

# **CZYNNIK STYMULUJĄCY TWORZENIE KOLONII GRANULOCYTÓW (G-CSF) JAKO NOWY BIOMARKER W SPERSONALIZOWANEJ TERAPII RAKA JELITA GRUBEGO?**

## **GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR (G-CSF) AS A NEW BIOMARKER FOR PERSONALIZED TREATMENT OF COLORECTAL CANCER?**

**Katarzyna Wawrzyniec<sup>1\*</sup>, Aleksandra Kawczyk-Krupka<sup>2</sup>, Beata Flak<sup>2</sup>,  
Omran Ibrahim<sup>2</sup>, Aleksander Sieroń<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Oddział Chorób Wewnętrznych SPZZOZ Staszów, 28-200 Staszów, ul. 11 Listopada 78

<sup>2</sup> Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Angiologii i Medycyny Fizykalnej  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, 41-902 Bytom, ul. Batorego 15

\*e-mail: Logia\_K@wp.pl

### **STRESZCZENIE**

Rak jelita grubego jest drugą przyczyną zgonów w populacji pacjentów onkologicznych. Pomimo ciągłego rozwoju metod diagnostycznych, wprowadzania programów badań przesiewowych, systematycznej kontroli pacjentów będących już po interwencji chirurgicznej lub chemioterapii, osiągnęte finalne efekty przeżycia chorych z rakiem jelita grubego nie są zadowalające. Przyczyną tak niesatysfakcjonujących wyników jest częste wykrywanie choroby już w zaawansowanym stadium, gdyż u co trzeciego chorego w momencie rozpoznania raka jelita grubego potwierdzone są przerzuty. Powszechnie stosowane, celem detekcji zmian nowotworowych i późniejszej kontroli nawrotu choroby, markery CEA i CA 19-9 nie są wystarczające. Z tego powodu konieczne są dalsze poszukiwania znaczników, które w połączeniu z dotychczas stosowanymi elementami diagnostycznymi, umożliwią z wysoką czułością i swoistością wykrycie raka, wznowy i progresji choroby oraz pozwolą przewidzieć przebieg, a także prawdopodobną odpowiedź na standardowe leczenie. Oparcie podejmowanych decyzji na takich danych i kwalifikowanie pacjenta do niestandardowego schematu leczniczego umożliwi w większym stopniu wdrożenie zindywidualizowanej terapii, która powinna odgrywać podstawową rolę w leczeniu.

### **ABSTRACT**

The colorectal cancer (CRC) is the second cause of death in the entire population of oncological patients. Despite of the development of diagnostic methods, screening programs, monitoring of patients after surgery or chemotherapy, results of survival rates are not satisfactory. The reason is that frequently the detection of the disease takes place already at the advanced stage, as every third patient at the time of diagnosis of CRC has already metastases. CEA and CA 19-9 markers are commonly used to detect cancer and to monitor the disease recurrence, are not sufficient. For this reason it becomes necessary to introduce new additional markers that will enable a higher sensitivity and specificity for detecting cancer,

it's recurrence and progression and will be helpful to predict the course of disease and response to standard therapy. Basing on an advanced diagnosis, an individualized therapy implementation will be possible. This approach should play a key role in the proper treatment.

Słowa kluczowe: G-CSF, rak jelita grubego, terapia spersonalizowana

Keywords: G-CSF, colon cancer, personalized therapy

## 1. Wstęp

Znaczny postęp w rozumieniu biomolekularnego podłoża kancerogenezy i procesu powstawania przerzutów pozwala uwzględnić coraz to nowsze czynniki. Poznanie ich funkcji umożliwia ich wykorzystanie na różnych etapach procesu diagnostyczno-terapeutycznego. W pierwszym etapie jako biomarkerów detekcyjnych, pozwalających wykryć nowotwór a następnie, umożliwiających stratyfikację ryzyka i rokowania (biomarkery prognostyczne) oraz przewidywanie dalszego przebiegu choroby, jak i prawdopodobnej odpowiedzi na standardowe leczenie, To pozwala na wdrożenie odpowiednio spersonalizowanej celowanej terapii (markery predykcyjne). Ostatnim etapem jest kontrolowanie stężeń tych czynników celem wczesnej detekcji wznowy, przerzutów bądź powstania nowego ogniska nowotworu zanim obecne będą objawy kliniczne lub zmiany w badaniach obrazowych [1].

Zgodnie z definicją markery nowotworowe są wysokocząsteczkowymi substancjami związanymi z powierzchnią komórek nowotworowych i są oznaczane w krwi obwodowej lub innych płynach ustrojowych. Marker, jak i metoda służąca do jego oznaczenia, powinny charakteryzować się jak najwyższą czułością i swoistością [2].

Markery nowotworowe nie są wytwarzane jedynie przez komórki guza, a co za tym idzie nie są wysoce wyselekcjonowanym i specyficznym znacznikiem. Częstość uwalniania są również przez prawidłowe komórki lub jako odpowiedź tych komórek na rozwój w organizmie nowotworu, aczkolwiek wtedy w zdecydowanie niższych stężeniach. Trudności interpretacyjne stwarzają sytuacje, w których pomimo obecności nowotworu, przeważnie na wczesnym etapie jego rozwoju, uzyskiwane są wyniki fałszywie ujemne. Podobny problem dotyczy wyników fałszywie dodatnich, kiedy przy braku zmian rozrostowych obserwowany jest wzrost stężenia markera nowotworowego. Celem zminimalizowania prawdopodobieństwa uzyskania wyników fałszywych prowadzone są poszukiwania nowych markerów, także z grupy cytokin.

Tak jak w każdym innym rodzaju nowotworu, również w raku jelita grubego badania laboratoryjne, jako mniej inwazyjne dla pacjenta w porównaniu do diagnostyki endoskopowej, są lepiej akceptowane i tolerowane przez chorego. Stwarzają możliwość wykonywania wielokrotnych powtórzeń oznaczeń bez znacznego obciążania organizmu pacjenta, a ich wyniki są niezależne subiektywnej oceny przeprowadzającego badanie [3].

Skróty używane w tej pracy wyjaśnione są w tabeli poniżej.

Tabela 1. Wykaz skrótów używanych w pracy

<b>CA 19-9</b>	antygen nowotworowy 19-9 (ang. <i>cancer antygen 19-9</i> )
<b>CEA</b>	antygen karcynoembrionalny (ang. <i>carcinoembryonic antigen</i> )
<b>GICA</b>	antygen towarzyszący nowotworom przewodu pokarmowego (ang. <i>gastrointestinal cancer antygen</i> )
<b>G-CSF</b>	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. <i>granulocyte colony stimulating factor</i> )
<b>G-CSFR</b>	receptor G-CSF (ang. <i>granulocyte colony stimulating factor receptor</i> )
<b>RT-PCR</b>	reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą (ang. <i>reverse transcriptase PCR</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z siarczanem dodecyłu sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>TAMs</b>	makrofagi związane z guzem (ang. <i>tumor associated macrophages</i> )

## 2. Rak jelita grubego

Rak jelita grubego (r.j.g.) jest trzecim co do częstości występowania na świecie nowotworem w populacji mężczyzn i drugim w populacji kobiet [4]. Zajmuje 2 miejsce wśród przyczyn zgonów z powodu nowotworów w Europie [5]. Corocznie zapadalność wzrasta o 2,5%. Odsetek 5-letnich przeżyć chorych na r.j.g. w krajach Europy Zachodniej wynosi 60%, a w Polsce wynik ten jest o 10% niższy. Aż u 30% pacjentów w momencie postawienia rozpoznania występują zmiany metastatyczne, a u co drugiego chorego leczonego z założeniem doszczętnego usunięcia zmiany pierwotnej dojdzie do nawrotu choroby [6]. Wiadomo jest, iż komórki r.j.g. wydzielają chemokiny, cytokiny i czynniki wzrostu poprzez które, na drodze auto- i parakrynej, wpływają na otaczające mikrośrodowisko oraz odpowiedź immunologiczną gospodarza, stwarzając sobie optymalne do rozwoju warunki. Z tego powodu tak ważne jest poznanie, a następnie praktyczne zastosowanie nowych biomarkerów, które zwiększą czułość i swoistość wykrywania i kontroli nowotworów przewodu pokarmowego, w tym r.j.g. i przyczynią się do poprawy przedstawionych powyżej danych statystycznych. Dynamiczny rozwój nowych gałęzi bioinżynierii i proteomiki jest nierozdzielnie związany z identyfikacją nowych biomarkerów, również do wczesnej detekcji rozwoju raka jelita grubego [7].

## 3. Powszechnie stosowane markery raka jelita grubego

Dotychczas praktyczne kliniczne zastosowanie w zakresie diagnostyki i terapii r.j.g. mają: CEA (antygen karcynoembrionalny) zaliczany do grupy antygenów towarzyszących nowotworom, czyli wytwarzanych również przez komórki prawidłowe. W przypadku zmian nowotworowych ich stężenie w surowicy w płynie wysiękowym z otrzewnej jest zdecydowanie wyższe. Przeważnie większa masa guza koreluje z wyższym stężeniem CEA, a po zabiegu cytoredukcyjnym odnotowywane jest obniżenie stężenia. Jest to czynnik powszechnie pomocniczo stosowany w detekcji r.j.g., jak również w późniejszej kontroli pacjenta onkologicznego celem szybkiego wychwytu momentu powstania wznowy. CEA jest białkiem pochodzącym z błony komórkowej komórek przewodu pokarmowego i trzustki. Jego uwalnianie jest nasilone w przebiegu nowotworów jelita grubego (szczególnie gruczolakoraków), żołądka, trzustki, piersi, płuca, pęcherza moczowego, jak również w zapaleniu i marskości wątroby, przewlekłym zapaleniu trzustki, chorobie wrzodowej żołądka i dwunastnicy, wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego. Jak można zauważyć, CEA nie jest selektywnym markerem r.j.g., ale z uwagi na dodatnią wartość predykcijną ponownego wzrostu stężenia, jest wskaźnikiem postępu choroby i powstania przerzutów. Jest markerem mało przydatnym we wczesnej fazie choroby, kiedy to charakteryzuje się jedynie ok. 40% czułością. A właśnie możliwość stosowania wykładników umożliwiających wychwyty chorych w początkowym stadium r.j.g., kiedy włączenie leczenia skutkuje nawet 90% wskaźnikiem 5-letniego przeżycia, wydaje się być, jak na razie, odległym celem [1, 8].

Drugim stosowanym markerem jest CA 19-9 (antygen nowotworowy 19-9) towarzyszący nowotworom przewodu pokarmowego (GIGA). Jest pochodną antygeny układu grup krwi wytwarzaną przez komórki przewodu pokarmowego i wątroby na wczesnym etapie organogenezy, jak również przez dojrzałe komórki oskrzeli, dróg żółciowych, trzustki czy gruczołów ślinowych. Nie jest to absolutnie swoisty dla r.j.g. marker, lecz z powodu tego nowotworu obserwowany jest znaczny wzrost sekrecji CA 19-9 [1].

Z uwagi na znaczne ograniczenia, niezadowalającą czułość czy swoistość izolowanego badania CEA lub CA 19-9, słuszne jest poszukiwanie nowych markerów, które w połączeniu ze stosowanymi obecnie oznaczeniami, ułatwią jednoznaczną interpretację wyników badań. Pojawiają się coraz liczniejsze doniesienia, na podstawie których można przypuszczać, że takim markerem mogłyby być G-CSF, którego wzrost stężenia obserwowany jest w szczególności w przebiegu raka jelita grubego o bardzo agresywnym rozwoju.

## 4. Czynniki stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF)

G-CSF pod względem biochemicznym jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 19 kDa, zbudowaną z łańcucha 174 aminokwasów. Jest hemopoetycznym czynnikiem wzrostu pobudzającym powstawanie i różnicowanie granulocytów obojętnochłonnych w szpiku kostnym poprzez stymulację

komórek progenitorowych. Z tego powodu związek ten znalazł kliniczne zastosowanie w terapii neutropenii powstałej po chemioterapii [9].

Jednak funkcja G-CSF nie jest do końca poznana i jednoznaczna, gdyż w procesie kancerogenezy wydzielany przez komórki nowotworowe na drodze auto- i parakrynej działa stymulująco na proces wzrostu tych komórek i powstawania przerzutów m.in. poprzez aktywację w otaczającej tkance procesu neoangiogenezy. Obserwowano transformację nowotworową prawidłowych komórek po aplikacji G-CSF oraz progresję zmiany miejscowej w wyniku narastającego nacieku pobudzanych parakrynie makrofagów. G-CSF jest zarówno wydzielany przez leukocyty naciekające guzy jelita grubego, jak i autologicznie przez komórki nowotworowe, co potwierdzono na przykładzie raka pęcherza moczowego. Taki mechanizm działania ujawnia ambiwalentny efekt G-CSF w zakresie obrony przeciwnowotworowej, gdyż poprzez aktywację neoangiogenezy, pobudzanie leukocytów i makrofagów związanych z guzem (LAM, TAMs) powodować może nasilenie progresji nowotworu [10].

Również w komórkach r.j.g. linii CaCo2 potwierdzono sekrecję G-CSF, co autokrynie stymuluje komórki r.j.g. do wzrostu w warunkach *in vitro*. W swoim badaniu Snehasis z zespołem za pomocą RT-PCR, SDS-PAGE elektroforezy i immunoblottingu oznaczali mRNA i ekspresję białka G-CSF [11]. Pomiar stężenia G-CSF w praktyce najczęściej jest wykonywany w surowicy krwi żyłnej chorego metodą immunoenzymatyczną ELISA.

Jednakże G-CSF jest głównie produkowany przez komórki szpiku kostnego, przewodu pokarmowego i gruczołu krokowego (komórki śródbłonna, keratynocyty i fibroblasty). Jego zwiększoną ekspresję obserwuje się w przebiegu chorób nowotworowych żołądka, płuc, sutka, gruczolakoraków jelita grubego i procesów zapalnych jelit czy żołądka [12, 13, 14].

W badaniach nad wpływem G-CSF na komórki r.j.g. Natori w swojej pracy udowadnia, że czynnik ten znacznie pobudza wszczepione podskórnie myszom komórki r.j.g. do wzrostu, najprawdopodobniej poprzez stymulację procesu angiogenezy [15].

W innym badaniu Yang wykazuje ekspresję receptorów G-CSFR w komórkach r.j.g.. W badanym materiale pochodzącym od 42 pacjentów w 31 przypadkach immunohistochemicznie potwierdzono obecność G-CSFR. Udowodniono, że w komórkach r.j.g. ekspresja G-CSFR jest wielokrotnie wyższa w porównaniu do komórek pochodzących z prawidłowej błony śluzowej jelita [16].

Badania przeprowadzone przez Liu i zespół na komórkach r.j.g. linii HT29 w odniesieniu do danych klinicznych pacjentów potwierdziły korelację pomiędzy ekspresją G-CSF a zróżnicowaniem i stopniem zaawansowania zmiany ogniskowej w jelicie, obecnością przerzutów i okresem przeżycia chorego [17].

Opisywany jest również przypadek pacjenta z rakiem żołądka, któremu towarzyszyła wybitnie wysoka leukocytoza ( $WBC\ 58000/mm^3$ ). Pobrane z materiału pooperacyjnego komórki wszczepiono myszom, u których liczba neutrofilii znacznie wzrosła, sugerując sekrecję G-CSF przez badane komórki. Badanie supernatantu z kolonii tych komórek potwierdziło obecność CSF [18].

Opis przypadku klinicznego 62-letniego chorego z pierwotnym rakiem żołądka niewydzielającym G-CSF opisał Kawaguchi. Stan pacjenta, pomimo wykonania radykalnego zabiegu, pogarszał się, leukocytoza wzrosła do  $125000/mm^3$ , Ponownie oznaczone stężenie G-CSF było podwyższone. W kontrolnym badaniu PET uwidocznił rozległy nacieki w łożu pooperacyjnej i otrzewnej, zmiany przerzutowe w wątrobie. Pacjent zmarł w 54 dobie po operacji [19].

Rak wątroby z wysoką aktywnością sekrecyjną G-CSF i leukocytozą rzędu  $19000/mm^3$  został opisany przez Aita K. jako przypadek o bardzo agresywnym przebiegu klinicznym u 74-letniego mężczyzny. Zgon nastąpił po 57 dniach od postawienia diagnozy [20].

Kolejny przypadek potwierdzający bardzo agresywny przebieg r.j.g. z towarzyszącym wysokim stężeniem G-CSF opisał Matsuda i zespół. Opisano niezwykle szybko rosnącego raka okrężnicy zstępującej u 52-letniego pacjenta, z wysoką leukocytozą  $63000/mm^3$ . Oznaczone stężenie G-CSF było wyraźnie podwyższone ( $640\ pg/ml$  przy normie  $< 18\ pg/ml$ ). Pomimo wykonanej paliatywnej operacji usunięcia guza jelita, okolicznych węzłów chłonnych i zmian przerzutowych w wątrobie stan pacjenta gwałtownie pogarszał się. Chory zmarł w 24 dobie po operacji z powodu masywnego wzrostu guza resztkowego w jelicie [21].

Podobny dramatyczny przebieg r.j.g., któremu towarzyszyło wysokie stężenie G-CSF (256 pg/ml) i leukocytoza 41000/mm<sup>3</sup> opisuje Irie z zespołem. W autopsji uwidoczono gruczolakoraka okrężnicy zstępującej, raka pęcherza moczowego, wątroby i zmiany przerzutowe w płucach [22].

Powyżej przedstawione doniesienia sugerują konieczność zwrócenia uwagi na możliwość współwystępowania wzrostu leukocytozy z nowotworem produkującym G-CSF u pacjentów onkologicznych bez ewidentnych objawów infekcji. Taki typ nowotworu charakteryzuje się bardzo inwazyjnym przebiegiem i złą prognozą dla chorego. Potwierdzenie wysokiego stężenia G-CSF powinno skłonić do zastosowania jak najwcześniej leczenia zabiegowego i włączenia agresywnej chemioterapii z uwzględnieniem ukierunkowanego działania przeciw G-CSF bez względu na stopień miejscowego zaawansowania guza.

## 5. Podsumowanie

Przypuszczalny przebieg choroby pacjenta z r.j.g. jest przeważnie określany za pomocą tradycyjnych klasyfikacji, uwzględniających ogniskowy zakres zmiany, zajęcie węzłów chłonnych i obecność przerzutów. Aczkolwiek w niektórych przypadkach obserwowany jest zupełnie zaskakujący przebieg choroby pomimo zaklasyfikowania chorych do tego samego stopnia zaawansowania klinicznego. Poszukiwanie i uwzględnienie roli nowych biomarkerów, umożliwi w większym stopniu wdrożenie zindywidualizowanej terapii, która powinna odgrywać podstawową rolę w procesie terapeutycznym.

Na podstawie opisywanych przypadków postuluje się, aby w r.j.g. o nawet niskim zaawansowaniu miejscowym, ale przebiegającym z wysoką ekspresją G-CSF stosować pooperacyjną chemioterapię lub immunoterapię skierowaną przeciw G-CSF. Badanie ekspresji mRNA G-CSF mogłoby być wykorzystywane do wczesnego wykrywania r.j.g., a na pewno do określania potencjału złośliwości nowotworu. G-CSF wydaje się być bardziej czułym i swoistym biomarkerem pomocnym w wykrywaniu przerzutów i wznowy r.j.g. w porównaniu do standardowo oznaczanych czynników CEA i CA19-9, ale wysunięcie tak daleko idącego wniosku jako pewnego dogmatu odnośnie przydatności diagnostycznej G-CSF w r.j.g. wymaga dalszej wnikliwej oceny w badaniach klinicznych na szerszej populacji pacjentów.

Z powodu intensywnego rozwoju nauk z pogranicza medycyny, biofizyki, bioinżynierii, biologii molekularnej i immunologii tak istotną jest nieustanna, skoordynowana współpraca, której efekty w coraz większym stopniu wpływają na codzienną pracę klinicystów opiekujących się pacjentem, zwiększając jej efektywność i otwierając nowe możliwości diagnostyczno-terapeutyczne.

## LITERATURA

- [1] A. Soborczyk, A. Deptała: *Markery nowotworowe w praktyce klinicznej*, Choroby Serca i Naczyń, tom 4(4), 2007, s. 184–189.
- [2] N.J. Nordenson: *Tumor markers*. *Gale Encyclopedia of Medicine*, The Gale Group, Farmington Hills 1999.
- [3] J. Chorostowska-Wynimko, M. Skroński, A. Szepechciński: *Molekularne markery prognostyczne i predykcyjne w diagnostyce niedrobnokomórkowego raka płuca*, *Onkologia Info*, tom VIII, vol. 3, 2011, s.160–167.
- [4] R. Siegel, E. Ward, O. Brawley, A. Jemal: *Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths*, *CA Cancer J Clin.*, vol. 61(4), 2011, s. 212–236.
- [5] *Global Cancer Facts and Figures 2nd Edition 2008*.
- [6] A. Śliwczyński, A. Tkacz, A. Kowalski, B. Wójcik-Klikiewicz, et al.: *Nowotwory złośliwe jelita grubego w świetle danych Narodowego Funduszu Zdrowia w latach 2006-2009*, *Nowotwory Journal of Oncology*, vol. 61(3), 2011, s. 252–261.
- [7] D.G. Ward, N. Suggett, Y. Cheng, et al.: *Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis*, *Br J Cancer*, vol. 94, 2006, s. 1898–1905.
- [8] D.Z. Chu, C.A. Erickson, M.P. Russell, et al.: *Prognostic significance of carcinoembryonic antigen in colorectal carcinoma. Serum levels before and after resection and before recurrence*, *Arch Surg*, vol. 126, 1991, s. 314–316.
- [9] C. Falandry, M. Campone, G. Cartron, D. Guerin, G. Freyer: *Trends in G-CSF use in 990 patients after EORTC and ASCO guidelines*, *Eur J Cancer*, vol. 46, 2010, s. 2389–2398.
- [10] H. Quentmeier, M. Zaborski, H.G. Drexler: *The human bladder carcinoma cell line 5637 constitutively secretes functional cytokines*, *Leuk Res*, vol. 21, 1997, s. 343–350.

- [11] J. Snehasis, P. Hitesh: *Expression of human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) in colon adenocarcinoma cell line (Caco-2)*, Biotechnol Lett, vol. 34, 2012, s. 1791–1796.
- [12] W. Yasui, N. Oue, P.P. Aung, S. Matsumura, M. Shutoh, H. Nakayama: *Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review*, Gastric Cancer, vol. 8, 2005, s. 86–94.
- [13] S. Koshida, D. Kobayashi, R. Moriai, N. Tsuji, N. Watanabe: *Specific overexpression of OLFM4(GW112/HGC-1) mRNA in colon, breast and lung cancer tissues detected using quantitative analysis*, Cancer Sci, vol. 98, 2007, s. 315–320.
- [14] N. Wentzensen, B. Wilz, P. Findeisen, et al.: *Identification of differentially expressed genes in colorectal adenoma compared to normal tissue by suppression subtractive hybridization*, Int J Oncol, vol. 24, 2004, s. 987–994.
- [15] T. Natori, M. Sata, M. Washida, Y. Hirata et al.: *G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells*, Biochem Biophys Res Commun, vol. 207, 2002, s. 1058–1061.
- [16] X. Yang, F. Liu, Z. Xu, C. Chen et al.: *Expression of granulocyte colony stimulating factor receptor in human colorectal cancer*, Postgrad Med, vol. 81, 2005, s. 333–337.
- [17] W. Liu, Y. Liu, J. Zhu, E. Wright et al.: *Reduced hGC-1 protein expression is associated with malignant progression of colon carcinoma*, Clin Cancer Res, vol. 14, 2008, s. 1041–1049.
- [18] J.M. Orenstein, A.M. Schwartz: *Small-cell undifferentiated carcinoma of the colorectum*, Ultrastruct Pathol, vol. 11, 1987, s. 781–786.
- [19] M. Kawaguchi, Y. Asada, T. Terada, A. Takehara et al.: *Aggressive recurrence of gastric cancer as a granulocyte-colony stimulating factor producing tumor*, Int J Clin Oncol, vol. 15, 2010, s. 191–195.
- [20] K. Aita, K. Seki: *Carcinosarcoma of the liver producing granulocyte-colony stimulating factor*, Pathol Int, vol. 56, 2006, s. 413–419.
- [21] A. Matsuda, K. Sasajima, T. Matsutani, H. Maruyama et al.: *Aggressive undifferentiated colon carcinoma producing granulocyte-colony stimulating factor: report of a case*, Surg Today, vol. 39, 2009, s. 990–993.
- [22] T. Irie, A. Takeda, R. Takada, Y. Saito et al.: *A case of granulocyte-colony stimulating factor-producing adenosquamous carcinoma of the liver accompanied by an adenocarcinoma of the ascending colon and urothelial carcinoma of the urinary bladder*, Nippon Shokakibyo Gakki Zasshi, vol. 108, 2011, s. 259–266.

otrzymano / submitted: 26.03.2013r.

wersja poprawiona / revised version: 09.06.2013r.

zaakceptowano / accepted: 28.09.2013r.