). W ewaluacji z 2020 roku ukazano, że ekspresja PD-L1 była istotnie związana z prawostronną lokalizacją guza, wielkością nowotworu oraz produkcją śluzu, natomiast nie była związana całkowitym i wolnym od objawów choroby czasem przeżycia. Wysznuło przypuszczenie, że zwiększone poziomy ekspresji PD-L1 mogą być związane ze złym rokowaniem u chorych z rakiem jelita grubego, wyniki nie są jednak jednoznaczne (Jung i in., 2020).

Niestety obok licznych badań przemawiających za niekorzystnym wpływem ekspresji białka PD-L1 na przebieg choroby nowotworowej w przypadku raka jelita grubego, istnieją także prace, które w przeciwieństwie do wcześniej przedstawionych badań, podają że ekspresja PD-L1 w komórkach guza była związana z dłuższym całkowitym i wolnym od objawów choroby czasem przeżycia chorych. Autorzy podkreślają również pozytywny wpływ ekspresji białka PD-L1 na

komórkach guza w przypadku raka sutka oraz raka jajnika (Y. Li i in., 2016). Dodatkowo w innym z odnalezionych badań ujawniono, że dodatnia ekspresja PD-L1 jest istotnie związana z niższym T, brakiem przerzutów do węzłów chłonnych oraz dłuższym przeżyciem całkowitym (Noh i in., 2020).

Immunoekspresja białka PD-L1 jest obserwowana nie tylko w komórkach guza, ale także w komórkach nacieku zapalnego w jego obrębie. Wyrażana jest głównie na komórkach T i komórkach prezentujących antygen, takich jak komórki B, komórki dendrytyczne i makrofagi. Istnienie takiej ekspresji wiąże się z mniej agresywnym przebiegiem nowotworu i lepszym całkowitym czasem przeżycia (Wyss i in., 2019).

W prezentowanym badaniu ujawniono występowanie dodatnich korelacji pomiędzy liczbą komórek nacieku zapalnego PD-L1 (+) w dużym polu widzenia w obrębie guza oraz w obrębie jelita bez zmian i liczbą wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza oraz w obrębie jelita bez zmian. Pozostaje to w zgodności z wynikami odnalezionymi w literaturze. Udokumentowano, że ekspresja PD-L1 w nacieku zapalnym i podścielisku istotnie koreluje z ekspresją CD8 zarówno w guzie, jak i w zrębie (Wyss i in., 2019). W kolejnym z analizowanych badań ekspresja PD-L1 w komórkach nacieku zapalnego korelowała także z obfitym naciekiem zapalnym z komórek T i komórek B. (Berntsson i in., 2018). Ujawniono ponadto, że ekspresja PD-L1 w nacieku zapalnym istotnie korelowała z ekspresją PD-1 w komórkach układu odpornościowego (Wyss i in., 2019) oraz że ekspresja PD-1 była istotnie związana z ekspresją PD-L1 w komórkach nacieku zapalnego (Berntsson i in., 2018).

W przedstawionym badaniu wykazano także występowanie dodatnich korelacji pomiędzy liczbą komórek nacieku zapalnego PD-L1 (+) w dużym polu widzenia w obrębie guza oraz w obrębie jelita bez zmian a liczbą komórek nacieku zapalnego PD-1 (+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian. Ponownie, ocenę tych znalezisk utrudnia brak w literaturze prac dotyczących niezmiennych nowotworowo tkanek u chorych z rakiem jelita grubego.

Uzyskane w prezentowanym badaniu wyniki dotyczące immunoekspresji białek PD-1 i PDL-1 w raku jelita grubego, choć nie mogą być jednoznacznie

zinterpretowane z uwagi na ograniczoną liczbę i niekiedy sprzeczność doniesień w literaturze, wydają się, poprzez ujawniony związek z czynnikami o udokumentowanym znaczeniu rokowniczym, takimi jak płeć, wiek oraz obecność owrzodzenia, wskazywać na celowość dalszych badań w tym obszarze.

Badania składu izotopowego – stabilnie, naturalnie występujących w przyrodzie, w tym w organizmach żywych – izotopów pierwiastków w przebiegu choroby nowotworowej są zupełnie nowym obszarem wiedzy. Od zapoczątkowania tego typu badań w 2015 roku (Taran, 2015) powoli wzrasta liczba doniesień na ten temat, jak dotąd nie objęły one jednak raka jelita grubego.

W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano znamienne statystycznie różnice w wartościach delta  $^{13}\text{C}$  pomiędzy badanymi lokalizacjami. Ujawniono, że wartości delta  $^{13}\text{C}$  są istotnie niższe w krezce w rzucie guza w porównaniu do centrum guza, obrzeża nowotworu, ściany jelita bez zmian w rzucie guza oraz ściany jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem. Zaobserwowano także, że wartości delta  $^{13}\text{C}$  są znamienne niższe w krezce poza guzem w porównaniu do centrum guza, obrzeża guza, ściany jelita bez zmian w rzucie guza oraz ściany jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem.

Odnalezione w literaturze przedmiotu prace ukazują naturalne zubożenie prawidłowej tkanki tłuszczowej pod względem zawartości ciężkich izotopów węgla -  $^{13}\text{C}$  (Elliott i in., 2014; Oppel i in., 2010). W badaniach prowadzonych na zwierzętach uszeregowano badane tkanki pod względem wartości delta  $^{13}\text{C}$  (poczynając od wartości najwyższych) w następujący sposób: włosy, mózg, mięśnie, wątroba, tłuszcz (Tieszen i in., 1983). Może to potencjalnie tłumaczyć różnice w wartościach delta  $^{13}\text{C}$  pomiędzy badanymi w przedstawionej pracy tkankami, wskazując, że najniższe wartości wykazano w krezce (zarówno w rzucie guza, jak i poza guzem), która ma potencjalnie najwyższą zawartości tkanki tłuszczowej.

W przedstawionym badaniu zaobserwowano istotne statystycznie różnice w wartościach delta  $^{13}\text{C}$  w krezce w rzucie guza oraz w krezce poza guzem pomiędzy guzami zlokalizowanymi prawo- i lewostronnie. Guzy umiejscowione po stronie prawej wykazywały wyższe wartości delta  $^{13}\text{C}$ . Dodatkowo znamienne

różnice w wartościach delta  $^{13}\text{C}$  ujawniono w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem przy zastosowaniu lokalizacji wg WHO (strona prawa, strona lewa, odbytnica). Wyższe wartości wykazano w guzach prawostronnych w porównaniu do guzów zlokalizowanych w odbytnicy.

W przedstawionym badaniu zaobserwowano także występowanie trendów dotyczących zmian wartości delta  $^{13}\text{C}$  pomiędzy guzami zlokalizowanymi po stronie prawej w porównaniu do guzów zlokalizowanych po stronie lewej, analizowanych zarówno w centrum, jak i na obrzeżu guza. I w tym przypadku, guzy prawostronne wykazywały wyższe wartości niż guzy lewostronne. Dodatkowo przy zastosowaniu dokładnej lokalizacji guza (kątnica, wstępnica, zagięcie wątrobowe, poprzecznicza, zagięcie śledzionowe, zstępnica, esica, zagięcie esiczo-odbytnicze, odbytnica), w przypadku guzów zlokalizowanych w odbytnicy, ujawniono zróżnicowane wartości delta  $^{13}\text{C}$  pomiędzy centrum guza a obrzeżem guza, wykazując wyższe wartości w centrum guza.

W przeprowadzonym badaniu ujawniono także występowanie trendów dotyczących wartości delta  $^{13}\text{C}$  w guzach z obecnym owrzodzeniem w porównaniu do guzów bez obecnego owrzodzenia. Wyższe wartości delta  $^{13}\text{C}$  wykazano w guzach bez obecnego owrzodzenia. Dodatkowo zróżnicowanie wartości delta  $^{13}\text{C}$  zaobserwowano pomiędzy ścianą jelita bez zmian w rzucie guza a ścianą jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, w przypadku guzów bez obecnego owrzodzenia, wykazując wyższe wartości delta  $^{13}\text{C}$  w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem.

Dodatkowo stwierdzono występowanie trendów dotyczących wartości delta  $^{13}\text{C}$  w krezką w rzucie guza i krezce poza guzem. Wyższe wartości wykazano w krezce poza guzem. Ponadto wartości delta  $^{13}\text{C}$  w krezce poza guzem zależały od płci pacjentów – były wyższe u mężczyzn. Zróżnicowane wartości delta  $^{13}\text{C}$  występowały w guzach po stronie prawej, po stronie lewej oraz guzach zlokalizowanych w odbytnicy (lokalizacja wg WHO), a także w guzach odbytnicy, przy zastosowaniu dokładnej lokalizacji (kątnica, wstępnica, zagięcie wątrobowe, poprzecznicza, zagięcie śledzionowe, zstępnica, esica, zagięcie esiczo-odbytnicze, odbytnica) pomiędzy krezką w rzucie guza a krezką poza guzem. W każdym

z powyższych przypadków wyższe wartości obserwowano w krezce poza guzem. Różnice w wartości delta  $^{13}\text{C}$  pomiędzy kreską w rzucie guza a kreską poza guza zaobserwowano także w rakach niewykazujących produkcji śluzu, guzach bez obecnego owrzodzenia oraz rakach o niższym stopniu histologicznej złośliwości nowotworu (low-grade). We wszystkich przypadkach wyższe wartości wykazano w krezce poza guzem.

W literaturze odnaleziono pojedyncze badania oceniające skład izotopowy pierwiastków w tkankach nowotworowych. W przypadku gruczolakoraka sutka zaobserwowano znamienne różnice w wartościach delta  $^{13}\text{C}$  pomiędzy tkanką nowotworową a prawidłowymi tkankami otaczającymi. Wykazano, iż wyższe wartości delta  $^{13}\text{C}$  występowały w guzie w porównaniu do jego otoczenia. Dodatkowo ujawniono występowanie ujemnych korelacji w wartościach delta  $^{13}\text{C}$  w stosunku do zawartości tkanki tłuszczowej, będącej ubogą w izotopy  $^{13}\text{C}$  (Tea i in., 2016). Badania przeprowadzone w guzie Wilmsa wykazały zróżnicowanie wartości delta  $^{13}\text{C}$ . Niższe wartości obserwowano w przypadku guza w porównaniu do nerki bez zmian, a także w przypadku nerczaków o większej dojrzałości komponenty nabłonkowej (Taran, Frączek, Sikora-Szubert, i in., 2016). W literaturze odnaleziono badania oceniające skład izotopowy wątrobiaka płodowego oraz mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego. Uzyskane wyniki nie wykazały jednak istotności statystycznej przeprowadzonych oznaczeń (Taran, Frączek, Sitkiewicz, i in., 2015, 2016).

W literaturze przedmiotu nie odnaleziono badań oceniających skład izotopowy stabilnych izotopów węgla w raku jelita grubego ani badań oceniających kompozycję izotopową w zależności od lokalizacji guza, obecności owrzodzenia, produkcji śluzu oraz stopnia histologicznej złośliwości nowotworu, które umożliwiłyby dalszą interpretację ujawnionych w prezentowanej pracy wyników.

W odniesieniu do składu izotopowego azotu, w prezentowanym badaniu zaobserwowano znamienne statystycznie różnice w wartościach delta  $^{15}\text{N}$  pomiędzy częścią z badanych lokalizacji. Ujawniono, że wartości delta  $^{15}\text{N}$  są istotnie niższe w centrum guza w porównaniu do ściany jelita bez zmian w rzucie guza, a także ściany jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem. Dodatkowo

wartości delta  $^{15}\text{N}$  były znamienne niższe w obrzeżu guza w porównaniu do ściany jelita bez zmian w rzucie guza oraz ściany jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem. Stwierdzono występowanie dodatnich korelacji pomiędzy wartościami delta  $^{15}\text{N}$  na obrzeżu guza w stosunku do centrum guza oraz ściany jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, w krezce w rzucie guza w stosunku do ściany jelita bez zmian w rzucie guza oraz ściany jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem, a także ściany jelita bez zmian w rzucie guza w stosunku do ściany jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem. W przedstawionym badaniu zaobserwowano także występowanie trendów dotyczących różnice wartości delta  $^{15}\text{N}$  pomiędzy kreską w rzucie guza a kreską poza guzem. Wyższe wartości delta  $^{15}\text{N}$  wykazano także w krezce poza guzem.

Ujawnione wyniki pozostają w zgodzie z nielicznymi obecnymi w literaturze przedmiotu badaniami dotyczącymi składu izotopowego azotu w przebiegu choroby nowotworowej. W badaniu z roku 2015 roku po raz pierwszy udokumentowano zubożenie izotopowe azotu w tkankach nowotworowych w porównaniu ze zdrowymi. W wystarczająco licznej dla potrzeb statystyki grupie neuroblastoma zjawisko to okazało się istotne statystycznie (Taran, 2015). Zróżnicowanie w wartościach delta  $^{15}\text{N}$  pomiędzy gruczolakorakiem sutka a niezmiennymi tkankami otaczającymi wykazano także w raku piersi. Pomimo braku uzyskania istotności statystycznej zaobserwowano niższe wartości delta  $^{15}\text{N}$  w guzie, w tym w rakach sutka potrójnie ujemnych (Tea i in., 2016b). Ocenie, mającej na celu ustalenie składu izotopowego, poddano także guza Wilmsa. Zaobserwowano, że wyższe wartości delta  $^{15}\text{N}$  były w obrębie guza niż w przypadku nerki bez zmian, a także w guzach bez obecności anaplazji, w porównaniu do guzów, w której ona występuje (Taran, Frączek, Sikora-Szubert, i in., 2016).

W aspekcie pozostałych cech histoklinicznych będących przedmiotem ewaluacji w prezentowanej pracy ujawniono, że w guzach niewykazujących produkcji śluzu udokumentowano niższe wartości delta  $^{15}\text{N}$  w krezce w rzucie guza w porównaniu do krezki poza guzem. W literaturze odnaleziono badanie wskazujące na zróżnicowanie składu izotopowego azotu w różnych typach tego samego nowotworu, np. pomiędzy podtypem płodowym i zarodkowym wątrobiaka

płodowego (wyższe wartości zaobserwowano w przypadku podtypu zarodkowego) (Taran, Frączek, Sitkiewicz, i in., 2016) oraz pomiędzy podtypem zarodkowym i pęcherzykowym mięśniakomięśaka prążkowanokomórkowego (wykazano wyższe wartości delta  $^{15}\text{N}$  w pęcherzykowym) (Taran, Frączek, Sitkiewicz, i in., 2015).

W prezentowanych badaniach zaobserwowano także niższe wartości delta  $^{15}\text{N}$  w krezce w rzucie guza w porównaniu do krezki poza guzem w przypadku nowotworów z makroskopowo obecnym owrzodzeniem. Ponadto ściana jelita bez zmian w rzucie guza cechowała się wyższymi wartościami delta  $^{15}\text{N}$  u mężczyzn i w przypadku lewostronnej lokalizacji nowotworu (przy zastosowaniu podziału strona prawa, strona lewa). Ujawniono także zróżnicowanie wartości delta  $^{15}\text{N}$  zależne od płci pacjentów. Wyższe wartości delta  $^{15}\text{N}$  wykazano w centrum guza w porównaniu do obrzeża guza wśród mężczyzn, w guzach z makroskopowo obecnym owrzodzeniem, w guzach bez obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (N0), a także w przypadku guzów zlokalizowanych w odbytnicy, przy zastosowaniu dokładnej lokalizacji (kątnica, wstępnicca, zagięcie wątrobowe, poprzecznica, zagięcie śledzionowe, zstępnica, esica, zagięcie esiczo-odbytnicze, odbytnica). Niestety w literaturze nie odnaleziono badań oceniających skład izotopowy nowotworów z uwzględnieniem lokalizacji guza w badanym narządzie, płci, obecności owrzodzenia oraz zajęcia regionalnych węzłów chłonnych, które byłyby pomocne w analizie powyższych znalezisk.

W przedstawionym badaniu ujawniono występowanie trendu dotyczącego wartości stosunku masowego N/C w guzach zlokalizowanych po stronie prawej, przy zastosowaniu podziału strona prawa, strona lewa, pomiędzy ścianą jelita bez zmian w rzucie guza a ścianą jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem. Wartości były wyższe w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza. Dodatkowo stosunek masowego N/C był wyższy w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w porównaniu do ściany jelita bez zmian w rzucie guza w przypadku raka nieprodukującego śluzu oraz guzów bez obecnego owrzodzenia.

W literaturze odnaleziono badanie, w którym wykazano, że zawartość procentowa azotu w raku sutka jest wyższa w porównaniu do tkanki otaczającej (Tea i in., 2016b). Nie zaobserwowano natomiast zróżnicowania w stosunku

masowym N/C w przypadku mięśniakomięsa prążkowanokomórkowego oraz wątrobiaka płodowego (Taran, Frączek, Sitkiewicz, i in., 2015, 2016). Podobnie jednak, jak w przypadku węgla i azotu, w literaturze przedmiotu nie odnaleziono badań oceniających stosunek masowy w samym raku jelita grubego, które umożliwiłyby dalszą interpretację ujawnionych w prezentowanej pracy wyników.

Interesującym wydaje się być ujawniony w prezentowanych badaniach związek składu izotopowego z naciekiem zapalnym i ekspresją białek PD-1 i PD-L1. W prezentowanym badaniu ujawniono występowanie dodatniej korelacji pomiędzy wartością delta  $^{15}\text{N}$  w centrum guza w stosunku do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian. Ponadto stwierdzono występowanie ujemnej korelacji pomiędzy wartością delta  $^{13}\text{C}$  w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza w stosunku do liczby komórek guza w dużym polu widzenia.

Pozostałe ujawnione w tym zakresie zależności dotyczą związku wartości delta  $^{15}\text{N}$  na obrzeżu guza oraz ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem z liczbą komórek nacieku zapalnego PD-L1 (+) w dużym polu widzenia obrębie jelita bez zmian, a także wartości delta  $^{15}\text{N}$  w krezce poza guzem z liczbą wszystkich komórek guza w dużym polu widzenia (obie korelacje ujemne). W aspekcie badań azotu w grupie neuroblastoma (Taran 2015) uzyskane wyniki mogą wskazywać na potencjalne implikacje kliniczne tego typu oznaczeń.

Rola białek PD-1 i PD-L1 w raku jelita grubego jest przedmiotem wielu badań i występowanie ich ekspresji zarówno na komórkach nowotworowych, jak i komórkach nacieku zapalnego wydaje się mieć wpływ na rozwój choroby nowotworowej. Wykazane w prezentowanym badaniu zależności pomiędzy ekspresją badanych białek a czynnikami histoklinicznymi o uznanym znaczeniu prognostycznym mogą stać się pomocne w lepszym zrozumieniu biologii raka jelita grubego.

Izotopowa spektrometria mas jako metoda badawcza jest narzędziem nowym w badaniach choroby nowotworowej. Uzyskane wyniki dotyczące składu izotopowego węgla i azotu w raku jelita grubego i tkankach go otaczających, wraz z odnalezionymi w literaturze badaniami oceniającymi kompozycję izotopową

w tkankach nowotworowych, dają niezbędne podstawy do prowadzenia dalszych badań w tym zakresie oraz wskazują wydaje się obiecujący kierunek pogłębiania wiedzy na temat nowotworów złośliwych już na poziomie atomowym – z wykorzystaniem izotopowej spektrometrii mas.

Ujawnione po raz pierwszy w prezentowanej pracy zależności pomiędzy ekspresją białek PD-1 i PD-L1 oraz składem izotopowym węgla i azotu w raku jelita grubego ukazują nieznane dotąd aspekty biologii tego nowotworu o potencjalnych implikacjach klinicznych, których lepsze zrozumienie może się przyczynić do poprawy rokowania dla powiększającej się grupy chorych z rakiem jelita grubego.

## 6. WNIOSKI

1. Ekspresja obu ewaluowanych białek, PD-1 oraz PD-L1 w raku jelita grubego i jego środowisku - zarówno w guzie, jak i jelicie bez zmian jest zróżnicowana. Znamienne wyższa ekspresja białka PD-1 obserwowana jest w utkaniu guza w porównaniu z niezmienną ścianą jelita.

2. Wartości delta  $^{15}\text{N}$  są znamienne niższe w centrum i na obrzeżu guza w porównaniu do niezmiennionej ściany w rzucie guza i pomiędzy guzem a marginesem chirurgicznym. Wartości delta  $^{13}\text{C}$  są znamienne niższe w krezce w rzucie guza oraz w krezce poza guzem w porównaniu do centrum guza, obrzeża guza, niezmiennionej ściany jelita w rzucie guza oraz ściany jelita pomiędzy guzem a marginesem chirurgicznym. Ujawnione różnice w wartości stosunku izotopowego stabilnych izotopów obu pierwiastków sugerują odmienność struktury nowotworu i jego środowiska na poziomie atomowym oraz wydają się wskazywać na możliwość wykorzystania przeprowadzonych pomiarów w celach diagnostycznych.

3. Ekspresja PD-1 w obrębie guza jest znamienne zależna od głębokości nacieku nowotworowego oraz stopnia złośliwości histologicznej nowotworu – dwóch czynników o uznanej wartości rokowniczej, a ponadto w zależności od lokalizacji guza zmienia się także w jelicie poza zmianą. Ekspresja PD-L1 w komórkach nowotworowych jest znamienne zależna od płci – czynnika, który w raku jelita grubego także ma znaczenie prognostyczne. Wartości składu izotopowego węgla w krezce, zarówno w rzucie guza, jak i poza guzem znamienne zależą od lokalizacji samego nowotworu, natomiast skład izotopowy azotu w niektórych lokalizacjach koreluje z ekspresją PD-L1. Uzyskane wyniki wydają się przemawiać za istnieniem pośredniego związku ekspresji PD-1, PD-L1 i składu izotopowego azotu z rokowaniem w raku jelita grubego.

4. Wykorzystanie izotopowej spektrometrii mas pozwala na ujawnienie nieznanych dotąd aspektów biologii raka jelita grubego i jego środowiska, a być może także implikacji klinicznych oznaczeń składu izotopowego. Konieczne byłyby jednak tak weryfikacja praktycznej wartości uzyskanych wyników w grupach o większej liczebności, jak i znaczne zwiększenie dostępności samej metody dla celów onkologii.

## 7. BIBLIOGRAFIA I NETOGRAFIA

1. Aaltonen, L. A., Hamilton, S. R., Jaffe, E. S., European Association for Haematopathology, International Agency for Research on Cancer, Society for Hematopathology, & World Health Organization. (2001). Pathology and genetics of tumours of the digestive system. IARC Press.
2. Abiko, K., Matsumura, N., Hamanishi, J., Horikawa, N., Murakami, R., Yamaguchi, K., Yoshioka, Y., Baba, T., Konishi, I., & Mandai, M. (2015). IFN- $\gamma$  from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 112(9), 1501–1509. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.101>
3. Adams, T. S., & Sterner, R. W. (2000). The effect of dietary nitrogen content on trophic level  $^{15}\text{N}$  enrichment. *Limnology and Oceanography*, 45(3), 601–607. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.3.0601>
4. Ágoston, E. I., Acs, B., Herold, Z., Fekete, K., Kulka, J., Nagy, A., Mühl, D., Mohacsi, R., Dank, M., Garay, T., Harsanyi, L., Györfy, B., & Szasz, A. M. (2022). Deconstructing Immune Cell Infiltration in Human Colorectal Cancer: A Systematic Spatiotemporal Evaluation. *Genes*, 13(4), 589. <https://doi.org/10.3390/genes13040589>
5. Ahn, S., Kim, T. H., Kim, S. W., Ki, C. S., Jang, H. W., Kim, J. S., Kim, J. H., Choe, J.-H., Shin, J. H., Hahn, S. Y., Oh, Y. L., & Chung, J. H. (2017). Comprehensive screening for PD-L1 expression in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 24(2), 97–106. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0421>
6. Akgül, Ö., Çetinkaya, E., Ersöz, Ş., & Tez, M. (2014). Role of surgery in colorectal cancer liver metastases. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(20), 6113–6122. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i20.6113>
7. Alexander, P. G., McMillan, D. C., & Park, J. H. (2020). The local inflammatory response in colorectal cancer – Type, location or density? A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treatment Reviews*, 83, 101949. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101949>
8. Alexiusdottir, K. K., Möller, P. H., Snaebjornsson, P., Jonasson, L., Olafsdottir, E. J., Björnsson, E. S., Tryggvadottir, L., & Jonasson, J. G. (2012). Association of symptoms of colon cancer patients with tumor location and TNM tumor stage. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 47(7), 795–801. <https://doi.org/10.3109/00365521.2012.672589>
9. Álvarez-Sierra, D., Marín-Sánchez, A., Ruiz-Blázquez, P., de Jesús Gil, C., Iglesias-Felip, C., González, Ó., Casteras, A., Costa, R. F., Nuciforo, P., Colobran, R., & Pujol-Borrell, R. (2019). Analysis of the PD-1/PD-L1 axis in human autoimmune thyroid disease: Insights into pathogenesis and clues to immunotherapy associated thyroid autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 103, 102285. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.05.013>
10. Ambrose, S. H. (1991). Effects of diet, climate and physiology on nitrogen isotope abundances in terrestrial foodwebs. *Journal of Archaeological Science*, 18(3), 293–317. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(91\)90067-Y](https://doi.org/10.1016/0305-4403(91)90067-Y)
11. Ambrose, S. H., & DeNiro, M. J. (1986). The isotopic ecology of East African mammals. *Oecologia*, 69(3), 395–406. <https://doi.org/10.1007/BF00377062>
12. Anbar, A. D. (2004). Iron stable isotopes: Beyond biosignatures. *Earth and Planetary Science Letters*, 217(3–4), 223–236. [https://doi.org/10.1016/S0012-821X\(03\)00572-7](https://doi.org/10.1016/S0012-821X(03)00572-7)

13. André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I., & de Gramont, A. (2004). Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer. *New England Journal of Medicine*, 350(23), 2343–2351. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032709>
14. André, T. R., Brito, M., Freire, J. G., & Moreira, A. (2018). Rectal and anal canal neuroendocrine tumours. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 9(2). <https://jgo.amegroups.com/article/view/16562>
15. Ang, C. W., Dawson, R., Hall, C., & Farmer, M. (2008). The diagnostic value of digital rectal examination in primary care for palpable rectal tumour. *Colorectal Disease: The Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 10(8), 789–792. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2007.01381.x>
16. Arvelo, F., Sojo, F., & Cotte, C. (2015, kwiecień 9). Biology of colorectal cancer. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2015.520>
17. Audrito, V., Serra, S., Stingi, A., Orso, F., Gaudino, F., Bologna, C., Neri, F., Garaffo, G., Nassini, R., Baroni, G., Rulli, E., Massi, D., Oliviero, S., Piva, R., Taverna, D., Mandalà, M., & Deaglio, S. (2017). PD-L1 up-regulation in melanoma increases disease aggressiveness and is mediated through miR-17-5p. *Oncotarget*, 8(9), 15894–15911. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15213>
18. Augestad, K. M., Merok, M. A., & Ignatovic, D. (2017). Tailored Treatment of Colorectal Cancer: Surgical, Molecular, and Genetic Considerations. *Clinical Medicine Insights. Oncology*, 11. <https://doi.org/10.1177/1179554917690766>
19. Balar, A. V., & Weber, J. S. (2017). PD-1 and PD-L1 antibodies in cancer: Current status and future directions. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 66(5), 551–564. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-1954-6>
20. Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: Back to Virchow? *The Lancet*, 357(9255), 539–545. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04046-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04046-0)
21. Ball, P. (2011). Flies sniff out heavy hydrogen. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/news.2011.39>
22. Ballesta, A. M., Molina, R., Filella, X., Jo, J., & Giménez, N. (1995). Carcinoembryonic antigen in staging and follow-up of patients with solid tumors. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 16(1), 32–41. <https://doi.org/10.1159/000217926>
23. Barboza, P. S., & Parker, K. L. (2006). Body protein stores and isotopic indicators of N balance in female reindeer (*Rangifer tarandus*) during winter. *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ*, 79(3), 628–644. <https://doi.org/10.1086/502811>
24. Bearhop, S., Waldron, S., Votier, S. C., & Furness, R. W. (2002). Factors that influence assimilation rates and fractionation of nitrogen and carbon stable isotopes in avian blood and feathers. *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ*, 75(5), 451–458. <https://doi.org/10.1086/342800>
25. Bednarczyk, K., Gawin, M., Chekan, M., Kurczyk, A., Mrukwa, G., Pietrowska, M., Polanska, J., & Widlak, P. (2019). Discrimination of normal oral mucosa from oral cancer by mass spectrometry imaging of proteins and lipids. *Journal of Molecular Histology*, 50(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10735-018-9802-3>
26. Ben-David, M., & Flaherty, E. (2012). Stable isotopes in mammalian research: A beginner's guide. *Journal of Mammalogy*, 93, 312–328. <https://doi.org/10.2307/41480342>

27. Berntsson, J., Eberhard, J., Nodin, B., Leandersson, K., Larsson, A. H., & Jirström, K. (2018). Expression of programmed cell death protein 1 (PD-1) and its ligand PD-L1 in colorectal cancer: Relationship with sidedness and prognosis. *Oncoimmunology*, 7(8), e1465165. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1465165>
28. Berut, M., Mik, M., Kędzia-Berut, R., Kujawski, R., Trzciński, R., Dziki, Ł., & Dziki, A. (2013). Colorectal cancer in young and elderly patients. *Polski Przegląd Chirurgiczny*, 85(8), 446–451. <https://doi.org/10.2478/pjs-2013-0068>
29. Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. *Nature Immunology*, 11(10), 889–896. <https://doi.org/10.1038/ni.1937>
30. Boriosi, J. P., Maki, D. G., Yngsdal-Krenz, R. A., Wald, E. R., Porter, W. P., Cook, M. E., & Bütz, D. E. (2014). Changes in breath carbon isotope composition as a potential biomarker of inflammatory acute phase response in mechanically ventilated pediatric patients. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 29(4), 599–605. <https://doi.org/10.1039/C3JA50331C>
31. Boutton, T. W., Arshad, M. A., & Tieszen, L. L. (1983). Stable isotope analysis of termite food habits in East African grasslands. *Oecologia*, 59(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF00388065>
32. Bray, C., Bell, L. N., Liang, H., Collins, D., & Yale, S. H. (2017). Colorectal Cancer Screening. *WMJ: Official Publication of the State Medical Society of Wisconsin*, 116(1), 27–33.
33. Brenner, H., Kloor, M., & Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *Lancet (London, England)*, 383(9927), 1490–1502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9)
34. Brody, R., Zhang, Y., Ballas, M., Siddiqui, M. K., Gupta, P., Barker, C., Midha, A., & Walker, J. (2017). PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 112, 200–215. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.08.005>
35. Brosens, L. A., Langeveld, D., van Hattem, W. A., Giardiello, F. M., & Offerhaus, G. J. A. (2011). Juvenile polyposis syndrome. *World Journal of Gastroenterology*, 17(44), 4839–4844. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i44.4839>
36. Cai, X., Gu, D., Chen, M., Liu, L., Chen, D., Lu, L., Gao, M., Ye, X., Jin, X., & Xie, C. (2018). The effect of the primary tumor location on the survival of colorectal cancer patients after radical surgery. *International Journal of Medical Sciences*, 15(14), 1640–1647. <https://doi.org/10.7150/ijms.27834>
37. Caldwell, R. L., Holt, G. E., & Caprioli, R. M. (2005). Tissue Profiling by MALDI Mass Spectrometry Distinguishes Clinical Grades of Soft Tissue Sarcomas. *Cancer Genomics & Proteomics*, 2(6), 333–345.
38. Caputo, F., Santini, C., Bardasi, C., Cerma, K., Casadei-Gardini, A., Spallanzani, A., Andrikou, K., Cascinu, S., & Gelsomino, F. (2019). BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215369>
39. Carlomagno, N., Santangelo, M. L., Amato, B., Calogero, A., Saracco, M., Cremone, C., Miranda, A., Dodaro, C., & Renda, A. (2014). Total colectomy for cancer: Analysis of factors linked to patients' age. *International Journal of Surgery (London, England)*, 12 Suppl 2, S135–S139. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2014.08.363>

40. Carpelan-Holmström, M., Louhimo, J., Stenman, U. H., Alfthan, H., & Haglund, C. (2002). CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Anticancer Research*, 22(4), 2311–2316.
41. Carr, S., & Kasi, A. (2020). Familial Adenomatous Polyposis. W StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538233/>
42. Cha, J.-H., Chan, L.-C., Li, C.-W., Hsu, J. L., & Hung, M.-C. (2019). Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Molecular Cell*, 76(3), 359–370. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.030>
43. Chaurand, P., Schwartz, S. A., Billheimer, D., Xu, B. J., Crecelius, A., & Caprioli, R. M. (2004). Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 76(4), 1145–1155. <https://doi.org/10.1021/ac0351264>
44. Choi, Y. Y., Kim, Y. J., & Jin, S. Y. (2010). Primary liposarcoma of the ascending colon: A rare case of mixed type presenting as hemoperitoneum combined with other type of retroperitoneal liposarcoma. *BMC Cancer*, 10, 239. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-239>
45. Chu, Q. D., Zhou, M., Medeiros, K. L., Peddi, P., Kavanaugh, M., & Wu, X.-C. (2016). Poor survival in stage IIB/C (T4N0) compared to stage IIIA (T1-2 N1, T1N2a) colon cancer persists even after adjusting for adequate lymph nodes retrieved and receipt of adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer*, 16, 460. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2446-3>
46. Chung, K.-C., Lee, K.-C., Chen, H.-H., Cheng, K.-C., Wu, K.-L., & Song, L.-C. (2021). Differential short-term outcomes of laparoscopic resection in colon and rectal cancer patients aged 80 and older: An analysis of Nationwide Inpatient Sample. *Surgical Endoscopy*, 35(2), 872–883. <https://doi.org/10.1007/s00464-020-07459-x>
47. Church, E. M., Mehlhaff, C. J., & Patnaik, A. K. (1987). Colorectal adenocarcinoma in dogs: 78 cases (1973-1984). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 191(6), 727–730.
48. Compton, C. C. (2003). Colorectal carcinoma: Diagnostic, prognostic, and molecular features. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 16(4), 376–388. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000062859.46942.93>
49. Coy, S., Rashid, R., Lin, J.-R., Du, Z., Donson, A. M., Hankinson, T. C., Foreman, N. K., Manley, P. E., Kieran, M. W., Reardon, D. A., Sorger, P. K., & Santagata, S. (2018). Multiplexed immunofluorescence reveals potential PD-1/PD-L1 pathway vulnerabilities in craniopharyngioma. *Neuro-Oncology*, 20(8), 1101–1112. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy035>
50. Cristescu, R., Mogg, R., Ayers, M., Albright, A., Murphy, E., Yearley, J., Sher, X., Liu, X. Q., Lu, H., Nebozhyn, M., Zhang, C., Lunceford, J. K., Joe, A., Cheng, J., Webber, A. L., Ibrahim, N., Plimack, E. R., Ott, P. A., Seiwert, T. Y., ... Kaufman, D. (2018). Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science*, 362(6411). <https://doi.org/10.1126/science.aar3593>
51. Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H.-J., Lynch, H. T., Minsky, B., Nordlinger, B., & Starling, N. (2010). Colorectal cancer. *The Lancet*, 375(9719), 1030–1047. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60353-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60353-4)
52. Dai, W., Li, Y., Meng, X., Cai, S., Li, Q., & Cai, G. (2017). Does tumor size have its prognostic role in colorectal cancer? Re-evaluating its value in colorectal adenocarcinoma with different macroscopic growth pattern. *International Journal of Surgery*, 45, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2017.07.100>

53. De Divitiis, C., Nasti, G., Montano, M., Fisichella, R., Iaffaioli, R. V., & Berretta, M. (2014). Prognostic and predictive response factors in colorectal cancer patients: Between hope and reality. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(41), 15049–15059. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i41.15049>
54. de Gooyer, J.-M., Verstegen, M. G., 't Lam-Boer, J., Radema, S. A., Verhoeven, R. H. A., Verhoef, C., Schreinemakers, J. M. J., & de Wilt, J. H. W. (2020). Neoadjuvant Chemotherapy for Locally Advanced T4 Colon Cancer: A Nationwide Propensity-Score Matched Cohort Analysis. *Digestive Surgery*, 37(4), 292–301. <https://doi.org/10.1159/000503446>
55. De Sousa Linhares, A., Battin, C., Jutz, S., Leitner, J., Hafner, C., Tobias, J., Wiedermann, U., Kundi, M., Zlabinger, G. J., Grabmeier-Pfistershammer, K., & Steinberger, P. (2019). Therapeutic PD-L1 antibodies are more effective than PD-1 antibodies in blocking PD-1/PD-L1 signaling. *Scientific Reports*, 9(1), 11472. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47910-1>
56. Dehal, A., Graff-Baker, A. N., Vuong, B., Fischer, T., Klempner, S. J., Chang, S.-C., Grunkemeier, G. L., Bilchik, A. J., & Goldfarb, M. (2018). Neoadjuvant Chemotherapy Improves Survival in Patients with Clinical T4b Colon Cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 22(2), 242–249. <https://doi.org/10.1007/s11605-017-3566-z>
57. Dinan, M. A., Curtis, L. H., Hammill, B. G., Patz, E. F., Abernethy, A. P., Shea, A. M., & Schulman, K. A. (2010). Changes in the use and costs of diagnostic imaging among Medicare beneficiaries with cancer, 1999-2006. *JAMA*, 303(16), 1625–1631. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.460>
58. Dinu, D., Dobre, M., Panaitescu, E., Bîrlă, R., Iosif, C., Hoara, P., Caragui, A., Boeriu, M., Constantinoiu, S., & Ardeleanu, C. (2014). Prognostic significance of KRAS gene mutations in colorectal cancer—Preliminary study. *Journal of Medicine and Life*, 7(4), 581–587.
59. Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5771), 212–217. <https://doi.org/10.1126/science.1124619>
60. Duan, K.-F., & Wang, H. (2019). The efficacy of panitumumab in refractory metastatic colorectal cancer: A meta-analysis. *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 24(4), 1457–1463.
61. Duffy, M. J. (2001). Carcinoembryonic Antigen as a Marker for Colorectal Cancer: Is It Clinically Useful? *Clinical Chemistry*, 47(4), 624–630. <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.4.624>
62. Duncan, M. W., Nedelkov, D., Walsh, R., & Hattan, S. J. (2016). Applications of MALDI Mass Spectrometry in Clinical Chemistry. *Clinical Chemistry*, 62(1), 134–143. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.239491>
63. Dżiki, Ł., Puła, A., Stawiski, K., Mudza, B., Włodarczyk, M., & Dżiki, A. (2015). Patients' Awareness Of The Prevention And Treatment Of Colorectal Cancer. *Polski Przegląd Chirurgiczny*, 87(9), 459–463. <https://doi.org/10.1515/pjs-2015-0088>
64. Eisenberg, S. (2012). Biologic therapy. *Journal of Infusion Nursing: The Official Publication of the Infusion Nurses Society*, 35(5), 301–313. <https://doi.org/10.1097/NAN.0b013e31826579aa>
65. Ellis, S. R., Paine, M. R. L., Eijkel, G. B., Pauling, J. K., Husen, P., Jervelund, M. W., Hermansson, M., Ejsing, C. S., & Heeren, R. M. A. (2018). Automated,

- parallel mass spectrometry imaging and structural identification of lipids. *Nature Methods*, 15(7), 515–518. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0010-6>
66. Elliott, K. H., Davis, M., & Elliott, J. E. (2014). Equations for Lipid Normalization of Carbon Stable Isotope Ratios in Aquatic Bird Eggs. *PLOS ONE*, 9(1), e83597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083597>
  67. Elsner, M. (2010). Stable isotope fractionation to investigate natural transformation mechanisms of organic contaminants: Principles, prospects and limitations.
  68. Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(3), 153–173. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030>
  69. Fornasier, G., Francescon, S., & Baldo, P. (2018). An Update of Efficacy and Safety of Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer: A Narrative Review. *Advances in Therapy*, 35(10), 1497–1509. <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0791-0>
  70. Gan, N., Jia, L., & Zheng, L. (2011). A Sandwich Electrochemical Immunosensor Using Magnetic DNA Nanoprobes for Carcinoembryonic Antigen. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(11), 7410–7423. <https://doi.org/10.3390/ijms12117410>
  71. Gao, Y., Wang, J., Zhou, Y., Sheng, S., Qian, S. Y., & Huo, X. (2018). Evaluation of Serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and Ferritin as Diagnostic Markers and Factors of Clinical Parameters for Colorectal Cancer. *Scientific Reports*, 8(1), 2732. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21048-y>
  72. Gardner, R. C., Feinerman, A. E., Kantrowitz, P. A., Gottblatt, S., Loewenstein, M. S., & Zamcheck, N. (1978). Serial carcinoembryonic antigen (CEA) blood levels in patients with ulcerative colitis. *The American Journal of Digestive Diseases*, 23(2), 129–133. <https://doi.org/10.1007/BF01073187>
  73. Gatalica, Z., Snyder, C., Maney, T., Ghazalpour, A., Holterman, D. A., Xiao, N., Overberg, P., Rose, I., Basu, G. D., Vranic, S., Lynch, H. T., Von Hoff, D. D., & Hamid, O. (2014). Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 23(12), 2965–2970. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0654>
  74. Gaye-Siessegger, J., Focken, U., Abel, H. J., & Becker, K. (2003). Feeding level and diet quality influence trophic shift of C and N isotopes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (L.)). *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 39(2), 125–134. <https://doi.org/10.1080/1025601031000113556>
  75. Gold, P., & Freedman, S. O. (1965). DEMONSTRATION OF TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN HUMAN COLONIC CARCINOMATA BY IMMUNOLOGICAL TOLERANCE AND ABSORPTION TECHNIQUES. *The Journal of Experimental Medicine*, 121, 439–462. <https://doi.org/10.1084/jem.121.3.439>
  76. Gordon, S. R., Maute, R. L., Dulken, B. W., Hutter, G., George, B. M., McCracken, M. N., Gupta, R., Tsai, J. M., Sinha, R., Corey, D., Ring, A. M., Connolly, A. J., & Weissman, I. L. (2017). PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*, 545(7655), 495–499. <https://doi.org/10.1038/nature22396>
  77. Grady, W. M., & Carethers, J. M. (2008). Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4), 1079–1099. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.076>

78. Guerrera, F., Mossetti, C., Ceccarelli, M., Bruna, M. C., Bora, G., Olivetti, S., Lausi, P. O., Solidoro, P., Ciccone, G., Ruffini, E., Oliaro, A., & Filosso, P. L. (2016). Surgery of colorectal cancer lung metastases: Analysis of survival, recurrence and re-surgery. *Journal of Thoracic Disease*, 8(7), 1764–1771. <https://doi.org/10.21037/jtd.2016.05.98>
79. Hacking, S., Vitkovski, T., Jain, S., Jin, C., Chavarria, H., Wu, D., & Nasim, M. (2021). Clinical Significance of Program Death Ligand-1 and Indoleamine-2,3-Dioxygenase Expression in Colorectal Carcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM*, 29(3), 201–208. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000868>
80. Half, E., Bercovich, D., & Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4, 22. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-4-22>
81. Hall, C., Clarke, L., Pal, A., Buchwald, P., Eglinton, T., Wakeman, C., & Frizelle, F. (2019). A Review of the Role of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Practice. *Annals of Coloproctology*, 35(6), 294–305. <https://doi.org/10.3393/ac.2019.11.13>
82. Halling, K. C., French, A. J., McDonnell, S. K., Burgart, L. J., Schaid, D. J., Peterson, B. J., Moon-Tasson, L., Mahoney, M. R., Sargent, D. J., O'Connell, M. J., Witzig, T. E., Farr, G. H., Goldberg, R. M., & Thibodeau, S. N. (1999). Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(15), 1295–1303. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.15.1295>
83. Hamanishi, J., Mandai, M., Matsumura, N., Abiko, K., Baba, T., & Konishi, I. (2016). PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: Perspectives and issues. *International Journal of Clinical Oncology*, 21(3), 462–473. <https://doi.org/10.1007/s10147-016-0959-z>
84. Hamfjord, J., Myklebust, T. Å., Larsen, I. K., Kure, E. H., Glimelius, B., Guren, T. K., Tveit, K. M., & Guren, M. G. (2022). Survival Trends of Right- and Left-Sided Colon Cancer across Four Decades: A Norwegian Population-Based Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 31(2), 342–351. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-21-0555>
85. Han, W., Feng, L., Li, H., & Liu, W. (2017). Bulk  $\delta^{15}\text{N}$  measurements of organic-rich rock samples by elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometry with enhanced oxidation ability. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 31(1), 16–20. <https://doi.org/10.1002/rcm.7754>
86. Han, X., Aslanian, A., & Yates, J. R. (2008). Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(5), 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.024>
87. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
88. Hayes, L., Forrest, L., Adams, J., Hidajat, M., Ben-Shlomo, Y., White, M., & Sharp, L. (2019). Age-related inequalities in colon cancer treatment persist over time: A population-based analysis. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 73(1), 34–41. <https://doi.org/10.1136/jech-2018-210842>
89. Hedges, R., & Reynard, L. (2007). Nitrogen isotopes and the trophic level of humans in archaeology. *Journal of Archaeological Science*, 34, 1240–1251.
90. Henderson, R. H., French, D., Maughan, T., Adams, R., Allemani, C., Minicozzi, P., Coleman, M. P., McFerran, E., Sullivan, R., & Lawler, M. (2021). The economic burden of colorectal cancer across Europe: A population-based cost-of-illness

- study. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 6(9), 709–722. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(21\)00147-3](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(21)00147-3)
91. Hoefs, J. (2009). *Stable Isotope Geochemistry* (6. wyd.). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-70708-0>
  92. Holtedahl, K., Borgquist, L., Donker, G. A., Buntinx, F., Weller, D., Campbell, C., Månsson, J., Hammersley, V., Braaten, T., & Parajuli, R. (2021). Symptoms and signs of colorectal cancer, with differences between proximal and distal colon cancer: A prospective cohort study of diagnostic accuracy in primary care. *BMC Family Practice*, 22, 148. <https://doi.org/10.1186/s12875-021-01452-6>
  93. Hu, T., & Zhang, J.-L. (2018). Mass-spectrometry-based lipidomics. *Journal of Separation Science*, 41(1), 351–372. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700709>
  94. Huang, C.-J., Jiang, J.-K., Chang, S.-C., Lin, J.-K., & Yang, S.-H. (2016). Serum CA125 concentration as a predictor of peritoneal dissemination of colorectal cancer in men and women. *Medicine*, 95(47), e5177. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000005177>
  95. Huang, Y.-M., Lee, Y.-W., Huang, Y.-J., & Wei, P.-L. (2020). Comparison of clinical outcomes between laparoscopic and open surgery for left-sided colon cancer: A nationwide population-based study. *Scientific Reports*, 10(1), 75. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57059-6>
  96. Idos, G. E., Kwok, J., Bonthala, N., Kysh, L., Gruber, S. B., & Qu, C. (2020). The Prognostic Implications of Tumor Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Scientific Reports*, 10(1), 3360. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60255-4>
  97. Ijzermans, J. N., Marquet, R. L., Bouwman, E., de Bruin, R. W., van der Meide, P. H., & Jeekel, J. (1987). Successful treatment of colon cancer in rats with recombinant interferon-gamma. *British Journal of Cancer*, 56(6), 795–796.
  98. Isaacsson Velho, P., & Antonarakis, E. S. (2018). PD-1/PD-L1 pathway inhibitors in advanced prostate cancer. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 11(5), 475–486. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1464388>
  99. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal*, 11(11), 3887–3895.
  100. Jakobsen, A., Andersen, F., Fischer, A., Jensen, L. H., Jørgensen, J. C. R., Larsen, O., Lindebjerg, J., Pløen, J., Rafaelsen, S. R., & Vilandt, J. (2015). Neoadjuvant chemotherapy in locally advanced colon cancer. A phase II trial. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, 54(10), 1747–1753. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2015.1037007>
  101. Jakubowska, K., Koda, M., Kisielewski, W., Kańczuga-Koda, L., & Famulski, W. (2019). Prognostic significance of inflammatory cell response in patients with colorectal cancer. *Oncology Letters*, 18(1), 783–791. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10343>
  102. Jalaiekhoo, H., Zokaasadi, M., Khajeh-Mehrzi, A., Rajaeinejad, M., Mousavi, S. A., Vaezi, M., Fumani, H. K., Keyhani, M., Alimoghaddam, K., & Ghavamzadeh, A. (2019). Effectiveness of adjuvant chemotherapy in patients with Stage II colorectal cancer: A multicenter retrospective study. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 24. [https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS\\_106\\_18](https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS_106_18)
  103. Jang, H. J., Kim, B. J., Kim, J. H., & Kim, H. S. (2017). The addition of bevacizumab in the first-line treatment for metastatic colorectal cancer: An updated meta-

- analysis of randomized trials. *Oncotarget*, 8(42), 73009–73016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20314>
104. Janssens, K., Boeckx, N., Camp, G. V., Beeck, K. O. D., Fransen, E., Calay, F., Damme, N. V., & Peeters, M. (2018). Comparing survival in left-sided and right-sided colorectal carcinoma: A Belgian population-based study. *Annals of Oncology*, 29, v98. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy150.017>
  105. Jaspersen, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044–2058. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.054>
  106. Jassem, J., & Kordek, R. (Red.). (2019). *Onkologia. Podręcznik dla studentów i lekarzy, wyd. 5 (5. wyd.)*. <https://www.ikamed.pl/onkologia-podrecznik-dla-studentow-i-lekarzy-wyd-5-VMG01250>
  107. Jayaraj, P., & Sen, S. (2019). Evaluation of PD-L1 and PD-1 expression in aggressive eyelid sebaceous gland carcinoma and its clinical significance. *Indian Journal of Ophthalmology*, 67(12), 1983–1987. [https://doi.org/10.4103/ijo.IJO\\_2056\\_18](https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_2056_18)
  108. Jb, W., Gj, B., Te, C., & Jr, E. (2006). Stable isotopes as one of nature's ecological recorders. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(7), 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.04.002>
  109. Jiang, Y., Chen, M., Nie, H., & Yuan, Y. (2019). PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: Clinical implications and future considerations. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 15(5), 1111–1122. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1571892>
  110. Jimenez-Rodriguez, R. M., Patil, S., Keshinro, A., Shia, J., Vakiani, E., Stadler, Z., Segal, N. H., Yaeger, R., Konishi, T., Shimada, Y., Widmar, M., Wei, I., Pappou, E., Smith, J. J., Nash, G., Paty, P., Garcia-Aguilar, J., & Weiser, M. R. (2020). Quantitative assessment of tumor-infiltrating lymphocytes in mismatch repair proficient colon cancer. *Oncoimmunology*, 9(1), 1841948. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1841948>
  111. Jones, H. J. S., & Cunningham, C. (2019). Adjuvant radiotherapy after local excision of rectal cancer. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, 58(sup1), S60–S64. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2019.1578895>
  112. Jung, D. H., Park, H. J., Jang, H. H., Kim, S.-H., Jung, Y., & Lee, W.-S. (2020). Clinical Impact of PD-L1 Expression for Survival in Curatively Resected Colon Cancer. *Cancer Investigation*, 38(7), 406–414. <https://doi.org/10.1080/07357907.2020.1793349>
  113. Kamocki, Z., Wilamowski, R., Reszeć, J., Zaręba, K., & Kędra, B. (2012). Angiosarcoma of the large intestine – a case report. *Contemporary Oncology*, 16(6), 590–592. <https://doi.org/10.5114/wo.2012.32496>
  114. Katzenberg, M. A., & Lovell, N. C. (1999). Stable isotope variation in pathological bone1. *International Journal of Osteoarchaeology*, 9(5), 316–324. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1212\(199909/10\)9:5<316::AID-OA500>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1212(199909/10)9:5<316::AID-OA500>3.0.CO;2-D)
  115. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual Review of Immunology*, 26, 677–704. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>
  116. Ketha, S. S., Singh, R. J., & Ketha, H. (2017). Role of Mass Spectrometry in Clinical Endocrinology. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 46(3), 593–613. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2017.04.001>

117. Kidambi, T. D., Kohli, D. R., Samadder, N. J., & Singh, A. (2019). Hereditary Polyposis Syndromes. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, 17(4), 650–665. <https://doi.org/10.1007/s11938-019-00251-4>
118. Kim, M. J., & Ha, S.-J. (2021). Differential Role of PD-1 Expressed by Various Immune and Tumor Cells in the Tumor Immune Microenvironment: Expression, Function, Therapeutic Efficacy, and Resistance to Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2021.767466>
119. Kitano, A., Ono, M., Yoshida, M., Noguchi, E., Shimomura, A., Shimoi, T., Kodaira, M., Yunokawa, M., Yonemori, K., Shimizu, C., Kinoshita, T., Fujiwara, Y., Tsuda, H., & Tamura, K. (2017). Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. *ESMO Open*, 2(2), e000150. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2016-000150>
120. Klaver, C. E. L., van Huijgevoort, N. C. M., de Buck van Overstraeten, A., Wolthuis, A. M., Tanis, P. J., van der Bilt, J. D. W., Sagaert, X., & D'Hoore, A. (2018). Locally Advanced Colorectal Cancer: True Peritoneal Tumor Penetration is Associated with Peritoneal Metastases. *Annals of Surgical Oncology*, 25(1), 212–220. <https://doi.org/10.1245/s10434-017-6037-6>
121. Klimczak, A., Kempieńska-Miroslawska, B., Mik, M., Dziki, L., & Dziki, A. (2014). Colorectal cancer mortality in Poland—Analysis of regional variation. *Archives of Medical Science: AMS*, 10(1), 63–67. <https://doi.org/10.5114/aoms.2012.28596>
122. Kobayashi, K., Fukushima, K., Onishi, Y., Nishina, K., Makabe, A., Yano, M., Wankel, S. D., Koba, K., & Okabe, S. (2021). Influence of  $\delta^{18}O$  of water on measurements of  $\delta^{18}O$  of nitrite and nitrate. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 35(2), e8979. <https://doi.org/10.1002/rcm.8979>
123. Koenig, J. L., Toesca, D. A. S., Harris, J. P., Tsai, C. J., Haraldsdottir, S., Lin, A. Y., Pollom, E. L., & Chang, D. T. (2019). Microsatellite Instability and Adjuvant Chemotherapy in Stage II Colon Cancer. *American Journal of Clinical Oncology*, 42(7), 573–580. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000554>
124. Konishi, T., Shimada, Y., Hsu, M., Tufts, L., Jimenez-Rodriguez, R., Cercek, A., Yaeger, R., Saltz, L., Smith, J. J., Nash, G. M., Guillem, J. G., Paty, P. B., Garcia-Aguilar, J., Gonen, M., & Weiser, M. R. (2018). Association of Preoperative and Postoperative Serum Carcinoembryonic Antigen and Colon Cancer Outcome. *JAMA Oncology*, 4(3), 309–315. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.4420>
125. Kumar, U., Anthony, M. L., Sahai, R., Mittal, A., Durgapal, P., & Kishore, S. (2021). Immunoexpression of PD-L1 and PD-1 and Its Clinicopathological Correlation in Urothelial Carcinomas. *Journal of Laboratory Physicians*, s-0041-1736480. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1736480>
126. Kuol, N., Stojanovska, L., Nurgali, K., & Apostolopoulos, V. (2018). PD-1/PD-L1 in disease. *Immunotherapy*, 10(2), 149–160. <https://doi.org/10.2217/imt-2017-0120>
127. Kythreotou, A., Siddique, A., Mauri, F. A., Bower, M., & Pinato, D. J. (2018). PD-L1. *Journal of Clinical Pathology*, 71(3), 189–194. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204853>
128. Lech, G., Słotwiński, R., Słodkowski, M., & Krasnodębski, I. W. (2016). Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World Journal of Gastroenterology*, 22(5), 1745–1755. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i5.1745>

129. Lee, H. T., Lee, S. H., & Heo, Y.-S. (2019). Molecular Interactions of Antibody Drugs Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in Immuno-Oncology. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061190>
130. Lehmann, W. D. (2017). A timeline of stable isotopes and mass spectrometry in the life sciences. *Mass Spectrometry Reviews*, 36(1), 58–85. <https://doi.org/10.1002/mas.21497>
131. Li, H., Fu, G., Wei, W., Huang, Y., Wang, Z., Liang, T., Tian, S., Chen, H., & Zhang, W. (2020). Re-Evaluation of the Survival Paradox Between Stage IIB/IIC and Stage IIIA Colon Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.595107>
132. Li, W.-J., Wang, J., & Ke, X.-Y. (2018). [PD-1/PD-L1 Signaling Pathway and Its Anti-Tumor Effect in Lymphoma -Review]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 26(3), 922–927. <https://doi.org/10.7534/j.issn.1009-2137.2018.03.049>
133. Li, Y., He, M., Zhou, Y., Yang, C., Wei, S., Bian, X., Christopher, O., & Xie, L. (2019). The Prognostic and Clinicopathological Roles of PD-L1 Expression in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2019.00139>
134. Li, Y., Liang, L., Dai, W., Cai, G., Xu, Y., Li, X., Li, Q., & Cai, S. (2016). Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Molecular Cancer*, 15(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0539-x>
135. Lim, J. H., Huh, J. W., Lee, W. Y., Yun, S. H., Kim, H. C., Cho, Y. B., Park, Y. A., & Shin, J. K. (2022). Comparison of Long-Term Survival Outcomes of T4a and T4b Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2021.780684>
136. Lorenzon, L., Biondi, A., Carus, T., Dziki, A., Espin, E., Figueiredo, N., Ruiz, M. G., Mersich, T., Montroni, I., Tanis, P. J., Benz, S. R., Bianchi, P. P., Biebl, M., Broeders, I., Luca, R. D., Delrio, P., D'Hondt, M., Fürst, A., Grosek, J., ... D'Ugo, D. (2018). Achieving high quality standards in laparoscopic colon resection for cancer: A Delphi consensus-based position paper. *European Journal of Surgical Oncology*, 44(4), 469–483. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.01.091>
137. Lyford-Pike, S., Peng, S., Young, G. D., Taube, J. M., Westra, W. H., Akpeng, B., Bruno, T. C., Richmon, J. D., Wang, H., Bishop, J. A., Chen, L., Drake, C. G., Topalian, S. L., Pardoll, D. M., & Pai, S. I. (2013). Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 73(6), 1733–1741. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2384>
138. Majek, O., Gondos, A., Jansen, L., Emrich, K., Holleczeck, B., Katalinic, A., Nennecke, A., Eberle, A., & Brenner, H. (2013). Sex Differences in Colorectal Cancer Survival: Population-Based Analysis of 164,996 Colorectal Cancer Patients in Germany. *PLoS ONE*, 8(7), e68077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068077>
139. Makino, T., Tsujinaka, T., Mishima, H., Ikenaga, M., Sawamura, T., Nakamori, S., Fujitani, K., Hirao, M., Kashiwazaki, M., Masuda, N., Takeda, M., & Mano, M. (2006). Primary signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum: Report of eight cases and review of 154 Japanese cases. *Hepato-Gastroenterology*, 53(72), 845–849.

140. Marzouk, O., & Schofield, J. (2011). Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer. *Cancers*, 3(2), 2767–2810. <https://doi.org/10.3390/cancers3022767>
141. Matsuda, T., Yamashita, K., Hasegawa, H., Oshikiri, T., Hosono, M., Higashino, N., Yamamoto, M., Matsuda, Y., Kanaji, S., Nakamura, T., Suzuki, S., Sumi, Y., & Kakeji, Y. (2018). Recent updates in the surgical treatment of colorectal cancer. *Annals of Gastroenterological Surgery*, 2(2), 129–136. <https://doi.org/10.1002/ags3.12061>
142. Mattar, M. C., Lough, D., Pishvaian, M. J., & Charabaty, A. (2011). Current Management of Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer. *Gastrointestinal Cancer Research : GCR*, 4(2), 53–61.
143. Mauzo, S. H., Tetzlaff, M. T., Milton, D. R., Siroy, A. E., Nagarajan, P., Torres-Cabala, C. A., Ivan, D., Curry, J. L., Hudgens, C. W., Wargo, J. A., Sahin, A. A., Pettaway, C. A., Prieto, V. G., & Aung, P. P. (2019). Expression of PD-1 and PD-L1 in Extramammary Paget Disease: Implications for Immune-Targeted Therapy. *Cancers*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/cancers11060754>
144. McCarroll, D., & Loader, N. J. (2004). Stable isotopes in tree rings. *Quaternary Science Reviews*, 23(7), 771–801. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2003.06.017>
145. McKay, A., Donaleshen, J., Helewa, R. M., Park, J., Wirtzfeld, D., Hochman, D., Singh, H., & Turner, D. (2014). Does young age influence the prognosis of colorectal cancer: A population-based analysis. *World Journal of Surgical Oncology*, 12, 370. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-12-370>
146. Mehan, A., Anthony, M. L., Paul, P., Syed, A., Chowdhury, N., Rao, S., Hussain, N., & Ravi, B. (2021). Expression of Programmed Cell Death-1 (PD-1) and Its Ligand (PD-L1) in Breast Cancers and Its Association with Clinicopathological Parameters: A Study from North India. *Journal of Laboratory Physicians*, s-0041-1736522. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1736522>
147. Mei, Z., Liu, Y., Liu, C., Cui, A., Liang, Z., Wang, G., Peng, H., Cui, L., & Li, C. (2014). Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 110(6), 1595–1605. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.46>
148. Mekota, A.-M., Grupe, G., Ufer, S., & Cuntz, U. (2006). Serial analysis of stable nitrogen and carbon isotopes in hair: Monitoring starvation and recovery phases of patients suffering from anorexia nervosa. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(10), 1604–1610. <https://doi.org/10.1002/rcm.2477>
149. Meng, X., Liu, X., Guo, X., Jiang, S., Chen, T., Hu, Z., Liu, H., Bai, Y., Xue, M., Hu, R., Sun, S.-C., Liu, X., Zhou, P., Huang, X., Wei, L., Yang, W., & Xu, C. (2018). FBXO38 mediates PD-1 ubiquitination and regulates anti-tumour immunity of T cells. *Nature*, 564(7734), 130–135. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0756-0>
150. Michener, R., & Lajtha, K. (2008). *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. John Wiley & Sons.
151. Mik, M., Berut, M., Dziki, L., Trzcinski, R., & Dziki, A. (2017). Right- and left-sided colon cancer – clinical and pathological differences of the disease entity in one organ. *Archives of Medical Science : AMS*, 13(1), 157–162. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58596>
152. M'Koma, A. E., Moses, H. L., & Adunyah, S. E. (2011). Inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer: Proctocolectomy and mucosectomy do not necessarily eliminate pouch-related cancer incidences. *International Journal*

- of Colorectal Disease, 26(5), 533–552. <https://doi.org/10.1007/s00384-011-1137-4>
153. Mohamed, A. S. E. D., El-Rebey, H. S., AboElnasr, L. S. A., & Abdou, A. G. (2021, listopad 25). The role and relationship between programmed death ligand 1 and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 immunohistochemical expression in colorectal carcinoma patients; an impact on outcome. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2021.1323>
154. Moore, J., & Semmens, B. (2008). Incorporating Uncertainty and Prior Information Into Stable Isotope Mixing Models. *Ecology letters*, 11, 470–480. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01163.x>
155. Morales-Betanzos, C. A., Lee, H., Gonzalez Ericsson, P. I., Balko, J. M., Johnson, D. B., Zimmerman, L. J., & Liebler, D. C. (2017). Quantitative Mass Spectrometry Analysis of PD-L1 Protein Expression, N-glycosylation and Expression Stoichiometry with PD-1 and PD-L2 in Human Melanoma. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 16(10), 1705–1717. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000037>
156. Naidoo, J., Page, D. B., Li, B. T., Connell, L. C., Schindler, K., Lacouture, M. E., Postow, M. A., & Wolchok, J. D. (2015). Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(12), 2375–2391. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv383>
157. Nguyen, H. T., & Duong, H.-Q. (2018). The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy (Review). *Oncology Letters*, 16(1), 9–18. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8679>
158. Noh, B.-J., Kwak, J. Y., & Eom, D.-W. (2020). Immune classification for the PD-L1 expression and tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal adenocarcinoma. *BMC Cancer*, 20(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-6553-9>
159. Nojadedh, J. N., Behrouz Sharif, S., & Sakhinia, E. (2018). Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI Journal*, 17, 159–168. <https://doi.org/10.17179/excli2017-948>
160. Norton, S. E., Ward-Hartstonge, K. A., Taylor, E. S., & Kemp, R. A. (2015). Immune cell interplay in colorectal cancer prognosis. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 7(10), 221–232. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v7.i10.221>
161. Ntomi, V., Foukas, P., Papaconstantinou, D., Antonopoulou, I., Pikoulis, A., Panagiotides, I., Pikoulis, E., & Syrigos, K. (2021). The clinical significance of PD-L1 in colorectal cancer (Review). *Oncology Reports*, 45(6), 1–9. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8043>
162. Okazaki, T., & Honjo, T. (2007). PD-1 and PD-1 ligands: From discovery to clinical application. *International Immunology*, 19(7), 813–824. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm057>
163. Okita, R., Maeda, A., Shimizu, K., Nojima, Y., Saisho, S., & Nakata, M. (2017). PD-L1 overexpression is partially regulated by EGFR/HER2 signaling and associated with poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(7), 865–876. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-1986-y>
164. Ooki, A., Shinozaki, E., & Yamaguchi, K. (2021). Immunotherapy in Colorectal Cancer: Current and Future Strategies. *Journal of the Anus, Rectum and Colon*, 5(1), 11–24. <https://doi.org/10.23922/jarc.2020-064>

165. Oppel, S., Federer, R. N., O'Brien, D. M., Powell, A. N., & Hollmén, T. E. (2010). Effects of Lipid Extraction on Stable Isotope Ratios in Avian Egg Yolk: Is Arithmetic Correction a Reliable Alternative? *The Auk*, 127(1), 72–78. <https://doi.org/10.1525/auk.2009.09153>
166. Overman, M. J., Ernstoff, M. S., & Morse, M. A. (2018). Where We Stand With Immunotherapy in Colorectal Cancer: Deficient Mismatch Repair, Proficient Mismatch Repair, and Toxicity Management. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 38, 239–247. [https://doi.org/10.1200/EDBK\\_200821](https://doi.org/10.1200/EDBK_200821)
167. Öztürk, E., Kuzu, M. A., Öztuna, D., Işık, Ö., Canda, A. E., Balık, E., Erkasap, S., Yoldaş, T., Akyol, C., Demirbaş, S., Özoğul, B., Topçu, Ö., Gedik, E., Baca, B., Ergüner, İ., Asoğlu, O., Erkek, B., Yılmazlar, T., Reis, E., ... Konan, A. (2019). Fall of another myth for colon cancer: Duration of symptoms does not differ between right- or left-sided colon cancers. *The Turkish Journal of Gastroenterology: The Official Journal of Turkish Society of Gastroenterology*, 30(8), 686–694. <https://doi.org/10.5152/tjg.2019.17770>
168. Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.-C., Tartour, E., Sautès-Fridman, C., & Fridman, W.-H. (2010). Immune infiltration in human tumors: A prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29(8), 1093–1102. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.416>
169. Pandey, M., Swain, J., Iyer, H. M., & Shukla, M. (2019). Primary lymphoma of the colon: Report of two cases and review of literature. *World Journal of Surgical Oncology*, 17. <https://doi.org/10.1186/s12957-018-1548-6>
170. Park, S. J., Lee, K. Y., & Lee, S.-H. (2020). Laparoscopic Surgery for Colorectal Cancer in Korea: Nationwide Data from 2013 to 2018. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*, 52(3), 938–944. <https://doi.org/10.4143/crt.2020.043>
171. Partyka, R., Sandelewski, A., Łobejko, I., Kocot, J., Jałowiecki, P., & Kokocińska, D. (2010). [Usefulness of evaluation of soluble fragment cytokeratin 18, carcinoembryonic antigen and gastrointestinal carcinoma-associated antigen in diagnostic of patients with colorectal cancer]. *Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 29(170), 128–130.
172. Patel, S. P., & Kurzrock, R. (2015). PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(4), 847–856. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0983>
173. Peterson, B. J., & Fry, B. (1987). Stable Isotopes in Ecosystem Studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 293–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.001453>
174. Petzke, K. J., Fuller, B. T., & Metges, C. C. (2010). Advances in natural stable isotope ratio analysis of human hair to determine nutritional and metabolic status. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 13(5). [https://journals.lww.com/clinicalnutrition/Fulltext/2010/09000/Advances\\_in\\_natural\\_stable\\_isotope\\_ratio\\_analysis.5.aspx](https://journals.lww.com/clinicalnutrition/Fulltext/2010/09000/Advances_in_natural_stable_isotope_ratio_analysis.5.aspx)
175. Ploug, M., Kroijer, R., Qvist, N., Lindahl, C. H., & Knudsen, T. (2021). Iron deficiency in colorectal cancer patients: A cohort study on prevalence and associations. *Colorectal Disease: The Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 23(4), 853–859. <https://doi.org/10.1111/codi.15467>

176. Qu, C.-Y., Zheng, Y., Zhou, M., Zhang, Y., Shen, F., Cao, J., & Xu, L.-M. (2015). Value of bevacizumab in treatment of colorectal cancer: A meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(16), 5072–5080. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i16.5072>
177. Raja, J., Hegde, R., Srodon, M., Katoch, A., Kurtzman, S., & Zhang, Z. (2017). A Case of Primary Melanoma of the Transverse Colon. *Cureus*, 9(10). <https://doi.org/10.7759/cureus.1803>
178. Rao, X., Wang, J., Song, H. M., Deng, B., & Li, J. G. (2020). KRT15 overexpression predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Neoplasia*, 67(2), 410–414. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2019\\_190531N475](https://doi.org/10.4149/neo_2019_190531N475)
179. Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny*, 14(2), 89–103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
180. Rehemtulla, A. (2010). Dinosaurs and Ancient Civilizations: Reflections on the Treatment of Cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 12(12), 957–968.
181. Rentsch, M., Schiergens, T., Khandoga, A., & Werner, J. (2016). Surgery for Colorectal Cancer—Trends, Developments, and Future Perspectives. *Visceral Medicine*, 32(3), 184–191. <https://doi.org/10.1159/000446490>
182. Resnick, K. E., Hampel, H., Fishel, R., & Cohn, D. E. (2009). Current and emerging trends in Lynch syndrome identification in women with endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 114(1), 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.03.003>
183. Reyzer, M. L., Hsieh, Y., Ng, K., Korfmacher, W. A., & Caprioli, R. M. (2003). Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 38(10), 1081–1092. <https://doi.org/10.1002/jms.525>
184. Richards, C. H., Roxburgh, C. S. D., Powell, A. G., Foulis, A. K., Horgan, P. G., & McMillan, D. C. (2014). The clinical utility of the local inflammatory response in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 50(2), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.09.008>
185. Richards, M. P., & Hedges, R. E. M. (1999). Stable Isotope Evidence for Similarities in the Types of Marine Foods Used by Late Mesolithic Humans at Sites Along the Atlantic Coast of Europe. *Journal of Archaeological Science*, 26(6), 717–722. <https://doi.org/10.1006/jasc.1998.0387>
186. Riley, J. L. (2009). PD-1 signaling in primary T cells. *Immunological Reviews*, 229(1), 114–125. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00767.x>
187. Roelofse, F., & Horstmann, U. E. (2008). A case study on the application of isotope ratio mass spectrometry (IRMS) in determining the provenance of a rock used in an alleged nickel switching incident. *Forensic Science International*, 174(1), 64–67. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.03.001>
188. Rogler, G. (2014). Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Letters*, 345(2), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.032>
189. Römpf, A., Guenther, S., Schober, Y., Schulz, O., Takats, Z., Kummer, W., & Spengler, B. (2010). Histology by Mass Spectrometry: Label-Free Tissue Characterization Obtained from High-Accuracy Bioanalytical Imaging. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(22), 3834–3838. <https://doi.org/10.1002/anie.200905559>

190. Rosen, L. S., Jacobs, I. A., & Burkes, R. L. (2017). Bevacizumab in Colorectal Cancer: Current Role in Treatment and the Potential of Biosimilars. *Targeted Oncology*, 12(5), 599–610. <https://doi.org/10.1007/s11523-017-0518-1>
191. Roth, J., & Hobson, K. (2000). Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissue of captive red fox: Implications for dietary reconstruction. *Canadian Journal of Zoology-revue Canadienne De Zoologie - CAN J ZOOL*, 78, 848–852. <https://doi.org/10.1139/cjz-78-5-848>
192. Rozanski, K., Johnsen, S. J., Schotterer, U., & Thompson, L. G. (1997). Reconstruction of past climates from stable isotope records of palaeo-precipitation preserved in continental archives. *Hydrological Sciences Journal*, 42(5), 725–745. <https://doi.org/10.1080/02626669709492069>
193. Rumba, R., Cipkina, S., Cukure, F., & Vanags, A. (2018). Systemic and local inflammation in colorectal cancer. *Acta Medica Lituanica*, 25(4), 185–196. <https://doi.org/10.6001/actamedica.v25i4.3929>
194. Saglam, O., & Conejo-Garcia, J. (2018). PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in advanced cervical cancer. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*, 5(2). <https://doi.org/10.15761/ICST.1000272>
195. Sajid, K. M., Parveen, R., Durr-e-Sabih, null, Chaouachi, K., Naeem, A., Mahmood, R., & Shamim, R. (2007). Carcinoembryonic antigen (CEA) levels in hookah smokers, cigarette smokers and non-smokers. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 57(12), 595–599.
196. Salmaninejad, A., Khoramshahi, V., Azani, A., Soltaninejad, E., Aslani, S., Zamani, M. R., Zal, M., Nesaei, A., & Hosseini, S. M. (2018). PD-1 and cancer: Molecular mechanisms and polymorphisms. *Immunogenetics*, 70(2), 73–86. <https://doi.org/10.1007/s00251-017-1015-5>
197. Santini, F. C., & Hellmann, M. D. (2018). PD-1/PD-L1 Axis in Lung Cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 24(1), 15–19. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000300>
198. Schnellhardt, S., Erber, R., Büttner-Herold, M., Rosahl, M.-C., Ott, O. J., Strnad, V., Beckmann, M. W., King, L., Hartmann, A., Fietkau, R., & Distel, L. (2020). Tumour-Infiltrating Inflammatory Cells in Early Breast Cancer: An Underrated Prognostic and Predictive Factor? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), E8238. <https://doi.org/10.3390/ijms21218238>
199. Schoeninger, M. J., & DeNiro, M. J. (1984). Nitrogen and carbon isotopic composition of bone collagen from marine and terrestrial animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48(4), 625–639. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(84\)90091-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(84)90091-7)
200. Schütz, F., Stefanovic, S., Mayer, L., von Au, A., Domschke, C., & Sohn, C. (2017). PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer. *Oncology Research and Treatment*, 40(5), 294–297. <https://doi.org/10.1159/000464353>
201. Scrimgeour, C. M., Gordon, S. C., Handley, L. L., & Woodford, J. A. T. (1995). Trophic Levels and Anomalous  $\delta^{15}\text{N}$  of Insects on Raspberry (*Rubus Idaeus* L.). *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 31(1), 107–115. <https://doi.org/10.1080/10256019508036256>
202. Sehgal, R., Sheahan, K., O'Connell, P. R., Hanly, A. M., Martin, S. T., & Winter, D. C. (2014). Lynch syndrome: An updated review. *Genes*, 5(3), 497–507. <https://doi.org/10.3390/genes5030497>
203. Shan, T., Chen, S., Wu, T., Yang, Y., Li, S., & Chen, X. (2019). PD-L1 expression in colon cancer and its relationship with clinical prognosis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12(5), 1764–1769.

204. Shia, J., Klimstra, D. S., Bagci, P., Basturk, O., & Adsay, N. V. (2012). TNM staging of colorectal carcinoma: Issues and caveats. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 29(3), 142–153. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2012.02.001>
205. Shinohara, T., Taniwaki, M., Ishida, Y., Kawaichi, M., & Honjo, T. (1994). Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics*, 23(3), 704–706. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1562>
206. Slawienski, M. J., Mauldin, G. E., Mauldin, G. N., & Patnaik, A. K. (1997). Malignant colonic neoplasia in cats: 46 cases (1990-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 211(7), 878–881.
207. Smith, C. C., Morgan, M. E., & Pilbeam, D. (2010). Isotopic ecology and dietary profiles of Liberian chimpanzees. *Journal of Human Evolution*, 58(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2009.08.001>
208. Song, I. H., Hong, S.-M., Yu, E., Yoon, Y. S., Park, I. J., Lim, S.-B., Kim, J. C., Yu, C. S., & Kim, J. (2019). Signet ring cell component predicts aggressive behaviour in colorectal mucinous adenocarcinoma. *Pathology*, 51(4), 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.03.001>
209. Song, M.-K., Park, B.-B., & Uhm, J. (2019). Understanding Immune Evasion and Therapeutic Targeting Associated with PD-1/PD-L1 Pathway in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061326>
210. Spangenberg, J. E., Vogiatzaki, M., & Zufferey, V. (2017). Gas chromatography and isotope ratio mass spectrometry of Pinot Noir wine volatile compounds ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and solid residues ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) for the reassessment of vineyard water-status. *Journal of Chromatography. A*, 1517, 142–155. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.08.038>
211. Sparkman, O. D. (2000). Mass Spectrometry: Overview and History. W R. A. Meyers (Red.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (s. a6001). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a6001>
212. Sparkman, O. D. (2006). Mass Spectrometry: Overview and History. W Encyclopedia of Analytical Chemistry. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a6001>
213. Srivastava, P., Husain, N., Shukla, S., Chauhan, S., Pandey, A., & Masood, S. (2021). PD-L1 Expression in colorectal carcinoma and its correlation with clinicopathological parameters, microsatellite instability and BRAF mutation. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, 64(3), 490–496. [https://doi.org/10.4103/IJPM.IJPM\\_521\\_20](https://doi.org/10.4103/IJPM.IJPM_521_20)
214. Stewart, C. J. R., Hillery, S., Platell, C., & Puppa, G. (2011). Assessment of Serosal Invasion and Criteria for the Classification of Pathological (p) T4 Staging in Colorectal Carcinoma: Confusions, Controversies and Criticisms. *Cancers*, 3(1), 164–181. <https://doi.org/10.3390/cancers3010164>
215. Stikma, J., Grootendorst, D. C., & van der Linden, P. W. G. (2014). CA 19-9 as a marker in addition to CEA to monitor colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 13(4), 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2014.09.004>
216. Sun, Y., Li, L., Wu, Y., & Yang, K. (2020). PD-1/PD-L1 in cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 505, 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.02.019>
217. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A*

- Cancer Journal for Clinicians, 71(3), 209–249.  
<https://doi.org/10.3322/caac.21660>
218. Sunshine, J., & Taube, J. M. (2015). PD-1/PD-L1 inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*, 23, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.011>
219. Tamura, H., Ishibashi, M., Sunakawa-Kii, M., & Inokuchi, K. (2020). PD-L1-PD-1 Pathway in the Pathophysiology of Multiple Myeloma. *Cancers*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/cancers12040924>
220. Tan, Z., Xue, H., Sun, Y., Zhang, C., Song, Y., & Qi, Y. (2021). The Role of Tumor Inflammatory Microenvironment in Lung Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2021.688625>
221. Taran, K. (2015). Izotopowa spektrometria mas (IRMS) jako nowe narzędzie w badaniach patomechanizmów choroby nowotworowej z uwzględnieniem mapy izotopowej organizmów dzieci w regionie łódzkim: Rozprawa habilitacyjna. Uniwersytet Medyczny. ISBN 978-83-939877-3-3
222. Taran, K., Frączek, T., Kamiński, R., Sitkiewicz, A., Kobos, J., & Paneth, P. (2015). The first protocol of stable isotope ratio assessment in tumor tissues based on original research. *Polish Journal of Pathology: Official Journal of the Polish Society of Pathologists*, 66(3), 288–295. <https://doi.org/10.5114/pjp.2015.54963>
223. Taran, K., Frączek, T., Sikora-Szubert, A., Sitkiewicz, A., Młynarski, W., Kobos, J., & Paneth, P. (2016). The first investigation of Wilms' tumour atomic structure-nitrogen and carbon isotopic composition as a novel biomarker for the most individual approach in cancer disease. *Oncotarget*, 7(47), 76726–76734. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12521>
224. Taran, K., Frączek, T., Sitkiewicz, A., Paneth, P., & Kobos, J. (2015). Rhabdomyosarcoma in children in the light of isotope ratio mass spectrometry. *Polish Journal of Pathology: Official Journal of the Polish Society of Pathologists*, 66(4), 383–388. <https://doi.org/10.5114/pjp.2015.57251>
225. Taran, K., Frączek, T., Sitkiewicz, A., Sikora-Szubert, A., Kobos, J., & Paneth, P. (2016). Hepatoblastoma Biology Using Isotope Ratio Mass Spectrometry: Utility of a Unique Technique for the Analysis of Oncological Specimens. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 70(0), 797–802. <https://doi.org/10.5604/17322693.1209211>
226. Tea, I., Martineau, E., Antheaume, I., Lalande, J., Mauve, C., Gilard, F., Barillé-Nion, S., Blackburn, A. C., & Tcherkez, G. (2016a). 13 C and 15 N natural isotope abundance reflects breast cancer cell metabolism. *Scientific Reports*, 6(1), 34251. <https://doi.org/10.1038/srep34251>
227. Thibodeau, S. N., Bren, G., & Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5109), 816–819. <https://doi.org/10.1126/science.8484122>
228. Tieszen, L. L., Boutton, T. W., Tesdahl, K. G., & Slade, N. A. (1983). Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet. *Oecologia*, 57(1), 32–37. <https://doi.org/10.1007/BF00379558>
229. Tomlinson, I. (2015). An update on the molecular pathology of the intestinal polyposis syndromes. *Diagnostic Histopathology*, 21(4), 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2015.04.006>
230. Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., Leming, P. D., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Horn, L., Drake, C. G., Pardoll, D. M., Chen, L., Sharfman, W. H., Anders, R. A., ... Sznol, M. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New*

- England *Journal of Medicine*, 366(26), 2443–2454.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>
231. Turner, N., Wong, H.-L., Templeton, A., Tripathy, S., Whiti Rogers, T., Croxford, M., Jones, I., Sinnathamby, M., Desai, J., Tie, J., Bae, S., Christie, M., Gibbs, P., & Tran, B. (2016). Analysis of local chronic inflammatory cell infiltrate combined with systemic inflammation improves prognostication in stage II colon cancer independent of standard clinicopathologic criteria. *International Journal of Cancer*, 138(3), 671–678. <https://doi.org/10.1002/ijc.29805>
232. Ullman, T. A., & Itzkowitz, S. H. (2011). Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*, 140(6), 1807–1816. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.057>
233. Uno, H., Alsum, P., Zimbric, M. L., Houser, W. D., Thomson, J. A., & Kemnitz, J. W. (1998). Colon cancer in aged captive rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology*, 44(1), 19–27. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2345\(1998\)44:1<19::AID-AJP2>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2345(1998)44:1<19::AID-AJP2>3.0.CO;2-#)
234. Väyrynen, J. P., Tuomisto, A., Klintrup, K., Mäkelä, J., Karttunen, T. J., & Mäkinen, M. J. (2013). Detailed analysis of inflammatory cell infiltration in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 109(7), 1839–1847. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.508>
235. Vega, P., Valentín, F., & Cubiella, J. (2015). Colorectal cancer diagnosis: Pitfalls and opportunities. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 7(12), 422–433. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v7.i12.422>
236. Vukobrat-Bijedic, Z., Husic-Selimovic, A., Sofic, A., Bijedic, N., Bjelogric, I., Gogov, B., & Mehmedovic, A. (2013). Cancer Antigens (CEA and CA 19-9) as Markers of Advanced Stage of Colorectal Carcinoma. *Medical Archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)*, 67(6), 397–401. <https://doi.org/10.5455/medarh.2013.67.397-401>
237. Wang, J., Wang, S., Song, X., Zeng, W., Wang, S., Chen, F., & Ding, H. (2016). The prognostic value of systemic and local inflammation in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 9, 7177–7185. <https://doi.org/10.2147/OTT.S113307>
238. Wang, X., Teng, F., Kong, L., & Yu, J. (2016). PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *OncoTargets and Therapy*, 9, 5023–5039. <https://doi.org/10.2147/OTT.S105862>
239. Warsinggih, Liliyanto, Prihantono, Ariani, G. D. W., & Faruk, M. (2020). Colorectal neuroendocrine tumors: A case series. *International Journal of Surgery Case Reports*, 72, 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2020.06.030>
240. Washington, M. K. (2008). Colorectal carcinoma: Selected issues in pathologic examination and staging and determination of prognostic factors. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 132(10), 1600–1607. <https://doi.org/10.5858/2008-132-1600-CCSIP>
241. Wei, R., Guo, L., Wang, Q., Miao, J., Kwok, H. F., & Lin, Y. (2019). Targeting PD-L1 Protein: Translation, Modification and Transport. *Current Protein & Peptide Science*, 20(1), 82–91. <https://doi.org/10.2174/1389203719666180928105632>
242. Weng, Y. M., Peng, M., Hu, M. X., Yao, Y., & Song, Q. B. (2018). Clinical and molecular characteristics associated with the efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors for solid tumors: A meta-analysis. *OncoTargets and Therapy*, 11, 7529–7542. <https://doi.org/10.2147/OTT.S167865>
243. White, C. D., & Armelagos, G. J. (1997). Osteopenia and stable isotope ratios in bone collagen of Nubian female mummies. *American Journal of Physical*

- Anthropology, 103(2), 185–199. [https://doi.org/10.1002/1096-8644\(199706\)103:2<185::AID-AJPA11>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1096-8644(199706)103:2<185::AID-AJPA11>3.0.CO;2-#)
244. WHO Classification of Tumours Editorial Board, W. C. T. E. (2019). WHO Classification of Tumours. Digestive System Tumours: WHO Classification of Tumours, Volume 1. World Health Organization. [https://books.google.pl/books?id=l5l\\_xgEACAAJ](https://books.google.pl/books?id=l5l_xgEACAAJ)
245. Wu, C., Yamada, K., Sumikawa, O., Matsunaga, A., Gilbert, A., & Yoshida, N. (2012). Development of a methodology using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry for the determination of the carbon isotope ratio of caffeine extracted from tea leaves (*Camellia sinensis*). *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 26(8), 978–982. <https://doi.org/10.1002/rcm.6177>
246. Wu, M., & Krishnamurthy, K. (2022). Peutz-Jeghers Syndrome. *W StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535357/>
247. Wu, X., Gu, Z., Chen, Y., Chen, B., Chen, W., Weng, L., & Liu, X. (2019). Application of PD-1 Blockade in Cancer Immunotherapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 661–674. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.03.006>
248. Wyss, J., Dislich, B., Koelzer, V. H., Galván, J. A., Dawson, H., Hädrich, M., Inderbitzin, D., Lugli, A., Zlobec, I., & Berger, M. D. (2019). Stromal PD-1/PD-L1 Expression Predicts Outcome in Colon Cancer Patients. *Clinical Colorectal Cancer*, 18(1), e20–e38. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.09.007>
249. Xi, Y., & Xu, P. (2021). Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational Oncology*, 14(10), 101174. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101174>
250. Xu, B., Jungbluth, A. A., Frosina, D., Alzumaili, B., Aleynick, N., Slodkowska, E., Higgins, K., Ho, A., Morris, L., Ghossein, R., & Katabi, N. (2019). The immune microenvironment and expression of PD-L1, PD-1, PRAME and MHC I in salivary duct carcinoma. *Histopathology*, 75(5), 672–682. <https://doi.org/10.1111/his.13944>
251. Yaghoubi, N., Soltani, A., Ghazvini, K., Hassanian, S. M., & Hashemy, S. I. (2019). PD-1/ PD-L1 blockade as a novel treatment for colorectal cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 110, 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.105>
252. Yang, C., Wang, J., Liu, J., Huang, S., & Xiong, B. (2020). Elevated carcinoembryonic antigen in patients with COVID-19 pneumonia. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03350-3>
253. Yang, J. (2018). Primary leiomyosarcoma in the colon. *Medicine*, 97(7). <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000923>
254. Yang, J., Du, X. lin, Li, S. ting, Wang, B. yuan, Wu, Y. ying, Chen, Z. ling, Lv, M., Shen, Y. wei, Wang, X., Dong, D. feng, Li, D., Wang, F., Li, E. xiao, Yi, M., & Yang, J. (2016). Characteristics of Differently Located Colorectal Cancers Support Proximal and Distal Classification: A Population-Based Study of 57,847 Patients. *PLoS ONE*, 11(12), e0167540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167540>
255. Yang, J., & Hu, L. (2019). Immunomodulators targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction: From antibodies to small molecules. *Medicinal Research Reviews*, 39(1), 265–301. <https://doi.org/10.1002/med.21530>

256. Yang, L., Xue, R., & Pan, C. (2019). Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *OncoTargets and Therapy*, 12, 3671–3682. <https://doi.org/10.2147/OTT.S190168>
257. Yanqing, H., Cheng, D., & Ling, X. (2018). Serum CA72-4 as a Biomarker in the Diagnosis of Colorectal Cancer: A Meta-analysis. *Open Medicine*, 13, 164–171. <https://doi.org/10.1515/med-2018-0026>
258. Yao, H., Wang, H., Li, C., Fang, J.-Y., & Xu, J. (2018). Cancer Cell-Intrinsic PD-1 and Implications in Combinatorial Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 9, 1774. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01774>
259. Yashiro, M. (2014). Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(44), 16389–16397. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i44.16389>
260. Yoshida, S., Nagatsuka, H., Nakano, K., Kogashiwa, Y., Ebihara, Y., Yano, M., & Yasuda, M. (2018). Significance of PD-L1 Expression in Tongue Cancer Development. *International Journal of Medical Sciences*, 15(14), 1723–1730. <https://doi.org/10.7150/ijms.27860>
261. Yu, H., Boyle, T. A., Zhou, C., Rimm, D. L., & Hirsch, F. R. (2016). PD-L1 Expression in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 11(7), 964–975. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.04.014>
262. Zak, K. M., Grudnik, P., Magiera, K., Dömling, A., Dubin, G., & Holak, T. A. (2017). Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2. *Structure (London, England: 1993)*, 25(8), 1163–1174. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.06.011>
263. Zha, H., Jiang, Y., Wang, X., Shang, J., Wang, N., Yu, L., Zhao, W., Li, Z., An, J., Zhang, X., Chen, H., Zhu, B., & Li, Z. (2021). Non-canonical PD-1 signaling in cancer and its potential implications in clinic. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(2), e001230. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001230>
264. Zhang, G. X., Qian, Z. Y., Yang, L. J., Wang, F., & Shen, H. (2017). [Expression characteristics of PTEN and NDRG1 in colorectal carcinoma and their prognostic value]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi = Chinese Journal of Pathology*, 46(4), 240–244. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2017.04.005>
265. Zhao, H., Wu, L., Yan, G., Chen, Y., Zhou, M., Wu, Y., & Li, Y. (2021). Inflammation and tumor progression: Signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1–46. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5>
266. Zheng, C., Jiang, F., Lin, H., & Li, S. (2019). Clinical characteristics and prognosis of different primary tumor location in colorectal cancer: A population-based cohort study. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 21(11), 1524–1531. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02083-1>
267. Zhou, R., Zhang, J., Zeng, D., Sun, H., Rong, X., Shi, M., Bin, J., Liao, Y., & Liao, W. (2019). Immune cell infiltration as a biomarker for the diagnosis and prognosis of stage I-III colon cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 68(3), 433–442. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2289-7>
268. Zlobec, I., & Lugli, A. (2008). Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Postgraduate Medical Journal*, 84(994), 403–411. <https://doi.org/10.1136/jcp.2007.054858>

269. <sup>1</sup><https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/microsatellite-instability>, 16.01.2021
270. <sup>2</sup><http://www.ftj.agh.edu.pl/~Rozanski/IRMSI.pdf>, 28.11.2020
271. <sup>3</sup><https://www.britannica.com/science/nitrogen>, 23.11.2020
272. <sup>4</sup><https://www.britannica.com/science/carbon-chemical-element>, 23.11.2020
273. <sup>5</sup><https://www.encyclopedia.com/science/dictionaries-thesauruses-pictures-and-press-releases/isotope-fractionation>, 14.12.2020
274. <sup>6</sup><https://www.pgi.gov.pl/psh/psh-2/baza-wiedzy-hydrogeologicznej/9066-hydrologia-i-hydrogeologia-izotopowa.html>, 14.12.2020

## 8. ANEKS

### 8.1. ALFABETYCZNY WYKAZ UŻYTYCH TERMINÓW, SKRÓTÓW I AKRONIMÓW WYKORZYSTANYCH W TEKŚCIE

Skrót	Nazwa w języku polskim	Nazwa w języku angielskim
AJCC	Amerykański Wspólny Komitet ds. Raka	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	Gruźlakowata polipowatość okrężnicy	<i>Adenomatous poliposis coli</i>
BMPR1A	Receptor białka morfogenetycznego kości typu 1	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A</i>
BRAF	-	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
CA19-9	Antygen węglowodanowy 19-9	<i>Carbohydrate antygen 19-9</i>
CA72-4	Antygen węglowodanowy 72-4	<i>Carbohydrate antygen 72-4</i>
CA125	Antygen węglowodanowy 125	<i>Carbohydrate antygen 125</i>
CD	Choroba Leśniowskiego-Crohna	<i>Crohn disease</i>
CD28	Antygen różnicowania komórkowego 28	<i>Cluster of differentiation 28</i>
CD274	Antygen różnicowania komórkowego 274	<i>Cluster of differentiation 274</i>
CEA	Antygen rakowo-płodowy	<i>Carcinoembryonic antygen</i>
CF-IRMS	Spektrometr masowy stosunku izotopowego z przepływem ciągłym	<i>Continuous flow isotope ratio mass spectrometer</i>
CI	Jonizacja chemiczna	<i>Chemical ionization</i>
CIS	Niestabilność chromosomalna	<i>Chromosomal instability</i>
CRC	Rak jelita grubego	<i>Colorectal carcinoma</i>
CTLA-4	Antygen - 4 cytotoksycznych limfocytów T	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DAB	Dwuaminobenzzydina	<i>Diaminobenzidine</i>

<b>DCC</b>	Usunięty w raku jelita grubego	<i>Deleted in colorectal carcinoma</i>
<b>DFS</b>	Przeżycie wolne od choroby	<i>Disease free survival</i>
<b>DLBCL</b>	Chłoniak rozlany z dużych limfocytów B	<i>Diffuse large B cell lymphoma</i>
<b>DNA</b>	Kwas deoksyrybonukleinowy	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>EGFR</b>	Receptor nabłonkowego czynnika wzrostu	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
<b>EI</b>	Jonizacja elektronami	<i>Electron ionization</i>
<b>ESI</b>	Jonizacja przez elektrorozpylanie	<i>Electrospray Ionization</i>
<b>FAP</b>	Rodzinna polipowatość gruczolakowata	<i>Familial adenomatous polyposis</i>
<b>HPV</b>	Wirus brodawczaka ludzkiego	<i>Human Papillomavirus</i>
<b>IBD</b>	Nieswoiste zapalenie jelit	<i>Inflammatory bowel disease</i>
<b>ICR</b>	Cyklotronowy rezonans jonów	<i>Ion cyclotron resonance</i>
<b>IgG1</b>	Immunoglobulina G1	<i>Immunoglobulin G1</i>
<b>IL-2</b>	Interleukina-2	<i>Interleukin-2</i>
<b>IL-10</b>	Interleukina-10	<i>Interleukin-10</i>
<b>INF-γ</b>	Interferon gamma	<i>Interferon gamma</i>
<b>IRMS</b>	Izotopowa spektrometria mas	<i>Isotope - ratio mass spectrometry</i>
<b>JPS</b>	Polipowatość młodzieńcza	<i>Juvenile polyposis syndrome</i>
<b>KER15</b>	Keratyna 15	<i>Keratin 15</i>
<b>KRAS</b>	-	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<b>m/z</b>	Stosunek masy do ładunku	<i>Mass-to-charge ratio</i>
<b>MAP</b>	Polipowatość związana z genem MUTYH	<i>MUTYH-associated polyposis</i>
<b>MALDI</b>	Laserowa jonizacja próbki wspomaganą matrycą	<i>Matrix- assisted laser desorption/ionization</i>
<b>MHC II</b>	Główny układ zgodności tkankowej II	<i>Major histocompatibility complex II</i>
<b>MLH 1</b>	Homolog MutL 1	<i>MutL homolog 1</i>
<b>MMR</b>	Naprawa niesparowanych zasad	<i>Miss match repair</i>
<b>MS</b>	Spektrometria mas	<i>Mass spectrometry</i>
<b>MSH 2</b>	Homolog MutS 2	<i>MutS Homolog 2</i>
<b>MSH 6</b>	Homolog MutS 6	<i>MutS Homolog 6</i>

<b>MSI</b>	Niestabilność mikrosatelitarna	<i>Microsatellite instability</i>
<b>MUTYH</b>	Homolog MutY Escherichia coli	<i>Escherichia coli MutY homolog</i>
<b>NC</b>	Rak neuroendokryny	<i>Neuroendocrine carcinoma</i>
<b>NET</b>	Guz neuroendokryny	<i>Neuroendocrine tumor</i>
<b>NOS</b>	Gdzie indziej niewymienione	<i>Not otherwise specified</i>
<b>NRAS</b>	-	<i>Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog</i>
<b>OS</b>	Całkowite przeżycie	<i>Overall survival</i>
<b>PD-1</b>	Białko programowanej śmierci - 1	<i>Programmed death – 1</i>
<b>PD-L1</b>	Ligand programowanej śmierci - 1	<i>Programmed death ligand-1</i>
<b>PD-L2</b>	Ligand programowanej śmierci - 2	<i>Programmed death ligand-2</i>
<b>PDB</b>	-	<i>Pee Dee Belemnite</i>
<b>PDCD1</b>	Białko programowanej śmierci komórkowej - 1	<i>Programmed cell death protein - 1</i>
<b>PMS2</b>	Homolog PMS1 2	<i>PMS1 homolog 2</i>
<b>PTEN</b>	Homolog fosfatazy i tensyny	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
<b>pTNM</b>	-	<i>Pathological Tumor-Node-Metastasis</i>
<b>RMS</b>	Mięsak prążkowanokomórkowy	<i>Rhabdomyosarcoma</i>
<b>SARS-CoV-2</b>	Drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
<b>SD</b>	Odchylenie standardowe	<i>Standard deviation</i>
<b>SMAD 2</b>	Matki przeciwko homologowi dekapentapletycznemu 2	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 2</i>
<b>SMAD 4</b>	Matki przeciwko homologowi dekapentapletycznemu 4	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
<b>SSL</b>	Siedzące zmiany ząbkowane	<i>Sessile serrated lesion</i>

<b>STK 11</b>	Kinaza treoninowo-serynowa 11	<i>Serine/threonine kinase 11</i>
<b>TCR</b>	Receptor limfocyty T	<i>T-cell receptor</i>
<b>TNM</b>	-	<i>Tumor-Node-Metastasis</i>
<b>TP 53</b>	Białko guza 53	<i>Tumor protein 53</i>
<b>TSA</b>	Tradycyjny gruczolak ząbkowany	<i>Traditional serrated adenoma</i>
<b>TOF</b>	Analizator czasu przelotu	<i>Time of flight</i>
<b>UC</b>	Wrzodzące zapalenie jelita grubego	<i>Ulcerative colitis</i>
<b>UICC</b>	Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem	<i>Union for International Cancer Control</i>
<b>USA</b>	Stany Zjednoczone	<i>The United States of America</i>
<b>VEGF</b>	Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>WHO</b>	Światowa Organizacja Zdrowia	<i>World Health Organization</i>

## 8.2. SPIS RYCIN

<b>Ryc. 1.</b> Klasyczna transformacja gruczolak-gruczolakorak w szlaku niestabilności chromosomalnej (mutacje genów APC, KRAS, DCC, SMAD4, TP53). Ilustracja wykonana przez autorkę.....	15
<b>Ryc. 2.</b> Oś PD-1/PD-L1 na przykładzie komórki nowotworowej oraz limfocyty T. Receptor limfocyty T (ang.: T-cell receptor, TCR). Główny układ zgodności tkankowej (ang.: major histocompatibility complex II, MHC II). Ilustracja wykonana przez autorkę.....	32
<b>Ryc. 3.</b> Zablokowanie szlaku PD-1/PD-L1 za pomocą przeciwciał przeciw PD-1 oraz PD-L1 w chorobie nowotworowej. Ilustracja wykonana przez autorkę.....	32
<b>Ryc. 4.</b> Schemat pobrania materiału do oznaczeń IRMS. Ilustracja wykonana przez autorkę.....	50
<b>Ryc. 5.</b> Mapa izotopowa nowotworu i jego otoczenia - delta <sup>15</sup> N (‰). Ilustracja wykonana przez autorkę.....	65
<b>Ryc. 6.</b> Mapa izotopowa nowotworu i jego otoczenia - delta <sup>13</sup> C (‰). Ilustracja wykonana przez autorkę.....	67

### 8.3. SPIS FOTOGRAFII

<b>Fot. 1.</b> Obraz makroskopowy raka jelita grubego. Zdjęcie z archiwum autorki. ....	19
<b>Fot.2.</b> Aparat Dako Autostainer wykorzystany do barwień immunohistochemicznych – Katedra Onkologii UM w Łodzi. Zdjęcie z archiwum autorki. ....	53
<b>Fot. 3.</b> Przygotowanie do oznaczeń izotopowych - materiał tkankowy umieszczony w kapsułce cynowej. Zdjęcie z archiwum autorki. ....	55
<b>Fot. 4.</b> Immunoekspresja białka PD-1 w komórkach nacieku zapalnego w obrębie raka gruczołowego jelita grubego o niższym stopniu złośliwości (low-grade), zlokalizowanym w zagięciu esiczo-odbytniczym, pow. 400x. Zdjęcie z archiwum autorki. ....	59
<b>Fot. 5.</b> Immunoekspresja białka PD-1 w komórkach nacieku zapalnego w obrębie jelita bez zmian, u pacjenta z rakiem gruczołowym o niższym stopniu złośliwości (low-grade), zlokalizowanym w zagięciu wątrobowym, pow. 400x. Zdjęcie z archiwum autorki. ....	59
<b>Fot. 6.</b> Immunoekspresja białka PD-L1 w komórkach raka gruczołowego jelita grubego o niskim stopniu złośliwości (low-grade), zlokalizowanym w esicy, pow. 400x. Zdjęcie z archiwum autorki. ....	62
<b>Fot. 7.</b> Immunoekspresja białka PD-L1 w komórkach rozproszonego nacieku zapalnego w obrębie raka gruczołowego jelita grubego o niskim stopniu złośliwości (low-grade), zlokalizowanym w odbytnicy, pow. 400x. Zdjęcie z archiwum autorki. ....	62
<b>Fot. 8.</b> Immunoekspresja białka PD-L1 w komórkach rozproszonego nacieku zapalnego w obrębie jelita bez zmian, u pacjenta z rakiem gruczołowym jelita grubego o niskim stopniu złośliwości (low-grade), zlokalizowanym w esicy, pow. 400x. Zdjęcie z archiwum autorki. ....	63

## 8.4. SPIS TABEL

<b>Tabela 1.</b> Uproszczona klasyfikacja złośliwych nowotworów nabłonkowych okrężnicy i odbytnicy wg WHO, 5. edycja, nomenklatura oryginalna. ....	9
<b>Tabela 2.</b> Podsumowanie informacji dotyczących zespołów zwiększających ryzyko rozwoju raka jelita grubego. ....	13
<b>Tabela 3.</b> TNM raka jelita grubego. ....	17
<b>Tabela 4.</b> Stopnie zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej (stage) w przypadku raka jelita grubego. ....	18
<b>Tabela 5.</b> Charakterystyka materiału do badań immunohistochemicznych. ....	48
<b>Tabela 6.</b> Charakterystyka materiału do badań izotopowych. ....	49
<b>Tabela 7.</b> Miejsce pobrania i liczba próbek do badań izotopowych. ....	51
<b>Tabela 8.</b> Wyniki oceny immunoekspresji białka PD-1. ....	57
<b>Tabela 9.</b> Wyniki oceny immunoekspresji białka PD-L1 w centrum guza. ....	60
<b>Tabela 10.</b> Wyniki oceny immunoekspresji białka PD-L1 w ścianie jelita bez zmian. ....	60
<b>Tabela 11.</b> Wartości delta $^{15}\text{N}$ dla badanych lokalizacji. ....	64
<b>Tabela 12.</b> Wartości delta $^{13}\text{C}$ dla badanych lokalizacji. ....	66
<b>Tabela 13.</b> Stosunek masowy N/C dla badanych lokalizacji. ....	68
<b>Tabela 14.</b> Podsumowanie ujawnionych korelacji dotyczących immunoekspresji białek w grupie badanej. ....	126
<b>Tabela 15.</b> Podsumowanie ujawnionych korelacji dotyczących składu izotopowego w grupie badanej. ....	126
<b>Tabela 16.</b> Podsumowanie uzyskanych korelacji pomiędzy badanymi parametrami histoklinicznymi, immunoekspresją badanych białek a składem izotopowym. ....	129
<b>Tabela 17.</b> Podsumowanie wyników analizy statystycznej immunoekspresji badanych białek. ....	142
<b>Tabela 18.</b> Podsumowanie wyników analizy statystycznej składu izotopowego. ....	143

## 8.5. SPIS DIAGRAMÓW

<b>Diagram 1.</b> Współczynnik korelacji rang Spearmana dla wieku oraz immunoekspresji badanych białek. ....	124
<b>Diagram 2.</b> Współczynnik korelacji rang Spearmana dla wieku oraz uzyskanych wartości stosunków izotopowych. ....	125
<b>Diagram 3.</b> Współczynnik korelacji rang Spearmana dla wybranych parametrów histoklinicznych, immunoekspresji badanych białek oraz składu izotopowego... ..	127
<b>Diagram 4.</b> Analiza składowych głównych w aspekcie lokalizacji guza – analiza całościowa (WARIANT A). ....	131
<b>Diagram 5.</b> Analiza składowych głównych w aspekcie dokładnej lokalizacji guza – analiza całościowa (WARIANT A). ....	133
<b>Diagram 6.</b> Analiza składowych głównych w aspekcie lokalizacji guza wg WHO – analiza całościowa (WARIANT A). ....	134
<b>Diagram 7.</b> Diagram zmiennych analizy składowych głównych – analiza całościowa (WARIANT A). ....	135
<b>Diagram 8.</b> Analiza składowych głównych w aspekcie lokalizacji guza – WARIANT B. ....	137
<b>Diagram 9.</b> Analiza składowych głównych w aspekcie dokładnej lokalizacji guza – WARIANT B. ....	138
<b>Diagram 10.</b> Analiza składowych głównych w aspekcie lokalizacji guza wg WHO – WARIANT B. ....	139
<b>Diagram 11.</b> Diagram zmiennych analizy składowych głównych – WARIANT B. ....	140

## 8.6. SPIS WYKRESÓW

<b>Wykres 1.</b> Intensywność wybarwienia komórek nacieku zapalnego PD-1(+) w guzie i ścianie jelita bez zmian. ....	58
<b>Wykres 2.</b> Intensywność wybarwienia komórek PD-L1(+) w komórkach guza, komórkach nacieku zapalnego w obrębie guza oraz w komórkach nacieku zapalnego w ścianie jelita bez zmian. ....	61
<b>Wykres 3.</b> Średnia wartość stosunku masowego N/C dla badanych lokalizacji. ..	69
<b>Wykres 4.</b> Test Kruskala – Wallisa – liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od cechy T (oś x) ( $p=0,026$ ). ....	70
<b>Wykres 5.</b> Test Kruskala – Wallisa – liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od cechy N (oś x) ( $p=0,029$ ). ....	71
<b>Wykres 6.</b> Test Wilcoxona - liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym .....	72
<b>Wykres 7.</b> Test Kruskala – Wallisa – liczba komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od cechy T (oś x). ....	73
<b>Wykres 8.</b> Test Wilcoxona - liczba komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian (oś y) w zależności od lokalizacji guza (oś x) ( $p=0,036$ ). ....	74
<b>Wykres 9.</b> Test Wilcoxona – stosunek liczby komórek PD-1(+) do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od stopnia histologicznej złośliwości nowotworu (oś x) ( $p=0,035$ ). ..	75
<b>Wykres 10.</b> Test Wilcoxona – stosunek liczby komórek PD-1(+) do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia (oś y) w obrębie guza i jelita bez zmian (oś x) ( $p=8,9e-05$ ). ....	76
<b>Wykres 11.</b> Test Wilcoxona – liczba komórek guza PD-L1(+) w dużym polu widzenia (oś y) w zależności od płci (oś x) ( $p=0,039$ ). ....	77
<b>Wykres 12.</b> Test Wilcoxona – liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od stopnia histologicznej złośliwości nowotworu (oś x). ....	78

<b>Wykres 13.</b> Test Kruskala – Wallisa – liczba wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie jelita bez zmian (oś y) w zależności od lokalizacji guza wg WHO (oś x). .....	79
<b>Wykres 14.</b> Test Wilcoxon – liczba komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od płci (oś x). .....	80
<b>Wykres 15.</b> Test Wilcoxon – liczba komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od obecności owrzodzenia (oś x). .....	81
<b>Wykres 16.</b> Test Kruskala – Wallisa – liczba komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od dokładniej lokalizacji guza (oś x). .....	82
<b>Wykres 17.</b> Test Wilcoxon – liczba komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian (oś y) w zależności od stopnia histologicznej złośliwości guza (oś x). .....	83
<b>Wykres 18.</b> Test Kruskala – Wallisa – liczba komórek PD-1(+) w dużym polu widzenia w jelicie bez zmian (oś y) w zależności od lokalizacji guza wg WHO (oś x). .....	84
<b>Wykres 19.</b> Test Wilcoxon – stosunek liczby komórek PD-1(+) do liczby wszystkich komórek nacieku zapalnego w dużym polu widzenia w obrębie guza (oś y) w zależności od obecności owrzodzenia (oś x). .....	85
<b>Wykres 20.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w centrum guza oraz krezce w rzucie guza (oś x) ( $p=7,7e-06$ ). .....	86
<b>Wykres 21.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w centrum guza oraz krezce poza guzem (oś x) ( $p=7,7e-06$ ). .....	87
<b>Wykres 22.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w obrzeżu guza oraz krezce w rzucie guza (oś x) ( $p=3e-05$ ). .....	88
<b>Wykres 23.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w obrzeżu guza oraz krezce poza guzem (oś x) ( $p=4,5e-05$ ). .....	89
<b>Wykres 24.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz krezce w rzucie guza (oś x) ( $p=0,00021$ ). .....	90
<b>Wykres 25.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz krezce poza guzem (oś x) ( $p=0,00021$ ). .....	91

<b>Wykres 26.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem oraz krezce w rzucie guza (oś x) ( $p=4,9e-05$ ).....	92
<b>Wykres 27.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem oraz krezce poza guzem (oś x) ( $p=4,9e-05$ ). .....	93
<b>Wykres 28.</b> Test Wilcoxon - delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem w zależności lokalizacji guza (oś x). .....	94
<b>Wykres 29.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w krezce w rzucie guza oraz w krezce poza guzem w zależności od lokalizacji guza wg WHO (oś x).....	95
<b>Wykres 30.</b> Test Wilcoxon – delta $^{15}\text{N}$ (oś y) w centrum guza oraz w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza (oś x) ( $p=0,0086$ ). .....	96
<b>Wykres 31.</b> Test Wilcoxon – delta $^{15}\text{N}$ (oś y) w centrum guza oraz w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem (oś x) ( $p=0,0043$ ). .....	97
<b>Wykres 32.</b> Test Wilcoxon – delta $^{15}\text{N}$ (oś y) w centrum guza oraz w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza (oś x) ( $p=0,0061$ ). .....	98
<b>Wykres 33.</b> Test Wilcoxon – delta $^{15}\text{N}$ (oś y) w obrzeżu guza oraz w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem (oś x) ( $p=0,0046$ ). .....	99
<b>Wykres 34.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem (oś x). .....	100
<b>Wykres 35.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem w zależności od płci (oś x).....	101
<b>Wykres 36.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w centrum oraz obrzeżu guza w zależności od lokalizacji guza (oś x).....	102
<b>Wykres 37.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w zależności lokalizacji guza (oś x). .....	103
<b>Wykres 38.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem w zależności lokalizacji guza wg WHO (oś x).....	104
<b>Wykres 39.</b> Test Wilcoxon - delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w centrum guza oraz obrzeżu guza w zależności od dokładnej lokalizacji guza (oś x). .....	105
<b>Wykres 40.</b> Test Wilcoxon - delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem w zależności od dokładnej lokalizacji guza (oś x).....	106

<b>Wykres 41.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem w zależności produkcji śluzu (oś x). .....	107
<b>Wykres 42.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w zależności od obecności owrzodzenia (oś x).....	108
<b>Wykres 43.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem w zależności od obecności owrzodzenia (oś x). .....	109
<b>Wykres 44.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w zależności od obecności owrzodzenia (oś x).....	110
<b>Wykres 45.</b> Test Wilcoxon – delta $^{13}\text{C}$ (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem w zależności od stopnia histologicznej złośliwości nowotworu (grade) (oś x).....	111
<b>Wykres 46.</b> Test Wilcoxon – delta $^{15}\text{N}$ (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem (oś x). .....	112
<b>Wykres 47.</b> Test Wilcoxon – delta $^{15}\text{N}$ (oś y) w centrum guza oraz obrzeżu guza w zależności od płci (oś x). .....	113
<b>Wykres 48.</b> Test Wilcoxon – delta $^{15}\text{N}$ (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza w zależności od płci (oś x). .....	114
<b>Wykres 49.</b> Test Wilcoxon – delta $^{15}\text{N}$ (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza w zależności od lokalizacji guza (oś x).....	115
<b>Wykres 50.</b> Test Wilcoxon – delta $^{15}\text{N}$ (oś y) w centrum guza oraz obrzeżu guza w zależności od dokładnej lokalizacji guza (oś x). .....	116
<b>Wykres 51.</b> Test Wilcoxon – delta $^{15}\text{N}$ (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem w zależności produkcji śluzu (oś x). .....	117
<b>Wykres 52.</b> Test Wilcoxon – delta $^{15}\text{N}$ (oś y) w centrum guza oraz obrzeżu guza w zależności od cechy N (oś x).....	118
<b>Wykres 53.</b> Test Wilcoxon – delta $^{15}\text{N}$ (oś y) w centrum guza oraz obrzeżu guza w zależności od obecności owrzodzenia (oś x). .....	119
<b>Wykres 54.</b> Test Wilcoxon – delta $^{15}\text{N}$ (oś y) w krezce w rzucie guza oraz krezce poza guzem w zależności od obecności owrzodzenia (oś x).....	120

<b>Wykres 55.</b> Test Wilcoxon – stosunek masowy N/C (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w zależności lokalizacji guza (oś x). .....	121
<b>Wykres 56.</b> Test Wilcoxon – stosunek masowy N/C (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem a marginesem w zależności od produkcji śluzu (oś x).....	122
<b>Wykres 57.</b> Test Wilcoxon – stosunek masowy N/C (oś y) w ścianie jelita bez zmian w rzucie guza oraz ścianie jelita bez zmian pomiędzy guzem z marginesem w zależności od obecności owrzodzenia (oś x). .....	123

## 9. STRESZCZENIE

### 9.1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Rak jelita grubego stanowi obecnie drugą co do częstości przyczynę zgonów z powodu choroby nowotworowej, ustępując jedynie rakowi płuc. Obserwuje się zarówno wzrost samej liczby chorych, jak i śmiertelności z powodu tego nowotworu. Skala problemu i jej wzrostowa tendencja, czynią raka jelita grubego jednym z wiodących wyzwań naszych czasów, ujawniając potrzebę jeszcze głębszego poznania biologii tego nowotworu, a wysoka śmiertelność mająca swoją przyczynę także w późnym rozpoznawaniu tego typu zmian, wskazuje na konieczność poszukiwania nowych, także interdyscyplinarnych metod o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym i prognostycznym.

Białko programowanej śmierci – 1 (PD-1) jest immunoreceptorem należącym do rodziny antygeny różnicowania komórkowego 28 / antygeny - 4 cytotoksycznych limfocytów T. Jest ono odpowiedzialne za regulację odpowiedzi immunologicznej poprzez hamowanie proliferacji limfocytów T, wytwarzania interferonu gamma oraz interleukiny-10. Częsteczka PD-1 pełni rolę immunologicznego punktu kontrolnego. Komórki nowotworów złośliwych mogą unikać oraz osłabiać odpowiedź immunologiczną poprzez aktywację immunologicznych białek punktów kontrolnych, w tym PD-1 oraz PD-L1.

Ligand programowanej śmierci – 1 (PD-L1) jest najważniejszym ligandem białka PD-1 i białkiem błony komórkowej, które po związaniu się z częsteczką PD-1, prowadzi do zahamowania proliferacji limfocytów T. Ekspresja częsteczki PD-L1 obserwowana jest na komórkach nowotworowych i prowadzi do unikania przez nie układu odpornościowego. Białko PD-L1 wchodzi w interakcję z częsteczką PD-1 na limfocytach T, co sprawia, że nie atakują one komórek nowotworowych, a sam guz może wzrastać bez przeszkód. Szlak PD-1/PD-L1 jest wykorzystywany przez komórki nowotworowe dla osłabienia odpowiedzi immunologicznej organizmu - jego aktywacja prowadzi do utrzymania się przewlekłej infekcji i rozwoju choroby nowotworowej.

Spektrometria mas jest techniką analityczną, która opiera się na pomiarze stosunku masy do ładunku jonów. Izotopowa spektrometria mas jest jej odmianą, która pozwala ustalić skład izotopowy wybranych pierwiastków chemicznych. Bazuje ona na pomiarze stosunków izotopowych pierwiastków lekkich: węgla, azotu, siarki, tlenu i wodoru, naturalnie występujących w środowisku i organizmach żywych, ale także w próbkach wzbogaconych izotopowo. Frakcjonowanie izotopowe polega na rozdzielaniu izotopów danego pierwiastka chemicznego, pod względem różnicy masy jąder atomowych, na skutek zachodzących naturalnie procesów. Stosunek izotopowy jest stosunkiem cięższych do lżejszych izotopów w badanym materiale. Różnica względna stosunków izotopowych zwyczajowo wyrażana w promilach określana jest jako delta ( $\delta$ ).

Zwrotnym punktem w historii spektrometrii mas było jej wprowadzenie w obszar medycyny, a w ostatnich latach zastosowanie izotopowej spektrometrii mas w badaniach tkanek transformowanych nowotworowo.

Literatura przedmiotu zawiera liczne prace wskazujące na istotne znaczenie obecności białek PD-1/PD-L1 dla przebiegu choroby nowotworowej. Praca badawcza obejmuje ocenę ekspresji białek PD-1 i PD-L1 w raku jelita grubego, w celu ujawnienia potencjalnych związków z histokliniką nowotworu o aspekcie klinicznym.

W piśmiennictwie nie odnaleziono badań składu izotopowego w raku jelita grubego, a wzrastająca częstość występowania oraz wysoka śmiertelność z powodu tego nowotworu wskazuje na celowość poszukiwania nowych metod pomocnych w diagnostyce lub nowych biomarkerów przydatnych dla oceny rokowania w indywidualnych przypadkach. Dlatego też projekt badawczy zakłada ocenę składu izotopowego pierwiastków najbardziej związanych z istnieniem komórek – węgla oraz azotu, zarówno w samych tkankach raka jelita grubego, jak i jego środowisku oraz poszukiwanie związków między stosunkiem izotopowym a biologią komórek nowotworowych i wynikających z tego potencjalnych implikacjach klinicznych.

Cele pracy:

1. Ocena ekspresji białek PD-1 oraz PD-L1 w raku jelita grubego i jego środowisku w materiale pooperacyjnym.
2. Poznanie struktury raka jelita grubego i jego środowiska na poziomie atomowym poprzez ustalenie wartości stosunku izotopowego stabilnych izotopów azotu i węgla w obrębie nowotworu i tkanek otaczających oraz wstępna ewaluacja wartości diagnostycznej pomiarów izotopowych.
3. Ocena interakcji nowotworu i jego środowiska poprzez poszukiwanie potencjalnych związków ekspresji badanych białek oraz składu izotopowego tkanki nowotworowej i jej otoczenia z wybranymi cechami histoklinicznymi oraz wstępna ewaluacja wartości prognostycznej przeprowadzonych oznaczeń.
4. Próba oceny potencjalnych zalet i ograniczeń praktycznego zastosowania izotopowej spektrometrii mas w raku jelita grubego.

Na podstawie zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr RNN/351/19/KE z dnia 10 września 2019 roku przeprowadzono prezentowane badania na materiale pochodzącym od 97 pacjentów z rakiem jelita grubego, w tym 78 przypadkach raka jelita grubego z archiwum Katedry Onkologii, Zakładu Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz 19 przypadkach bieżących tego nowotworu dla potrzeb oceny składu izotopowego pozyskanych od chorych operowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej – Centralnego Szpitala Weteranów w Łodzi. Pozyskane tkanki nie były poddawane działaniu żadnych substancji chemicznych, w tym nie były utrwalane w formalinie. Świeże tkanki były oznaczane i zamrożone natychmiast po pobraniu w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Do wykonania badań immunohistochemicznych wykorzystano tkanki zatopione w blokach parafinowych, pochodzące od pacjentów operowanych

w latach 2013-2020, z rozpoznaniem raka jelita grubego. Łącznie wykonano i poddano ocenie 136 odczynów z dwóch lokalizacji (centrum guza oraz ściany jelita bez zmian) dla obu przeciwciał, PD-1 oraz PD-L1.

Materiał wykorzystany do badań z użyciem izotopowego spektrometru mas stanowiło 112 próbek tkanek nowotworów i ich środowiska, w których dokonano 310 oznaczeń składu izotopowego stabilnych izotopów azotu i węgla.

Barwienia immunohistochemiczne wykonano w aparacie Dako Autostainer. Wykorzystano dwa przeciwciała firmy Biorbyt, pierwotne mysie przeciwciało monoklonalne skierowane przeciw PD-1 (w rozcieńczeniu 1:100, pH 8) oraz pierwotne królicze przeciwciało poliklonalne skierowane przeciw PD-L1 (w rozcieńczeniu 1:100, pH 8).

Badania składu izotopowego poprzedzono przygotowaniem tkanek, które poddano procesowi liofilizacji w Pracowni Oznaczania Leków i Metabolitów, podlegającej pod Środowiskowe Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Analizę składu izotopowego azotu i węgla przeprowadzono w spektrometrze masowym stosunku izotopowego z przepływem ciągłym (*ang.: continuous flow isotope ratio mass spectrometer, CF-IRMS*) Sercon HS 20-22 sprzężonym z analizatorem elementarnym.

Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą pakietów języka R (v. 4.1). Analiza statystyczna została przeprowadzona w dwóch obszarach. Pierwszy uwzględniał całą grupę badaną, natomiast drugi obejmował same wyniki oznaczeń izotopowych. Obliczono i wykorzystano w analizie średnią, medianę, zakres (minimum, maksimum) oraz odchylenie standardowe. W porównywaniu danych pomiędzy grupami klinicznymi wykorzystano nieparametryczny test Manna-Whitneya-Wilcoxon dla dwóch zmiennych niezależnych oraz test Kruskala-Wallis dla trzech i więcej zmiennych niezależnych. Nieparametryczny test Wilcoxon użyto jako test post-hoc w przypadku istotnych porównań testem Kruskala-Wallis. Korelacje pomiędzy zmiennymi zbadano przy pomocy współczynnika korelacji rang Spearmana. Poziom istotności przyjęto na poziomie  $p < 0,05$ . Do znalezienia

prawidłowości między cechami pacjentów przeprowadzono analizę składowych głównych (PCA).

W wyniku przeprowadzonych badań ujawniono 14 znamienych statystycznie związków immunoekspresji obu badanych białek PD-1 i PD-L1 z cechami histoklinicznymi, w tym uznanymi czynnikami o znaczeniu rokowniczym oraz 13 znamienych statystycznie różnic składu izotopowego węgla i azotu pomiędzy utkaniem raka jelita grubego a jego środowiskiem, a ponadto w przypadku węgla również związku z lokalizacją guza. Ponadto zaobserwowano 32 trendy, 29 korelacji oraz 6 przestrzennych grupowań badanych parametrów.

Wynioskowano, że:

1. Ekspresja obu ewaluowanych białek, PD-1 oraz PD-L1 w raku jelita grubego i jego środowisku - zarówno w guzie, jak i jelicie bez zmian jest zróżnicowana. Znamienne wyższa ekspresja białka PD-1 obserwowana jest w utkaniu guza w porównaniu z niezmienną ścianą jelita.
2. Wartości delta  $^{15}\text{N}$  są znamienne niższe w centrum i na obrzeżu guza w porównaniu do niezmienniej ściany w rzucie guza i pomiędzy guzem a marginesem chirurgicznym. Wartości delta  $^{13}\text{C}$  są znamienne niższe w krezce w rzucie guza oraz w krezce poza guzem w porównaniu do centrum guza, obrzeża guza, niezmienniej ściany jelita w rzucie guza oraz ściany jelita pomiędzy guzem a marginesem chirurgicznym. Ujawnione różnice w wartości stosunku izotopowego stabilnych izotopów obu pierwiastków sugerują odmienność struktury nowotworu i jego środowiska na poziomie atomowym oraz wydają się wskazywać na możliwość wykorzystania przeprowadzonych pomiarów w celach diagnostycznych.
3. Ekspresja PD-1 w obrębie guza jest znamienne zależna od głębokości nacieku nowotworowego oraz stopnia złośliwości histologicznej nowotworu – dwóch czynników o uznanej wartości rokowniczej, a ponadto w zależności od lokalizacji

guza zmienia się także w jelicie poza zmianą. Ekspresja PD-L1 w komórkach nowotworowych jest znamienne zależna od płci – czynnika, który w raku jelita grubego także ma znaczenie prognostyczne. Wartości składu izotopowego węgla w krezce, zarówno w rzucie guza, jak i poza guzem znamienne zależą od lokalizacji samego nowotworu, natomiast skład izotopowy azotu w niektórych lokalizacjach koreluje z ekspresją PD-L1. Uzyskane wyniki wydają się przemawiać za istnieniem pośredniego związku ekspresji PD-1, PD-L1 i składu izotopowego azotu z rokowaniem w raku jelita grubego.

4. Wykorzystanie izotopowej spektrometrii mas pozwala na ujawnienie nieznanych dotąd aspektów biologii raka jelita grubego i jego środowiska, a być może także implikacji klinicznych oznaczeń składu izotopowego. Konieczne byłyby jednak tak weryfikacja praktycznej wartości uzyskanych wyników w grupach o większej liczebności, jak i znaczne zwiększenie dostępności samej metody dla celów onkologii.

Ujawnione po raz pierwszy w prezentowanej pracy zależności pomiędzy ekspresją białek PD-1 i PD-L1 oraz składem izotopowym węgla i azotu w raku jelita grubego ukazują nieznanne dotąd aspekty biologii tego nowotworu o potencjalnych implikacjach klinicznych, których lepsze zrozumienie może się przyczynić do poprawy rokowania dla powiększającej się grupy chorych z rakiem jelita grubego.

## **9.2. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM - ABSTRACT**

**Evaluation of the potential diagnostic and prognostic value of PD-1 and PD-L1 protein expression in colorectal carcinoma as well as the structure and interaction of the neoplasm and its environment at the atomic level.**

Colorectal carcinoma is currently the second most common cause of cancer death, giving way only to lung carcinoma. There is an increase in both the number of patients and the mortality rate due to this neoplasm. The scale of the problem and its growing tendency make colorectal carcinoma one of the leading challenges of our time, revealing the need for an even deeper understanding of the biology of this neoplasm, and the high mortality caused by the late diagnosis of this type of lesions indicates the need to look for new, also interdisciplinary methods of potential diagnostic and prognostic importance.

Programmed cell death - 1 (PD-1) is an immunoreceptor belonging to the cluster of differentiation 28 / cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 family of T cells. It is responsible for regulating the immune response by inhibiting T cell proliferation, the production of interferon gamma and interleukin-10. The PD-1 molecule acts as an immune checkpoint. Cancer cells can avoid and weaken the immune response by activating immune checkpoint proteins, including PD-1 and PD-L1.

Programmed death - ligand 1 (PD-L1) is the most important ligand of the PD-1 protein and the cell membrane protein which, after binding to the PD-1 molecule, leads to the inhibition of T-lymphocyte proliferation. Expression of the PD-L1 molecule is observed on neoplastic cells and leads to their avoidance of the immune system. The PD-L1 protein interacts with the PD-1 molecule on T lymphocytes, which means that they do not attack cancer cells, and the tumor itself can grow unhindered. The PD-1 / PD-L1 pathway is used by cancer cells to weaken the body's immune response - its activation leads to the persistence of chronic infection and the development of neoplastic disease.

Mass spectrometry is an analytical technique that measures the mass-to-charge ratio of ions. Isotope ratio mass spectrometry is its variant that allows to determine the isotopic composition of selected chemical elements. It is based on the measurement of the isotopic ratios of light elements: carbon, nitrogen, sulfur, oxygen and hydrogen, naturally occurring in the environment and living organisms but also in isotope enriched samples. Isotope fractionation is the separation of isotopes of a given chemical element in terms of the difference in the mass of atomic nuclei as a result of naturally occurring processes. The isotope ratio is the ratio of the heavier to lighter isotopes in the examined material. The relative difference in isotopic ratios usually expressed in per mille is defined as delta ( $\delta$ ).

A turning point in the history of mass spectrometry was its introduction to the field of medicine, and in recent years the use of isotope ratio mass spectrometry in the study of neoplastic-transformed tissues.

The literature on the subject contains numerous studies indicating the importance of the presence of PD-1 / PD-L1 proteins in the course of neoplastic disease. The research project includes the evaluation of PD-1 and PD-L1 protein expression in colorectal carcinoma, in order to reveal potential relationships with the neoplasm histoclinic of a clinical aspect.

No studies of the isotope composition in colorectal carcinoma have been found in the literature, and the increasing incidence and high mortality due to this neoplasm indicate the advisability of searching for new methods helpful in diagnostics or new biomarkers useful for the assessment of prognosis in individual cases. Therefore, the research project assumes the assessment of the isotopic composition of the elements most related to the existence of cells - carbon and nitrogen, both in the colon carcinoma tissue itself and in its environment, and the search for relationships between the isotope ratio and the biology of cancer cells and the resulting potential clinical implications.

The aims of the study appeared as follow:

1. Assessment of PD-1 and PD-L1 protein expression in colorectal carcinoma and its environment in postoperative material.
2. Understanding the structure of colorectal carcinoma and its environment at the atomic level by determining the isotope ratio of nitrogen and carbon stable isotopes within the neoplasm and surrounding tissues, and preliminary evaluation of the diagnostic value of isotope measurements.
3. Assessment of the interaction of the neoplasm and its environment by searching for potential relations between the expression of the studied proteins and the isotopic composition of the neoplastic tissue and its surroundings with selected histoclinical features and preliminary evaluation of the prognostic value of the research performed.
4. An attempt to evaluate the potential advantages and limitations of the practical application of isotope ratio mass spectrometry in colorectal carcinoma.

Based on the agreement of the Bioethics Committee of the Medical University of Lodz, No. RNN/351/19/KE of 10th September 2019 the presented research was conducted on material from 97 patients with colorectal carcinoma, including 78 cases of colorectal carcinoma from the archives of the Chair of Oncology, Department of Pathomorphology of the Medical University of Lodz, and 19 current cases of this cancer for the purposes of assessing the isotope composition obtained from patients operated in Department of General and Colorectal Surgery, Military Medical Academy University Teaching Hospital- Central Veterans' Hospital, Lodz, Poland. The obtained tissues were not exposed to any chemical substances, including the fixation in formalin. Fresh tissues were labeled and frozen immediately after obtaining at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

To perform immunohistochemical studies, tissues embedded in paraffin blocks, obtained from patients operated in the years 2013-2020, diagnosed with colorectal carcinoma, were used. In total, 136 stains from two locations (tumor

center and unchanged intestinal wall) were performed and assessed for both antibodies, PD-1 and PD-L1.

The material used for the studies with the isotope ratio mass spectrometer consisted of 112 samples of neoplastic tissues and their environment, in which 310 determinations of the isotopic composition of nitrogen and carbon stable isotopes were performed.

Immunohistochemical staining was performed on the Dako Autostainer apparatus. Two antibodies from the Biorbyt company were used, a primary mouse monoclonal antibody against PD-1 (diluted 1: 100, pH 8) and a primary rabbit polyclonal antibody against PD-L1 (diluted 1: 100, pH 8).

The study of the isotope composition was preceded by the preparation of tissues, which were subjected to the process of lyophilization in the Laboratory of Quantitative Analysis of Drugs and Metabolites, subordinate to the Mass Spectrometry Facility of the Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences in Warsaw. The isotope composition analysis of nitrogen and carbon was performed in a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (CF-IRMS) Sercon HS 20-22 coupled with an elemental analyzer.

All statistical analyzes were performed using R language packages (v. 4.1). Statistical analysis was carried out in two areas. The first one included the entire study group, while the second one included the results of isotope determinations only. The mean, median, range (minimum, maximum) and standard deviation were calculated and used in the analysis. In comparing the data between clinical groups, the non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test for two independent variables and Kruskal-Wallis test for three or more independent variables were used. The nonparametric Wilcoxon test was used as a post-hoc test for significant comparisons with the Kruskal-Wallis test. The correlations between the variables were examined using the Spearman's rank correlation coefficient. The significance level was set at  $p < 0.05$ . Principal Components Analysis (PCA) was performed to find the regularities between the patient's features.

As a result of the conducted research, 14 statistically significant immunoexpression associations of both PD-1 and PD-L1 proteins under study were

revealed, with histoclinical features, including recognized prognostic factors, and 13 statistically significant differences in the isotopic composition of carbon and nitrogen between the tissues of colorectal carcinoma and its environment, and, in the case of carbon, also related to the location of the tumor. In addition, 32 trends, 29 correlations and 6 spatial clusterings of the examined parameters were observed.

It was concluded that:

1. Expression of both evaluated proteins, PD-1 and PD-L1 in colorectal carcinoma and its environment - both in the tumor and in the intestine wall without changes, is diversified. Significantly higher expression of the PD-1 protein is observed in the tumor tissue as compared to the unchanged intestinal wall.
2. Delta  $^{15}\text{N}$  values are significantly lower in the center and periphery of the tumor compared to the unchanged wall in the tumor projection and between the tumor with the surgical margin. Delta  $^{13}\text{C}$  values are significantly lower in the mesentery in tumor projection and in the mesentery outside the tumor compared to the tumor center, tumor periphery, unchanged intestinal wall in tumor projection, and intestinal wall between tumor and surgical margin. The revealed differences in the value of the isotope ratio of the stable isotopes of both elements suggest the different structure of the neoplasm and its environment at the atomic level and seem to indicate the possibility of using the performed measurements for diagnostic purposes.
3. The expression of PD-1 within the tumor is significantly dependent on the depth of the neoplastic infiltration and the degree of histological malignancy of the neoplasm - two factors with a recognized prognostic value, and also in the intestine outside the lesion depending on the tumor location. Expression of PD-L1 in neoplastic cells is significantly dependent on sex - a factor that is also prognostic in colorectal carcinoma. The values of the carbon isotope composition in the mesentery, both in the tumor projection and outside the tumor, significantly

depend on the location of the neoplasm itself, while the nitrogen isotope composition in some locations correlates with PD-L1 expression. The obtained results seem to support the existence of an indirect relationship between PD-1, PD-L1 expression and nitrogen isotope composition with prognosis in colorectal carcinoma.

4. The use of isotope ratio mass spectrometry allows to reveal previously unknown aspects of the biology of colorectal carcinoma and its environment, and possibly also the clinical implications of isotopic composition determinations. However, it would be necessary to verify the practical value of the results obtained in larger groups, as well as to significantly increase the availability of the method itself for oncology purposes.

The relationships between the expression of PD-1 and PD-L1 proteins and the isotopic composition of carbon and nitrogen in colorectal carcinoma, disclosed for the first time in the present study, reveals previously unknown aspects of this cancer's biology with potential clinical implications, the better understanding of which may contribute to the improvement of prognosis for the increasing number of patients with colorectal carcinoma.