

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

lek. med. Magdalena Białas

**„STAN ZRÓŻNICOWANIA I TYP NACIEKANIA RAKA
ŻOŁĄDKA W POWIĄZANIU Z MUTACJAMI GENU
E-KADHERYNY W SPORADYCZNYCH RAKACH
ŻOŁĄDKA”**

PRACA DOKTORSKA

Promotor: prof. dr hab. Jerzy Stachura

Pracę wykonano w: Katedrze Patomorfologii
Wydziału Lekarskiego CM UJ
Kierownik Katedry: prof. dr hab. Jerzy Stachura

SPIS TREŚCI	STR.
Skróty i pojęcia	3
I. Wstęp	5
• Epidemiologia raka żołądka	5
• Pojęcia: „sporadyczny”, „rodzinny” oraz „dziedziczny, genetycznie uwarunkowany” rak żołądka. Kryteria amsterdamskie.	8
• Etiopatogeneza raka żołądka	11
• Najczęściej stosowane podziały i klasyfikacje raka żołądka	22
• Funkcja E-kadheryny oraz rola ECCU w progresji nowotworów	25
• Rola angiogenezy w procesie wzrostu i rozsiewu nowotworu	30
• Rola wybranych czynników regulujących proces apoptozy	31
II. Cel pracy	34
III. Materiały i metody	35
• Materiały	35
• Metody	37
I. Wyniki	50
IV. Dyskusja	71
V. Wnioski	92
VI. Streszczenie	93
II. Streszczenie (w języku angielskim)	96
III. Piśmiennictwo	98
IV. Zdjęcia	108

Skróty i pojęcia

- ◆ AI – (apoptotic index) – indeks apoptotyczny
- ◆ ang. - angiopoetyny
- ◆ APC – (*adenomatous polyposis coli gene*): gen polipowatości rodzinnej jelita grubego
- ◆ BIR - baculovirus IAP repeat
- ◆ bFGF – (basic fibroblast growth factor): czynnik wzrostu fibroblastów
- ◆ CAMs – (cell adhesion molecules): cząsteczki przylegania komórkowego
- ◆ CDH1 - (*E-cadherin gene*): gen kodujący białko E-kadherynę
- ◆ COX-2 - (cyclo-oxygenase-2): cyklooksigenaza 2
- ◆ E-cadherin – (epithelial cadherin): kadheryna obecna w tkankach nabłonkowych
- ◆ EBV – wirus Epsteina –Barra
- ◆ ECCU – (E-cadherin-catenin unit): układ kadherynowo-kateninowy
- ◆ EGFR – (epidermal growth factor receptor): receptor dla nabłonkowego czynnika wzrostu
- ◆ FAP – (familial adenomatous polyposis): rodzinna polipowatość jelita grubego
- ◆ FDGC – (familial diffuse gastric cancer): rodzinny rozlany rak żołądka
- ◆ FIGC – (familial intestinal gastric cancer): rak żołądka typu jelitowego występujący rodzinnie
- ◆ GIST – (gastrointestinal stromal tumor): guz stromalny przewodu pokarmowego
- ◆ GSK-3 β - (glycogen-synthetase kinase 3 β): kinaza syntetazy glikogenu 3 β
- ◆ HDGC syndrom – (hereditary diffuse gastric cancer syndrom): zespół dziedzicznego, rozlanego raka żołądka
- ◆ H-E - barwienie metodą hematoksylina-eozyna
- ◆ HGFR – (hepatocyte growth factor receptor): receptor dla czynnika wzrostu hepatocytów
- ◆ HIGC syndrom – (hereditary intestinal gastric cancer syndrom): zespół dziedzicznego, jelitowego raka żołądka
- ◆ HNPCC – (hereditary non-polyposis colon cancer): dziedziczny rak jelita grubego nie powstający na podłożu polipowatości jelita
- ◆ Hp – bakteria *Helicobacter pylori*
- ◆ IAP family – (inhibitor of apoptosis family): rodzina białek będących inhibitorami procesu apoptozy
- ◆ IGCLC - the International Gastric Cancer Linkage Consortium
- ◆ IL-8 - interleukina 8
- ◆ MMP 7 – metaloproteinaza 7
- ◆ MSI – (microsatellite instability): zjawisko niestabilności mikrosatelitarnego DNA
- ◆ MSP-SSCP – (methylation-specific PCR-SSCP): wykrywająca metylację reakcja PCR-SSCP
- ◆ PCR – (polymerase chain reaction): reakcja łańcuchowa katalizowana przez polimerazę
- ◆ PJS1 – (*Peutz - Jeghers syndrom gene*): gen związany z zespołem Peutz – Jeghers'a
- ◆ pow. - powiększenie
- ◆ p120 – podobne do katenin białko 120
- ◆ RER – (replication error): błąd powstający podczas replikacji
- ◆ rtPCR – (reverse transcription polymerase chain reaction): odwrotna reakcja łańcuchowa katalizowana przez polimerazę
- ◆ SCID mouse – (severe combined immunodeficiency mouse): mysz wykazująca nasilony, złożony niedobór odporności
- ◆ SNH klasyfikacja - (S-site, N-nodes, H- histopathology): kliniczno- patologiczna klasyfikacja raków żołądka

- ◆ SSCP – (single-strand conformation polymorphism): konformacyjny polimorfizm pojedynczych nici
- ◆ wsp. - współpracownicy
- ◆ TGF β - (transforming growth factor β): transformujący czynnik wzrostu β
- ◆ TNM – T- (primary tumor): cecha określająca głębokość nacieku raka, N- (regional lymph nodes): liczba przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych, M- (metastases): obecność lub brak przerzutów odległych
- ◆ VEGFs – (vascular endothelial growth factors): czynniki wzrostu śródbłonnków naczyniowych
- ◆ VEGFRs – (vascular endothelial growth factor receptors): receptory dla czynników wzrostu śródbłonnków

I. Wstęp

Nowotwory pierwotne żołądka mogą mieć charakter łagodny lub złośliwy, przy czym rozrosty łagodne są dużo rzadsze i stanowią jedynie około 5% z ogólnej liczby zmian nowotworowych w tym narządzie. Pozostałe 95% to rozrosty złośliwe. [1] W grupie nowotworów złośliwych żołądka ponad 90% stanowią te wywodzące się z nabłonka błony śluzowej żołądka, czyli raki (*carcinoma ventriculi*), wśród których zdecydowanie dominują raki typu gruczołowego (*adenocarcinoma*). [1,2] Poza rakami do częstszych, złośliwych nowotworów tego narządu należą: chłoniaki (*lymphoma ventriculi*) – 4%, rakowiaki (*carcinoid*) – 3%, oraz mięsaki (*sarcoma*) – 2%. [3] Odrębną grupę zmian stanowią w żołądku tzw. guzy stromalne (GIST), wśród których spotkać można zarówno nowotwory o łagodnym przebiegu klinicznym, zmiany o nieokreślonym potencjale złośliwości jak i nowotwory złośliwe. [4,5]

- Epidemiologia raka żołądka

Rak żołądka jest chorobą występującą na całym świecie. [3] Pod koniec lat 90-tych dwudziestego wieku był on drugim pod względem częstości rakiem rozpoznawanym wśród ludności świata. [6]. Jednakże częstość jego występowania na świecie nie jest stała i zmienia się w zależności od rejonu geograficznego. Różnice w częstości występowania raka żołądka pomiędzy krajami o najwyższej i najniższej zachorowalności sięgają kilkunastu razy. Najniższa zachorowalność, a co za tym idzie najniższa chorobowość na raka żołądka występuje obecnie w wysokorozwiniętych krajach Europy Zachodniej (za wyjątkiem Portugalii), w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie i Australii, a także wielu krajach Afryki. [7] Współczynnik zachorowalności dla tych rejonów wynosi 5 – 10,8 przypadków na 100 tys. mieszkańców. [8,9] Obszarami o najwyższej zachorowalności na raka żołądka są: Japonia, Korea, Chiny oraz kraje Ameryki Środkowej i Południowej (np. Chile, Kolumbia) – współczynnik zachorowalności wynosi tam 49,1 – 77, 9 przypadków na 100 tys. mieszkańców. [6] Wysoka zachorowalność panuje także w Rosji i niektórych krajach Europy Wschodniej (np. Jugosławii), a także w Portugalii i Finlandii – 45, 5 przypadków na 100 tys. mieszkańców.

Polska należy do krajów o pośredniej zachorowalności na raka żołądka. Według danych epidemiologicznych z 1999 roku rak żołądka w Polsce wśród mężczyzn plasował się na miejscu czwartym (po raku oskrzela, jelita grubego i prostaty), a wśród kobiet na miejscu siódmym (po rakach sutka, jelita grubego, płuca, szyjki macicy, trzonu macicy i jajnika). Standaryzowane współczynniki zapadalności na raka żołądka z roku 1999 dla mężczyzn i kobiet wynosiły

odpowiednio: 15,3 oraz 5,8 na 100 tyś. mieszkańców. [10] Były one nieco niższe od współczynników obliczonych w roku 1996, które wynosiły: 18,2 i 8,4 na 100 tyś. mieszkańców. [11] W liczbach bezwzględnych na raka żołądka zachorowało w 1999 roku około 3600 mężczyzn i 2030 kobiet. Kompletność rejestracji zachorowań na nowotwory złośliwe w Polsce w 1999 roku oceniono na 86%. [10] Obserwuje się wahania częstości występowania raka żołądka w obrębie poszczególnych krajów, jednak różnice te są znacząco niższe niż pomiędzy różnymi krajami i regionami geograficznymi świata. W Polsce mapy zachorowalności na raka żołądka wśród mężczyzn i kobiet różnią się. Obszarami o najwyższej zachorowalności na raka żołądka wśród mężczyzn jest środkowy pas kraju biegnący z północy na południe wzdłuż Wisły (z maksymalnymi wartościami współczynnika zachorowalności w woj. wrocławskim i elbląskim). Najwyższa zachorowalność na raka żołądka wśród kobiet panuje w woj. toruńskim oraz na południowo-wschodnich krańcach Polski. [11]

Od początku lat czterdziestych w większości krajów świata obserwuje się stałą tendencję spadkową dotyczącą tak współczynników zachorowalności na raka żołądka, [6,7,12] jak i współczynników umieralności. [7,12-15] W krajach, gdzie ten spadek jest najszybszy (Stany Zjednoczone, Szwajcaria) zanotowano zmniejszenie ilości noworozpoznawanych przypadków raka żołądka nawet o kilkadziesiąt procent w ciągu jednej generacji. [9] Zauważono, iż spadek liczby zachorowań na raka żołądka związany jest przede wszystkim ze spadkiem częstości występowania raków typu jelitowego, podczas gdy ilość raków typu rozlanego utrzymuje się praktycznie na stałym poziomie, lub wg innych autorów nieznacznie rośnie. [9,13,16] Pomimo tendencji spadkowej rak żołądka ciągle pozostaje jednym z najczęściej rozpoznawanych nowotworów złośliwych człowieka – w 1990 roku odnotowano w skali światowej około 800 000 nowych zachorowań. [6] Liczby bezwzględne opisujące ilość wszystkich rozpoznawanych na świecie raków żołądka nieznacznie zwiększają się – wynika to z przyrostu bezwzględnej liczby ludności świata oraz ze starzenia się części społeczeństw. [6]

Także i w Polsce na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat obserwujemy tendencję do zmniejszania się ogólnej liczby zachorowań na raka żołądka. [10,11,17] Odnotowywany w naszym kraju spadek jest znacznie wolniejszy niż w wysokorozwiniętych krajach Europy Zachodniej. [11] Poza spadkiem liczby zachorowań na raka żołądka, tak w Polsce jak i na świecie, obserwujemy również tendencję do zwiększania się częstości występowania raka typu rozlanego, a zmniejszania raka typu jelitowego. [16,18,19] Na obszarach o wysokiej częstości występowania raka żołądka zdecydowanie dominują raki typu jelitowego i obserwowane zmniejszenie liczby zachorowań wiąże się właśnie ze spadkiem liczby raków tego typu, podczas gdy liczba raków typu rozlanego pozostaje

mniej więcej stała. Na obszarach o niskiej zachorowalności różnice te zacierają się, albo wręcz obserwuje się niewielką dominację raków typu rozlanego. [13]

Na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci nastąpiły także zmiany jeśli chodzi o lokalizację raka w stosunku do ścian i krzywizn żołądka. Obserwujemy zmniejszanie się liczby przypadków raka zlokalizowanego w okolicy odźwiernika przy coraz częstszym występowaniu zmian w części okołowpustowej. [18-20]

Rak żołądka jest chorobą ludzi starszych, najliczniejszą grupę chorych stanowią ludzie powyżej 60 roku życia. [2,9] W tej grupie wiekowej około 2-2,5 razy częściej chorują mężczyźni. [8,11,21] Średni wiek mężczyzn, w którym dochodzi do rozpoznania raka żołądka wynosi około 65 lat, dla kobiet jest on o 5-7 lat wyższy. Wzrost częstości występowania raka żołądka wraz z wiekiem widoczny jest przede wszystkim dla raków typu jelitowego, podczas gdy wzrost częstości występowania raka typu rozlanego wraz z wiekiem jest znacznie słabiej wyrażony. [22] Raki żołądka u ludzi przed czterdziestym rokiem życia zdarzają się rzadko i stanowią poniżej 5% (wg niektórych autorów poniżej 2%) wszystkich przypadków raka tego narządu. [23] Raki żołądka zdiagnozowane przed 50-tym rokiem życia określamy mianem raków o wczesnym początku. [24] Wśród ludzi młodych (poniżej 40 roku życia) dominują raki typu rozlanego zajmujące rozległe obszary ściany żołądka i rokujące wyjątkowo niekorzystnie. [23] W tej grupie wiekowej obserwujemy odwrócenie procentowego udziału płci wśród chorych – stosunek mężczyzn do kobiet wynosi poniżej jedności. [8,11,23] Około 40 roku życia proporcja chorych na raka mężczyzn do kobiet zaczyna przekraczać jeden, a w dalszych grupach wiekowych zaznacza się coraz większy procentowy udział mężczyzn. Pojawienie się raka u osoby młodej sugeruje możliwość występowania u danego pacjenta (a czasem i w rodzinie danego pacjenta) genetycznie uwarunkowanych predyspozycji sprzyjających rozwojowi nowotworów. Rak żołądka u dzieci jest chorobą niezwykle rzadką – pojedyncze opisane w literaturze przypadki były rakami typu rozlanego wg Laurena. [25]

Rokowanie u pacjentów z rakiem żołądka zależy przede wszystkim od stopnia zaawansowania procesu w momencie diagnozy i operacji. [26] Przypadki raka wczesnego: ograniczonego do błony śluzowej, bądź błony śluzowej i podśluzowej rokują bardzo dobrze – wykonanie radykalnego zabiegu operacyjnego gwarantuje, w zależności od stanu węzłów chłonnych 85-93% 5-cio letnie przeżycia. [2,27,28] Rak zaawansowany (wykraczający poza błonę podśluzową) rokuje bardzo źle. Pomimo udoskonalenia techniki operacyjnej i wprowadzenia metody całkowitej gastrektomii, która poprawiła wyniki leczenia, 5-cio letnie przeżycia wśród pacjentów poddanych „potencjalnie leczniczemu” zabiegowi operacyjnemu wynoszą 10-15%. [2,26] Dodatkowo u znacznego procenta pacjentów już w momencie diagnozy proces jest rozsiany i wykonanie radykalnego, leczniczego

zabiegu nie jest możliwe. [29] Dlatego całkowite 5-cio letnie przeżycia liczone dla całej grupy chorych na zaawansowanego raka żołądka nie przekraczają 5%. [26]

Na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci (1963-1999) obserwujemy także powolny spadek umieralności z powodu raka żołądka, tak wśród mężczyzn, jak i wśród kobiet, przy czym spadek ten w grupie mężczyzn jest wolniejszy niż w grupie kobiet. [10,30] Jeszcze na początku dwudziestego wieku rak żołądka był najczęstszym powodem śmierci z przyczyn nowotworowych wśród ludności Europy Zachodniej i Ameryki. [12] W Polsce jeszcze w latach sześćdziesiątych rak żołądka był pierwszą przyczyną zgonów z przyczyn nowotworowych, odpowiadając za ponad jedną trzecią zgonów nowotworowych wśród mężczyzn (33%) i około jedną piątą (21%) wśród kobiet. [11,17] Obecnie wśród zgonów z przyczyn nowotworowych rak żołądka plasuje się na drugim miejscu w populacji mężczyzn (po zgonach z powodu raka oskrzela) i 4 miejscu wśród kobiet (po zgonach z powodu raka sutka, płuca, jelita grubego). Pod koniec lat dziewięćdziesiątych rak żołądka był powodem około 8,5% zgonów z przyczyn nowotworowych wśród mężczyzn (standaryzowany współczynnik umieralności wynosił w 1999 roku 16,5/100tyś mieszkańców) oraz około 6% zgonów z przyczyn nowotworowych wśród kobiet (standaryzowany współczynnik umieralności wynosił 5,7/100tyś). [10] W liczbach bezwzględnych odpowiadało to około 4400 zgonom/rok wśród mężczyzn i około 2400 zgonom/rok wśród kobiet. [17] W analogicznym okresie czasu w Stanach Zjednoczonych rak żołądka odpowiadał za 2,5% zgonów z przyczyn nowotworowych. [1,3] Współczynniki umieralności z powodu raka żołądka w Polsce są podobne jak w pozostałych krajach Europy Środkowej. Wskaźnik miasto/wieś dla standaryzowanych współczynników umieralności na nowotwory złośliwe żołądka zbliżył się na początku lat dziewięćdziesiątych do jedności (wskaźnik M/W dla mężczyzn i kobiet wynosi 0.95) [17], podczas gdy w latach siedemdziesiątych dominowały zgony w populacji wiejskiej. [11]

- Pojęcia: „sporadyczny”, „rodzinny” oraz „dziedziczny, genetycznie uwarunkowany” rak żołądka. Kryteria amsterdamskie.

Znakomita większość nowotworów człowieka, w tym także raków żołądka, to nowotwory występujące sporadycznie. *Raki sporadyczne* rozwijają się jako efekt kumulowania się kolejnych, nieletalnych mutacji pojawiających się za życia komórki po zakończeniu rozwoju embriogenetycznego danego osobnika. Mutacje te nie są obecne w komórkach zarodkowych u danego pacjenta oraz w komórkach prawidłowej błony śluzowej żołądka poza naciekiem raka. Nabyte za życia mutacje, których nie udało się naprawić przy pomocy obecnych w komórce

mechanizmów naprawczych, a zarazem takie, które nie spowodowały śmierci komórki utrwalają się podczas kolejnych podziałów komórkowych i w sprzyjających warunkach mogą, choć nie muszą, zapoczątkować proces karcinogenezy. *Raki sporadyczne* żołądka stanowią ponad 90% wszystkich raków w tym narządzie. Występują one zazwyczaj u pojedynczych członków danej rodziny i typowo rozpoznawane są po szóstej dekadzie życia.

Niekiedy rak żołądka rozwija się u więcej niż jednego członka danej rodziny – mówimy wtedy o *rodzinnym występowaniu* raka żołądka. Przypuszcza się, iż pomiędzy 5 a 10 % raków żołądka występuje rodzinnie. [15,24,31] Większość przypadków raków żołądka występujących rodzinnie wynika z narażenia danej rodziny na wpływy tych samych czynników środowiskowych (w tym także obecności infekcji *H. pylori* wśród jej członków), z podobnych zwyczajów kulturowych, żywieniowych oraz podobnych tradycji. [8,24] Po zmianie nawyków żywieniowych czy sposobu życia następuje zmiana w częstości występowania tego nowotworu w danej rodzinie.

Jednak około jedna trzecia (2-3%) przypadków raków żołądka występujących rodzinnie to raki *dziedziczne, uwarunkowane genetycznie*. [24,32] W takich przypadkach u członków danej rodziny przekazywana jest z pokolenia na pokolenie mutacja dotycząca któregoś z genów kluczowych dla procesu karcinogenezy. Mutacja taka obecna jest we wszystkich komórkach u danego osobnika, także komórkach zarodkowych i nosi nazwę mutacji germinalnej. Nowotwór rozwijający się u takiej osoby określamy mianem *nowotworu występującego rodzinnie, uwarunkowanego genetycznie, związanego z obecnością germinalnej mutacji w konkretnym genie* (w skrócie: *nowotwór germinalny= zarodkowy*). W przypadku raka żołądka najlepiej poznanym przykładem jest nazwany i opisany w 1999 roku przez Guilforda i wsp. zespół dziedzicznego, rozlanego raka żołądka (HDGC syndrom – hereditary diffuse gastric cancer syndrom) [33], w którym u około 25-30% pacjentów stwierdzamy obecność zarodkowej mutacji dotyczącej genu *CDH1* (*E-cadherin gene*) kodującego białko E-kadherynę [34,35]. W rodzinach obarczonych germinalną mutacją obecną w którymś z kluczowych dla procesu karcinogenezy genie obserwuje się wyższe od populacyjnego ryzyko wystąpienia procesu nowotworzenia - u członków danej rodziny może rozwijać się jeden rodzaj nowotworu o typowej lokalizacji lub cała gama różnych nowotworów w wielu miejscach. Nowotwory zarodkowe pojawiają się zazwyczaj u ludzi młodszych niż przypadki sporadyczne tych samych nowotworów oraz mogą występować w formie mnogiej u jednego pacjenta. [28,36,37]

Nie ma jednoznacznych i sztywnych kryteriów klinicznych pozwalających na zakwalifikowanie danej rodziny, w której wystąpiły mnogie raki żołądka o rozlanym typie wzrostu jako rodziny z zespołem HDGC. Kryteria te są ciągle dyskutowane i modyfikowane. W roku 1991 opracowano kryteria służące wyodrębnieniu rodzin, w których z dużym prawdopodobieństwem mamy do

czynienia z narażeniem na występowanie uwarunkowanych genetycznie raków jelita grubego (tzw. zespołu HNPCC- hereditary non-polyposis colon cancer), nazwane „kryteriami amsterdamskimi” [38]. Kryteria te zyskały ogólną akceptację i posłużyły także do definiowania innych, genetycznie uwarunkowanych i występujących rodzinnie zespołów nowotworzenia o autosomalnie dominującym sposobie dziedziczenia, w tym także zespołu HDGC. Zgodnie z tzw. „kryteriami amsterdamskimi” rodzina, w której występują mnogie raki żołądka może zostać zakwalifikowana jako rodzina z zespołem HDGC, jeśli spełnia następujące kryteria:

- rak żołądka wystąpił u przynajmniej trzech krewnych w danej rodzinie, przy czym jeden z chorych ma być krewnym pierwszego stopnia dwu pozostałych
- chorzy w danej rodzinie należą przynajmniej do dwu następujących po sobie generacji
- u przynajmniej jednego chorego rak żołądka został rozpoznany przed 50 rokiem życia

Powyższe kryteria są bardzo ostre. Spełnienie wszystkich trzech daje bardzo wysokie prawdopodobieństwo obecności podłoża genetycznego dla powstających w danej rodzinie nowotworów, jednak wg Shinmura i wsp. [39] jedynie 0,9% przypadków raków żołądka spośród 3632 przebadanych przez autorów spełniało równocześnie wszystkie powyższe kryteria. Można więc przypuszczać, iż przy tak ostrych wytycznych pewien procent rodzin z uwarunkowanym genetycznie, dziedzicznym podłożem rozwoju raka żołądka jest pomijany. Dlatego w roku 1999 IGCLC (the International Gastric Cancer Linkage Consortium) złagodziło kryteria, jakie powinna spełniać rodzina, aby z klinicznego punktu widzenia podejrzewać w niej wystąpienie zespołu HDGC. [40] Zgodnie ze złagodzonymi przez IGCLC kryteriami obecnie przyjmujemy następujące wytyczne:

- dwa lub więcej potwierdzonych badaniem histologicznym przypadków raka żołądka o rozlanym typie wzrostu u krewnych pierwszego bądź drugiego stopnia, z których przynajmniej jeden został zdiagnozowany przed pięćdziesiątym rokiem życia lub
- trzy lub więcej potwierdzonych badaniem histologicznym przypadków raka żołądka o rozlanym typie wzrostu u krewnych pierwszego bądź drugiego stopnia, bez względu na wiek pacjentów, w którym postawiono rozpoznanie

Yabuta i wsp. [41] analizowali rodziny, w których występowała kumulacja przypadków raków żołądka: 12% z nich (2/17) spełniało złagodzone kryteria ustalone przez IGCLC, konieczne do rozpoznania zespołu HDGC. Rodziny, w których wystąpiło kilka przypadków raka żołądka o rozlanym typie wzrostu, jednak które nie spełniają kryteriów pozwalających na rozpoznanie zespołu HDGC zostały nazwane rodzinami z rodzinnym rozlanym rakiem żołądka (FDGC). [24]

Nie zawsze dysponujemy wystarczającymi danymi klinicznymi dotyczącymi członków rodziny chorego. W takiej sytuacji można stosować tzw. kryteria minimalne pozwalające z dużym prawdopodobieństwem zidentyfikować chorych i rodziny, w których rak żołądka jest najprawdopodobniej związany z dziedzicznymi predyspozycjami genetycznymi. [42]

Rzadziej mamy do czynienia z uwarunkowanym genetycznie zespołem rodzinnego raka żołądka typu jelitowego - HIGC. W przypadku zespołu HIGC nie zidentyfikowano jak do tej pory genu odpowiadającego za rozwój tego konkretnego nowotworu. Definicja zespołu HIGC zależy od częstości, z jaką rak żołądka występuje w danej populacji. Dla krajów o wysokiej zapadalności na raka żołądka, jak np. Japonii, do rozpoznania zespołu HIGC muszą zostać spełnione tzw. kryteria amsterdamskie. [24,38] W krajach o niskiej zapadalności, np. USA, Wielkiej Brytanii wystarczy spełnienie złagodzonych kryteriów wg Caldas w stosunku do raków typu jelitowego. [40]

- Etiopatogeneza raka żołądka

Rak żołądka jest chorobą o złożonej i zdecydowanie wieloczynnikowej etiologii. W jego rozwoju bierze udział cały szereg lepiej i gorzej poznanych czynników tak zewnętrznych jak i wewnętrznych. [43] Czynniki zewnętrzne, przede wszystkim ogólnie rozumiane przyzwyczajenia dietetyczne oraz infekcja drobnoustrojem *Helicobacter pylori* odgrywają pierwszoplanową rolę w rozwoju znacznej części raków żołądka, zwłaszcza na terenach o najwyższej na niego zapadalności. [1] Wpływ tych czynników zaznacza się szczególnie mocno w odniesieniu do raka typu jelitowego, występującego u starszych osób, częściej w dystalnej części żołądka. [6] Specyficzne zwyczaje kulturowe, przyzwyczajenia żywieniowe oraz rozpowszechnienie infekcji *Helicobacter pylori* są niekwestionowanymi, najlepiej poznanymi i równocześnie najbardziej ze sobą powiązаныmi czynnikami biorącymi udział w rozwoju raka żołądka. Powyższe czynniki występują często wspólnie na danym obszarze, nasilając i wzajemnie modyfikując swoje oddziaływanie. Tak więc raki powstające jako konsekwencja narażenia na niekorzystne wpływy czynników środowiskowych (zewnętrznych) wynikają z wieloletniego kumulowania się efektów wielu powiązanych, niekorzystnych oddziaływań. Powyższe czynniki działając pojedynczo najprawdopodobniej w wielu przypadkach nie byłyby w stanie doprowadzić do rozwoju raka żołądka.

Czynniki wewnętrzne predysponujące do rozwoju raka żołądka to szeroko rozumiane mechanizmy i uwarunkowania genetyczne, mogące w sprzyjających warunkach stanowić podłoże dla procesu nowotworzenia w żołądku. Specyficzne uwarunkowania genetyczne odgrywają pierwszoplanową rolę w rozwoju raków typu rozlanego, występujących u młodych chorych, często powstających w części proksymalnej żołądka i pojawiających się rodzinnie. Niektóre opisywane zmiany genetyczne

zwiększają ryzyko rozwoju wielu chorób – nowotworowych i nienowotworowych u danego człowieka, inne jak np. germinalna mutacja w genie E-kadheryny zdają się predysponować do powstania u nosiciela raka, najczęściej żołądka, charakterystycznie o rozlanym typie wzrostu.

Różnorodność, złożoność i wzajemne przenikanie się wpływów mogących prowadzić do rozwoju raka żołądka utrudnia, a często wręcz uniemożliwia opisanie każdego z czynników predysponujących z osobna. Elementem dodatkowo utrudniającym dokładne określenia czynników biorących udział w patogenezie raka żołądka jest fakt, iż w różnych rejonach świata pierwszoplanową rolę odgrywają różne czynniki zewnętrzne. Na nie dodatkowo nakłada się jeszcze wpływ występujących indywidualnie w niektórych rodzinach czynników wewnętrznych.

1. Czynniki środowiskowe w patogenezie raka żołądka

Dieta: tradycyjnie uważa się, iż nawyki żywieniowe, to znaczy rodzaj spożywanych pokarmów, dostępność do pewnych grup środków spożywczych oraz sposób przygotowywania, przechowywania i konserwowania pokarmów mogą odgrywać najważniejszą rolę w rozwoju raka żołądka, [13,44] zwłaszcza na obszarach o najwyższej na niego zachorowalności i w odniesieniu do raka typu jelitowego. [6] Nie udało się znaleźć pojedynczego produktu spożywanego przez ludność we wszystkich krajach o wysokiej zapadalności na raka żołądka, któremu można by przypisać pierwszoplanową rolę w rozwoju tego nowotworu. Wymienia się wiele grup produktów, które w różny sposób powiązane są z rozwojem raka żołądka.

- spożywanie świeżych warzyw i owoców

Na większości obszarów o podniesionej zapadalności na raka żołądka (Japonia, Chiny, Korea) spożycie świeżych warzyw i owoców, z przyczyn ekonomicznych bądź kulturowych jest niskie i nieregularne: spadek w okresie zimowo-wiosennym i tylko niewielki wzrost w okresie letnio-jesiennym. [13] Spożywanie dużej ilości świeżych warzyw i owoców odgrywa ochronną rolę w rozwoju przewlekłego zanikowego zapalenia żołądka [45] oraz koreluje ze zmniejszoną zapadalnością na raka tego narządu. [46] Najprawdopodobniej także spożywanie czosnku i cebuli zmniejsza ryzyko zachorowania. Rolę ochronną w procesie karcinogenezy przypisuje się antyoksydantom zawartym w świeżych owocach: głównie witaminie C oraz niektórym składnikom obecnym w świeżych czerwonych, zielonych i żółtych warzywach, takim jak karoten czy tokoferol. [3] Poza wyżej wymienionymi związkami korzystny wpływ ma również kwas foliowy zawarty w świeżych produktach roślinnych. Gotowanie warzyw zmniejsza ich ochronną rolę.

- dieta bogata w sól

Elementem diety związanym z rozwojem raka żołądka jest wysokie spożycie soli, a zwłaszcza produktów spożywczych (np. ryb i mięsa) konserwowanych przy użyciu soli lub specjalnych marynat zawierających duże jej stężenie. [44,47] Wysokie stężenie soli w żołądku bezpośrednio uszkadza błonę śluzową doprowadzając do nadmiernego złuszczenia nabłonka powierzchni z następową przyspieszoną regeneracją. Dodatkowo potęguje ono niekorzystne efekty działania pochodnych azotanów. Do produktów bogatych równocześnie w sól i azotany zaliczyć można: marynowane produkty mięsne i warzywne, suszone ryby, szynki, bekon oraz wędzone mięsa. Podczas wędzenia dodatkowo powstają policykliczne, aromatyczne węglowodory zaliczane do karcinogenów żołądkowych. [48] W Japonii, jednym z krajów o najwyższej zapadalności na raka żołądka, spożywa się znaczne ilości produktów marynowanych w specjalnych zalewach o wysokim stężeniu soli. Równocześnie jednak spożycie świeżych warzyw i owoców w Japonii jest niskie. [13] Innym elementem diety mogącym predysponować do rozwoju raka żołądka w Japonii jest wysokie spożycie sosu sojowego – poza innymi składnikami także bogatego w sól. W warunkach eksperymentalnych udało się wywołać u szczurów karmionych dietą bogatą w sól raka gruczołowego żołądka. [49] W rejonach świata, gdzie spożywa się duże ilości konserwowanej żywności zawierającej wysokie stężenia soli oraz azotanów najczęściej równocześnie stwierdza się ograniczony dostęp do świeżych produktów owocowo-warzywnych, dlatego trudno jest opisać wpływ każdego z powyższych czynników oddzielnie. Należy przyjąć, iż działając wspólnie potęgują one wzajemnie swoje niekorzystne oddziaływanie.

Ukazały się jednak także pojedyncze prace, w których nie znaleziono związku pomiędzy rozwojem raka żołądka i spożywaniem pokarmów o dużej zawartości soli. [50]

- dieta bogata w azotany

Czynnikiem wiążącym się z podniesieniem ryzyka rozwoju raka żołądka jest wzmożona produkcja nitrozamin – potencjalnych karcinogenów - z pochodnych azotanów obecnych w jamie ustnej w ślinie oraz w żołądku. [51] Pewna część azotanów obecnych w organizmie człowieka pochodzi ze spożywanych produktów roślinnych, w przeważającej mierze ze świeżych warzyw, szczególnie tych nadmiernie nawożonych. Kolejnym źródłem azotanów są środki konserwujące używane w przetwórstwie spożywczym do konserwacji mięsa oraz ryb. Dalsza część azotanów może dostać się do organizmu człowieka wraz z zanieczyszczoną wodą pitną. Występująca w Polsce aż do lat 60-tych przewaga zachorowań na raka żołądka na terenach wiejskich wynikała częściowo z zanieczyszczenia studziennej wody pitnej przez azotany. W niektórych krajach Ameryki Południowej np. w Kolumbii zauważono, iż w tych rejonach kraju, gdzie zapadalność na raka żołądka jest znacząco wyższa, stężenie azotanów w wodzie pitnej używanej przez tamtejszą ludność jest większe, niż w wodzie pitnej na terenach o niższej zapadalności na raka żołądka.[52]

Część azotanów dostająca się do przewodu pokarmowego człowieka jest wydalana z moczem w formie niezmienionej, reszta jest wtórnie absorbowana, a następnie wydzielana do śliny. Podczas kontaktu z bakteriami obecnymi w jamie ustnej i żołądka azotany są redukowane do azotynów [45], a te w kontakcie z niektórymi składnikami pożywienia mogą być przekształcane w nitrozaminy - potencjalne karcinogeny uszkadzające kwasy nukleinowe dzięki silnym własnościom alkilującym. W warunkach prawidłowych w ślinie człowieka znajdują się niewielkie ilości zarówno azotanów jak i azotynów. Także w żołądku obecna jest niewielka ilość azotanów – ów niski poziom utrzymywany jest dzięki niskiemu pH soku żołądkowego. W miarę wzrostu pH soku żołądkowego wzrasta w żołądku ilość bakterii mogących redukować azotany do azotynów. [53] U ludzi, u których doszło do wzrostu pH soku żołądkowego np. w przebiegu zanikowego zapalenia błony śluzowej żołądka lub w trakcie leczenia lekami zmniejszającymi wydzielanie kwasu solnego dochodzi do przyspieszenia przemiany azotanów w azotyny [13], i w konsekwencji do podniesienia poziomu tych ostatnich w żołądku. Dodatkowo pewna ilość azotanów i azotynów jest wytwarzana przez makrofagi obecne w ścianie żołądka w przebiegu przewlekłego zapalenia. [45] Tak więc poziom azotynów w żołądku zależy od ilości azotanów spożywanych w diecie, który warunkuje zawartość azotanów w ślinie oraz od tempa przemiany azotanów w azotyny w żołądku. [43] Część witamin, np. witamina C i E utrudniają proces dalszej przemiany azotynów do karcinogennych nitrozamin. [13] Niskie spożywanie świeżych owoców bogatych w witaminy na terenach o dużej zawartości azotanów w diecie potęgują wzajemnie swoje niekorzystne oddziaływania i sprzyjają rozwojowi raka żołądka. Wysoki poziom nitrozamin w soku żołądkowym występuje u osób z rakiem żołądka, anemią złośliwą i u pacjentów po częściowej gastrektomii.

W żołądku powstają również niewielkie ilości nitrozamidów. Także i one uważane są za karcinogeny żołądkowe. Są to związki nietrwałe, których poziom nie zależy od zawartości azotanów w diecie. Odgrywają one mniejszą niż nitrozaminy rolę w karcinogenezie żołądkowej.

- dieta bogata w węglowodany

W niektórych regionach o wysokiej zapadalności na raka żołądka w diecie ludności dominują węglowodany: ziemniaki, niektóre rośliny strączkowe, produkty mączne. Równocześnie jednak na wielu obszarach dieta bogata w węglowodany pokrywa się z wysokim spożyciem soli i niskim spożyciem świeżych warzyw i owoców. Na części terenów o najwyższej zapadalności na raka żołądka, gdzie w diecie ludności dominują produkty mączne stwierdzono dodatkowo zanieczyszczenie nieprawidłowo przechowywanych ziaren zbóż przez sporysz. Trudno więc jednoznacznie stwierdzić, który z tych czynników odgrywa tu pierwszoplanową rolę, najprawdopodobniej istotne jest współdziałanie wszystkich wyżej wymienionych.

Spadek częstości występowania raka żołądka w USA i wysoko rozwiniętych krajach Europy Zachodniej wynika zapewne w dużej mierze z podniesienia poziomu życia i ogólnie rozumianej zmiany przyzwyczajzeń żywieniowych ludności [6], a w tym przede wszystkim z szerokiego dostępu do świeżych warzyw i owoców (także cytrusowych bogatych w witaminę C) przez cały rok oraz ze zmiany sposobu przechowywania żywności. [54] Zamiast marynowania i wędzenia w wysoko rozwiniętych krajach Europy Zachodniej oraz Ameryce podstawowym sposobem konserwowania żywności jest dziś mrożenie. Rezygnacja z marynowania i wędzenia spowodowała ograniczenie spożycia środków potencjalnie mutagennych takich jak sól, azotany i aromatyczne węglowodory, a równocześnie umożliwiła zachowanie większej ilości cennych elementów (witamin, antyoksydantów) w tak przechowywanych produktach. Równocześnie zmniejszanie się liczby nowych przypadków raka żołądka, zwłaszcza tych poza wpustem, może mieć związek z malejącą częstością infekcji bakterią *Helicobacter pylori*. [12]

Infekcja drobnoustrojem *Helicobacter pylori* a rak żołądka

Helicobacter pylori (*H. pylori*) jest bakterią ponownie odkrytą przeszło dwadzieścia lat temu w śluzie obecnym na powierzchni błony śluzowej żołądka [55], początkowo nazwaną: *Campylobacter pylori*. Pierwsze opisy prawdopodobnie tej samej bakterii pochodzą z końca XIX wieku. Zakażenie *H. pylori* trwa latami, zwykle nie ulega samowyleczeniu [56] i prowadzi do rozwoju przewlekłego, aktywnego, z czasem zanikowego zapalenia błony śluzowej żołądka, [57] uważanego za stan przednowotworowy. Infekcja tym drobnoustrojem łączy się z częstszym występowaniem choroby wrzodowej dwunastnicy, raka żołądka poza wpustem i B-komórkowych chłoniaków żołądka. [55,58] Równocześnie skolonizowanie żołądka przez bakterie *H.pylori* jest czynnikiem protekcyjnym w rozwoju refluksu przełykowo-żołądkowego i raka gruczołowego przełyku oraz wpustu. [56]

Ryzyko rozwoju raka w dalszej części żołądka u osoby zainfekowanej szczepami *H. pylori* jest od trzech [59] do sześciu [60] razy większe od populacyjnego i jest tym wyższe, im wcześniej doszło do infekcji. Uważa się, iż potrzeba kilkunastu do kilkudziesięciu lat, aby na podłożu zmian powodowanych przez *H. pylori* doszło do rozwoju raka żołądka, dlatego najwyższe ryzyko rozwoju nowotworu występuje u ludzi, u których infekcja miała miejsce we wczesnym dzieciństwie. [56] Zapalenie żołądka rozwijające się na podłożu infekcji *H. pylori* jest zjawiskiem częstym i obserwowanym na całym świecie. [45,58] Jednak tylko niewielki procent ludzi zainfekowanych (poniżej 10%) zachoruje ostatecznie na raka żołądka. [1] Obserwacja ta wskazuje, iż sama tylko infekcja *H.pylori* nie jest czynnikiem wystarczającym do zapoczątkowania i podtrzymania procesu karcinogenezy w żołądku i że dopiero współdziałał dalszych czynników np. dietetycznych prowadzi

do powstania raka. Potwierdzeniem tego faktu mogą być doniesienia, iż częstość występowania raka żołądka w populacjach o podobnie wysokim stopniu zakażenia drobnoustrojem *H.pylori* nie jest jednakowa.

Helicobacter pylori jest bakterią polimorficzną. U jednego zarażonego mogą równocześnie współwystępować różne szczepy o odmiennym wpływie na błonę śluzową żołądka. [61] Najsilniejsze i najszybciej postępujące zmiany zapalne w błonie śluzowej żołądka wywołują szczepy posiadające *gen cagA*. [62] Związane jest to z intensywnym wydzielaniem przez te szczepy prozapalnych cytokin np. IL-8. Wg Blasera i wsp. 40 - 60% szczepów identyfikowanych w populacjach Europy Zachodniej oraz Ameryki Północnej posiada *gen cagA*, szczepy obecne u ludności Azji są prawie w 100% *cagA* pozytywne. [56] W grupie osób seropozytywnych w kierunku *H.pylori* ryzyko rozwoju raka żołądka jest wyższe u osób mających przeciwciała przeciwko szczepom posiadającym *gen cagA*, niż w grupie osób mających przeciwciała przeciwko szczepom nie posiadającym powyższego genu. Wreszcie różnice w częstości występowania raka żołądka w populacjach o wysokim procencie infekcji *H.pylori* u ludzi wynikają z różnego wieku pacjentów w momencie infekcji. Jeśli do infekcji dochodzi we wczesnym okresie życia (dzieciństwie), jak to ma miejsce w krajach biednych, rozwijających się, gdzie ludność żyje w gorszych warunkach mieszkaniowych, to ryzyko rozwoju raka żołądka jest wyższe niż w przypadku, gdy zainfekowane zostają osoby dorosłe. [57]

Infekcja *H.pylori* rozpoczyna proces zapalny, początkowo ostry, przechodzący następnie w przewlekły [57], w trakcie którego powstają endogenne produkty (np. „wolne rodniki”) mogące uszkadzać błony komórkowe, białka enzymatyczne, a także bezpośrednio DNA komórek błony śluzowej żołądka. Podobnie niekorzystne działanie mogą też mieć produkty przemiany materii bakterii *H.pylori*. Ponadto trwająca latami infekcja zmniejsza o około 20% ekspresję białek biorących udział w naprawie błędów replikacyjnych w DNA, co sprzyja kumulowaniu się nieprawidłowości w dalszych pokoleniach komórek błony śluzowej żołądka. Przewlekły proces zapalny indukowany przez tę bakterię zwiększa ryzyko nabycia oraz utrwalenia przez proliferujące komórki potencjalnie karcinogennych mutacji. Kolejność zjawisk w błonie śluzowej żołądka, w której toczy się przewlekłe zapalenie zaproponował już w roku 1988 Pelayo Correa [45]: zapalenie powierzchowne – zapalenie zanikowe – metaplasia – dysplasia – rak. Tak więc infekcja *H.pylori* zwiększa prawdopodobieństwo uszkodzeń w obrębie błony śluzowej żołądka, efekty uszkodzeń kumulują się i po latach mogą skutkować rozwojem raka zwłaszcza w dalszej części żołądka, typu jelitowego i częściej na terenach o wyższej zachorowalności na ten nowotwór. [45,57] Ponadto infekcja *H.pylori* sprzyja procesowi hipermetylacji promotora genu *CDHI* wyłączającemu

najważniejsze białko kompleksu ECCU, zaburzając tym samym proces przylegania oraz przekazywania sygnałów pomiędzy komórkami i ułatwiając rozwój nowotworu. [63]

Potwierdzeniem szczególnej roli szeroko rozumianych czynników środowiskowych w patogenezie raka żołądka jest fakt, iż wśród ludności migrującej z terenów o wysokiej zapadalności na tereny o niskiej zapadalności częstość występowania raka żołądka spada. [64] Zachorowalność na raka żołądka wśród japońskich emigrantów do Stanów Zjednoczonych utrzymuje się na wysokim poziomie odpowiadającym zachorowalności w Japonii, nieznacznie spada u pierwszego pokolenia urodzonego w Stanach Zjednoczonych, oraz zbliża się w drugim pokoleniu do wartości typowych dla rdzennych mieszkańców Ameryki. [65] Obniżenie zachorowalności na raka żołądka w kolejnych pokoleniach potomków emigrantów z Japonii można wytłumaczyć zmianami nawyków żywieniowo-kulturowych. Zmiany te szybciej przejmują dzieci, które podlegają silniejszym wpływom otoczenia np. rówieśników w szkole. Natomiast osoby dorosłe początkowo próbują utrzymywać zwyczaje charakterystyczne dla poprzedniego miejsca zamieszkania. Ponadto zmiana przyzwyczajzeń i nawyków żywieniowych w wieku dorosłym nie chroni danej osoby przed ujawnieniem się konsekwencji niekorzystnych oddziaływań jakich doświadczała ona w dzieciństwie, w poprzednim miejscu zamieszkania. [65]

2.Czynniki genetyczne (wewnętrzne) w patogenezie raka żołądka

Badania molekularne wielu nowotworów wskazują, że kumulujące się w komórkach zmiany genetyczne dotyczące genów supresorowych onkogenezy lub onkogenów są krokami kluczowymi dla rozwoju nowotworów. [8] Wyłączenie któregoś z genów supresorowych bądź aktywacja onkogeny mogą zapoczątkować transformację nowotworową. Zmiany genetyczne wiodące do procesu transformacji nowotworowej w danej tkance mogą być nabyte za życia jako mutacja somatyczna, bądź dziedziczyć się jako mutacja germinalna. [66]

Pierwszym sygnałem wskazującym, iż na rozwój raka żołądka mogą wpływać uwarunkowania genetyczne była obserwacja z początków poprzedniego wieku, że nowotwór ten częściej rozwija się u ludzi posiadających grupę krwi A niż grupę O. Przewaga osób z grupą krwi A w stosunku do liczb występujących w populacji generalnej jest szczególnie widoczna w grupie pacjentów z rakiem żołądka typu rozlanego wg Laurena. [45]

Opisano wiele rodzin, w których predyspozycja do rozwoju raka żołądka przekazywana była z pokolenia na pokolenie – najbardziej znaną z nich jest rodzina Napoleona Bonaparte. W rodzinie tej w trzech kolejnych pokoleniach wystąpiło 8 przypadków raka żołądka. [8]

Krewni chorego na raka żołądka mają wyższe ryzyko zachorowania na ten nowotwór, przy czym ryzyko to jest różne w zależności od typu histologicznego raka. W przypadku raka typu jelitowego wg Laurena ryzyko to jedynie nieznacznie przekracza jeden, dla raka rozlanego jest siedmiokrotnie wyższe od populacyjnego. [32]

W rozwoju raka żołądka mogą brać udział liczne mutacje somatyczne w genach supresorowych onkogenezy, zwłaszcza położonych na ramieniu długim chromosomów: 5, 7, 13 oraz na ramieniu krótkim chromosomów: 1, 11, 17, 18. [8] Zjawisko utraty heterozygotyczności w rakach żołądka w odniesieniu do powyższych lokalizacji jest znane i może być potwierdzeniem obecności w tych miejscach istotnych dla procesu onkogenezy genów supresorowych. [67] Około 20% raków sporadycznych żołądka wykazuje somatyczną mutację w obrębie genu *APC* (chr.5q21). Nieco wyższy procent sporadycznych raków żołądka wykazuje zjawisko niestabilności mikrosatelit (MSI), wynikające z obecności nabytej mutacji w obrębie któregoś z genów odpowiedzialnych za naprawę błędów replikacyjnych – tzw. „mismatch repair genes”. [68] Genotyp HLA-DR5 łączy się z wyższym ryzykiem rozwoju anemii złośliwej i w konsekwencji również wyższym ryzykiem powstania raka żołądka. [69] Część raków żołądka wykazuje obecność somatycznej mutacji w genie *p53*. [8]

Rak żołądka może być jedną z manifestacji wielu dziedzicznych zespołów rodzinnego występowania nowotworów, w których specyficzne zaburzenie genetyczne przekazywane jest z pokolenia na pokolenie w formie mutacji germinalnej. Mutacja taka może skutkować rozwojem raka żołądka jako jedynego nowotworu lub predysponować do rozwoju wielu różnych schorzeń nowotworowych, w tym także raka żołądka. Wyższe od populacyjnego ryzyko rozwoju raka żołądka, u podłoża którego leżą specyficzne zmiany genetyczne dziedziczące się jako mutacje germinalne występuje w następujących zespołach:

1. HDGC – jest to zespół związany z obecnością germinalnej mutacji w obrębie genu *CDH1* kodującego białko E-kadherynę - dochodzi wtedy do rozwoju tzw. dziedzicznego, rozlanego raka żołądka (HDGC). [33,70]

Jest to rzadki, rodzinny zespół dziedziczy się autosomalnie dominująco, z penetracją sięgającą 80%. [71] Rak żołądka rozwija się w młodym wieku, czasami już u nastolatków, a średnia wieku pacjentów przy rozpoznaniu wynosi około 35 lat. [28] Rak często rozwija się wieloogniskowo, a rozsiane, drobne (0,1-1mm średnicy) ogniska raka zbudowanego z komórek sygnetywowych można stwierdzić w obrębie błony śluzowej żołądka, który w badaniu gastroscopowym wygląda prawidłowo. [28,36,37] Charakteryzuje się bardzo agresywnym przebiegiem i wysoką śmiertelnością. Z histologicznego punktu widzenia jest on zawsze rakiem rozlanym. W takich rodzinach wyższe od populacyjnego jest także ryzyko rozwoju raka sutka,

jelita grubego i jajnika.[24,31,34,72] Nie ma zgodności co do zwiększenia ryzyka rozwoju raka prostaty i trzustki. [73]

2. w zesp. Lyncha (HNPCC) [74]

Jest to dziedzicznie uwarunkowany zespół związany z germinálną mutacją w obrębie jednego z sześciu genów należących do grupy tzw. mismatch repair genes (najczęściej w *genach hMLH1* lub *hMSH2*), odpowiadających za naprawę błędów replikacyjnych w nowopowstającej nici DNA. Zaburzenie naprawy błędów replikacyjnych wiedzie do powstania zjawiska niestabilności mikrosatelit - MSI. Najczęstszym nowotworem związanym z zespołem Lyncha jest rak jelita grubego rozwijający się u młodszych chorych niż przypadki sporadyczne tego nowotworu. Dodatkowo u nosicieli takiej mutacji rośnie ryzyko rozwoju raka gruczołowego endometrium oraz raka żołądka. Ryzyko rozwoju raka żołądka jest około 4 razy większe od ryzyka populacyjnego. Większość diagnoz stawiana jest w piątej dekadzie życia (średni wiek około 55 lat). Z histologicznego punktu widzenia rak żołądka powstający na podłożu zespołu Lyncha jest najczęściej rakiem typu jelitowego, charakterystycznie o fenotypie RER+. W tej grupie pacjentów infekcję *H. pylori* stwierdza się znacznie rzadziej niż u pacjentów, u których rozwinął się tzw. sporadyczny rak żołądka typu jelitowego.

3. w zespole FAP (zespół rodzinnej polipowatości jelita grubego) [8]

Jest to w miarę rzadki, dziedziczący się autosomalnie dominująco zespół, u podłoża którego leży germinálna mutacja obecna w jednym z alleli *genu APC*, położonym na ramieniu długim chromosomu piątego (5q21). W zespole FAP dochodzi już u nastolatków do rozwoju w obrębie przewodu pokarmowego (głównie jelita grubego) mnogich polipów gruczolakowych, najczęściej typu cewkowego. Czasami ich liczba sięga kilku tysięcy. [3] W zespole tym istnieje 100% ryzyko rozwoju raka jelita grubego na podłożu któregoś z polipów. Często rozwijają się mnogie raki jelita grubego. Dodatkowo pacjenci z zespołem FAP mają wyższe od populacyjnego ryzyko rozwoju raka żołądka oraz dwunastnicy. Podobnie wyższym ryzykiem rozwoju raka żołądka obarczeni są chorzy z odmianami zespołu FAP: zespołem Turcota i zespołem Gardnera.

4. w zespole Li-Fraumeni [75]

Jest to rzadki zespół związany z obecnością germinálnej mutacji w jednym z alleli *genu p-53*. Nosiciele tej mutacji narażeni są na rozwój licznych nowotworów: zarówno mięsaków, białaczek, nowotworów CSN jak i raków (głównie raka żołądka, trzustki, wątroby i sutka). Ryzyko rozwoju raka żołądka u chorych z zespołem Li-Fraumeni jest wyższe od populacyjnego, a nowotwór rozwija się wcześniej niż przypadki sporadyczne (przed 50 rokiem życia). [3]

5. w zespole Peutz-Jeghersa [76]

Jest to rzadki, dziedziczący się autosomalnie dominująco zespół, w którym poza występowaniem mnogich polipów hamartomatycznych jelita grubego (bez tendencji do zezłośliwienia) oraz charakterystycznych przebarwień na skórze i błonach śluzowych potwierdzono wzrost ryzyka rozwoju licznych raków, między innymi raka przełyku, żołądka, dwunastnicy, sutka i płuca. U podłoża zespołu leży mutacja *genu PJS1* leżącego na krótkim ramieniu chromosomu 19.

6. w zespole Cowdena [8]

Jest to rzadki, dziedziczący się autosomalnie dominująco zespół, związany z mutacją położonego na krótkim ramieniu chromosomu 10 *geny PTEN*. U chorych występują mnogie polipy żołądka. Ryzyko rozwoju raka żołądka jest nieznacznie wyższe od populacyjnego.

7. w przypadku obecności germlinalnej mutacji w *genie BRCA2* [77,78]

Obecność germlinalnej mutacji w *genie BRCA2* łączy się z częstszym rozwojem w tych rodzinach raków sutka, jajnika i żołądka. W przypadkach rodzin, w których u kilku członków występują nowotwory w wyżej wymienionych lokalizacjach, a nie stwierdzono obecności mutacji w *genie CDH1* oraz *p-53* należy poszukiwać mutacji w *genie BRCA2*.

3. Inne czynniki związane z częstszym występowaniem raka żołądka

- czynniki socjoekonomiczne i wykonywany zawód

Rak żołądka częściej rozwija się u ludzi żyjących w gorszych warunkach socjoekonomicznych. [13] Za taki stan rzeczy odpowiadać mogą złożone zależności pomiędzy sposobem odżywiania, dostępnością czy też jej brakiem do pewnych produktów spożywczych (np. świeżych owoców przez cały rok) oraz większym prawdopodobieństwem zarażenia się drobnoustrojem *Helicobacter pylori* w młodszym wieku. Ryzyko zakażenia *H. pylori* związane jest z warunkami mieszkaniowymi, w jakich żyje dane społeczeństwo, a w szczególności ze średnią liczbą osób mieszkających w jednej izbie. Pracownicy kopalń, rafinerii, ludzie zatrudnieni w przemyśle gumowym częściej chorują na raka żołądka.

- mieszkanie na terenach wiejskich

W niektórych krajach np. Chinach obserwuje się wyższą zachorowalność na raka żołądka wśród ludności mieszkającej na terenach wiejskich niż w miastach. [79]

Analizując dane statystyczne dotyczące Polski można stwierdzić, iż w pierwszej połowie poprzedniego stulecia zapadalność na raka żołądka i umieralność z jego powodu wśród ludności

terenów wiejskich była wyższa niż w miastach. Pod koniec dwudziestego wieku różnice te zatarły się. [11]

- infekcja wirusem Epsteina –Barra (EBV)

Wirus EBV bierze udział w rozwoju wielu nowotworów człowieka, w tym między innymi części raków żołądka. Raki te mają zazwyczaj charakterystyczny obraz histologiczny: naciek nisko- lub nie zróżnicowanego nowotworu przepojony jest obfitym, nienowotworowym naciekiem limfocytarnym, stąd nazwa – „lymphoepithelioma-like carcinoma” [80] - w ponad 80% raków żołądka o takiej prezentacji histologicznej można wykazać obecność wirusa EBV. [81] Ponadto w 6-9% gruczolakoraków żołądka o klasycznej prezentacji histologicznej można wykazać obecność powyższego wirusa. [81] W grupie przebadanych w naszym zakładzie przypadków raków żołądka o prezentacji nie odpowiadającej typowemu rakowi „lymphoepithelioma-like carcinoma” 12,5% raków wykazywało w hybrydyzacji in situ pozytywny odczyn na obecność RNA wirusa EBV. [82] Dokładny mechanizm karcinogennego działania wirusa EBV na błonę śluzową żołądka nie został jeszcze wyjaśniony.

- radioterapia w młodym wieku

Osoby leczone w młodości z powodu chłoniaków przy pomocy naświetlań połączonych z chemioterapią w wieku późniejszym statystycznie częściej chorują na raka żołądka. Wskazuje to na potencjalną rolę naświetlań w procesie karcinogenezy.

- kikut po usunięciu części żołądka

Po operacyjnym usunięciu części żołądka w pozostawionym kikucie dochodzi do rozwoju przewlekłego, zanikowego zapalenia błony śluzowej żołądka prowadzącego do zaniku błony śluzowej, a następnie metaplazji i dalej metaplazji z cechami dysplazji. Cechy zapalenia zanikowego w kikucie można obserwować już w kilka miesięcy po wykonaniu operacji. Uważa się, iż istnieje 3-5 razy zwiększone ryzyko rozwoju raka w pozostawionym kikucie żołądka po wcześniejszej operacji, przy czym rozwoju raka w kikucie należy spodziewać się wiele lat później (15-20 lat) [2] w okolicy zespolenia. [1] Resekcja części żołądka u młodego człowieka (przed 45r. życia) jest obarczona wyższym ryzykiem rozwoju raka niż resekcja w wieku późniejszym. Ryzyko rozwoju raka jest tym większe, im więcej czasu upłynęło od poprzedniej operacji. [83] Równoczesne z resekcją wykonanie wagoatomii przyspiesza rozwój raka, wskazując iż obniżenie wydzielania soku żołądkowego wzmacnia niekorzystne wpływy innych, np. środowiskowych czynników biorących udział w patogenezie raka żołądka. Bezpośrednią przyczyną zapoczątkowania w kikucie żołądka procesu przewlekłego, zanikowego zapalenia błony śluzowej jest zapewne wytworzenie nowych stosunków anatomicznych umożliwiających zarzucanie treści jelitowej

zawierającej żółć do pozostawionej części żołądka. Dochodzi również do zmiany flory bakteryjnej tak w kikucie żołądka, jak i w początkowym odcinku jelita cienkiego.

- alkohol i papierosy

Nie ma zgodności co do wpływu papierosów na wzrost ryzyka rozwoju raka żołądka. W większości krajów częstość zachorowań na raka żołądka konsekwentnie, acz powoli maleje w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat, podczas gdy ilość wypalanych papierosów zwiększa się. Wskazywałoby to na brak związku pomiędzy paleniem a wzrostem ryzyka zachorowania na raka żołądka. Zauważono natomiast, iż częstość występowania raka żołądka u palących papierosy pracowników kopalń węgla kamiennego w Ameryce jest wyższa niż w całej populacji amerykańskiej. Nie ma jednak pewności, czy czynnikiem odpowiedzialnym za powstanie raka było wieloletnie narażenie na składnikami pyłu węglowego, palenie papierosów czy niski status socjoekonomiczny powyższej grupy ludności. Wydaje się także, iż picie alkoholu nie ma związku z rozwojem raka żołądka. [64,84]

- kontakt z azbestem

Wśród nowotworów, których rozwój wiązany jest z kontaktem z azbestem niektórzy autorzy wymieniają również raka żołądka, choć związek ten nie jest pewny.

- Najczęściej stosowane podziały i klasyfikacje raka żołądka

Raki żołądka możemy klasyfikować na podstawie obrazu makroskopowego, jaki tworzy nowotwór w ścianie żołądka lub na podstawie cech histologicznych nacieku nowotworu ocenianych przy użyciu mikroskopu.

Do oceny typu makroskopowego zaawansowanego raka żołądka służy klasyfikacja Bormanna. W oryginalnej wersji opublikowanej w roku 1926 zaproponowano cztery makroskopowe formy: rak o typie polipa, rak grzybiasty, rak owrzodziały i rozlany naciek w ścianie żołądka bez tworzenia guza nazwane odpowiednio typem 1-4 wg Bormanna. Klasyfikację do grup 1-4 wg Bormanna przeprowadzamy po otworzeniu usuniętego chirurgicznie żołądka na podstawie oglądania obecnej w ścianie zmiany. W 1981 klasyfikacja Bormanna została poszerzona o tzw. typ 0. [85] Jest to rak, który bez względu na obraz makroskopowy w ścianie żołądka, nie nacieka głębiej niż błona podśluzowa i jest określany mianem „raka wczesnego”. Zakwalifikowanie przypadku do tzw. grupy 0 wg Bormanna możliwe jest, inaczej niż to ma miejsce w przypadku pozostałych typów, dopiero po dokładnym obejrzeniu i szczegółowej ocenie mikroskopowej licznych wycinków tkankowych pobranych ze zmienionego obszaru ściany żołądka.

Z morfologicznego punktu widzenia raki żołądka są grupą niezwykle heterogenną. [86,87] Ta wyjątkowa zmienność obrazów histologicznych zaowocowała powstaniem wielu odrębnych klasyfikacji histologicznych. [2] Najstarszą, najlepiej znaną i najpowszechniej używaną klasyfikacją histologiczną raków żołądka jest tzw. klasyfikacja Laurena, zaproponowana w roku 1965. [22] Klasyfikacja ta opiera się na równoczesnej ocenie cech architektonicznych nacieku raka oraz cech cytologicznych pojedynczych komórek. W oryginalnym artykule autor wyodrębnił dwa typy raków żołądka: jelitowe i rozlane. 14% przypadków nie spełniało kryteriów żadnej z powyższych grup i zostało określone mianem „raki niesklasyfikowane”. Później zaproponowano dodanie trzeciej kategorii nazwanej: raki mieszane. Zawiera ona w sobie te przypadki, w których występują obydwie powyższe utkanie mniej więcej w równych proporcjach. W powyższej klasyfikacji nie znajdują umiejscowienia raki o całkowicie litym typie wzrostu (ang. solid carcinoma). Część autorów określa je mianem: „rak niesklasyfikowany”. Lauren, wyodrębniając grupę tzw. raków jelitowych, oparł się głównie na ich cesze morfologicznej jaką jest tworzenie struktur gruczołowych, a co za tym idzie upodabnianie się nacieku raka do błony śluzowej jelita. Cechami charakterystycznymi raków tzw. rozlanych wg Laurena są: sposób wzrostu i naciekania nowotworu oraz cechy cytologiczne poszczególnych komórek. Podział Laurena nie ma znaczenia rokowniczego, znajduje jednak odbicie w różnicach epidemiologicznych raków w poszczególnych grupach. [22,88] Ze względów historycznych oraz z powodu najszerzego jej rozpowszechnienia i względnej łatwości przeprowadzania podziału w większości prac i opracowań klasyfikacja Laurena jest bazą wyjściową dla dalszych podziałów i porównań.

W 1992 Goseka i wsp. opublikowali pracę, w której zaproponowali nowy podział histologiczny raków żołądka, nazwany później klasyfikacją Goseki. [89] Opiera się ona na ocenie dwu parametrów: tendencji do tworzenia struktur gruczołowych w obrębie nacieku raka oraz obecności śluzu w cytoplazmie komórek raka. Zaletą tego podziału jest jasność kryteriów pozwalających przypisać przypadek do danej grupy, a w konsekwencji łatwość w dokonaniu podziału oraz relatywnie wysoka powtarzalność wyników, kiedy ocena dokonywana jest przez kilku niezależnych oceniających. [90] Klasyfikacja Goseki ma znaczenie prognostyczne u pacjentów poddanych potencjalnie leczniczemu zabiegowi operacyjnemu. [89] Raki nie zawierające śluzu wewnątrzkomórkowego (grupa I oraz III) rokują lepiej niż te bogate w śluz wewnątrzkomórkowy (grupa II oraz IV). Klasyfikacja Goseki pozwala także przewidzieć najbardziej prawdopodobną drogę rozsiewu raka: raki zakwalifikowane jako typ I częściej rozsiewają się drogą krwionośną dając przerzuty w narządach odległych, podczas gdy raki typu IV wg Goseki częściej naciekają struktury okoliczne, zajmując otrzewną oraz bliższe i dalsze węzły chłonne. [90].

Klasyfikacja opisowa wg WHO [6] zakłada podział nowotworów złośliwych pochodzenia nabłonkowego (raków żołądka) na pięć kategorii:

1. gruczolakoraki (adenocarcinoma)
2. raki płasko-gruczolowe (adenosquamous carcinoma)
3. raki płaskonabłonkowe (squamous cell carcinoma)
4. raki drobnokomórkowe (small cell carcinoma)
5. raki niezróżnicowane (undifferentiated carcinoma)

Cztery ostatnie typy rzadko występują w żołądku w formie czystej, nieco częściej można natomiast znaleźć obszary odpowiadające któremuś z powyższych utkań w obrębie raka o innym dominującym obrazie histologicznym. Wśród raków gruczolowych wyróżniono cztery warianty wg WHO:

- ◆ raki typu cewkowego (tubular adenocarcinoma)
- ◆ raki typu papilarnego (papillary adenocarcinoma)
- ◆ raki śluzowe (mucinous carcinoma)
- ◆ raki sygnetowatomórkowe (signet-ring cells carcinoma)

W ostatecznym określeniu typu histologicznego raka wg WHO bierze się pod uwagę dominujące utkanie w ocenianych wycinkach lub wymienia kilka z nich, jeśli są one podobnie rozlegle reprezentowane. [6] „Czystego” raka śluzowego oraz „czystego” raka sygnetowatomórkowego rozpoznajemy, gdy odpowiednie utkanie stanowi ponad 50% całości danego nowotworu. [2]

Podział Minga [91] należy do tzw. klasyfikacji patobiologicznych. Na podstawie oceny charakteru wzrostu nowotworu, wzajemnych układów komórek i wyglądu granicy nacieku wyodrębniono podtyp raka o wzroście naciekającym oraz podtyp o wzroście rozprężającym. W wielu przypadkach podtyp rozprężający wg Minga pokrywa się z rakiem jelitowym wg Laurena, a podtyp naciekający wg Minga pokrywa się z rozlanym wg Laurena.

Niezależnie od nadania każdemu przypadkowi raka nazwy zgodnie z kryteriami przyjętymi dla danej klasyfikacji ocenia się również tzw. stopień zróżnicowania nowotworu - G (ang. grading). [6] Jest to skodyfikowana ocena tego, jak bardzo struktura nacieku nowotworu odbiega od prawidłowej tkanki, z której się on wywodzi. Nowotwory wyraźnie przypominające tkankę, z której się wywodzą określamy mianem wysokozróżnicowanych (ang. well differentiated) i przypisujemy im symbol G1. Nowotwory bardzo znacznie odbiegające od struktury tkanki, z której się wywodzą określamy mianem niskozróżnicowanych (ang. poorly differentiated) i opisujemy symbolem: G3. Nowotwory o pośrednim typie zróżnicowania tworzą kategorię określaną mianem: G2.

W przypadku raka żołądka symbolem G1 określimy raki zbudowane w ponad 95% ze struktur gruczołowych, symbolem G3 – raki, w których mniej niż 50% utkania stanowią struktury gruczołowe. [2,6] Większość raków typu jelitowego wg Laurena mieści się w kategoriach: G2 lub G1, podczas gdy przeważająca część raków typu rozlanego wg Laurena odpowiada kategorii G3. Raki sygnetowatokomórkowe są z definicji zaliczane do kategorii G3.

W 1995 roku zaproponowana została tzw. „nowa klasyfikacja wg Carneiro”, wyróżniająca cztery podtypy raka żołądka: gruczołowy, lity, złożony z izolowanych komórek i mieszany. [87] Klasyfikacja ta posiada według autorów niezależną wartość prognostyczną: raki mieszane rokują znacznie gorzej od raków złożonych w całości lub w dominującym procencie z jednego utkania. Podtypy: gruczołowy i złożony z izolowanych komórek w większości odpowiadają typowi jelitowemu i rozlanemu wg Laurena. Z podgrupy, którą Lauren początkowo nazwał rakami niesklasyfikowanymi powstały dwa podtypy: raki lite i raki mieszane. [86,87]

W roku 2004 zaproponowano kolejny podział raków żołądka nazwany klasyfikacją SNH (ang. S-site, N-nodes, H- histopathology), opierający się na ocenie trzech kryteriów: lokalizacji guza, stanu węzłów chłonnych oraz cech histopatologicznych, do których należą typ wzrostu raka i obecność śluzu wewnątrz komórek raka. [92] Podział ten został zaprezentowany na XVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Patologicznego we Wrocławiu. Ta nowa, kliniczno-patologiczna klasyfikacja posiada według autorów istotną statystycznie wartość rokowniczą.

Poza wyżej wymienionymi zaproponowano wiele innych klasyfikacji raków żołądka, nie wszystkie jednak znalazły szeroką akceptację środowiska lekarskiego. Do innych, częściej używanych należą: zaproponowana w 1972 roku klasyfikacja Mulligana opierająca się na ocenie cech cytologicznych komórek nowotworowych, bez względu na układy, jakie te komórki tworzą [93], klasyfikacja Kubo [94] z 1971 roku wyróżniająca trzy podtypy raka żołądka, klasyfikacja Jassa [95] zaproponowana w 1980 roku, tworzona na podstawie wspólnej analizy cech klasyfikacji Minga i Laurena. Ponadto istnieją liczne i niejednokrotnie bardzo skomplikowane, posiadające wiele podgrup podziały stworzone przez patomorfologów japońskich.

- Funkcja E-kadheryny oraz rola ECCU w progresji nowotworów

Prawidłowy rozwój danej tkanki podczas embriogenezy, późniejsze utrzymanie jej architektoniki, zapewnienie właściwego przylegania międzykomórkowego i, co się z tym łączy, sprawnej sygnalizacji pomiędzy komórkami realizuje się dzięki tzw. cząsteczkom przylegania komórkowego (cell adhesion molecules = CAMs). W zależności od budowy powyższych cząsteczek dzielimy je na cztery duże rodziny: selektyny (typy: E – obecne na komórkach śródbłonna, P – na płytkach krwi, L

– na leukocytach), integryny (obecne na wielu komórkach, przede wszystkim leukocytach), kadheryny (występujące na komórkach nabłonkowych i nienabłonkowych) oraz tzw. rodzinę białek podobnych do immunoglobulin [ang. „immunoglobulin supergene family”]-obecne na komórkach śródbłonnów naczyń. [96]

E-kadheryna to wapniozależna, przezbłonowa glikoproteina obecna w tkankach nabłonkowych, należąca obok między innymi N-kadheryn i P-kadheryn do dużej rodziny kadheryn. Znana jest również pod nazwami: Uvomorulina, L-CAM, cell-CAM 120/80 lub Arc-1. [97] E-kadheryna wraz z kolejnymi białkami: α , β oraz γ kateninami oraz białkiem p120^{ctn} tworzy układ funkcjonalny zwany jednostką E-kadherynowo-kateninową (ECCU). [98] Powyższy kompleks odpowiada za utrzymanie prawidłowej architektoniki tkanki nabłonkowej oraz umożliwia procesy przylegania pomiędzy jej komórkami. [99,100] Zaburzenie prawidłowego przylegania pomiędzy komórkami może zaowocować utratą hamowania kontaktowego dotyczącego procesów wzrostu oraz doprowadzić do uniezależnienia się komórek od sygnałów kontrolujących procesy proliferacyjne, w szczególności odpowiedzialnych za sterowanie cyklem komórkowym.[99] Osłabienie procesów przylegania międzykomórkowego może sprzyjać oddzieleniu się pojedynczych komórek od ogniska pierwotnego i tym samym stworzyć warunek konieczny do zapoczątkowania powstawania przerzutów odległych. [101] E-kadheryna odgrywa ponadto rolę w początkowym okresie rozwoju osobniczego w procesach organo- i morfogenezy. [99,102] Bierze także udział w procesie sygnalizacji pomiędzy komórkami nabłonka. [102] Zmiany ekspresji E-kadheryny w uszkodzonej tkance podczas gojenia rany umożliwiają sprawny przebieg procesów naprawczych. [103]

E-kadheryna kodowana jest przez *gen CDH1*, położony na długim ramieniu chromosomu 16 (16q22.1), składający się z 16 eksonów. [98,104] Gen ten jest uważany za gen supresorowy procesów: onkogenezy [105] oraz inwazji nowotworowej. [106] Eksony 1-12 kodują pozakomórkową część białka, ekson 13 i część 14 fragment śródbłonowy, pozostałe: część cytoplazmatyczną białka E-kadheryny. [34]. Produkt *genu CDH1* to białko o ciężarze 120 kDa, składające się z trzech odmiennych funkcjonalnie odcinków. Krótki, śródbłonowy fragment białka E-kadheryny zapewnia jego umocowanie w obrębie błony komórkowej komórki nabłonkowej. Część wewnątrzcytoplazmatyczna białka odpowiada za bezpośrednie łączenie z kolejnymi białkami zwanymi kateninami. [106] Najczęściej E-kadheryna łączy się bezpośrednio z β - kateniną. Jest to białko o ciężarze 92kDa, kodowane przez *gen CTNNB1* położony na ramieniu krótkim chromosomu trzeciego (3p). [107] Rzadziej miejsce β -kateniny zajmuje γ -katenina, nazywana także plakoglobina. [108] Jest to białko o ciężarze 83kDa kodowane na ramieniu długim chromosomu jedenastego (11q). [97] β - bądź γ -katenina łączą się następnie z kolejnym białkiem: α -kateniną –

białkiem o ciężarze 102kDa kodowanym przez *gen CTNNA1* leżący na ramieniu długim chromosomu piątego (5q). [107] *Gen CTNNA1* uważany jest za gen supresorowy procesów inwazji. [109] Taki układ zapewnia wytworzenie ścisłego połączenia scalającego nie tylko błony komórkowe, lecz także cytoszkielety aktynowe sąsiadujących ze sobą komórek nabłonkowych. [107,110] Dodatkowo w miejscu połączenia E-kadheryny z β -kateniną zaczepione jest kolejne białko: p120^{ctn}, będące substratem kinazy tyrozynowej. [111] Część pozakomórkowa białka E-kadheryny składa się z pięciu powtarzających się domen, z których każda zbudowana jest z około 110 aminokwasów. W obrębie każdej domeny znajduje się miejsce zapewniające przyłączenie cząsteczki wapnia oraz występuje motyw HAV (Histydyna-Arginina-Valina), odpowiadający za powstawanie homodimerów E-kadheryny na powierzchni komórek nabłonka. [98,110] Miejsce odpowiedzialne za przyłączanie cząsteczki wapnia w obrębie E-kadheryny kodowane jest przez ekson 8 i 9 *genu CDH1*. [112] Dimery E-kadheryny w leżących naprzeciw siebie komórkach nabłonkowych zespalają się na zasadzie „zamka błyskawicznego”. Powstawanie powyższych połączeń zależne jest od pozakomórkowego poziomu wapnia. [97] E-kadheryna działa więc w układach dimerowych, w połączeniu z α , β , γ kateninami oraz podobnym do katenin białkiem p120^{ctn} [101], a powstający w ten sposób wapniozależny układ funkcjonalny ECCU odgrywa pierwszoplanową rolę w zapewnieniu adhezji międzykomórkowej i utrzymaniu prawidłowej struktury tkanki nabłonkowej. Poza wytwarzaniem homodimerowych połączeń pomiędzy cząsteczkami E-kadheryny mogą też powstawać połączenia E-kadheryny z innymi białkami należącymi do rodziny cząsteczek przylegania komórkowego (CAMs), na przykład z integrzynami obecnymi na powierzchni limfocytów. [106]

Na długim ramieniu chromosomu 16 znajdują się także geny kodujące dalsze, nienabłonkowe białka należące do rodziny kadheryn: N- kadherynę, P- kadherynę i kadherynę-11. W trakcie progresji procesu nowotworowego obserwujemy coraz większe zmiany w prawidłowej strukturze tkanki nabłonkowej oraz zaburzenia adhezji międzykomórkowej. Powyższe procesy uzależnione są także częściowo od modulacji czyli inaczej tzw. „przełączania ekspresji” białek z rodziny kadheryn (ang. „cadherin switching”) w trakcie progresji procesu nowotworowego. [107,109]

Nie mniej istotną od E-kadheryny rolę w układzie ECCU odgrywa β -katenina, która nie tylko bierze udział w zapewnieniu przylegania międzykomórkowego, lecz także jest kluczowym elementem tego układu w procesie sygnalizacji międzykomórkowej. [106] W prawidłowych warunkach większość β -kateniny występuje w formie związanej, stanowiąc część układu ECCU. Poziom wolnej β -kateniny w cytoplazmie komórki utrzymywany jest na stałym, niskim poziomie. Nie włączona do kompleksu ECCU β -katenina jest w znacznej części wyłapywana, fosforylowana i

ostatecznie degradowana przez układ: APC - kinaza GSK-3 β - aksyna. [107,108] Zaburzenie degradacji wolnej β -kateniny np. na skutek mutacji w *genie APC* lub zablokowania aktywności kinazy GSK-3 β po aktywacji szlaku Wnt doprowadza do akumulacji wolnej β -kateniny w cytoplazmie komórki. [113] Tak nagromadzone białko przemieszczane jest poprzez układ proteasomów w obręb jądra komórkowego. Tu β -katenina bezpośrednio pobudza czynniki transkrypcyjne: Lef-1 i Tcf-4 [113], które aktywują kolejne geny odpowiedzialne za regulację procesów proliferacji komórkowej oraz apoptozy. Są to przede wszystkim gen kodujący: cyklinę D1 wpływającą na przebieg cyklu komórkowego oraz onkogen c-myc. [97,114] Ponadto pobudzany jest *gen MMP7* kodujący metaloproteinazę 7 oraz *gen gastryny*. [107] Przedostanie się na teren jądra komórkowego γ -kateniny powoduje pobudzenie tych samych czynników proliferacyjnych.

Około 60%, tak sporadycznych jak i germinalnych, mutacji dotyczących *genu APC* w rakach jelita grubego ma miejsce w okolicy 5' końca *genu APC* skutkując powstaniem skróconego produktu, który nie traci możliwości przyłączenia wolnej β -kateniny, jednak jest pozbawiony możliwości jej degradacji. [98] Podobne mutacje *genu APC* mają też miejsce w części przypadków raka żołądka.

Akumulacja wolnej β -kateniny w cytoplazmie komórki z jej przemieszczeniem się w obręb jądra i w efekcie zapoczątkowaniem procesów podziałowych rozpoczyna się również w przypadku zaktywowania szlaku Wnt. Po aktywacji szlaku Wnt dochodzi do pobudzenia dalszych białek (np. białka Dsh), które hamuje aktywność kompleksu aksyna-GSK3 β , zwalniając tym samym proces fosforylacji i degradacji wolnej β -kateniny. Aktywność β -kateniny i jej zdolność do łączenia się z E-kadheryną jest dodatkowo modyfikowana przez liczne receptory o aktywności kinazy tyrozynowej oraz fosfatazy, między innymi EGFR, HGFR a także onkogen c-erbB2 i c-met. [108]

Komórki prawidłowej tkanki nabłonkowej charakteryzuje silna adhezja międzykomórkowa oraz silna, błonowa ekspresja E-kadheryny. Ekspresja ta występuje we wszystkich, nienowotworowych nabłonkach bez wyjątku i dotyczy wszystkich komórek danego nabłonka. [41,99,115]

Nowotworowe komórki pochodzenia nabłonkowego wykazują obniżoną adhezję międzykomórkową. [97] Poprawnie funkcjonujący układ ECCU konieczny jest do utrzymania prawidłowego przylegania międzykomórkowego pomiędzy komórkami danego nabłonka. Utrata lub osłabienie funkcji przylegania międzykomórkowego związanego z nieprawidłowościami działania tego układu wydają się być istotnym elementem w patogenezie wielu nowotworów złośliwych pochodzenia nabłonkowego (raków), między innymi raka żołądka. [99] Liczne doniesienia wskazują, iż w wielu rakach, zwłaszcza tych nisko zróżnicowanych dochodzi do osłabienia lub utraty ekspresji białka E-kadheryny [115-119], co łączy się z pogorszeniem rokowania. [112,120] Utrata zależnej od E-kadheryny funkcji przylegania międzykomórkowego

umożliwia oddzielanie się pojedynczych komórek nowotworowych od ogniska pierwotnego. [101] Zapoczątkowuje to proces przemieszczania się komórek nowotworowych do miejsc odległych, co stanowi warunek konieczny powstania przerzutów. [101] Immunoreaktywność E-kadheryny w rakach rozległe i szybko przerzutujących jest mniejsza niż w rakach o mniejszym potencjale do dawania przerzutów. [121] Utrata przylegania międzykomórkowego wyzwala także komórki spod wpływu sygnałów hamowania kontaktowego czy dotyczących procesów proliferacji i umożliwia wyłamania się komórki spod kontroli sygnałów dotyczących procesów wzrostu. [122]

Wyłączenie funkcji układu ECCU może nastąpić na drodze genetycznej lub epigenetycznej. [123] Opisano liczne mutacje obecne w genie kodującym E-kadherynę. Mogą to być np. mutacje punktowe, które zmieniają sens odczytu albo doprowadzają do powstania skróconego produktu białkowego poprzez przedwczesne pojawienie się kodonu „STOP” – są to tzw. mutacje skracające (ang. „truncating mutations”). Rzadziej w raku żołądka pojawiają się duże katastrofy genowe skutkujące utratą całego locus w miejscu *geny CDHI* na chromosomie 16. Nieprawidłowości stwierdzane w *genie CDHI* mogą mieć charakter mutacji somatycznych, nabywanych w trakcie życia komórki i dotyczących jedynie komórek nowotworu lub mutacji zarodkowych (germinalnych), kiedy to zmiana obecna jest we wszystkich komórkach organizmu danego chorego i może być przekazywana następnym pokoleniom. Mutacje germinalne *geny CDHI* wyłączające funkcję produktu białkowego genu opisano w rozlanych, występujących rodzinnie rakach żołądka charakteryzujących się wczesnym początkiem, zazwyczaj przed 40 rokiem życia i fatalnym przebiegiem, określanych mianem „dziedzicznych rozlanych raków żołądka” – HDGC. [28,31,34-37,70,72] Utrata funkcji ECCU jest w tych przypadkach zjawiskiem wczesnym i kluczowym dla zapoczątkowania procesu nowotworzenia w żołądku. Ryzyko rozwoju raka żołądka u członków danej rodziny będących nosicielami mutacji w *genie CDHI* jest tak wysokie (wynosi około 70-80% [71]), iż usprawiedliwia wykonanie profilaktycznej gastrektomii, także w przypadkach, gdy błona śluzowa żołądka w kolejnych badaniach endoskopowych nie wykazuje żadnych stwierdzanych makroskopowo zmian. [28,36,37]

Dalszym powodem zaburzenia funkcji układu ECCU mogą być mutacje w genie kodującym β -kateninę, skutkujące najczęściej powstaniem nieprawidłowego białka, które nie jest przyłączane przez układ APC-aksyna-GSK-3 β i nie może być w związku z tym fosforylowane i degradowane. [124] W hodowlach komórkowych linii komórek raków żołądka stwierdzono także obecność mutacji w genie kodującym β -kateninę, która powodowała przedwczesne zakończenie syntezy białka β -kateniny i powstanie skróconego produktu pozbawionego obszaru odpowiadającego za przyłączanie α -kateniny. [97]

Poza mechanizmami genetycznymi wyłączenie funkcji kompleksu ECCU może nastąpić na skutek zdarzeń epigenetycznych –np. zmiany w domenie regulacyjnej genu lub hipermetylacji obszarów CpG w obrębie promotora *genu E-kadheryny*. [116,118,123] Efektem powyższych jest zaburzenie produkcji białka, możliwe do wykazania przy pomocy badań immunohistochemicznych. Hipermetylacja promotora może dotyczyć jednego lub obydwu alleli *genu CDH1*. Może występować samodzielnie lub towarzyszyć mutacjom obecnym w pierwszym allelu genu. Zjawisko hipermetylacji promotora *genu CDH1* jest najczęstszym mechanizmem odpowiadającym za wyłączenie drugiego allelu powyższego genu w przypadkach obecności germinalnej mutacji w allelu pierwszym i stanowi tzw. drugie uderzenie (ang. „second hit”) ostatecznie wyłączające funkcję *genu CDH1* w zespole dziedzicznego, rozlanego raka żołądka. Hipermetylacja promotora, a nie mutacje w *genie CDH1* jest wg niektórych badaczy najczęstszym zjawiskiem odpowiedzialnym za wystąpienie nieprawidłowej ekspresji białka E-kadheryny w rakach żołądka. [116,125]

- Rola angiogenezy w procesie wzrostu i rozsiewu nowotworu

Angiogeneza, czyli formowanie nowych naczyń krwionośnych, jest zjawiskiem biorącym udział w procesach rozwojowych; w czasie organo i morfogenezy. W warunkach prawidłowych nie występuje jednak w obrębie dojrzałych tkanek w dorosłym organizmie - wyjątkiem są procesy gojenia ran oraz organizacji wysięku zapalnego. Angiogeneza jest ponadto zjawiskiem kluczowym dla rozwoju, wzrostu oraz rozsiewu procesów nowotworowych. [126] Najważniejszymi czynnikami biorącymi udział w stymulacji procesu angiogenezy są czynniki wzrostu śródbłonnków naczyniowych (VEGFs), ich receptory (VEGFRs) oraz angiopoetyny (Ang.) [127] Poza czynnikami oddziałującymi w sposób specyficzny na śródbłonki w procesie angiogenezy biorą też udział inne, mniej ważne czynniki, np. czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β) oraz czynniki wydzielane przez makrofagi. Ekspresja VEGFs jest indukowana w stanach niedotlenienia oraz przez niektóre onkogeny, np. onkogen Ras. [128] Angiogeneza może też zostać pobudzona w następstwie obniżenia poziomu czynników antyangiogenetycznych takich jak np. trombospondyna, której poziom zależny jest między innymi od stanu *genu p-53*. Inaktywacja *genu p-53* powoduje obniżenie poziomu trombospondyny, co skutkuje nasileniem angiogenezy. [3]

Jedynie bardzo niewielkie guzy, nie przekraczające 1-2 milimetrów średnicy mogą obyć się bez własnej sieci naczyń krwionośnych zaopatrujących je w substancje odżywcze. [128] Dalszy wzrost nowotworu zależny jest od wykształcenia odpowiedniej sieci naczyń umożliwiającej adekwatne do rosnącej masy guza dostarczanie substancji odżywczych. Poza funkcjami odżywczymi bogata sieć

naczyniowa zdaje się umożliwiać proces rozsiewu odległego nowotworów: cienkościenne, niedojrzałe naczynia o niekompletnej błonie podstawnej [129] stwarzają komórkom nowotworowym możliwość przedostania się do krążenia i przemieszczenia wraz z krwią do miejsc odległych od ogniska pierwotnego. W nowym miejscu ponownie wzrost przerzutu zależy jest od wytworzenia odpowiednio gęstej sieci naczyniowej. Zdolność tkanki nowotworowej do indukowania powstawania w jej obrębie nowych naczyń krwionośnych oraz nasilenie tego procesu mają więc znaczenie dla przebiegu procesu nowotworowego. W przypadku niektórych nowotworów (np. raka sutka) nasilenie procesu angiogenezy jest niezależnym czynnikiem rokowniczym. [130] Doniesienia dotyczące istotności procesów angiogenezy w przypadku raka żołądka nie są jednoznaczne. [131,132]

- Rola wybranych czynników regulujących proces apoptozy

Jednym z kluczowych mechanizmów kontrolujących „jakość” komórek w organizmie człowieka jest proces apoptozy. Zaburzenia przebiegu lub kontroli tego procesu wynikające z zachwiania równowagi pomiędzy czynnikami pro- i antyapoptotycznymi mogą doprowadzić zarówno do przedłużenia, jak i skrócenia czasu życia komórek. Przedłużenie życia komórki sprzyja kumulowaniu się w niej kolejnych mutacji, które, jeśli nie zostaną naprawione, mogą wprowadzić komórkę na drogę karcinogenezy. Zaburzenie równowagi pomiędzy białkami pro- i antyapoptotycznymi utrudnia też eliminowanie tych komórek, w których doszło do utrwalenia się nieprawidłowości na poziomie DNA. Ekspresja surviviny doprowadza do przedłużenia żywotności komórek w czasie progresji nowotworu oraz umożliwia komórkom nowotworowym zdobycie odporności na chemioterapeutyki (uniknięcie cytotoksycznego wpływu leków przeciwnowotworowych).

Za hamowanie procesu apoptozy odpowiada rodzina białek inhibitorowych zwanych IAP (inhibitor of apoptosis family), które modyfikują aktywność enzymów wykonawczych procesu apoptozy, głównie kaspaz i pro-kaspaz. W roku 1997 opisano nowy gen oraz białko należące do rodziny IAP nazwane surviviną. [133] *Gen surviviny* leży na długim ramieniu chromosomu 17 (17q25) [133], składa się z trzech intronów i czterech eksonów i koduje białko o ciężarze 16,5kDa, zbudowane ze 142 aminokwasów. [134] Survivina determinuje podatność komórki na sygnały proapoptotyczne [135] i dzięki hamowaniu aktywności proteaz wykonawczych procesu apoptozy: kaspazy 3 i kaspazy 7 sprawia, iż komórka staje się niewrażliwa na sygnały kierujące ją na drogę programowanej śmierci. [136] W przeciwieństwie do innych białek rodziny IAP survivina zawiera tylko jeden motyw BIR (baculovirus IAP repeat), leżący przy N-końcu białka, odpowiadający za

bezpośrednie przyłączanie i modyfikowanie aktywności kaspaz oraz nie posiada domeny odpowiedzialnej za przyłączanie cynku (tzw. „RING finger”). [133] W warunkach prawidłowych survivina jest obecna w tkankach płodowych podczas rozwoju embriogenetycznego (np. w nerkach, wątrobie, płucach), natomiast nie występuje w dojrzałych tkankach organizmu człowieka, [133,137] wyjątek stanowi łożysko i grasica. [133] Jej ekspresja pojawia się także w licznych nowotworach pochodzenia nabłonkowego, przede wszystkim rakach gruczołowych np. płuca, jelita, żołądka, prostaty, trzustki, sutka, [135,138] a także niektórych chłoniakach. [136] Opisano pojawienie się pozytywnego odczynu w nienowotworowej błonie śluzowej żołądka pobranej w sąsiedztwie raka żołądka, którego komórki były survivino-pozytywne. [137] W 1999 roku opisano dwa dodatkowe warianty surviviny, różniące się właściwościami regulacyjnymi w stosunku do procesu apoptozy: survivina Δ Ex3, pozbawiona eksonu 3, o silnych własnościach antyapoptotycznych oraz survivina 2B, która nie posiada aktywności antyapoptotycznej, ale za to jest antagonistą surviviny. [139] Wszystkie trzy formy obecne są w rakach żołądka, przy czym najwyższy poziom osiąga survivina. [135] Poziom dwu dodatkowo opisanych form jest niski: surviviny Δ Ex3 w miarę stały i niezależny od stopnia zaawansowania raka, surviviny 2B zmniejszający się w miarę zwiększania się stopnia zaawansowania nowotworu. [139]

Pojawienie się ekspresji surviviny może korelować z jądrową akumulacją p-53. [140] Lu i wsp. uważają, iż prawidłowe białko p-53 ma zdolność hamowania aktywności *geny surviviny*. W przypadku pojawienia się mutacji w *genie p-53*, która to mutacja jest najczęściej opisywaną pojedynczą zmianą w nowotworach człowieka [141], obserwujemy z jednej strony przedłużenie życia białka p-53 i wynikającą stąd jego jądrową akumulację, z drugiej zaś strony nadekspresję surviviny i co za tym idzie hamowanie całego procesu apoptozy. Indeks apoptotyczny (AI) w rakach wykazujących ekspresję surviviny jest niższy od indeksu określanego w rakach ujemnych w kierunku powyższego białka. [140]

Białko p-53 odgrywa pierwszoplanową rolę w regulacji cyklu komórkowego i kontroli procesu apoptozy, bierze udział w procesie transkrypcji DNA oraz wpływa na nasilenie procesu angiogenezy. Jest ono kodowane przez *gen p-53* składający się z 11 eksonów, położony na krótkim ramieniu chromosomu 17 (chr.17p 13.1), należący do tzw. genów supresorowych onkogenezy. [141] Produktem *geny p-53* jest zlokalizowane jądrowo białko p-53 o bardzo krótkim (około 20min.) czasie półtrwania, którego poziom w warunkach prawidłowych jest niewielki i nieoznaczalny immunohistochemicznie. [30] Do szybkiej aktywacji *geny p-53* wyrażającej się przede wszystkim nagłym wzrostem poziomu białka w jądrze komórkowym dochodzi w sytuacji uszkodzenia DNA. Jądrowa akumulacja białka p-53 doprowadza do pobudzenia transkrypcji wybranych genów regulujących przebieg cyklu komórkowego, co prowadzi do jego zahamowania

w fazie G1. Daje to komórce czas na naprawienie zmian w DNA. Jeśli naprawa powiedzie się, przebieg cyklu komórkowego jest kontynuowany. W razie niepowodzenia dochodzi do aktywacji kolejnych genów (między innymi: bax oraz IGF-BP3), kierujących komórkę na drogę apoptozy. [3] Białko p-53 ma także zdolność pobudzania produkcji trombospondyny 1, która hamuje proces angiogenezy. Inaktywacja *genu p-53* powoduje spadek poziomu trombospondyny, i w konsekwencji pobudzenie angiogenezy.

Mutacje w *genie p-53* są najczęściej opisywanymi zmianami genetycznymi w nowotworach człowieka. [141] Zmutowane białko p-53 traci zdolność kontroli przebiegu cyklu komórkowego oraz procesu transkrypcji DNA. Takie białko akumuluje się w jądrze komórkowym i może być wykrywane metodami immunohistochemicznymi. Potwierdzeniem szczególnej roli p-53 jest fakt, iż u osób z zespołem Li-Fraumeni, u których wyłączone są obydwa allele *genu p-53*, występuje 25 razy wyższe od populacyjnego ryzyko rozwoju całej gamy różnych: nabłonkowych i nienabłonkowych nowotworów. [30]

II. Cel pracy

Celem mojej pracy jest próba wyodrębnienia grupy czynników mających znaczenie rokownicze w sporadycznych, zaawansowanych rakach żołądka, a w szczególności:

1. Ocena częstości występowania mutacji w *genie E-kadheryny* metodą PCR/SSCP, porównanie otrzymanych wyników z oceną ekspresji białka E-kadheryny oraz β -kateniny oznaczonych metodami immunohistochemicznymi oraz korelacja powyższych z długością przeżycia pacjentów po operacji.
2. Ocena zależności pomiędzy występowaniem mutacji w *genie E-kadheryny* a cechami histologicznymi raka: stopniem zróżnicowania, typem wzrostu, obecnością i składem nacieku zapalnego, nasileniem angiogenezy, ekspresją białek surviviny i p-53 oraz zaawansowaniem procesu chorobowego w momencie diagnozy.
3. Ocena zależności pomiędzy występowaniem nieprawidłowości ekspresji białek E-kadheryny oraz β -kateniny a cechami histologicznymi raka: stopniem zróżnicowania, typem wzrostu, obecnością i składem nacieku zapalnego, nasileniem angiogenezy, ekspresją białek surviviny i p-53 oraz zaawansowaniem procesu chorobowego w momencie diagnozy.
4. Znalezienie istotnych statystycznie czynników rokowniczych w zaawansowanym raku żołądka przy zastosowaniu modelu Coxa.

III. Materiały i metody

- Materiały

Zgromadzony w archiwum Katedry Patomorfologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum UJ materiał pochodzi od 84 chorych operowanych w latach 1996-2000 w I Katedrze Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej CMUJ w Krakowie z powodu zaawansowanego raka żołądka. Materiał ten obejmuje preparaty histologiczne oraz kostki parafinowe przygotowane rutynowo w naszej Katedrze, a także zamrożone w -80°C , nieutralone fragmenty tkankowe pochodzące w każdym przypadku z nacieku nowotworu (T = tumor) oraz z nieobjętej procesem nowotworowym ściany żołądka (N = normal).

Materiał operacyjny został dostarczony do Katedry Patomorfologii bezpośrednio po zabiegu, w formie nieutralonej. W każdym przypadku wykonano szczegółowy opis makroskopowy otrzymanego preparatu oraz pobrano i natychmiast zamrożono w -80°C dwa wycinki: wycinek z nacieku nowotworu (oznaczono T) oraz wycinek z błony śluzowej żołądka oddalonej od nacieku nowotworowego (oznaczono N). Pozostały materiał operacyjny utrwalono w formalinie, a następnie pobrano wg skodyfikowanego schematu otrzymując preparaty histologiczne pochodzące z obydwu, odpowiednio oznaczonych marginesów operacyjnych, z nacieku raka, taśmy przez całą długość żołądka, węzłów chłonnych krzywizny większej i mniejszej, i w niektórych przypadkach z dodatkowych, nadesłanych osobno do badania narządów (np. sieci, śledziony).

Preparaty histologiczne rutynowo barwione metodą hematoksylina–eozyna zostały wykonane w Pracowni Histologicznej Katedry Patomorfologii CMUJ. W sumie naciek raka widoczny był na 698 szkiełkach - średnio 8,3 szkiełka z naciekiem raka na jeden oceniany przypadek. W pojedynczych przypadkach naciek raka widoczny był jedynie na 3-4 szkiełkach, ale były i takie przypadki, w których zajętych było kilkanaście szkiełek. Odczyny immunohistochemiczne wykonano w Laboratorium Immunohistochemicznym Katedry Patomorfologii CMUJ. Izolację DNA oraz badania molekularne związane z oceną obecności mutacji w *genie E-kadheryny* zostały wykonane w Pracowni Molekularnej Katedry Patomorfologii CMUJ.

Informacje kliniczne obejmujące, poza podstawowymi danymi osobowymi wraz z długością przeżycia po operacji, także wywiad rodzinny dotyczący zachorowań na raka żołądka w najbliższej rodzinie chorego były dostępne we wszystkich przypadkach. Żaden z pacjentów w przeprowadzonym wywiadzie nie zgłaszał występowania raka żołądka u członków rodziny, dlatego wszystkie analizowane przypadki zostały zakwalifikowane jako raki sporadyczne.

Szczegółowe określenie stopnia zaawansowania raka w momencie operacji zostało przeprowadzone na podstawie oceny cech TNM (tabela I) przy wykorzystaniu zmodyfikowanej w 2002 roku klasyfikacji TNM, zgodnie z wytycznymi „AJCC Cancer Staging Manual” (tabela II). [142]

TABELA I: Sposób określenia cechy T, N i M dla raka żołądka [142]

cecha T (“primary tumor”) – guz pierwotny	
Tis = carcinoma in situ	Rak śródnabłonkowy, brak cech inwazji blaszki właściwej błony śluzowej
T1	Rak nacieka blaszkę właściwą lub błonę podśluzową
T2	Rak nacieka mięśniówkę właściwą albo podsurowicówkę ściany żołądka
T2a	Rak nacieka mięśniówkę właściwą ściany żołądka
T2b	Rak nacieka podsurowicówkę ściany żołądka
T3	Rak przechodzi poza surowicówkę, jednak nie nacieka okolicznych struktur ^{a)}
T4	Rak przechodzi poza surowicówkę i nacieka okoliczne struktury ^{a)}
cecha N („regional lymph nodes”) - okoliczne węzły chłonne	
NX	Węzłów chłonnych nie znaleziono
N0	Brak przerzutów w węzłach chłonnych
N1	Obecne przerzuty w 1 do 6 węzłów chłonnych
N2	Obecne przerzuty w 7 do 15 węzłach chłonnych
N3	Obecne przerzuty w powyżej 15 węzłach chłonnych
cecha M („distant metastasis”) – obecność przerzutów odległych	
MX	Brak wiadomości na temat obecności przerzutów odległych
M0	Brak stwierdzonych przerzutów odległych
M1	Przerzuty odległe obecne

a) – przez „struktury okoliczne” należy rozumieć: śledzionę, poprzecnicę, wątrobę, przeponę, trzustkę, struktury ściany jamy brzusznej, nadnercza, nerki, jelito cienkie oraz przestrzeń zaotrzewnową.

TABELA II: Określenie stopnia zaawansowania raka żołądka na podstawie cech TNM (ang. stage grouping) [142]

STAGE	cecha T	cecha N	cecha M
-------	---------	---------	---------

Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1	N0	M0
Stage IB	T1	N1	M0
	T2a/b	N0	M0
Stage II	T1	N2	M0
	T2a/b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stage IIIA	T2a/b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
Stage IIIB	T3	N2	M0
Stage IV	T4	N1-3	M0
	T1-3	N3	M0
	dowolne T	dowolne N	M1

- Metody

Przygotowanie rutynowych preparatów histologicznych

Preparaty histologiczne sporządzono z materiału operacyjnego utrwalonego w 10%, zbuforowanym roztworze formaliny, rutynowo przeprowadzonego i zatopionego w parafinie. Skrawki o grubości 4µm były barwione hematoksyliną – eozyną. Barwienie metodą Alcjan toluidyny – PAS wykonano w celu wykazania obecności śluzu wewnątrz komórek nowotworowych oraz śluzu pozakomórkowego w obrębie nacieku raka. Ocenę histologiczną preparatów standardowych oraz odczynów immunohistochemicznych wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego firmy Leitz (Laborlux S).

W każdym przypadku liczono ilość szkiełek, na których widoczne było utkanie nowotworu przyjmując zasadę, iż liczyć należy te szkiełka, na których powierzchnia zajęta przez naciek nowotworu zajmuje minimum jedną czwartą pola widzenia mikroskopu przy powiększeniu 5x.

Określenie typu makroskopowego raka wg podziału Bormanna

Na podstawie opisów wyglądu makroskopowego materiałów operacyjnych każdemu przypadkowi został przypisany jeden z czterech typów wg Bormanna:

Typ 1 wg Bormanna = rak o typie polipa – rak rosnący egzofitycznie w formie wypukłego guza lub w formie uszypułowanego polipa bez owrzodzenia na powierzchni

Typ 2 wg Bormanna = rak typu grzybiastego – rak rosnący w formie guzowatego tworu o nierównej powierzchni z obecnym owrzodzeniem o wypukłych, wałowych brzegach. Pomimo penetracji w głąb dna owrzodzenia leży powyżej powierzchni ściany żołądka.

Typ 3 wg Bormanna = rak owrzodziały – rak ma postać owrzodzenia penetrującego głęboko w obręb ściany żołądka. Brzegi owrzodzenia są płaskie lub nieznacznie wypukłe, a dno owrzodzenia leży poniżej powierzchni prawidłowej błony śluzowej żołądka.

Typ 4 wg Bormanna = rak rozlegle naciekający ścianę żołądka – w tym typie naciek raka zawiera się w obrębie ściany żołądka, nie tworząc ani zmiany guzowatej na powierzchni żołądka ani nie powodując powstania zagłębienia z owrzodzeniem. Naciek taki może dotyczyć niewielkiego obszaru ściany żołądka lub w skrajnych przypadkach może zajmować rozlegle niemal całą ścianę tego narządu. Taki stan określamy mianem: „linitis plastica”

Ocena histologiczna

Badane przypadki zakwalifikowano kolejno według następujących klasyfikacji i podziałów stosowanych do oceny histologicznej raków żołądka:

- I. Klasyfikacji histologicznej wg Laurena [22]
- II. Klasyfikacji histologicznej WHO [6]
- III. Klasyfikacji wg Goseki [89]
- IV. Klasyfikacji Minga (mikroskopowa ocena typu wzrostu) [91]
- V. Oceny stopnia zróżnicowania nowotworu (tzw. „grading”) [1,6]

Ponadto oceniono:

VI. Obecność, intensywność oraz skład nacieku zapalnego w obrębie nowotworu i na jego granicy: na tzw. „froncie inwazji”

VII. Typ utkania histologicznego przerzutów raka obecnych w węzłach chłonnych
Ocena histologiczna została przeprowadzona bez znajomości danych klinicznych.

I. Klasyfikacja wg Laurena

Dokonując podziału na podgrupy wg klasyfikacji Laurena bierze się pod uwagę dwa kryteria:

- ◆ ogólną strukturę utkania nowotworu ze szczególnym uwzględnieniem tendencji do tworzenia struktur gruczołowych i papilarnych przez grupy komórek nowotworowych
- ◆ cechy cytologiczne poszczególnych komórek nowotworowych: ich wielkość, kształt, różnice w kształcie i wielkości pomiędzy komórkami w kolejnych polach widzenia, wielkość, kształt i regularność obrysów jąder komórkowych oraz strukturę i granice cytoplazmy poszczególnych komórek. Cechą pomocną jest znalezienie polaryzacji jąder komórkowych tworzących struktury gruczołowe, obecność rąbka szczoteczkowego oraz śluzu wewnątrzkomórkowego. [22]

Raki typu jelitowego wg Laurena charakteryzują się wyraźną tendencją do tworzenia cewek gruczołowych. [zdj. nr 1,2,3] Poszczególne komórki różnią się znacznie pomiędzy sobą pod

względem wielkości, kształtów, wielkości i barwliwości jąder (widoczny polimorfizm) [zdj. nr 2,3], są większe od komórek składających się na typowy naciek raka rozlanego, często można na pojedynczych komórkach znaleźć rąbek szczoteczkowy.

Raki typu rozlanego nie wykazują (lub wykazują jedynie nieznaczną) tendencję do tworzenia struktur gruczołowych. Jego utkanie stanowią małe, okrągłe, podobne do siebie komórki, pozbawione rąbka szczoteczkowego, naciekające w sposób rozległy i rozlany ścianę żołądka. Mitozy widuje się rzadko. Raki typu rozlanego wg Laurena często odpowiadają podtypowi sygnetowatokomórkowemu w podziale WHO. [zdj. nr 4, 5]

Zgodnie z modyfikacją wprowadzoną do oryginalnej klasyfikacji Laurena raki, w których obszary o cechach odpowiadających zarówno typowi jelitowemu jak i rozlanemu przemieszane są w podobnych proporcjach klasyfikujemy jako typ mieszany. [zdj. nr 6] Raki nie wykazujące dostatecznych cech zróżnicowania, które pozwalałyby zakwalifikować dany przypadek do którejś z wyżej wymienionych grup określano mianem niesklasyfikowanych. [6]

II. Klasyfikacja histologiczna wg WHO

Każdy przypadek raka gruczołowego (adenocarcinoma) został przyporządkowany do jednej z kategorii wg podziału WHO, gdy w danym raku występowało tylko jedno utkanie lub jeśli jedno z utkań zdecydowanie dominowało (>95%) nad pozostałymi. Jeżeli dwa lub więcej utkań występowały w podobnych proporcjach wymieniano je w kolejności od najszerzej do najslabiej reprezentowanego. Raki, które nie tworzyły cewek, ani żadnych innych struktur umożliwiających ustalenie kierunku ich różnicowania zakwalifikowano do kategorii: Rak niezróżnicowany (Carcinoma undifferentiatum). Kierowano się następującymi regułami pozwalającymi na przypisanie danego przypadku do odpowiedniego podtypu:

1. Gruczolakorak cewkowy (Adenocarcinoma tubulare) – w utkaniu nowotworu dominowały struktury cewkowe różniące się średnicą oraz kształtami światła, wyściółką nabłonkową i zawartością w świetle cewek. [zdj. nr 1,2,3,10] Komórki formujące cewy gruczołowe różniły się stopniem atypii, a całość obrazu stopniem zróżnicowania. Warianty nisko zróżnicowane przyjmowały ogniskowo obraz raków litych (adenocarcinoma solidum).
2. Gruczolakorak brodawkowy (Adenocarcinoma papillare) – w utkaniu nowotworu dominowały palczaste struktury brodawkowate zbudowane z włóknisto-naczyniowego rdzenia pokrytego cylindrycznymi lub walcowatymi komórkami o różnym stopniu atypii. [zdj. nr 7]
3. Gruczolakorak śluzotwórczy (Adenocarcinoma mucinosum) – w utkaniu nowotworu dominowały rozległe obszary (ponad 50%) leżącego pozakomórkowo śluzu, w którym obecne były pojedyncze komórki nowotworowe lub całe ich grupy, w tym także komórki sygnetowate,

albo luźno ułożone struktury gruczołowe wyścielone walcowatymi komórkami produkującymi śluz. [zdj. nr 8]

4. Raki sygnetowatokomórkowe (Adenocarcinoma mucocellulare) – w utkaniu nowotworu dominują rozrzucone, pojedyncze komórki lub małe ich grupy zawierające śluz wewnątrzkomórkowy. Śluz może mieć postać pojedynczej kropli spychającej jądro na obwód, w wyniku czego przybiera ono postać półksiężyca lub może występować w postaci licznych, drobnych kropli rozrzuconych po cytoplazmie, jądro komórkowe leży wtedy centralnie. [zdj. nr 4, 5, 9]

III. Klasyfikacja wg Goseki

Zakłada ona podział raków żołądka na cztery grupy wyodrębnione na podstawie oceny dwu cech w obrębie nacieku nowotworowego:

- a) tendencji do tworzenia struktur gruczołowych przez komórki raka (struktury gruczołowe łatwo identyfikowalne/ brak struktur gruczołowych)
- b) obecności w komórkach nowotworowych śluzu wewnątrzkomórkowego (większość komórek zawiera śluz wewnątrzkomórkowy/ całkowity brak lub jego obecność jedynie w nielicznych komórkach). Za śluz wewnątrzkomórkowy uważa się zarówno pojedynczą, dużą kroplę śluzu obecną w cytoplazmie i spychającą jądro komórkowe na obwód dając obraz typowej komórki sygnetowatej jak i drobne, chaotycznie rozrzucone po cytoplazmie kropelki śluzu nie przemieszczające jądra komórki. [zdj. 9,10] Zgodnie z powyższymi kryteriami śluz obecny pozakomórkowo np. wewnątrz nowotworowych gruczołów nie jest brany pod uwagę. Z kombinacji powyższych cech otrzymujemy cztery możliwe typy wg Goseki:

Typ wg Goseki	Tworzenie struktur gruczołowych	Obecność śluzu w cytoplazmie komórek
1	wyraźne	brak
2	wyraźne	wyraźna
3	brak	brak
4	brak	wyraźna

IV. Typ wzrostu wg Minga

Na podstawie cech podanych przez Minga [91] każdorazowo oceniono typ wzrostu raka:

1. Rak o naciekającym typie wzrostu (N): – komórki nowotworowe naciekają ścianę żołądka pojedynczo lub w małych grupach, granica nacieku jest rozmyta, podścielisko często bywa

desmoplastyczne. Zazwyczaj typ naciekający wg Minga pokrywa się z typem rozlanym wg Laurena.

2. Rak o rozprężającym typie wzrostu (R): – granica nacieku nowotworowego jest wyraźnie zdefiniowana, często z obecnym obfitym, przewlekłym naciekiem zapalnym. Rak zdaje się raczej uciskać niż naciekać kolejne warstwy ściany żołądka. Komórki nowotworowe zachowują związki pomiędzy sobą, często tworzą cewki. Rak ten najczęściej pokrywa się z typem jelitowym wg Laurena.

Jeśli w nacieku raka stwierdzono oba typy wzrostu przypadek kwalifikowano jako N/R.

V. Ocena stopnia zróżnicowania nowotworu (tzw. „grading”)

Ocenę stopnia zróżnicowania raka przeprowadzono według skali trójstopniowej [6], w której:

G1 = rak wysoko zróżnicowany - struktura morfologiczna raka jest zbliżona do prawidłowej błony śluzowej, widać wyraźne struktury gruczołowe obejmujące ponad 95% utkania nowotworu [zdj. nr 1,7]

G3 = rak nisko zróżnicowany – rak zbudowany z poronnych, nieregularnych struktur gruczołowych obejmujących poniżej 50% utkania nowotworu, wyścielonych komórkami wykazującymi znaczny polimorfizm lub zbudowany z pojedynczych komórek nie wykazujących tendencji do układania się w struktury gruczołowe, często z obecnością komórek sygnetowatych [zdj. nr 4,5]

G2 = rak o pośrednim stopniu zróżnicowania – są to te przypadki, które na zasadzie wykluczenia nie dają się zakwalifikować do żadnej z wyżej opisanych grup. Struktury gruczołowe obejmują 50-95% utkania nowotworu.

VI. Ocena obecności i intensywności nacieku zapalnego w obrębie utkania raka i na jego granicy oraz ocena składu komórkowego tego nacieku

Przy ocenie nacieku zapalnego na granicy tkanki prawidłowej i nowotworowej brano pod uwagę jego intensywność, ciągłość oraz skład komórkowy. Każdorazowo określano komórkę dominującą w nacieku zapalnym, a także wymieniano inne, mniej liczne składniki. W podobny sposób oceniono intensywność oraz skład komórkowy nacieku zapalnego w obrębie nacieku raka. Przyjęto następującą skalę oceny intensywności nacieku zapalnego:

0. - naciek zapalny (na granicy/w obrębie utkanie raka) nieobecny
1. - nieliczne, rozproszone komórki nacieku zapalnego (w przypadku granicy nie tworzące linii ciągłej)
2. - komórki nacieku zapalnego liczne, miejscami leżące w skupiskach

3. - komórki nacieku zapalnego bardzo liczne, równomiernie rozłożone (na granicy tkanki prawidłowej i nacieku nowotworowego tworzące pas ciągły)

VII. Ocena histologiczna przerzutów obecnych w węzłach chłonnych

Oglądając węzły chłonne liczono ilość zajętych przez przerzuty węzłów oraz określono typ utkania raka w przerzucie wg kryteriów klasyfikacji WHO. [zdj. nr 11, 12, 13, 14, 15]

Wykonanie i interpretacja reakcji immunohistochemicznych

Reakcje immunohistochemiczne wykonywano na materiałach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. Skrawki histologiczne grubości 4µm położono na silanizowanych szkiełkach podstawowych SuperFrost+ (SuperFrost Inc.) i wysuszono w cieplarni elektrycznej (temp. 56°C, przez noc). Materiały odparafinowywano w trzech zmianach ksyłenu i uwadniano w trzech zmianach alkoholu o malejących stężeniach. W celu pozbycia się tła blokowano wewnętrzną aktywność peroksydazy 3% wodą utlenioną (czas: 5min). Dalej następowało odmaskowanie antygeny i inkubacja z przeciwciałem pierwotnym - w zależności od wykonywanego odczynu występowały różnice w sposobie odmaskowywania antygeny oraz w warunkach inkubacji z przeciwciałem pierwotnym. Po inkubacji płukano preparaty w buforze TBS (50mM Tris-HCL, 150mM NaCl, pH=7,6; DAKO Corporation, numer katalogowy K 4001). Efekt reakcji uwidaczniano przy wykorzystaniu systemu EnVision+ (kozie immunoglobuliny sprzężone z polimerem dextranu znakowanym peroksydazą w buforze Tris-HCl (DAKO Corporation, numer katalogowy K4001). W celu uzyskania reakcji barwnej po wypłukaniu preparatów w buforze TBS wykonywano reakcję enzymatyczną na peroksydazę przy pomocy systemu AEC Substrate-Chromogen (nadtlenek wodoru w roztworze 3-amino-9-etylokarbazolu, 0,75 mg/ml, N,N-dimetyloformamidu 2,5% w buforze octanowym, 50mM, pH= 5,0), (DAKO Corporation, numer katalogowy K3464) uzyskując ceglasczerwone zabarwienie w przypadku odczynu pozytywnego. Po wypłukaniu w wodzie destylowanej podbarwiano jądra hematoksyliną Mayera i tak otrzymane preparaty zamykano w glicerożelu. Wszystkie preparaty oceniano w mikroskopie świetlnym firmy Leitz (Laborlux S).

Przygotowanie oraz ocena ekspresji białek E-kadheryny i β -kateniny metodą immunohistochemiczną

Ekspresja białka E-kadheryny w komórkach raka badana była immunohistochemicznie przy użyciu monoklonalnego, mysiego przeciwciała firmy BioGenex (klon 36, nr katalogowy 390M),

pracującego na tkankach utrwalonych w formalinie. Badana tkanka została poddana inkubacji z przeciwciałem pierwotnym (w rozcieńczeniu 1:50) przez 60 minut. Odmaskowanie antygeny przeprowadzono przy użyciu kuchenki mikrofalowej (3 razy po 5min., moc 750W), w buforze cytrynianowym, w pH = 6,0.

Ekspresję białka β -kateniny w komórkach nacieku raka badano immunohistochemicznie przy użyciu monoklonalnego, mysiego przeciwciała (IgG1) firmy BD Biosciences Pharmingen, numer katalogowy 610154, pracującego na tkankach utrwalonych w formalinie. Badana tkanka została poddana inkubacji z przeciwciałem pierwotnym (w rozcieńczeniu 1:100) przez 60 minut. Do odmaskowania antygeny użyto buforu cytrynianowego (warunki jak powyżej). W obydwu przypadkach kontrolę pozytywną stanowiła prawidłowa błona śluzowa żołądka, kontrolą negatywną był ten sam wycinek błony śluzowej, ale podczas wykonywania odczynu pominięto inkubację z przeciwciałem pierwotnym.

Prawidłowy odczyn immunohistochemiczny zarówno w kierunku E-cadheryny jak i β -kateniny zlokalizowany jest jedynie w błonie komórkowej. [zdj. nr 16,17] Przy ocenie uzyskanych wyników zwracano uwagę na procent komórek pozytywnych, w których uzyskano odczyn błonowy (dodatkowo poniżej 10%/ dodatkowo 11-90%/ dodatkowo ponad 90%) oraz intensywność odczynu porównując efekt barwienia w obrębie nacieku nowotworowego z efektem barwienia w obrębie prawidłowej błony śluzowej żołądka. Przy ocenie intensywności odczynu wyróżniono następujące kategorie:

- (+) – intensywność odczynu błonowego w komórkach raka i komórkach prawidłowej błony śluzowej identyczna
- (+/-) – odczyn błonowy w komórkach raka słabszy niż w komórkach błony śluzowej
- (-) – brak odczynu błonowego w komórkach raka

Po kombinacji powyższych powstały cztery następująco zdefiniowane kategorie:

- 3 - odczyn o intensywności (+) obecny ponad 90% komórek
- 2 - odczyn o zmiennej intensywności: obszary (+) i (+/-) obecne w ponad 10% komórek. Obszary o różnym nasileniu odczynów występowały w różnych proporcjach w kolejnych przypadkach
- 1 - odczyn o intensywności (+/-) obecny w ponad 90% komórek
- 0 - brak odczynu (-) w ponad 90% komórek

Przy ostatecznej ocenie wyników odczynów w kierunku E-cadheryny i β -kateniny przyjęto następującą interpretację:

Ekspresja PRAWDŁOWA:	kategoria 3	[zdj. nr 16, 17]
Ekspresja OSŁABIONA:	kategoria 2 oraz 1	[zdj. nr 18, 19, 21]

BRAK EKSPRESJI:

kategoria 0

Dodatkowo zwracano uwagę na ewentualne pojawienie się odczynu poza błoną komórkową: w obrębie cytoplazmy (C) komórek nowotworowych [zdj. nr 21] lub w obrębie jądra (J) [zdj. nr 18, 20], przyjmując również taką sytuację za nieprawidłową.

Przygotowanie oraz ocena ekspresji białka p-53 metodą immunohistochemiczną

Ocenę ekspresji białka p-53 przeprowadzono przy użyciu monoklonalnego przeciwciała przeciw ludzkiemu białku p-53 firmy DAKO (klasa IgG2b κ , klon DO-7, numer katalogowy M 7001, LOT 108, stężenie 400ug/l) w rozcieńczeniu 1:50. Po uwodnieniu odmaskowano antygen w kuchence mikrofalowej w buforze cytrynianowym o pH=6.0, (3 razy po 5min). Inkubacja z przeciwciałem pierwotnym w rozcieńczeniu 1:50 wykonana była w temperaturze pokojowej przez 90min. Przy ocenie uzyskanych wyników kierowano się procentem komórek wykazujących pozytywną, jądrową reakcję immunohistochemiczną, kwalifikując każdy przypadek do jednej z poniższych grup:

- 0 - całkowity brak reakcji w jądrach komórek nowotworowych
- 1 - widoczna reakcja w poniżej 10% jąder komórek nowotworowych
- 2 - widoczna reakcja w 10- 50% jąder komórek nowotworowych
- 3 - widoczna reakcja w 51- 90% jąder komórek nowotworowych
- 4 - widoczna reakcja w ponad 90% jąder komórek nowotworowych

Ostatecznie przypadki należące do grupy 0 oraz 1 zakwalifikowano jako przypadki negatywne, należące do grupy 2 jako słabo pozytywne, a należące do grup 3 i 4 jako silnie pozytywne.

Przygotowanie oraz ocena ekspresji białka Surviviny metodą immunohistochemiczną

Ocenę ekspresji białka Surviviny wykonano przy użyciu monoklonalnego, mysiego przeciwciała firmy Lab Vision Ab2(4F7) nadającego się do pracy na skrawkach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. Kontrolę pozytywną dołączaną każdorazowo do zestawu badanych preparatów stanowiły wycinki z grasicy. [133] Kontrolą negatywną były te same skrawki z grasicy, jednak przy wykonywaniu odczynu pominięto inkubację z przeciwciałem pierwotnym.

Antygen odmaskowywano gotując szkiełka w szybkowarze w roztworze EDTA o pH=8 przez 2,5 min. Preparaty inkubowano z przeciwciałem pierwotnym w rozcieńczeniu 1:50 przez 60 min. Przy ocenie ekspresji Surviviny wykorzystano półilościową metodę przedstawioną w pracy J. Yu [137]. Polega ona na określeniu procentu pozytywnych w powyższym barwieniu komórek nacieku raka i przyporządkowaniu każdego przypadku do jednej z poniższych grup:

- 0: poniżej 5% komórek pozytywnych
- 1: 5-25% komórek pozytywnych

- 2: 25-50% komórek pozytywnych
- 3: 50-75% komórek pozytywnych
- 4: > 75% komórek pozytywnych

Komórki pozytywne to takie, w których pojawił się wyraźny odczyn jądrowy lub poza reakcją w jądrze dodatkowo wystąpiło zabarwienie w cytoplazmie komórek. Ostatecznie przyjęłam:

PRZYPADKI NEGATYWNE: grupa 0

PRZYPADKI SŁABO POZYTYWNE: grupa 1 oraz 2

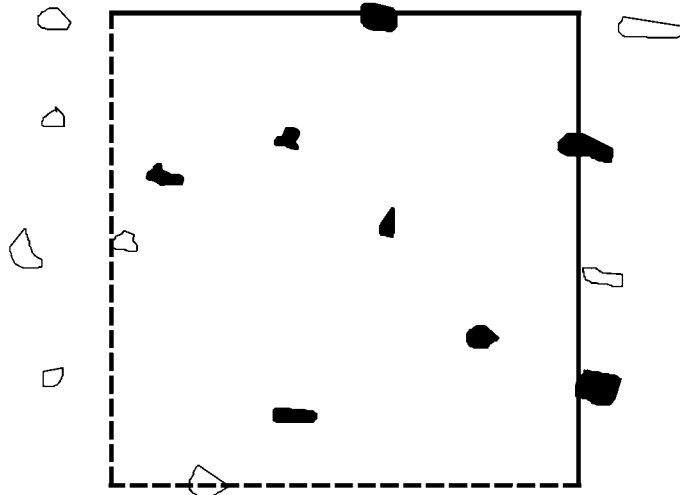
PRZYPADKI SILNIE POZYTYWNE: grupa 3 i 4

Ocena nasilenia angiogenezy w obrębie nacieku raka żołądka

W celu określenia nasilenia angiogenezy w obrębie nacieku raka policzono tzw. „gęstość naczyń” (ang. „vessel length density”), czyli całkowitą długość naczyń w jednostce objętości tkanki. Uzyskano wynik wyrażany w $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$.

W celu znalezienia najlepszego przeciwciała przeprowadzono wstępne badania na 40 losowo wybranych przypadkach raka żołądka przy użyciu trzech najczęściej stosowanych markerów naczyniowych (CD31, CD34 i czynn.VIII). Powyższy materiał został opracowany, a wyniki opublikowane. [143] Po przeanalizowaniu otrzymanych wyników do ostatecznej oceny nasilenia angiogenezy wybrano przeciwciało CD34. [zdj. nr 22, 23, 24] Morfometria została wykonana na mikroskopie firmy Zeiss współpracującym z kamerą ZVS-47DE (Optronics, USA) przy użyciu systemu komputerowej analizy obrazu: „AnalySIS 3.2” (Soft- Imaging System GmbH, Germany). [144]

W celu ilościowego określenia nasilenia angiogenezy w każdym badanym przypadku wybrano wycinek ze ściany żołądka z rakiem, obejmujący głębokie partie nacieku wraz z tzw. „frontem inwazji”. Po wykonaniu barwienia immunohistochemicznego przeprowadzono stereologiczną ocenę długości naczyń metodą „hot spots”. Jest to metoda często stosowana przy ocenie angiogenezy. [130-132,145,146] Polega ona na przejrzaniu ocenianego preparatu pod małym powiększeniem (5X) i wyborze pól o największym zagęszczeniu naczyń. W obrębie takich pól dokonuje się wyboru i zapisania pięciu obszarów, używając obiektywu o powiększeniu 10X. Zapisane obszary są wyświetlane na ekranie monitora, na którym równocześnie widoczne są cztery jednakowe ramki pomiarowe. Pomiar polega na zaznaczeniu wszystkich naczyń leżących wewnątrz ramek oraz na dwu z czterech boków każdej z nich. (patrz rysunek)



System komputerowy wylicza tzw. długość naczyń dla każdego badanego przypadku zgodnie z wzorem przedstawionym w pracy Białas i wsp. [143]

Po oznaczeniu długości naczyń w badanych rakach żołądka wyliczono wartość odpowiadającą medianie wartości „gęstości naczyń” i w ten sposób otrzymano dwie grupy nazwane odpowiednio:

1. raki o małym nasileniu angiogenezy
2. raki o dużym nasileniu angiogenezy

Wykrywanie obecności mutacji w genie *E-kadheryny* metodą PCR/SSCP

W celu zbadania obecności mutacji w *genie CDH1 (E-kadheryny)* z zamrożonych par materiałów tkankowych (N=normal, T=tumor) wyizolowano DNA używając komercyjnie dostępnego zestawu QIAamp Mini Kit (Qiagen). Podczas izolacji postępowano zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu (QIAamp Mini Kit Manual, 2001). [147]

Dla każdego z szesnastu eksonów badanego *genu CDH1* przeprowadzono reakcję łańcuchową katalizowaną przez polimerazę (PCR) w celu amplifikacji fragmentów DNA wszystkich kolejnych eksonów *genu CDH1*. Do wykonania reakcji PCR użyto komercyjnie dostępnych primerów (firmy IDT Inc). (tabela nr III, str. 48) Warunki amplifikacji zamieszczone są w tabeli. Primery użyte do badań zostały tak dobrane, aby powstający produkt reakcji obejmował pełną długość badanego eksonu genu oraz krótkie odcinki przylegających fragmentów niekodujących, jednak biorących udział w wycinaniu intronów. Po amplifikacji kolejnych eksonów uzyskany produkt poddano denaturacji, a następnie przeanalizowano przy użyciu metody konformacyjnego polimorfizmu pojedynczych nici (SSCP) poprzez przeprowadzenie całonocnej elektroforezy pionowej na żelu MDE (BMA Co). Każdy zdenaturowany, jednoniciowy fragment DNA, w zależności od konformacji przestrzennej jaką posiada, inaczej zachowuje się w polu elektrycznym. Różniące się

fragmenty DNA, migrując z inną szybkością tworzą odrębne prążki. W przypadku pojawienia się mutacji lub polimorfizmów w badanym odcinku DNA na żelu pojawiają się prążki dodatkowe. Uwidocznienie prążków następuje po wysrebrzeniu żelu (0,012M azotanem srebra). Starannie wystandaryzowana procedura SSCP jest bardzo czułą metodą wykrywania mutacji, odznaczającą się korzystną relacją pomiędzy kosztami i nakładem pracy, a ilością uzyskanych danych. [148] Zastosowana metodyka SSCP, w której osobno amplifikowane były wszystkie kolejne eksony genu kodującego E-kadherynę wraz z przylegającymi odcinkami intronowego DNA umożliwiła nie tylko wykrycie mutacji, lecz także ich umiejscowienie w poszczególnych częściach genu.

Dodatkowy prążek obecny jedynie w próbce pochodzącej z nacieku raka (T) traktowany był jako mutacja. Dodatkowy prążek obecny zarówno w próbce pochodzącej z guza (T) jak i z nienowotworowego fragmentu ściany żołądka (N) traktowany był jako polimorfizm. Tak uzyskane żele zostały przeniesione na papier filtrujący 3MM (Whatmann), wysuszone i sfotografowane [zdj. nr 25, 26].

TABELA III: Sekwencje primerów wykorzystanych do amplifikacji kolejnych 16 eksonów genu *CDHI* do analizy SSCP, temperatura dla przeprowadzenia reakcji PCR, warunki reakcji SSCP

Numer eksonu	Sekwencje primerów użyte do amplifikacji kolejnych eksonów genu <i>CDHI</i>	Temperatura reakcji PCR (°C)	Warunki reakcji SSCP	Wielkość prążka (bp)
1	1F 5'- TACGGGGGGCGGTGCTCCGG-3' 1R 5'- GAATGCGTCCCTCGCAAG-3'	70	0.8x MDE 15 h / temp. pokojowa/ 4W 0.8x MDE 17 hours run / 8°C/ 4W	284
2	2F 5'- TCACCCGGTTCATCTAC-3' 2R 5'- TTCCAACCCCTCCCTACT-3'	58	0.8x MDE 17 hours run / 8°C/ 4W	198
3	3F 5'- GTCTTTAATCTGTCCAATTTCC-3' 3R 5'- AAACAACAGCGAACTTCTCAG-3'	55	0.8x MDE 17 hours run / 8°C/ 4W	309
4	4F 5'- CTTGTTCTCATCTTCTTTC-3' 4R 5'- CCCTTTCTCCTTGGTACT-3'	58	0.8x MDE 17 hours run / 8°C/ 4W	237
5	5F 5'- GTTGGGATCCTTCTTACTA-3' 5R 5'- AAATCCTGGGTGGATGTTAC-3'	58	0.6x MDE + 10% Glycerol 17 hours run / 8°C/ 4W	256
6	6F 5'- CTCACTTGGTCTTTTCAG-3' 6R 5'- AACCTTTGGGCTTGGACA-3'	58	0.8x MDE 17 hours run / 8°C/ 4W	246
7	7F 5'- AGCTTGTCTAAACCTTCATC-3' 7R 5'- GCTTAGACCATCACTGTATT-3'	58	0.8x MDE 17 hours run / 8°C/ 4W	328
8	8F 5'- TTGGTTGTGTCGATCTCTCT-3' 8R 5'- CAGTGGTACCCTTAGTTCAT-3'	58	0.8x MDE 17 hours run / 8°C/ 4W	223
9	9F 5'- GTA CT TGT AAT GAC AC AT CTC -3'	58	0.8x MDE 17 hours run / 8°C/ 4W	252

	9R 5'- TGCCAGTTTCTGCATCTTGC -3'			
10	10F 5'- ACTTCATTGTTTCTGCTCTC -3' 10R 5'- AACCAGTTGCTGCAAGTCAG -3'	60	0.8x MDE 17 hours run / 8°C/ 4W	308
11	11F 5'- GTTGTTTGCTGGTCCTATTC -3' 11R 5'- GAACTAGCTAGGAGGTCGAG -3'	58	0.8x MDE 17 hours run / 8°C/ 4W	253
12	12F 5'- TGGGGATTCACTACTGTTGC -3' 12R 5'- GCATGGCAGTTGGAGCAAAG -3'	58	0.8x MDE 17 hours run / 8°C/ 4W	326
13	13F 5'- TTTCTCCCTGGTCTCATC -3' 13R 5'- TGAGTCACTTGCCAGCTGGA -3'	60	0.8x MDE 17 hours run / 20°C/ 4W	297
14	14F 5'- CTCTCAACACTTGCTCTGTC -3' 14R 5'- AGAGATCACCACTGAGCTAC -3'	58	0.6x MDE + 10% Glycerol 17 hours run / 8°C/ 4W	209
15	15F 5'- CATAGCCCTGTGTGTATGAC -3' 15R 5'- CGGATGCTTTGGCTTTCCAC -3'	58	0.8x MDE 17 hours run / 8°C/ 4W	248
16	16F 5'- AGATGACAGGTGTGCCCTTC -3' 16R 5'- ATTTCTGCATTTCCAGCAC -3'	58	0.8x MDE 17 hours run / 8°C/ 4W	315

Analiza statystyczna

W opracowaniu statystycznym otrzymanych wyników zastosowano testy nieparametryczne, które charakteryzują się dużą wydolnością dla małych grup badanych oraz nie wymagają posiadania rozkładu normalnego grupy. Wykorzystano następujące testy:

- test istotności różnic U Manna-Whitneya
- test χ^2
- analizę wariancji ANOVA rang Kruskala-Wallis
- współczynnik korelacji rang Spearmana
- długość przeżyć pacjentów analizowano przy użyciu metody Kaplan-Meier'a oraz modelu regresji proporcjonalnych hazardów Coxa

Dla wszystkich analiz statystycznych oraz przy określaniu współczynnika korelacji przyjęto wartość $p < 0,05$ jako poziom istotności statystycznej. Wartość p pomiędzy 0,10 a 0,05 traktowano jako trend. Przy opracowywaniu danych zastosowano oprogramowanie STATISTICA for Windows, wersja 6.0 (StatSoft Inc).

IV. Wyniki

Dane demograficzne

Analizowana seria obejmuje materiał od 62 mężczyzn oraz 22 kobiet (m:k = 3:1) w wieku od 35 do 81 lat (średni wiek = 59.1 , dla mężczyzn = 57.2 , dla kobiet = 64.8). W momencie rozpoczęcia analizowania danych sześćdziesiąt dwie osoby z badanej grupy nie żyły, dwudziestu jeden chorych żyło i pozostawało w kontroli I Katedry Chirurgii w Krakowie.

Rozkład cech wg klasyfikacji TNM w ocenianej grupie był następujący:

		Razem	Mężczyźni	Kobiety
cecha T w klasyfikacji TNM	T1	0	0	0
	T2	4	2	2
	T3	71	52	19
	T4	9	8	1
cecha N w klasyfikacji TNM	N0	12	7	5
	N1	20	12	8
	N2	20	18	2
	N3	32	25	7
cecha M w klasyfikacji TNM	M0	54	39	15
	M1	30	23	7

Stopień zaawansowania klinicznego (WHO staging) określony na podstawie cech TNM:

st. zaawansowania	razem	mężczyźni	kobiety
IB	1	0	1
II	9	6	3
IIIA	17	11	6
IIIB	12	11	1
IV	45	34	11
suma	84	62	22

Makroskopowa ocena postaci raka wg klasyfikacji Bormanna

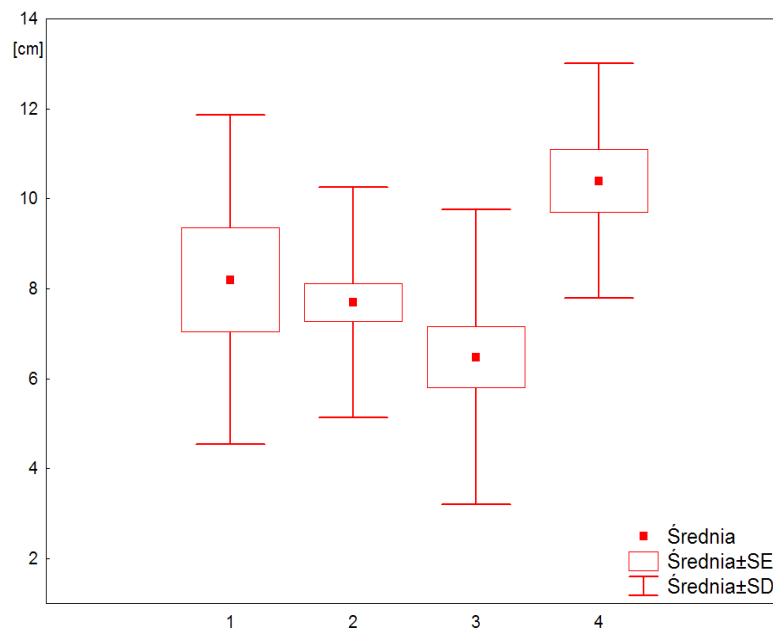
Prawie dwie trzecie ocenianych raków żołądka (52 przypadki) rosło w formie polipa lub guza (typ I lub II wg Bormanna), tworząc wyraźne masy wpuklające się do światła żołądka. W 61 przypadkach powierzchnia raka była owrzodziła (typ II lub III wg Bormanna). W 10 przypadkach rak naciekał

ścianę żołądka w sposób rozlany, doprowadzając do jej pogrubienia i usztywnienia na dużym obszarze (typ IV wg Bormanna).

Makroskopowy podział raków żołądka (klasyfikacja Bormanna):

Typ wg Bormanna	Ilość przypadków	% całości
I	13	15,5
II	39	46,4
III	22	26,2
VI	10	11,9

Analiza statystyczna wykazała obecność istotnych różnic w rozmiarach raka w poszczególnych grupach wg Bormanna. Największe różnice stwierdzono pomiędzy grupą IV, gdzie średnio naciek raka miał największą średnicę, a pozostałymi grupami - (w teście Kruskala-Wallisa $p=0,0042$).



WYKRES 1: Średni wymiar nacieku raka w zależności od typu wg Bormanna

Różnice pomiędzy średnim wymiarem nacieku raka w grupach: I, II i III wg Bormanna są mniejsze, widoczny był jednak większy rozrzut wartości średnicy guza.

Ocena histologiczna

1. Podział wg Laurena

W analizowanej grupie raków żołądka najliczniej reprezentowane były raki typu jelitowego wg Laurena – 31 przypadki (37%). Kolejne 29 przypadków zakwalifikowano jako raki rozlane wg Laurena (34,5%). Pozostałe 24 przypadki (28,5%) to raki o budowie mieszanej, czyli raki posiadające w swoim utkaniu zarówno elementy odpowiadające typowi jelitowemu jak i rozlanemu wg Laurena, występujące w mniej więcej równych proporcjach.

2. Typ utkania raka wg podziału WHO

Ponad połowa wszystkich przypadków raków typu jelitowego wg Laurena zbudowana była tylko z jednego utkania histologicznego wg podziału WHO; we wszystkich przypadkach było to utkanie cewkowe (adenocarcinoma tubulare). W trzynastu przypadkach widoczne były dwa różne utkania wg WHO, przy czym najczęściej współistniały: komponenta cewkowa i papilarna (7 przypadków). Poza tym obok utkania cewkowego występowało utkanie: śluzowe (adenocarcinoma mucinosum) – trzy przypadki, niewielkie obszary śluzowokomórkowe (adenocarcinoma mucocellulare) – dwa przypadki i w jednym przypadku obszar o budowie niezróżnicowanej (carcinoma undifferentiatum). W około połowie raków typu rozlanego wg Laurena (14/29) występowały dwa różne utkania histologiczne wg WHO, najczęściej obserwowano dominującą komponentę śluzowokomórkową (mucocellulare) i jako drugie utkanie śluzowe (mucinosum), cewkowe (tubulare), lite (solidum) oraz nisko zróżnicowane obszary raka gruczołowego nie tworzące struktur gruczołowych, a zarazem nie posiadające w swym utkaniu komórek sygnetowatych, które w raportach histopatologicznych opisywane były jako: „poorly differentiated carcinoma”, a ja nadałam im roboczą nazwę „carcinoma NOS = not otherwise specified”. W ośmiu przypadkach raków rozlanych zauważono trzy i więcej z wyżej wymienionych utkań histologicznych. Tak więc 22 z 29 (76%) raków zakwalifikowanych jako typ rozlany wg Laurena miało w swym utkaniu co najmniej dwa różne, podobnie rozległe typy wg podziału WHO. Jedynie siedem przypadków raków rozlanych można określić jako czyste raki śluzowokomórkowe.

Raki mieszane wg Laurena z definicji zawierają dwa różne utkania. W 9 przypadkach raki te były zbudowane z dwu różnych, w 11 z trzech różnych, a w 4 z więcej niż trzech różnych utkań histologicznych wg podziału WHO.

Ilość różnych utkań wg WHO w zależności od typu raka wg Laurena

typ wg Laurena	JELITOWY (%)	ROZLANY (%)	MIESZANY (%)	całość
----------------	--------------	-------------	--------------	--------

liczba przypadków (procent)	31 (37%)			29 (34,5%)			24 (28,5%)			84 (100%)
utkania wg WHO	jedno	dwa	więcej	jedno	dwa	więcej	dwa	trzy	więcej	
liczba przypadków	16	13	2	7	14	8	9	11	4	84
procent	19%	15,5%	2,5%	8,3%	16,6%	9,5%	10,7%	13%	4,9%	100%

3. Podział wg Goseki

Najliczniej reprezentowane były raki należące do grupy I wg Goseki (34 przypadki), a więc takie, w których dominowały obszary z wyraźnym tworzeniem cewek gruczołowych, a w komórkach nowotworowych nie stwierdzono obecności śluzu. Grupy: III oraz IV wg Goseki były podobnie liczne (odpowiednio 23 i 20 przypadków). Najmniej raków – jedynie 7 przypadków znalazło się z grupie II wg Goseki. W 28 przypadkach widoczne były dwa zdecydowanie różne obrazy, tak, że zakwalifikowanie raka do którejś z grup wg Goseki nie było jednoznaczne – najczęściej współistniejącymi typami utkania były: typ III z typem I (9 przypadków) oraz typ I z typem IV (8 przypadków). Większość raków, które zbudowane były z dwu typów utkań wg klasyfikacji Goseki należała do kategorii raków mieszanych.

Liczebność poszczególnych grup wg podziału Goseki

Typ raka wg Goseki	I	II	III	IV
Ilość przypadków	34	7	23	20

4. Typ wzrostu wg Minga

Czterdzieści przypadków raków (48%) zakwalifikowano jako raki o naciekającym typie wzrostu wg Minga. Przeważającą grupę stanowiły wśród nich raki typu rozlanego wg Laurena (25 przypadków). W tej grupie znalazło się również 11 przypadków raków typu mieszanego i cztery przypadki raków typu jelitowego wg Laurena.

Trzydzieści cztery przypadki raków (40%) zostało zakwalifikowanych jako raki o rozprężającym typie wzrostu. Wśród nich przeważały raki typu jelitowego wg Laurena (24 przypadki). Znalazło się tu również osiem raków typu mieszanego oraz dwa typu rozlanego wg Laurena.

W 10 przypadkach (12%) obydwie typy wzrostu obecne były w podobnych proporcjach i nie dało się jednoznacznie zakwalifikować powyższych przypadków do którejś z wymienionych wcześniej grup.

Relacje pomiędzy typem wzrostu wg Minga
a typem histologicznym raka wg Laurena

Typ wzrostu wg Minga	ROZPREŻAJĄCY			NACIEKAJĄCY			OBYDWA		
Ilość przypadków (procent)	34 (40%)			40 (48%)			10 (12%)		
w tym raków wg Laurena	J	M	R	J	M	R	J	M	R
liczba	24	8	2	4	11	25	3	5	2
% w obrębie danej kategorii wg Minga	70,5	23,5	6,0	10,0	27,5	62,5	30	50	20
% całości przypadków	28,5	9,5	2,4	4,8	13,1	29,8	3,6	5,9	2,4

J – rak typu jelitowego wg Laurena
M – rak typu mieszanego wg Laurena
R – rak typu rozlanego wg Laurena

5. Stopień zróżnicowania raka

Raki wysoko zróżnicowane (ang. „well differentiated”) inaczej określane skrótem G1 stanowiły 14,3% całości (12 przypadków). Wszystkie wysoko zróżnicowane raki żołądka należały do grupy raków jelitowych wg Laurena. Siedem z nich prezentowało jednorodny, cewkowy obraz histologiczny. W kolejnych czterech przypadkach dominowało utkanie cewkowe, jednak widoczna była wyraźna domieszka o budowie kosmkowej. W ostatnim przypadku obok dominujących utkań: cewkowego i kosmkowego widoczny był także niewielki obszar o budowie śluzowej.

Raki o pośrednim stopniu zróżnicowania inaczej określane skrótem G2 stanowiły 13,1% całości (11 przypadków). Wśród nich tylko jeden rak należał do kategorii raków mieszanych wg Laurena. Zbudowany był z trzech mniej więcej równomiernie reprezentowanych utkań histologicznych: cewkowego i śluzowego oraz śluzowokomórkowego. Pozostałych 10 przypadków raków o pośrednim stopniu zróżnicowania należało do kategorii raków jelitowych wg Laurena, przy czym 6 z nich zbudowane było tylko z utkania cewkowego, w pozostałych czterech przypadkach obok utkania cewkowego widoczna była komponenta kosmkowa (1 przypadek), śluzowa (2 przypadki) oraz śluzowokomórkowa (1 przypadek).

Zdecydowana większość ocenianych przeze mnie raków – 72,6% znalazła się w kategorii raków nisko zróżnicowanych (ang. „poorly differentiated”), inaczej określanych skrótem G3. Wszystkie raki rozlane wg Laurena (29 przypadków) oraz wszystkie poza jednym rakiem mieszanym wg Laurena (23 przypadki) znalazły się w kategorii raków nisko zróżnicowanych – G3. Do kategorii raków nisko zróżnicowanych zaliczyłam także 9 z 31 (29%) raków typu jelitowego wg Laurena.

Relacje pomiędzy stopniem zróżnicowania raka
a typem histologicznym wg Laurena

	typ wg Laurena			liczba przypadków
	jelitowy	mieszany	rozlany	
G1	12	0	0	12
G2	10	1	0	11
G3	9	23	29	61
suma	31	24	29	84

6. Ocena intensywności oraz składu nacieku zapalnego na tzw. „froncie nacieku” raka oraz w jego głębi

W przeważającej liczbie przypadków (51 = 60,7%) naciek zapalny na granicy tkanki nowotworowej i prawidłowej był nieobecny (29 raków) lub jedynie minimalny (22 raki).

W pozostałych 33 przypadkach (39,3%) stwierdziłam występowanie intensywnego (16 raków) lub bardzo intensywnego (17 raków) nacieku zapalnego na granicy nacieku raka. W większości przypadków (27 raków) naciek złożony był z limfocytów i plazmocytów, przy czym w czterech przypadkach występowała niewielka domieszka granulocytów. W 6 przypadkach naciek na granicy raka składał się w przeważającej części z granulocytów. Intensywny lub bardzo intensywny naciek zapalny obserwowałam także w 36 przypadkach (42,9%) w głębi utkania raka. Także w tych przypadkach w składzie nacieku dominowały limfocyty i plazmocyty, w kilku przypadkach stwierdziłam niewielką domieszkę granulocytów. W sześciu przypadkach naciek składał się głównie z granulocytów.

W większości przypadków stwierdzenie obecności lub braku obecności nacieku zapalnego na tzw. „froncie inwazji” pokrywało się z jego obecnością lub brakiem w głębi nacieku raka, a związek ten był istotny statystycznie (współczynnik korelacji Spearmana $R=0,75$; $p=0,0001$). Rozbieżności wystąpiły w ośmiu przypadkach: w pięciu stwierdziłam intensywny naciek zapalny w głębi guza przy jego braku na granicy nacieku, a w trzech naciek na „froncie inwazji” był intensywny, podczas

gdy w głębi guza był minimalny lub nieobecny. Stwierdzono także związek pomiędzy rodzajem komórek zapalnych w obrębie nacieku i na tzw. „froncie inwazji” – (w teście Chi^2 $p=0,0001$).

7. Typ utkania histologicznego przerzutów raka obecnych w węzłach chłonnych

Obecności przerzutów w węzłach chłonnych krzywizn większej i mniejszej nie stwierdzono jedynie u 11 pacjentów (13% przypadków). U 73 pacjentów (87% przypadków) przerzuty były obecne w węzłach chłonnych krzywizn, przy czym u 32 z nich zajmowały ponad 15 przebadanych węzłów (wg TNM - N3).

U przeważającej większości pacjentów (70 przypadków) stwierdzone w węzłach chłonnych przerzuty z histologicznego punktu widzenia opowiadały typom utkań wg WHO stwierdzonym w obrębie nacieku w ścianie żołądka. Obecność większej liczby utkań w obrębie guza pierwotnego korelowała z większą różnorodnością utkań w węzłach chłonnych. Wszystkie przypadki raka jelitowego wg Laurena zbudowane tylko z jednego utkania - cewkowego (Adenocarcinoma tubulare) posiadały w przerzutach wyłącznie utkanie typu cewkowego. W trzech przypadkach raków mieszanych wg Laurena, w których w obrębie nacieku w ścianie żołądka stwierdziłam obecność trzech różnych, mniej więcej równomiernie reprezentowanych utkań: cewkowego, śluzowego i sygnetowatokomórkowego w przerzutach w węzłach chłonnych obecne były wyłącznie pola zbudowane z komórek sygnetowatych. W kolejnych pięciu przypadkach raków mieszanych wg Laurena zbudowanych z co najmniej dwu utkań w przerzutach stwierdziłam obecność jedynie komponenty cewkowej.

Jedynie w trzech na 73 przypadki z przerzutami stwierdziłam wystąpienie w obrębie węzła chłonnego przerzutu o utkaniu nie występującym w nacieku w ścianie żołądka. W dwu przypadkach były to raki o typie mieszanym wg Laurena złożone z komponenty cewkowej oraz pól zbudowanych z komórek sygnetowatych, podczas gdy w przerzutach poza wcześniej wymienionymi utkaniami pojawiły się rozległe pola o budowie śluzowej. W kolejnym przypadku rak typu rozlanego zbudowany w przeważającej większości z pól sygnetowatokomórkowych z niewielką domieszką pól śluzowych w przerzutach posiadał, poza obszarami sygnetowatokomórkowymi, rozległe obszary o budowie cewkowej. Wyraźnie wykształcone cewki zbudowane były z komórek, które zgodnie z założeniami klasyfikacji Laurena odpowiadały komponente jelitowej.

Wykrywanie obecności mutacji w genie E-kadheryny metodę PCR/SSCP

Analizując wzór otrzymanych na żelach prążków stwierdzono obecność mutacji w *genie CDH1* w jedenastu z 84 raków, co stanowi 13% badanych przypadków. W jednym przypadku stwierdzono obecność dwu różnych mutacji w dwu sąsiednich eksonach *genu CDH1*, co daje w sumie liczbę dwunastu mutacji.¹

Stwierdzone mutacje rozrzucone były na całej długości genu i wystąpiły w eksonach: czwartym, piątym i szóstym (po 2 przypadki), siódmym, ósmym, dziesiątym i czternastym (po 1 przypadku) oraz dwie w obrębie intronu piątego.

W sześciu przypadkach z obecną mutacją w *genie CDH1* stwierdzono metodą immunohistochemiczną równoczesne wystąpienie nieprawidłowej ekspresji białka E-kadheryny. W teście dokładnym Fishera oraz w teście Chi² stwierdzono istotny statystycznie związek pomiędzy obecnością mutacji w *genie CDH1* a zaburzeniami ekspresji tego białka stwierdzanymi immunohistochemicznie: p odpowiednio: 0,04 i 0,03. W pięciu przypadkach pomimo obecności mutacji ekspresja białka była zachowana i prawidłowa.

Lokalizacja mutacji w *genie CDH1* i wzajemne relacje z immunohistochemiczną ekspresją E-kadheryny i β -kateniny

Nr histologiczny	Lokalizacja mutacji	Ekspresja E-kadheryny	Ekspresja β -kateniny
1344083	ekson 6	N	N
1347147	ekson 8	F	F
1363260	ekson 4, 5	N	N
1365835	ekson 6	N	N
1373213	intron 5	F	N
1381134	ekson 10	F	F
1402020	ekson 7	F	F
1403654	ekson 14	F	N
1405699	intron 5	F	N
1427596	ekson 5	N	N
1443403	ekson 4	N	N

N – odczyn prawidłowy

F – odczyn nieprawidłowy (zmieniona lokalizacja lub intensywność)

¹ Dokładna analiza typu mutacji zidentyfikowanych w obecnym materiale metodą PCR/SSCP obejmująca sekwencjonowanie ampikonów pochodzących ze zmienionych obszarów genu jest przedmiotem dalszych badań w Katedrze Patomorfologii CM UJ i przedstawiona zostanie w kolejnej pracy. Wstępne wyniki sekwencjonowania potwierdziły swoistość metody PCR/SSCP.

Stwierdzono, iż mutacje w *genie CDHI* występują częściej w rakach nisko zróżnicowanych (G3): wynik istotny statystycznie w teście χ^2 liczonym metodą NW (najwyższej wiarygodności): $p=0,03$, w teście χ^2 liczonym metodą Pearsona stwierdzono występowanie trendu: $p=0,099$. Stwierdzono, iż mutacja w *genie E-kadheryny* statystycznie częściej występuje w tych przypadkach, gdzie w błonie śluzowej żołądka poza rakiem nie występował tzw. rozrost dołączkowy (hyperplasia foveolaris) – (w teście χ^2 $p < 0,04$).

Stwierdzono występowanie trendu pomiędzy obecnością mutacji w *genie CDHI* a typem raka wg Goseki (w teście χ^2 $p=0,09$).

Nie znaleziono różnic w obecności mutacji w *genie E-kadheryny* w zależności od typu raka wg Laurena (w teście χ^2 $p=0,17$) oraz Minga (w teście χ^2 $p=0,46$). Nie stwierdzono związku pomiędzy obecnością mutacji w *genie CDHI* a akumulacją białka p-53 (w teście χ^2 $p=0,35$), w zależności od obecności lub braku ekspresji surviviny (w teście χ^2 : $p=0,59$), w zależności od nasilenia angiogenezy w obrębie nacieku raka (w teście χ^2 : $p=0,47$) oraz od obecności nacieku zapalnego w obrębie raka lub na tzw. „froncie inwazji”. Nie stwierdzono różnic dotyczących lokalizacji raka w grupach z obecną mutacją w *genie E-kadheryny* i bez niej.

Immunohistochemia

1. 1 ekspresja białek E-kadheryny oraz β -kateniny i związki z obecnością mutacji w *genie CDHI*

Immunohistochemiczna ocena ekspresji białka E-kadheryny i β -kateniny w obrębie tkanki nowotworowej została wykonana w 83 z 84 badanych przypadków (w jednym przypadku niemożliwe było odszukanie kostek parafinowych i tym samym uzyskanie preparatów do wykonania odczynów).

Stwierdzono, iż 80% badanych raków (66 przypadków) wykazuje prawidłową, błonową ekspresję białka E-kadheryny o sile porównywalnej z ekspresją obserwowaną w prawidłowej błonie śluzowej żołądka w danym przypadku. Ekspresję nieprawidłową stwierdzono w 17 przypadkach: w jednym przypadku zaobserwowano całkowity brak ekspresji białka E-kadheryny – był to rak z obecną mutacją w *genie CDHI*, w dwu dalszych ekspresja była osłabiona, a w pozostałych czternastu przypadkach obok ekspresji błonowej (prawidłowej lub osłabionej) dodatkowo pojawiła się ekspresja cytoplazmatyczna. Wśród powyższych 17 raków z nieprawidłową immunohistochemiczną ekspresją E-kadheryny w sześciu przypadkach potwierdzono obecność somatycznej mutacji w genie kodującym powyższe białko.

Prawidłową, błonową ekspresję białka β -kateniny w obrębie tkanki nowotworowej stwierdzono w 67 przypadkach (81%), podczas gdy w 16 przypadkach (19%) ekspresja była zmieniona: w ośmiu przypadkach osłabiona, w kolejnych ośmiu o zmienionej lokalizacji. W dziewięciu przypadkach zaburzeniom ekspresji β -kateniny nie towarzyszyły nieprawidłowości związane z ekspresją E-kadheryny, natomiast w pozostałych siedmiu przypadkach występowały również zmiany ekspresji E-kadheryny. Spośród tych siedmiu przypadków w trzech stwierdzono także obecność mutacji w *genie CDH1*. Nie stwierdzono występowania związków pomiędzy zaburzeniem ekspresji E-kadheryny i β -kateniny w badanej grupie raków.

Sumaryczna interpretacja odczynów immunohistochemicznych w kierunku E-kadheryny i β -kateniny wykazała, iż prawie 68% przebadanych raków żołądka (57 przypadków) nie wykazuje zaburzeń ekspresji żadnego z powyższych białek. W 26 przypadkach mamy do czynienia z nieprawidłowym odczynem, przy czym w 7 przypadkach zaburzenia dotyczą równocześnie E-kadheryny i β -kateniny, w 10 przypadkach jedynie E-kadheryny, a w 9 jedynie β -kateniny.

Wzajemne relacje pomiędzy zaburzeniami ekspresji E-kadheryny i β -kateniny oraz obecnością mutacji w *genie CDH1*

przypadki z zaburzeniami ekspresji E-kadheryny lub/i β -kateniny (%)	w tym zmiany dotyczące:	Liczba (% przypadków nieprawidłowych)	W tym przypadków z równocześnie stwierdzoną mutacją w <i>genie CDH1</i>
26 (32%)	obydwu białek	7 (27%)	3
	tylko E-kadheryny	10 (38%)	3
	tylko β -kateniny	9 (35%)	0

Podsumowanie immunohistochemicznej oceny ekspresji białek E-kadheryny i β -kateniny:

Ekspresja E-kadheryny	Ilość przypadków (procent)	W tym przyp. z potwierdzoną mutacją w <i>genie CDH1</i>
PRAWIDŁOWA BŁONOWA	66 (79,5%)	5

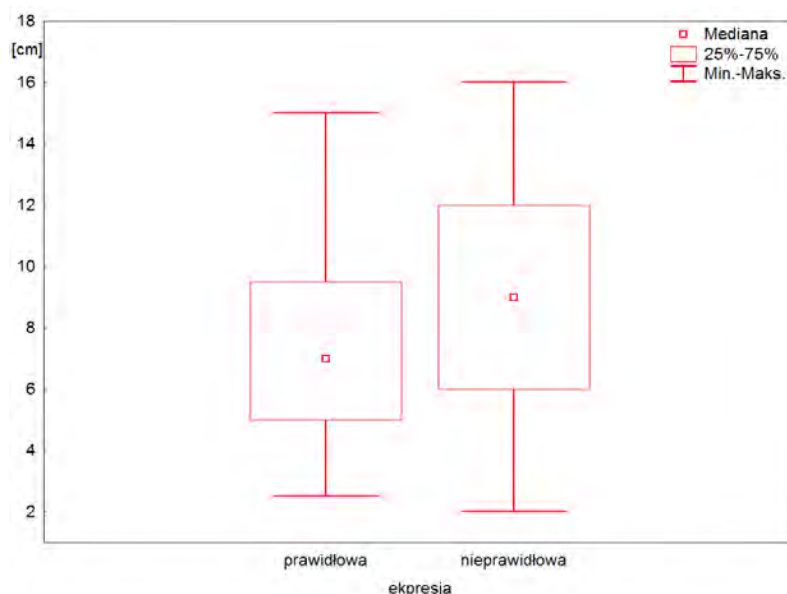
Ekspresja β-kateniny	Ilość przypadków (procent)	W tym przyp. z potwierdzoną mutacją w <i>genie CDH1</i>
PRAWIDŁOWA BŁONOWA	67 (81%)	8

OSŁABIŁONA BŁONOWA	2 (2,4%)	1
BŁONOWA i CYTOPLAZ- MATYCZNA	14 (16,8%)	4
BRAK EKSPRESJI	1 (1,3%)	1

OSŁABIŁONA BŁONOWA	8 (9,5%)	2
JĄDROWA lub/i CYTOPLAZ- MATYCZNA	8 (9,5%)	1
BRAK EKSPRESJI	0	0

1. 2 związki zaburzeń ekspresji białek E-kadheryny oraz β -kateniny z innymi cechami raka żołądka

Zaburzenia ekspresji E-kadheryny dotyczyły raków typu rozlanego i mieszanego wg Laurena. Wykazano, iż nieprawidłowa ekspresja tego białka częściej występuje w rakach rozlanych wg Laurena (w teście χ^2 $p=0,0002$), częściej w rakach nisko zróżnicowanych: G3 (w teście χ^2 $p=0,05$) oraz częściej w grupie III i IV wg Goseki (w teście χ^2 $p=0,02$). Średni wymiar nacieku raka w grupie, w której stwierdzono zaburzenia ekspresji E-kadheryny był wyższy niż w grupie bez zaburzeń, a różnica znalazła się na granicy istotności statystycznej (w teście U-Manna Whitneya $p=0,055$). Średni wymiar nacieku raka był również większy w grupie z zaburzeniami ekspresji E-kadheryny lub β -kateniny. W tym przypadku różnica była istotna statystycznie (w teście U-Manna Whitneya $p=0,047$).



WYKRES 2: Różnice w średnim wymiarze nacieku raka w grupach bez i z obecnością zaburzeń ekspresji badanych białek ECCU

Zaburzenia ekspresji samej β -kateniny dotyczyły wszystkich trzech typów wg Laurena, przy czym najliczniejszą grupę stanowiły tu raki typu jelitowego – cztery przypadki. Co ciekawe 75% z nich to raki o wysokim (G1), a 25% o pośrednim (G2) stopniu zróżnicowania.

Cechy morfologiczne raków z nieprawidłową ekspresją
E-kadheryny lub β -kateniny

	raki typu jelitowego		raki typu mieszanego		raki typu rozlanego	
	wg Laurena		wg Laurena		wg Laurena	
	G1/G2	G3	G1/G2	G3	G1/G2	G3
z zab. ekspresją obydwu białek	-	-	-	-	-	7
z zab. ekspresją E-kadheryny	-	-	-	4	-	6
z zab. Ekspresją β -kateniny	4	-	-	2	-	3

Porównanie cech morfologicznych raków z równoczesną nieprawidłową ekspresją obydwu badanych białek wykazało, iż wszystkie wyżej wymienione (siedem przypadków) było rakami nisko zróżnicowanymi (G3), wg klasyfikacji Laurena należało do typu rozlanego. W 72% (5 przypadkach) stwierdzono w nich pojawienie się silnej ekspresji surviviny, przy ekspresji wynoszącej 46% w całej badanej grupie raków. Wszystkie powyższe przypadki należały do III (57%) bądź IV (43%) typu wg Goseki. Wszystkie powyższe przypadki (100%) charakteryzowały się naciekającym typem wzrostu wg Minga oraz obecnością przerzutów w węzłach chłonnych. Jedynie w 1 na 7 przypadków stwierdzono obecność zatorów w naczyniach w ścianie żołądka. Tylko jedna osoba spośród siedmiu przeżyła powyżej 15 miesięcy i żyła w momencie rozpoczęcia analizy danych. Pozostałe sześć osób zmarło – średnia długość przeżycia wynosi około 7 miesięcy od operacji i była niższa od średniej długości przeżycia w grupie bez nieprawidłowości w ekspresji białek układu ECCU, jednak powyższa różnica nie osiągnęła wymaganego poziomu istotności statystycznej. Powyższe raki nie miały charakterystycznego wyglądu makroskopowego: należały do grupy 2, 3 i 4 wg Bormanna (odpowiednio 3, 2 i 2 przypadki).

Porównanie cech morfologicznych raków z zaburzeniem ekspresji jednego lub równocześnie obydwu badanych białek układu ECCU wykazało, iż 22 przypadki z 26, w których stwierdzono zaburzenia ekspresji E-kadheryny lub β -kateniny należały do raków o niskim stopniu

zróźnicowania (G3). Różnice pomiędzy grupami nie osiągnęły jednak istotności statystycznej ze względu na znaczną przewagę przypadków należących do grupy G3 w badanej serii.

Zależność pomiędzy stopniem zróźnicowania raka
a zaburzeniami ekspresji E-kadheryny lub β -kateniny

	Stopień zróźnicowania G1	Stopień zróźnicowania G2	Stopień zróźnicowania G3	suma
Odczyn prawidłowy	10	9	38	57
Odczyn nieprawidłowy	2	2	22	26

Stwierdzono natomiast istotny statystycznie związek pomiędzy typem raka wg Goseki a zaburzeniami ekspresji białek E-kadheryny i β -kateniny: większość raków z zaburzoną ekspresją białek kompleksu ECCU należy do grupy IV wg Goseki (w teście Chi^2 $p=0,01$), podczas gdy większość raków z prawidłową ekspresją to raki z I grupy wg Goseki. (w teście Pearsona $p=0,017$). Wszystkie raki należące do grupy II wg Goseki charakteryzowały się prawidłową ekspresją E-kadheryny i β -kateniny.

Związek pomiędzy zaburzeniami ekspresji białek kompleksu ECCU
a typem raka wg Goseki

Typ raka wg Goseki	Całkowita ilość przypadków	W tym przypadków z prawidłową ekspresją białek ECCU	Ilość przypadków z nieprawidłową ekspresją białek ECCU (%)
I	34	27	7 (20%)
II	6	6	0 (0%)
III	23	15	8 (35%)
IV	20	9	11 (55%)
suma	83	57	26

Nie znaleziono różnic w zaburzeniach ekspresji białek: E-kadheryny i β -kateniny w zależności od typu raka wg Minga (w teście Chi^2 $p=0,20$).

2. ekspresja białka p-53

Ocenę ekspresji białka p-53 wykonano w 83 przypadkach - w jednym wykonanie odczynu nie było możliwe z powodu zniszczenia kostek parafinowych. Stwierdzono, iż 30,2% przypadków wykazywało: nieznaczną (9,63%) lub silną (20,48%) jądrową ekspresję białka p-53. W pozostałych

69,8% przypadków nie stwierdzono akumulacji białka p-53 w jądrze. Pojawienie się jądrowej akumulacji białka p-53 dotyczyło ponad 35% raków typu jelitowego wg Laurena (11 z 31 przypadków) i 24% raków typu rozlanego (7 z 29 przypadków).

Podsumowanie ekspresji białka p-53

Nasilenie odczynu	Reakcja jądrowa	
	Ilość przypadków	%
0	48	57,83
1	10	12,04
2	8	9,63
3	15	18,07
4	2	2,40

Nie stwierdzono związku pomiędzy akumulacją białka p-53 a: zaburzeniami ekspresji E-kadheryny (w teście χ^2 $p=0,32$), zaburzeniami ekspresji białek kompleksu ECCU (w teście χ^2 $p=0,5$), stopniem zróżnicowania raka (w teście χ^2 $p=0,45$), typem raka wg Laurena (w teście χ^2 $p=0,6$) oraz pomiędzy akumulacją białka p-53 a ekspresją surviviny (w teście χ^2 $p=0,12$).

3. ekspresja białka surviviny

Ekspresję białka surviviny oceniono w 83 z 84 badanych przypadków. Odczyn silnie pozytywny w obrębie nacieku raka wystąpił w 38 przypadkach (46%). Równocześnie w 13 pozytywnych przypadkach stwierdzono pojawienie się odczynu także w nienowotworowej błonie śluzowej (w 4 przypadkach silnego i 9 przypadkach słabego). Słaby odczyn w obrębie nacieku raka wystąpił w 10 przypadkach (12%), a w czterech towarzyszył mu również słaby odczyn w prawidłowej błonie śluzowej. Sumarycznie pozytywny odczyn w kierunku surviviny wystąpił w 58% ocenianych raków. Trzydzieści pięć przypadków (42%) było całkowicie negatywnych i we wszystkich tych przypadkach nie stwierdzono obecności odczynu w obrębie nienowotworowej błony śluzowej. Stwierdzono częstsze występowanie jądrowej akumulacji białka p-53 w rakach wykazujących pozytywny odczyn w kierunku surviviny w porównaniu z rakami survivino-negatywnymi – odpowiednio 37% i 20% przypadków z akumulacją p-53, jednak powyższa różnica okazała się być nieistotna statystycznie (w teście χ^2 $p=0,2$, w teście Fishera $p=0,15$).

Jądrowa akumulacja białka p-53 w rakach wykazujących pozytywną i negatywną ekspresję surviviny

EKSPRESJA SURVIVINY	POZYTYWNA	NEGATYWNA
ilość przypadków	48	35
w tym przypadków p-53 pozytywnych (procent)	18 (37%)	7 (20%)

Nie znaleziono różnic dotyczących stopnia zaawansowania raka, zmian ekspresji białek układu ECCU lub pojawienia się mutacji w *genie CDHI* w grupach z dodatnią i ujemną ekspresją surviviny.

4. ocena nasilenia angiogenezy w obrębie nacieku raka

Mediana wartości długości naczyń (ang. „vessel length density”) w badanej grupie raków wynosiła $21,4 \cdot 10^{-5} \text{ um/um}^3$: raki o gęstości długości naczyń powyżej tej wartości zaliczono do grupy o dużym nasileniu angiogenezy, poniżej – do grupy o małym nasileniu angiogenezy.

wartości uzyskane przy ocenie tzw. „vessel length density”
przy użyciu przeciwciała CD34

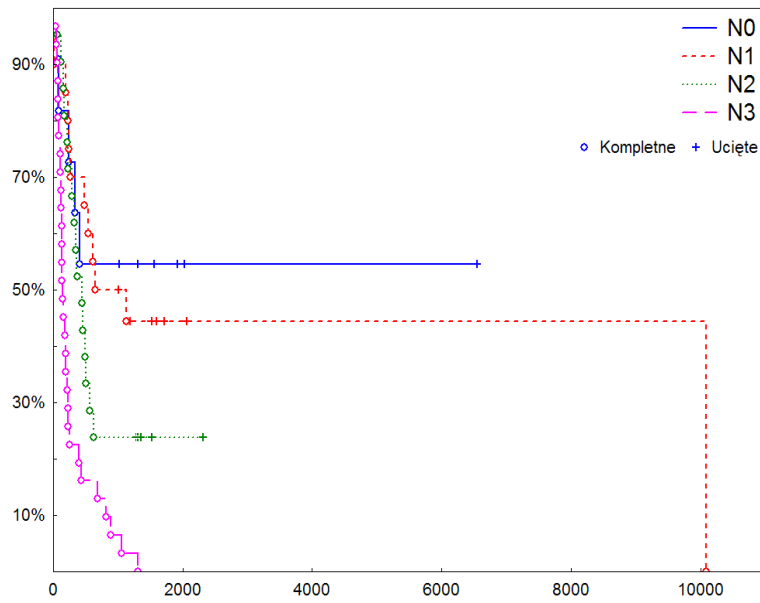
wartość średnia	$24,5 \cdot 10^{-5}$
mediana	$21,4 \cdot 10^{-5}$
minimum	$6,0 \cdot 10^{-5}$
maksimum	$65,9 \cdot 10^{-5}$
odchylenie standardowe	$12,2 \cdot 10^{-5}$

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w nasileniu angiogenezy pomiędzy różnymi grupami raka żołądka wg podziału Laurena, Goseki i Minga. Nie znaleziono także różnic w nasileniu angiogenezy pomiędzy rakami z prawidłową i zaburzoną ekspresją białek układu ECCU oraz pomiędzy rakami ze stwierdzoną mutacją w *genie CDHI* i bez niej.

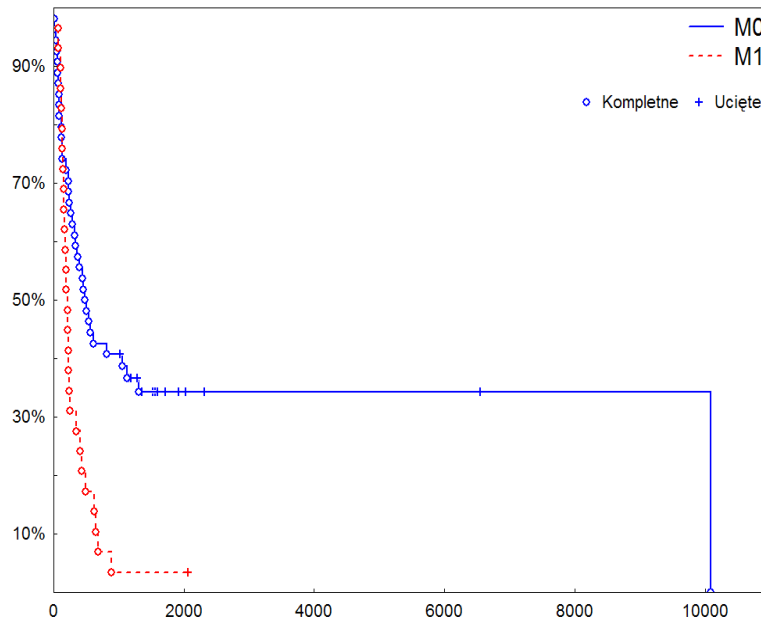
Analiza czynników wpływających na przeżycie w zaawansowanych rakach żołądka – analiza jednowymiarowa

W analizie jednowymiarowej wpływ na przeżycie miały następujące zmienne: stan węzłów chłonnych czyli cecha N w klasyfikacji TNM ($p=0,0001$) – (wykres nr 3), obecność przerzutów odległych czyli cecha M w klasyfikacji TNM ($p=0,018$) – (wykres nr 4) oraz stopień zaawansowania wg klasyfikacji WHO (tzw. stage) ($p=0,0003$) – (wykres nr 5). Zajęcie większej liczby węzłów chłonnych, obecność przerzutów odległych oraz wyższy stopień zaawansowania klinicznego pogarszają rokowanie pacjentów z zaawansowanym rakiem żołądka. Na wykresie przedstawiającym długości przeżyć pacjentów w zależności od cechy T (głębokość nacieku raka)

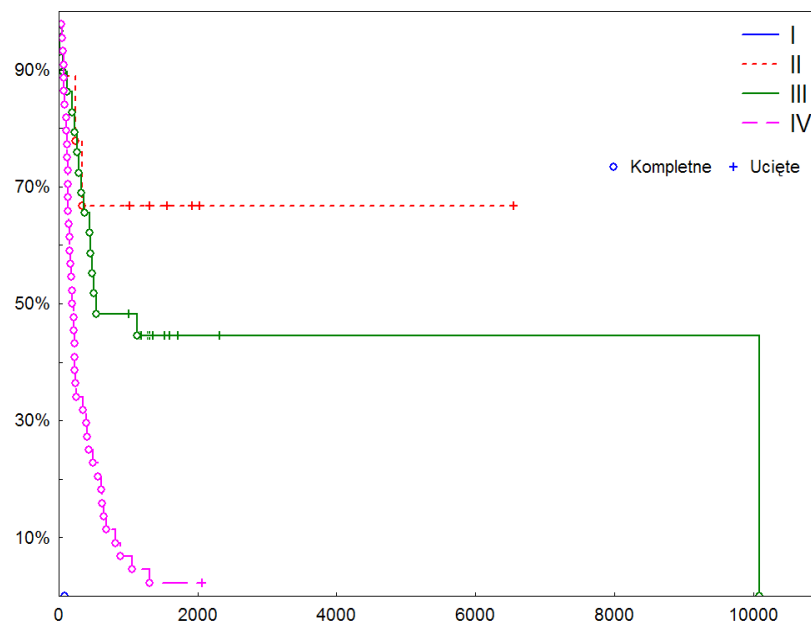
widać wyraźne różnice pomiędzy grupami T2, T3 i T4 – (wykres nr 6), różnice te nie są jednak statystycznie istotne; w teście χ^2 $p= 0,55$. Należy przypuszczać, że trudności w wykazaniu istotnych statystycznie różnic pomiędzy porównywanymi grupami związane są z faktem, iż większość ocenianych przypadków należy do grupy T3, do grup T2 i T4 zaliczono jedynie niewielki procent przypadków i ta dysproporcja w liczebności grup uniemożliwiła osiągnięcie istotnego statystycznie wyniku.



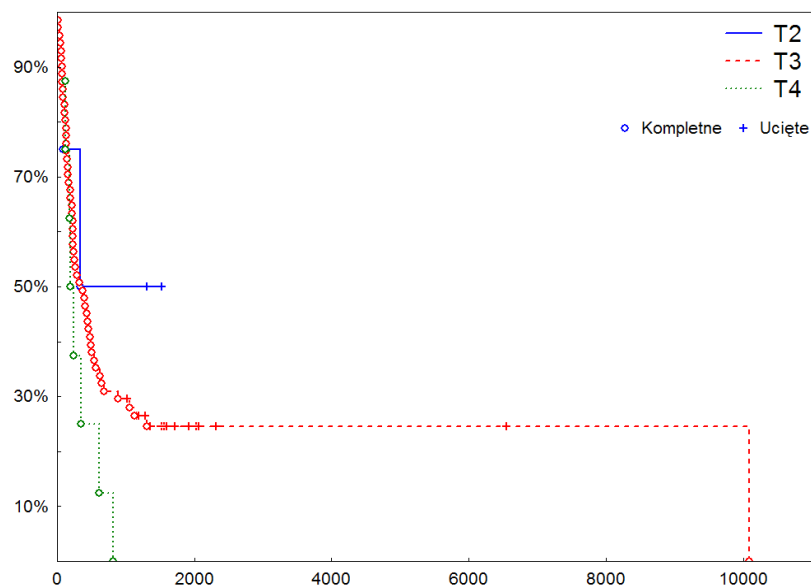
WYKRES 3: Zależność długości przeżycia od stanu węzłów chłonnych (krzywe Kaplan-Meiera)



WYKRES 4: Zależność długości przeżycia od obecności lub braku przerzutów odległych (krzywe Kaplan-Meiera)



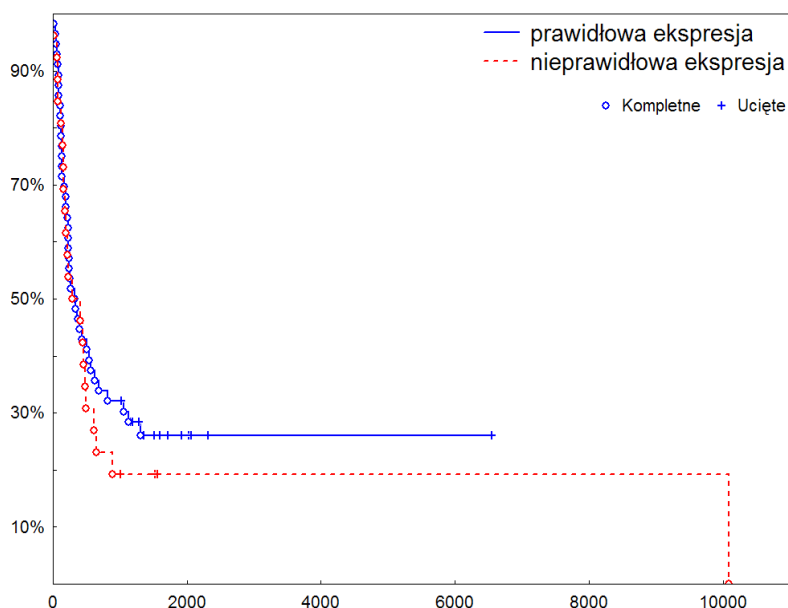
WYKRES 5: Zależność długości przeżycia od stopnia zaawansowania klinicznego raka (ang. stage) (krzywe Kaplan-Meiera)



WYKRES 6: Zależność długości przeżycia chorych z rakiem żołądka od głębokości nacieku raka (cecha T) (krzywe Kaplan-Meiera)

W przeprowadzonej analizie jednowymiarowej stwierdzenie obecności mutacji w *genie E-kadheryny* nie ma wpływu na długość przeżycia w zaawansowanych rakach żołądka. Średni okres obserwacji dla grupy pacjentów bez stwierdzonej mutacji w *genie CDHI* jest nieco dłuższy od średniego okres obserwacji dla grupy ze stwierdzoną mutacją w *genie CDHI* (wartości 782 dni/ 717 dni), jednak różnica nie osiągnęła wymaganej istotności statystycznej.

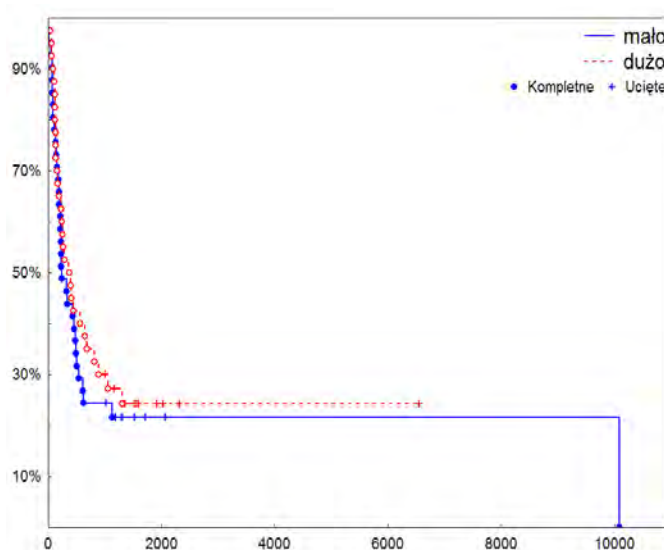
Krzywa przeżycia grupy chorych, u których stwierdzono zaburzenia ekspresji E-kadheryny lub β -kateniny różni się od krzywej przeżycia grupy chorych bez stwierdzonych nieprawidłowości badanych białek układu ECCU (wykres nr 7). W analizie statystycznej stwierdzono występowanie trendu pomiędzy powyższymi parametrami. (w teście Chi^2 $p=0,071$).



WYKRES 7: Prawdopodobieństwo przeżycia chorych bez i ze stwierdzonymi zaburzenia ekspresji E-kadheryny lub β -kateniny (krzywe Kaplan-Meiera)

Nie znaleziono istotnej statystycznie zależności pomiędzy akumulacją białka p-53 i skróceniem długości przeżycia pacjentów z zaawansowanym rakiem żołądka, jednak stwierdzono występowanie trendu pomiędzy tymi parametrami. (w teście Chi^2 $p=0,095$). Nie znaleziono różnic dotyczących długości przeżycia chorych w zależności od obecności lub braku ekspresji białka surviviny.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic dotyczących długości przeżyć pacjentów w grupach o małym i dużym nasileniu angiogenezy (wykres nr 8).



WYKRES 8: Przeżycia w grupach pacjentów o małym i dużym nasileniu angiogenezy (krzywe Kaplan-Meiera)

Na przeżycie w zaawansowanym raku żołądka nie wpływają: typ raka wg Laurena (w teście χ^2 $p=0,97$), typ raka wg Minga, oraz liczba różnych utkań w obrębie nacieku raka (w teście χ^2 $p=0,76$). Nie znaleziono różnic w długości przeżyć pacjentów, u których stwierdzono obecność nacieku zapalnego w obrębie raka lub wzdłuż tzw. „frontu inwazji” w porównaniu z grupą raków bez widocznego nacieku zapalnego (w teście χ^2 odpowiednio: $p=0,41$, $p=0,89$).

Analiza czynników wpływających na przeżycie w zaawansowanych rakach żołądka - model regresji proporcjonalnych hazardów Coxa

Czynniki wpływające na przeżycie w zaawansowanych rakach żołądka badano metodą regresji proporcjonalnych hazardów Coxa. Stworzono kilka modeli, z których najlepszą przewidywalność czasu przeżycia uzyskano w modelu zaprezentowanym poniżej. Cały model charakteryzował się wysoką istotnością statystyczną (test $\chi^2 = 45,70$ $p < 0,00001$), a niezależnymi czynnikami wpływającymi na przeżycie były: stan węzłów chłonnych (zmienna o najwyższej istotności statystycznej: $p=0,00004$), wiek pacjenta, typ wg Goseki oraz zaburzenia ekspresji białek układu ECCU. Typ raka wg Laurena zbliża się do poziomu istotności statystycznej ($p=0,063$). W prezentowanym modelu na przeżycia nie wpływał: stopień zróżnicowania raka, pojawienie się ekspresji surviviny i białka p-53, oraz stwierdzenie mutacji w *genie CDHI*.

Czas przeżycia w modelu regresji proporcjonalnego hazardu Coxa

ZMIENNA	WARTOŚĆ p
stan węzłów chłonnych	0,00004
wiek	0,00851
typ wg Goseki	0,02549
zaburzenia ekspresji białek układu ECCU	0,0481
typ raka wg Laurena	0,0636
stopień zróżnicowania raka	0,218
ekspresja surviviny	0,231
ekspresja białka p-53	0,291
mutacja w <i>genie CDHI</i>	0,918

V. Dyskusja

Omówienie wybranych cech histologicznych badanej grupy raków

Materiał obejmuje grupę raków żołądka operowanych na przestrzeni czterech lat (X 1996- X 2000) w I Klinice Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej w Krakowie. W powyższym materiale można stwierdzić procentowo niższy od spodziewanego na podstawie publikowanych statystyk udział raków typu jelitowego, a wyższy raków typu rozlanego i mieszanego wg Laurena. Raki typu jelitowego stanowią w badanej grupie jedynie 37% (31 przypadków), podczas gdy w innych opisywanych seriach udział tego typu raków jest zazwyczaj wyższy, wynosząc nawet 50% [115,149,150] do 74% wszystkich przypadków. [90] Raki typu rozlanego i mieszanego wg Laurena to w sumie 53 przypadki, co stanowi około 63% całości. Polska jest krajem o stosunkowo niskich wartościach współczynników zapadalności na raka żołądka, co więcej zapadalność ta od jakiegoś czasu spada. Można przypuszczać, iż spadek ten przede wszystkim związany jest z eliminowaniem niekorzystnych czynników środowiskowych (np. z diety), co wiąże się z szybszym zmniejszaniem się zapadalności na raka typu jelitowego, niż typu rozlanego. Jednak powyższy argument zdaje się być niewystarczający do wytłumaczenia obecnej w naszym materiale dysproporcji. Prawdopodobnie kolejną przyczyną, przynajmniej częściowo tłumaczącą powyższą dysproporcję jest fakt, iż I Katedra Chirurgii Gastroenterologicznej jest szpitalem wysokospecjalistycznym, w którym z definicji przeprowadza się zabiegi o stopniu trudności uniemożliwiającym ich przeprowadzenie w ogólnych oddziałach chirurgicznych. Wszystkie badane przeze mnie przypadki były rakami zaawansowanymi - u 62% pacjentów (52 przypadki) naciek raka zajmował więcej niż jedną okolicę żołądka, równocześnie w 59 przypadkach obecny był na jednej z krzywizn i obydwu ścianach. W 13 przypadkach naciek raka ciągnął się od wpustu (często przechodząc na początkowy fragment przełyku) aż po odźwiernik. Średni wymiar nacieku raka w żołądku wynosił 7,86 cm i wahał się od 2 do 16 cm, przy czym w 25 przypadkach średnica nacieku nowotworowego wynosiła 10 i więcej centymetrów. Jedynie w 20 przypadkach średnica nacieku była mniejsza od 5cm. Ponad połowa pacjentów (54%) operowana była w najwyższym, IV stopniu zaawansowania choroby nowotworowej. Można przypuszczać, iż przypadki mniej zaawansowane, a przede wszystkim przypadki o mniejszej rozległości nacieku i bardziej ograniczonych formach (polipowate, wyraźnie odgraniczony guz na jednej ścianie), wśród których z histologicznego punktu widzenia przeważają raki typu jelitowego wg Laurena, były częściej operowane poza Kliniką Uniwersytecką ze względu na mniejszy stopień trudności zabiegu operacyjnego. Kwalifikowanie do zabiegów operacyjnych także osób z rozległym naciekiem nowotworu mogło spowodować relatywne zwiększenie się w

ocenianej przez mnie grupie liczby raków klasyfikowanych jako typ rozlany lub mieszany wg Laurena.

Większość raków w ocenianej serii: 61 z 84 (73%) została zakwalifikowana jako raki nisko zróżnicowane – G3. Część raków żołądka już od etapu raka wczesnego wykazuje niski stopień zróżnicowania (G3). [116] Inne, zwłaszcza raki typu jelitowego wg Laurena, w początkowym okresie choroby wykazują cechy znacznego podobieństwa do prawidłowej błony śluzowej i mogą być określone jako raki wysokozróżnicowane (G1). Endoh i wsp. uważają, iż pewien procent raków wykazujący na wczesnych etapach rozwoju wysoki stopień zróżnicowania w miarę postępu procesu chorobowego ulega progresji do form coraz niżej zróżnicowanych. [151] Przy takim założeniu w miarę zwiększania się stopnia zaawansowania procesu chorobowego będziemy obserwować coraz mniejszy udział raków wysokozróżnicowanych przy coraz liczniej reprezentowanej grupie raków niskozróżnicowanych. W ocenianej przez mnie serii raki w najwyższym: IV stopniu zaawansowania wg WHO [142] stanowiły 54% całości, natomiast w stopniu IIIB i IV sumarycznie 68% wszystkich przypadków. Wysoki stopień zaawansowania większości badanych przypadków może tłumaczyć występującą znaczną dominację raków niskozróżnicowanych (G3) w ocenianej przez mnie grupie.

Mutacje w genie CDH1

Wyniki badań dotyczące obecności mutacji w *genie CDH1* w sporadycznych rakach żołądka oraz procentowego udziału przypadków, w których stwierdza się zaburzenia ekspresji któregoś z białek układu ECCU publikowane przez różnych autorów są różne. Nie ma też zgodności co do wzajemnej relacji pomiędzy obecnością mutacji w *genie E-kadheryny*, a ekspresją powyższego białka określaną metodą immunohistochemiczną. W obecnej pracy przy badaniu mutacji w *genie CDH1* wykorzystano metody molekularne: PCR/SSCP, charakteryzujące się wysoką czułością oraz korzystnym stosunkiem pomiędzy nakładem pracy i kosztów a ilością uzyskanych danych. [148] Odpowiedni dobór primerów (tabela nr 3, str. 48) zapewnił możliwość systematycznego zbadania struktury każdego z szesnastu eksonów genu wraz z niewielkimi, obustronnymi odcinkami intronowego DNA. Pozwoliło to nie tylko na wykrycie mutacji w obrębie samych eksonów, lecz także zmian w odcinkach granicznych, odpowiadających za prawidłowy przebieg procesu wycinania intronów („splicing”). Taki dobór primerów umożliwiający ocenę pełnych sekwencji eksonowych wraz z krótkimi fragmentami przylegających intronów jest metodą popularną, stosowaną także w innych pracach. [152,153]

Przy wykorzystaniu metody PCR/SSCP stwierdzono obecność mutacji w *genie CDHI* w 13% wszystkich przebadanych przypadków. [154] Dziesięć z jedenastu stwierdzonych mutacji dotyczyła raków w całości lub częściowo wykazujących rozlany typ wzrostu (zakwalifikowanych jako rozlane bądź mieszane wg Laurena). Biorąc pod uwagę tylko tę grupę można stwierdzić, iż mutacje somatyczne w *genie CDHI* w populacji polskiej są obecne w około 19% raków o budowie rozlanej bądź mieszanej. Dane z piśmiennictwa podają występowanie mutacji w *genie CDHI* w szerokim zakresie od 0% [116] do 56% [118] raków rozlanych. Jednak należy zaznaczyć, iż różni autorzy stosowali odmienne metody badawcze, dlatego też publikowane przez nich wyniki nie zawsze mogą być w bezpośredni sposób porównywane. Ostatni przypadek, w którym stwierdzono obecność mutacji w *genie CDHI* należy do grupy raków typu jelitowego wg Laurena. Złożony jest on z obszarów zbudowanych z wyraźnie polimorficznych, różniących się wielkością i kształtem komórek charakterystycznych dla raka typu jelitowego, które wykazują tylko nieznaczną tendencję do tworzenia struktur gruczołowych, oraz z rozległych pól o budowie litej. Rak wykazuje naciekający typ wzrostu wg Minga. Stopień zróżnicowania raka we wszystkich wycinkach jest jednakowy: G3. W komórkach raka nie stwierdzono obecności śluzu (wg Goseki typ III).

W roku 1998 Guilford i wsp. [70] po raz pierwszy opisali trzy różne rodziny Maori z Nowej Zelandii, w których w kilku pokoleniach wiele osób chorowało na raka żołądka. Z histologicznego punktu widzenia były to raki nisko zróżnicowane, o rozlanym typie wzrostu wg Laurena. Choroba dotyczyła ludzi młodych (w kilku przypadkach nastolatków), większość chorych zmarła z powodu rozsiewu raka przed ukończeniem 40-go roku życia. W badaniach molekularnych Guilford i wsp. wykazali obecność germinalnej mutacji w *genie* kodującym E-kadherynę u członków opisywanych rodzin, definiując tym samym nowy zespół - HDGC. [33] Autorzy przedstawili koncepcję, iż podstawą rozwoju raków w tych rodzinach jest wyłączenie funkcji układu ECCU związane z obecnością germinalnej mutacji w *genie E-kadheryny*, zmieniającej właściwości białka odpowiedzialnego za zapewnienie i utrzymanie procesów przylegania pomiędzy sąsiadującymi komórkami i zaburzające procesy sygnalizacji pomiędzy nimi. W przypadkach HDGC w pierwszym allelu genu obecna jest germinalna mutacja dotycząca *genu CDHI*- najczęściej typu mutacji skracającej (ang. „truncating mutation”) [33,70], drugi allel wyłączany jest na skutek hipermetylacji promotora genu [107,118,155], dodatkowej mutacji w obrębie drugiego allelu, np. mutację zmieniającą ramkę odczytu (ang. „missense mutation”), wypadnięcie nie zmieniające ramki odczytu (ang. „in-frame deletion”) [35] lub utraty dużej części materiału genetycznego na chromosomie 16 obejmującego także *gen CDHI* – tzw. LOH. [72] Mechanizm wyłączenia funkcji E-kadheryny w przypadkach HDGC odpowiada modelowi inaktywacji charakterystycznej dla genów supresorowych [35,72] i jest zgodny z tzw. koncepcją „dwu uderzeń” Knudsona (ang. „two-

hit hypothesis”). [156] Jest zjawiskiem wczesnym i kluczowym dla rozwoju charakterystycznego histologicznie raka żołądka o rozlanym typie wzrostu. Obecność rodzin będących nosicielami germinalnej mutacji w *genie CDHI* w populacji Nowej Zelandii, a także w innych populacjach na świecie, np. brytyjskiej [31,34], niemieckiej [72], japońskiej [41], północnoamerykańskiej [34] czy koreańskiej [157] została potwierdzona dalszymi pracami. Do roku 2004 opisano 45 różnych mutacji germinalnych w *genie E-kadheryny*. [24] Wykazano, iż takie mutacje w *genie CDHI* są zjawiskiem charakterystycznym dla około 25% - 30% rodzin spełniających kryteria HDGC. [31,34,35,158]

Mutacje w *genie E-kadheryny* stwierdza się także w sporadycznych rakach żołądka. [118,120,152-154,159,160] Jednak w tych przypadkach mutacja często wydaje się być obecna tylko w jednym allelu genu i nie wpływać na ekspresję białka. Potwierdzeniem koncepcji, iż dopiero wyłączenie obydwu alleli *genu CDHI* ma poważne skutki funkcjonalne są badania przeprowadzone na myszach przez Riethmachera i wsp. i Larne i wsp., którzy pokazali, iż heterozygotyczne myszy z unieczynnionym jednym allelem *genu CDHI* (ang. „E-cadherin knockout mice”) rozwijają się prawidłowo i są płodne, podczas gdy zarodki mysie pozbawione obydwu alleli powyższego genu umierają na wczesnych etapach rozwoju. [161,162] Można przypuszczać, iż różne typy mutacji będą wywierać odmienny wpływ na komórki, w których są obecne. Dowodem na to jest doświadczenie przeprowadzone przez Kremera i wsp. [105] Wszczepiali oni kolejnym grupom myszy SCID (severe combined immunodeficiency mouse) komórki raka żołądka posiadające prawidłowy *gen E-kadheryny* lub komórki z obecnymi mutacjami genu: delecją eksonu 9, delecją eksonu 8 oraz mutacją punktową w eksonie 8. Autorzy stwierdzili, że we wszystkich badanych grupach myszy rozwinął się guz, jednak w grupie, której wszczepiono komórki z delecją eksonu 9 oraz mutacją punktową w eksonie 8 średnica guza była istotnie większa niż w dwu pozostałych grupach. Guzy, w grupie, w której wszczepiono komórki z nieuszkodzonym *genem CDHI* oraz z delecją w eksonie 8 miały porównywalną średnicę. Ponadto u wszystkich badanych myszy rozwinęły się przerzuty w płucach. Pomimo różnic w średnicach guzów w zależności od obecności i typu mutacji w *genie CDHI* nie stwierdzono różnic w ilości przerzutów w płucach pomiędzy badanymi grupami myszy. Powyższe doświadczenie dowodzi, że nie tylko sam fakt obecności nieprawidłowości w genie, ale też ich charakter mają wpływ na ostateczny efekt biologiczny powstający na podłożu danej zmiany na poziomie DNA.

Pierwsze prace mówiące o obecności mutacji somatycznych w rakach żołądka wskazywały, iż lokalizują się one w odcinku pomiędzy eksonem 7 i 9 *genu CDHI* i polegają najczęściej na wypadnięciu materiału genetycznego obejmującego ekson 9. [159] Powstający produkt pozbawiony jest wtedy fragmentu odcinka pozakomórkowego białka odpowiadającego za przyłączanie jonów

wapnia. [120] Po delecji materiału kodowanego przez ekson 9 dochodzi do fuzji części białka kodowanej przez ekson 8 i 10. [159] Becker i wsp. stworzyli przeciwciało [E-cad delta 9-1, klone 7E6], które wykrywa ten jeden konkretny typ mutacji. Przy pomocy przeciwciała E-cad delta 9-1 autorzy stwierdzili obecność tego typu mutacji w 12% (13 ze 108 przypadków) sporadycznych raków rozlanych w populacji japońskiej i w 5,6% (12 z 214 przypadków) sporadycznych raków rozlanych w populacji niemieckiej. [159] W badanej przez mnie grupie sporadycznych raków żołądka pochodzących z populacji polskiej we wszystkich przypadkach zakwalifikowanych jako raki rozlane (29 przypadków) wykonano odczyn immunohistochemiczny przy użyciu przeciwciała E-cad delta 9-1 z równoczesną pozytywną kontrolą dołączoną do przeciwciała. W żadnym z badanych raków nie uzyskano pozytywnego wyniku odczynu. Równocześnie żadna z mutacji stwierdzonych metodami molekularnymi w badanej grupie raków żołądka nie występowała w eksonie 9. Można przypuszczać, iż ten typ mutacji w populacji polskiej jest rzadszy niż w wyżej opisanych, a liczba 29 przypadków przebadanych raków rozlanych nie była wystarczająca do znalezienia tego typu zmiany.

Mutacje znalezione w badanej przez mnie grupie rozrzucone są na całej długości genu *CDHI* (od eksonu 4 do 14). Występowanie mutacji somatycznych poza odcinkiem pomiędzy eksonem 7 a 9 genu *E-kadheryny* (w eksonach: 2, 3, 5, 7 i 16) opisane zostało także przez innych autorów. [120,152,153,160]

Tamura i wsp. badali 26 przypadków wczesnych, nisko zróżnicowanych raków żołądka o rozlanym typie wzrostu i w żadnym nie znaleźli mutacji w genie *CDHI*. [116] Wyciągnęli więc wnioski, że wyłączenie funkcji genu *E-kadheryny* w rakach sporadycznych jest zjawiskiem późnym. Do podobnych wniosków doszła grupa Richardsa i wsp. oraz Kremera i wsp. [31,105] Jednak wcześniej Becker i wsp. stwierdzili obecność mutacji somatycznych w rakach sygnetowatokomórkowych żołądka tak wczesnych jak i zaawansowanych, dochodząc do wniosku, iż mutacje w genie *E-kadheryny* w rakach rozlanych żołądka mogą być zjawiskiem wczesnym. [112] Również Muta i wsp. [152] znaleźli mutacje w genie *E-kadheryny* w 2 na 10 badanych sygnetowatokomórkowych raków wczesnych. Badana przez mnie grupa raków żołądka obejmuje jedynie przypadki zaawansowane – mogę więc stwierdzić, iż mutacje w genie *CDHI* występują w rakach zaawansowanych, nie mam natomiast możliwości ustosunkowania się do stwierdzenia, iż mutacje takie obserwuje się także w rakach wczesnych.

Berx i wsp. stwierdzili, iż większość mutacji somatycznych stwierdzanych w genie *CDHI* w sporadycznych, rozlanych rakach żołądka to mutacje typu: „in-frame” delecje (delecje nie zaburzające ramki odczytu), które powodowały wypadnięcie części materiału genetycznego na poziomie mRNA, co skutkowało powstaniem niekompletnego białka albo mutacje punktowe,

doprowadzające do zmiany pojedynczego aminokwasu w strukturze białka. W obydwu przypadkach tzw. ramka odczytu zostaje zachowana, w efekcie czego powstające białko, choć niekompletne, może być wbudowywane w obręb błony komórkowej. [120] Dzięki temu możliwe jest wystąpienie pozytywnego odczynu immunohistochemicznego, pomimo obecności mutacji w genie, która skutkuje zmianą w budowie białka. W badanej przeze mnie grupie stwierdziłam, iż w pięciu przypadkach z potwierdzoną metodami molekularnymi obecnością mutacji w *genie CDHI* nie łączyły się zmiany ekspresji białka oceniane metodą immunohistochemiczną. Zupełnie inna sytuacja ma miejsce w co najmniej połowie przypadków sporadycznych, zrazikowych raków sutka. W przeważającej liczbie przypadków (86%) zrazikowych raków sutka mutacje doprowadzają do wcześniejszego pojawienia się kodonu „STOP”, w efekcie czego powstaje skrócony produkt białkowy (są to tzw. „truncating mutations”). [120] Przedwczesne pojawienie się sygnału „STOP” w czasie syntezy białka często wyzwała szybko następujący proces degradacji powstałego, uszkodzonego produktu [163], efektem czego jest brak ekspresji E-kadheryny w około 50% (wg niektórych autorów nawet 75%) zrazikowych raków sutka [164]. Immunohistochemiczne stwierdzenie braku ekspresji E-kadheryny w raku sutka jest dla wielu patologów elementem wspierającym diagnozę raka zrazikowego. [164]

Zaburzenia ekspresji białek ECCU w rakach żołądka

E-kadheryna jest najważniejszym elementem układu ECCU odpowiadającego za utrzymanie architektoniki tkanki nabłonkowej i polaryzacji komórek. Ponieważ zaburzenie prawidłowej architektoniki jest jedną z podstawowych cech tkanki nowotworowej, immunohistochemiczna ocena ekspresji E-kadheryny i innych białek układu ECCU była badana w wielu nowotworach pochodzenia nabłonkowego [165], a doniesienia o zmianach i nieprawidłowościach ekspresji poszczególnych elementów kompleksu ECCU można znaleźć poza rakiem żołądka [116,119] w odniesieniu do innych nowotworów, np. raka jelita grubego [166-168], raka sutka [164,167], raka prostaty [169], raka przełyku [170]. W przypadkach raków żołądka autorzy donoszą o osłabieniu bądź całkowitym zniesieniu immunoreaktywności w kierunku E-kadheryny lub wystąpieniu odczynu w cytoplazmie komórek, zwłaszcza w przypadkach nowotworów nisko zróżnicowanych. Jednak procent raków żołądka, w których stwierdzono powyższe nieprawidłowości jest bardzo różny w różnych publikacjach: od 7% [117] do 92% [115]. W badanej przeze mnie grupie raków żołądka nieprawidłowy odczyn w kierunku E-kadheryny to albo odczyn osłabiony (w jednym przypadku całkowicie nieobecny), albo o zmienionej lokalizacji: zamiast błonowego widoczna była reakcja cytoplazmatyczna lub jądrowa. Taki typ nieprawidłowości odczynu jest zgodny z

zaburzeniami opisywanymi w większości publikacji na ten temat. [20,41,63,72,105,115-119,167,170,171]

W ocenianej grupie raków 68% przypadków nie wykazywało zaburzeń ekspresji żadnego z powyższych białek. W 32% przypadków wystąpił odczyn nieprawidłowy. W 7 przypadkach zaburzenia dotyczyły równocześnie E-kadheryny i β -kateniny – wszystkie powyższe raki należały do kategorii raków rozlanych wg Laurena. W 10 przypadkach zaburzenia dotyczyły jedynie E-kadheryny - te raki były rakami rozlanymi bądź mieszanymi wg Laurena. Dziewięć raków wykazywało nieprawidłową ekspresję jedynie β -kateniny – były wśród nich zarówno raki rozlane, mieszane jak i jelitowe. Obserwacja, iż zaburzenia ekspresji E-kadheryny występują w rakach w całości lub częściowo o rozlanym typie wzrostu, natomiast β -kateniny w rakach tak rozlanych jak i jelitowych jest zgodna z wynikami przedstawionymi przez Jawhari i wsp. [119] Średni wymiar nacieku raka w grupie, w której stwierdzono nieprawidłowości ekspresji białek E-kadheryny lub/i β -kateniny był wyższy niż w grupie bez zaburzeń ekspresji tych białek [wykres nr 2, str.61]. Stwierdzono także występowanie istotnych statystycznie różnic związanych ze zmienioną ekspresją białek układu ECCU pomiędzy grupami wg podziału Laurena (dla testu Chi^2 $p=0,0002$), w zależności od dominującego utkania wg WHO (dla testu Chi^2 $p=0,001$) oraz w zależności od typu wg Goseki (dla testu Chi^2 $p=0,01$).

Według Wang'a i wsp. aż 80% raków żołądka wykazuje nieprawidłową ekspresją co najmniej jednego z białek układu ECCU, przy czym zaburzenia ekspresji E-kadheryny dotyczą jedynie około 7% przebadanych raków, podczas gdy zmiany ekspresji β - oraz γ -kateniny badacze wykryli odpowiednio w 55 i 58%. Autorzy stwierdzili korelację z klasyfikacją Minga, zaawansowaniem procesu nowotworowego i stanem węzłów chłonnych. [117] Otrzymane przeze mnie wyniki odbiegają od tych podanych przez Wang'a i wsp.: w ocenianym materiale stwierdzono procentowo niższy udział zaburzeń ekspresji β -kateniny (19%) i wyższy E-kadheryny (20%), nie potwierdzono także korelacji z klasyfikacją Minga (w teście Chi^2 $p=0,2$).

Jeszcze wyższy procent przypadków z zaburzoną ekspresją E-kadheryny podaje Mayer i wsp., według których w badanej grupie 60 raków 55 (92%) wykazywało w porównaniu z prawidłową błoną śluzową osłabienie bądź całkowity brak ekspresji E-kadheryny. Zaburzenia ekspresji E-kadheryny korelowały z niskim zróżnicowaniem raka, cechą T wg klasyfikacji TNM i podziałem Laurena, natomiast nie występowała korelacja ze stanem węzłów chłonnych, średnicą guza w centymetrach i podziałem Bormanna. [115] Gulmann i wsp. oceniali ekspresję E-kadheryny i β -kateniny w grupie 117 raków żołądka i stwierdzili obecność nieprawidłowości dotyczących E-kadheryny w 30% badanych przypadków oraz β -kateniny w 25% badanych przypadków. Nie

stwierdzili różnic pomiędzy grupą raków o lokalizacji dystalnej i proksymalnej, natomiast znaleźli różnice związane z typem raka: zaburzenia ekspresji występowały częściej w rakach rozlanych. [20] Podobne wyniki badań wskazujące, iż nieprawidłowości ekspresji E-kadheryny i β -kateniny częściej dotyczą raków rozlanych przedstawiają także inne grupy badaczy. [119,171]

Zaburzenia ekspresji białek układu ECCU w rakach żołądka, w których nie potwierdzono obecności mutacji w genie CDH1

Tamura i wsp. uznali za nieprawidłową (osłabioną bądź nieobecną) ekspresję białka E-kadheryny w 10 na 26 przebadanych (38%) wczesnych, niskozróżnicowanych, rozlanych raków żołądka, nie znajdując jednak w żadnym z powyższych przypadków metodami molekularnymi obecności mutacji w *genie CDH1*. [172] Natomiast oceniając stan promotora *genu CDH1* metodą MSP-SSCP stwierdzili wystąpienie hipermetylacji promotora w 18 na 26 (69%) ocenianych raków. We wszystkich rakach wykazujących nieprawidłową ekspresję E-kadheryny wystąpiła równocześnie hipermetylacja promotora *genu CDH1*. Badacze wyciągnęli wniosek, iż w sporadycznych rakach żołądka mutacje w *genie CDH1* są zjawiskiem rzadkim, a zmiany ekspresji białka E-kadheryny, występujące relatywnie często, wynikają z inaktywacji genu poprzez hipermetylację jego promotora. Sama zaś hipermetylacja jest zjawiskiem kluczowym dla rozwoju rozlanego raka żołądka. [116] Machado i wsp. przebadali 23 przypadki sporadycznych raków żołądka (16 rozlanych i 7 jelitowych), oceniając stan *genu CDH1*, obecność hipermetylacji promotora *genu CDH1*, LOH w miejscu *genu CDH1* na chromosomie 16 oraz ekspresję białka E-kadheryny. [118] W badanej grupie stwierdzili obecność mutacji w jednym allelu *genu CDH1* w 9 na 16 raków rozlanych (56%) i w żadnym z siedmiu jelitowych. Wszystkie raki z potwierdzoną mutacją w *genie E-kadheryny* utraciły błonowy odczyn w kierunku E-kadheryny, w części przypadków pojawił się nieprawidłowo zlokalizowany odczyn (cytoplazmatyczny). Tylko w jednym przypadku za wyłączenie drugiego allelu genu odpowiadało tzw. zjawisko LOH w miejscu 16q22.1, w pozostałych przypadkach nie stwierdzono żadnych zmian genetycznych w obrębie drugiego allelu *genu CDH1*. Dalsze badania potwierdziły, iż w pozostałych przypadkach wyłączenie funkcji drugiego allelu nastąpiło na skutek hipermetylacji promotora genu. Ponadto opisano dwie linie komórkowe niskozróżnicowanych raków żołądka: HGC-27 i GT3TKB, w których ekspresja E-kadheryny jest całkowicie nieobecna pomimo braku stwierdzanych metodami molekularnymi mutacji w *genie CDH1*. [153] Autorzy przypuszczają, iż wyłączenie genu i związany z nim brak ekspresji E-kadheryny mogło nastąpić na skutek hipermetylacji promotora genu. Także inne grupy opisywały osłabienie ekspresji białka E-kadheryny w rakach żołądka, w których nie stwierdzono obecności mutacji w *genie CDH1*. [165]

Można przypuszczać, iż w badanym przeze mnie materiale zaburzenia ekspresji białek układu ECCU w przypadkach, w których nie potwierdzono metodami molekularnymi obecności mutacji w *genie CDH1* łączyć należy z obecnością zjawisk epigenetycznych, a przede wszystkim z hipermetylacją promotora genu. Ocena stanu promotora *genu CDH1* nie była przedmiotem niniejszej pracy.

Pozytywna reakcja immunohistochemiczna w przypadkach raków z potwierdzoną mutacją w genie CDH1

W badanym przeze mnie materiale w pięciu przypadkach z potwierdzoną mutacją w *genie CDH1* odczyny immunohistochemiczne w kierunku E-kadheryny były prawidłowe – o prawidłowej, błonowej lokalizacji i prawidłowej sile. Podobną sytuację opisano w komórkach raka żołądka z linii Kato3 oraz MKN45. Linia Kato3 pochodzi z przerzutu syngnetowatokomórkowego, niskozróżnicowanego raka żołądka. [113] W hodowli *in vitro* komórki nowotworowe linii Kato3 rosną w przeważającej większości pojedynczo z tworzeniem jedynie niewielkich i nielicznych agregatów, sugerując występowanie w nich zaburzeń działania układu ECCU. Metodami molekularnymi wykazano w komórkach obecność mutacji punktowej w *genie CDH1*. [173] Pomimo tego komórki linii Kato3 wykazują prawidłowy, błonowy odczyn immunohistochemiczny w kierunku E-kadheryny. [113] Dalsze badanie wykazały, iż w tym przypadku mutacja doprowadza do zmiany struktury białka skutkującej utrudnieniem przyłączenia β -kateniny do cytoplazmatycznego końca E-kadheryny i łączy się z osłabieniem i zmianą lokalizacji odczynu immunohistochemicznego w kierunku β -kateniny. [113] Również komórki raka żołądka linii KMN45 rosnące w hodowli *in vitro* przeważająco w postaci pojedynczych komórek, charakteryzuje obecność mutacji w *genie CDH1*. [173] Mutacja wpływa na zmianę struktury pozakomórkowej części białka E-kadheryny, a dokładniej domeny odpowiedzialnej za wiązanie cząsteczki wapnia. [113] Immunohistochemiczna ocena ekspresji E-kadheryny oraz pozostałych białek układu ECCU wykazuje obecność prawidłowego, błonowego odczynu.

Także inni autorzy stwierdzili obecność pozytywnej reakcji immunohistochemicznej w rakach, w których potwierdzono obecność mutacji w *genie CDH1*. [31,112,155] Becker i wsp. [159] uważają, że na podstawie wyników odczynów immunohistochemicznych w kierunku E-kadheryny nie można wysuwać wniosków, co do obecności lub braku mutacji w *genie CDH1*. Identyczne wnioski płyną z pracy Tamura i wsp. [153] Wyniki moich badań są podobne – w badanej grupie 55% przypadków z potwierdzoną mutacją w *genie CDH1* wykazało równocześnie nieprawidłowości ekspresji białka E-kadheryny, jednak w pięciu przypadkach pomimo stwierdzenia obecności mutacji oceniana immunohistochemicznie ekspresja produktu na poziomie białka była

prawidłowa. Powyższe rozbieżności można próbować tłumaczyć w dwojaki sposób. Prawdopodobnie w części raków sporadycznych żołądka mutacja dotyczy tylko jednego allelu *genu CDHI*, bez wyłączenia drugiego allelu, jak to ma miejsce w przypadkach zespołu HDGC. Pozostały, drugi allel (tzw. „wild-type”) zapewnia powstawanie białka, które jest wykrywane immunohistochemicznie. W rakach, w których potwierdzono obecność mutacji w pierwszym allelu i hipermetylację promotora w drugim allelu *genu CDHI*, w ani jednym przypadku nie stwierdzono prawidłowej, błonowej ekspresji E-kadheryny. [118] Ponadto znaczny procent mutacji obecnych w sporadycznych rakach żołądka to tzw. „in-frame” delecje, które nie zaburzają ramki odczytu. [159] Można więc domniemywać, że powstające białko pozbawione jest wprawdzie pewnego fragmentu, ciągle jednak może zostać wbudowane w błonę komórkową i w związku z tym być wykryte metodami immunohistochemicznymi. Także Becker i wsp. stwierdzili, iż obecność mutacji w *genie CDHI* nie musi doprowadzić do zmian w ocenianej immunohistochemicznie ekspresji białka. [112]. Richards i wsp. [31] pokazali, iż nawet pewna część raków w zespole HDGC ma zachowaną ekspresję E-kadheryny. Przebadałi oni osiem rodzin brytyjskich spełniających kryteria definiujące zespół HDGC, których członkowie cierpieli na raka żołądka. Metodą PCR/SSCP/sekwencjonowanie stwierdzili w dwu rodzinach obecność germinacyjnej mutacji w *genie E-kadheryny*. Obydwie mutacje doprowadzały do przedwczesnego zakończenia syntezy białka (ang. truncating mutations), powodując powstanie białka o skróconej długości. Pomimo stwierdzenia mutacji w *genie* ocena immunohistochemiczna ekspresji białka w obrębie nacieku raka przy pomocy monoklonalnego przeciwciała HECD-1 (Affiniti Research Products, Exeter, UK) wykrywającego tzw. motyw HAV leżący w pozakomórkowej części białka wykazała w części przypadków obecność ekspresji badanego białka. Siła ekspresji była porównywalna z siłą stwierdzoną w obrębie prawidłowej błony śluzowej u danego pacjenta. Autorzy stwierdzili jednak dodatkowo heterogenną lokalizację odczynów: odczyn o lokalizacji błonowej obserwowali w obrębie obszarów wyżej zróżnicowanych, podczas gdy w obrębie obszarów nisko zróżnicowanych stwierdzili dodatkowo obecność odczynu cytoplazmatycznego, jednak o nasileniu jak w prawidłowej błonie śluzowej. Autorzy wyciągnęli wniosek, iż w przypadkach tych dwu rodzin w drugim allelu *genu CDHI* obecna była mutacja, która nie wyłączyła produkcji białka, a powstający produkt był zmieniony w taki sposób, iż ciągle możliwa była jego detekcja metodą immunohistochemiczną. Podobny przypadek opisali Kellet i wsp. [72] – członkowie jednej z rodzin zespołem HDGC i potwierdzoną mutacją w *genie CDHI* mieli zachowaną immunoreaktywność w kierunku E-kadheryny.

Modulacje ekspresji E-kadheryny podczas rozwoju embriogenetycznego oraz postępu procesu nowotworowego

Omawiając ekspresję E-kadheryny należy też wspomnieć, że ekspresja ta ulega modulacjom (włączaniu i wyłączaniu) w trakcie rozwoju embriogenetycznego [99,102], podczas procesów gojenia ran [103] oraz w trakcie postępu procesu nowotworowego. W tym ostatnim przypadku może ona ulegać nie tylko osłabieniu ale i nasileniu. Mayer i wsp. stwierdzili, że w badanych przerzutach raka żołądka do wątroby ekspresja E-kadheryny była silniejsza w porównaniu do ekspresji w guzie pierwotnym. [115] Jeden z takich E-kadheryno- dodatnich przerzutów wywodził się z negatywnego guza pierwotnego. Równocześnie 20% przerzutów z raków pierwotnie dodatnich była E-kadheryno- ujemna. Jawhari i wsp. opisali raki żołądka, w których ekspresja E-kadheryny i dalszych białek układu ECCU w obrębie nacieku pierwotnego w ścianie żołądka oraz w przerzutach do węzłów chłonnych nie była jednakowa. [119] Autorzy często obserwowali sytuację, w której przerzut do węzła wywodzący się z raka o osłabionej bądź nieobecnej ekspresji E-kadheryny wykazywał prawidłową, błonową ekspresję badanego białka. Przeciwnie wyniki, jednakże uzyskane w badaniach na myszach, przedstawił Kremer i wsp. – w badanych immunohistochemicznie przerzutach raka żołądka do płuc wszystkie przerzuty były E-kadheryno - negatywne, mimo iż powstały z guzów, które wykazywały ekspresję powyższego białka. [105] Tak więc ekspresja E-kadheryny nie jest niezmienna i zapewne zależy nie tylko od samego układu ECCU, ale podlega też wpływom otoczenia, w jakim rozwija się naciek nowotworu.

Podobne rozbieżności występują w publikacjach dotyczących raka jelita grubego. Gofuku i wsp. [174] badając immunohistochemicznie 100 przypadków raków jelita grubego stwierdzili osłabienie ekspresji białka E-kadheryny w 29% przypadków, nie stwierdzili jednak występowania zależności pomiędzy osłabieniem odczynu a głębokością nacieku raka lub obecnością przerzutów odległych. Schuhmacher i wsp. [175] stwierdzili osłabienie immunoreaktywności w 51% i jej brak w 28% badanych raków jelita grubego, ponadto w wielu przypadkach stwierdzili także zmianę lokalizacji odczynu: z błonowego na cytoplazmatyczny. 14% badanych raków nie wykazywało zmian ekspresji E-kadheryny. Analiza molekularna przypadków, w których wykazano całkowity brak reaktywności E-kadheryny nie wykazała obecności zmian w obrębie *genu CDH1*. Autorzy nie stwierdzili zależności między osłabieniem reaktywności badanego białka a stopniem zróżnicowania (grade = G) raka i zaawansowaniem procesu chorobowego. Dodatkowo stwierdzili, iż brak lub osłabienie immunoreaktywności E-kadheryny łączyło się z lepszym [175], a nie jak donosi większość autorów gorszym rokowaniem. Jeszcze inne wyniki przedstawia El-Bahrawy i wsp. [166] Donoszą oni, iż w badanej przez nich serii 30 raków jelita grubego aż w 85% przypadków stwierdzili nieprawidłową immunoreaktywność białek kompleksu ECCU, przy czym

nieprawidłowość ta wyrażała się nasileniem, a nie jak większość autorów donosi osłabieniem ekspresji z równoczesną nieprawidłową lokalizacją odczynu. Zmiana lokalizacji polegała na akumulacji białka w cytoplazmie komórek nowotworu. Jeszcze inni autorzy stwierdzili, iż siła ekspresja E-kadheryny, a także α - i β -kateniny jest zależna od stopnia zróżnicowania nowotworu: silniejsza w wysoko zróżnicowanych rakach jelita grubego, a słaba w nisko zróżnicowanych. [99]

Nieprawidłowości ekspresji dalszych białek układu ECCU: β -kateniny i α -kateniny

Stwierdzone przeze mnie nieprawidłowości ekspresji β -kateniny dotyczyły zarówno raków rozlanych, jak i jelitowych i w każdej z wymienionych grup obecne były w około 10% przypadków. Uzyskane wyniki procentowo należą do jednych z najniższych, w porównaniu do prac publikowanych przez innych autorów.[119,171] Najbardziej odbiegające od moich wyniki przedstawiają Jawhari i wsp., którzy stwierdzili w ocenianej grupie 89 raków żołądka wystąpienie nieprawidłowej ekspresji β -kateniny w 58% raków rozlanych i 38% raków jelitowych. [119] Na funkcjonowanie układu ECCU oddziałuje także α -katenina. Zaburzenia ekspresji tego białka opisywane są przez niektórych autorów nawet w 60-70% raków żołądka. [117,119,149] Według autorów dwu pierwszych prac nie ma różnic w częstości występowania zaburzeń ekspresji α -kateniny pomiędzy rakami typu jelitowego i rozlanego. Ostatnia grupa badaczy donosi, iż w rakach typu jelitowego osłabienie ekspresji α -kateniny jest rzadsze niż w rozlanych i występuje częściej u chorych, u których obecna była infekcja *H. pylori*. [149] Zaburzenia działania α -kateniny mogą zmienić funkcjonowanie całego układu ECCU, nawet wtedy, gdy pozostałe białka jednostki kadherynowo-kateninowej są prawidłowe. [149]

Zależności pomiędzy kompleksem E-kadherynowo-kateninowym a innymi układami

Dodatkowo wyciąganie wniosków na temat zależności pomiędzy wynikami odczynów immunohistochemicznych a stanem funkcjonalnym układu E-kadherynowo-kateninowego komplikuje fakt, że białka układu ECCU są zależne od genu *APC* oraz EGFR. Produktem prawidłowego genu *APC* jest białko (310kDa), które łączy się z wolną, obecną w cytoplazmie komórki β -kateniną i bierze udział w jej degradacji. [124] W części przypadków raków jelita grubego, w których obecna jest mutacja w genie *APC* dochodzi do utrudnienia łączenia się wolnej β -kateniny z układem APC-aksyna-GSK 3 β , co uniemożliwia proces degradacji wolnej β -kateniny. [107] Powstający w ten sposób nadmiar β -kateniny przemieszczany jest, poprzez układ proteasomów, do jądra komórkowego gdzie pobudza czynniki transkrypcyjne oraz zmienia

ekspresję genów. [20] Raki jelita grubego z nieprawidłową: cytoplazmatyczną i jądrową, zamiast błonowej, ekspresją β -kateniny rokują gorzej. [168]

Mutacje w *genie APC* występują także w rakach żołądka, wg Chew-Wun i wsp. zwłaszcza tych wysoko zróżnicowanych [176], są jednak zjawiskiem rzadszym niż w rakach jelita grubego. Ocena immunohistochemiczna białka APC pokazała, iż część przypadków raka żołądka wykazuje nieprawidłową ekspresję APC, która koreluje z obniżoną ekspresją E-kadheryny. [20] Jawhari i wsp. twierdzą, iż mutacja w *genie APC* dotyczy około 20% przypadków raków żołądka. [113] W sprzeczności z tym stwierdzeniem są wyniki badań Tamury i wsp., którzy przebadali 26 rozlanych, niskozróżnicowanych raków żołądka i w żadnym nie stwierdzili obecności mutacji w *genie APC*. [116] Do podniesienia poziomu wolnej β -kateniny w cytoplazmie komórki z dalszymi tego konsekwencjami opisanymi wcześniej dochodzi także w przypadku obecności mutacji w *genie AXIN1* lub *AXIN2*, kodującym białko aksynę, które jest jednym z elementów układu kontrolującego poziom wolnej β -kateniny w cytoplazmie komórki. [107]

Podsumowania wyników oceny immunohistochemicznej białek układu ECCU oraz obecności mutacji w genie CDH1

Na zakończenie trzeba zauważyć, iż w publikowanych pracach badacze używają różnych, czasem niedostępnych komercyjnie przeciwciał wytwarzanych w jednym tylko laboratorium. Część przeciwciał „działa” na tkankach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie, między innymi monoklonalne, mysie IgG firmy BioGenex (klon 36, nr katalogowy 390M) używane przede wszystkim w tej pracy oraz monoklonalne, mysie przeciwciało HECD-1, (Takara, Kyoto, Japan) [72,116] czy Anti-E-cadherin Ab, Novocastra, Newcastle upon Tyne, England. [167] Inne, jak na przykład mysie przeciwciało IgG1: mab 6F9 (Eurodiagnostics, Apeldoorn, the Netherlands) używane przez Mayer i wsp. wymagają wykonania preparatów mrożakowych z tkanki świeżej. [115] Różne przeciwciała mają niejednakowe miejsca wiązania z białkiem: dla przykładu przeciwciało używane przez Becker'a i wsp. [159] to Anti-E-Cadherin (AEC klon 36), Lexington, KY, które łączy się ze śródcytoplazmatyczną częścią białka E-kadheryny, rozpoznając jego C-terminalny koniec (kodowany przez eksony 14-16). Richards i inni wykorzystują monoklonalne przeciwciało HECD-1 (Affiniti Research Products, Exeter, UK) wykrywające tzw. motyw HAV leżący w pozakomórkowej części białka E-kadheryny. [31] Przeciwciała mające swój punkt uchwytu w pozakomórkowej części białka są zazwyczaj łatwiejsze w użyciu (łatwiej jest uzyskać silny, prosty w interpretacji odczyn), jednak należy liczyć się z możliwością uszkodzenia tego fragmentu białka, który warunkuje przyczepienie się przeciwciała. Jeśli punkt uchwytu przeciwciała znajduje się w

wewnątrzkomórkowej części białka, to uzyskanie prawidłowego odczynu jest trudniejsze, należy stosować inne metody odmaskowywania antygeny, jednak uszkodzenia miejsca wiązania zdarzają się dużo rzadziej. Monoklonalne, szczurze przeciwciało IgG1 [E-cad delta 9-1, klone 7E6] rozpoznaje jedynie fragment białka będący miejscem fuzji obszarów kodowanych przez ekson 8 i 10, a więc rozpoznaje jeden typ zmutowanego białka. [159] Bezpośredniego dowodu na to, iż używanie różnych przeciwciał daje niejednakowe wyniki dostarcza m.in. praca Keller'a i wsp. [72], w której autorzy opisali raka żołądka od chorej z rodziny z zespołem HDGC. Przy użyciu przeciwciała HECD-1 (Takara Biomedicals, Japan) uzyskano rozlany odczyn cytoplazmatyczny w komórkach nowotworu. Odczyn wykonany w tym samym przypadku przy pomocy przeciwciała AEC (Hamburg, Germany) był całkowicie negatywny. Powyższe przeciwciała różnią się miejscami uchwytu w białku.

Tak więc różnice dotyczące częstości wykrywanych w *genie CDHI* mutacji oraz wzajemnych relacji pomiędzy obecnością mutacji w *genie E-kadheryny* a ekspresją powyższego białka określaną metodą immunohistochemiczną można tłumaczyć wieloma, często współistniejącymi przyczynami, przede wszystkim:

1. doborem grupy przypadków do badania
2. nakładającymi się różnicami populacyjnymi
3. stosowaniem niejednakowych metod badawczych (wnioskowanie o stanie genu tylko na podstawie immunohistochemii, badania oparte o preparaty mrożakowe/ materiał utrwalony, wykorzystanie materiałów archiwalnych/ otrzymanywanych na bieżąco, badania oparte o analizę DNA metodą PCR/ analiza cDNA przy wykorzystaniu metody rtPCR, ocena kompletu eksonów/ tylko części eksonów *genu CDHI* itd.)
4. używaniem przeciwciał różnych firm, o różnych miejscach uchwytu, wymagających innych warunków do wykonania odczynów immunohistochemicznych
5. pojawieniem się w części przypadków niezależnych od stanu genu modyfikacji posttranslacyjnych, które dodatkowo zmieniają własności białka
6. obecnością zjawisk epigenetycznych (hipermetylacji promotora genu *E-kadheryny*), która w tej pracy nie była badana
7. innych, nie zauważonych jeszcze czynników

Podsumowując wyniki moich badań oraz doniesienia z literatury można wyciągnąć wniosek, iż w sporadycznych rakach żołądka stan *genu E-kadheryny* nie zawsze odzwierciedla stan funkcjonalny tego białka określany przy pomocy immunohistochemii. Potwierdzenie obecności mutacji w powyższym genie nie jest równoznaczne z wyłączeniem funkcji białka i pogorszeniem

rokowania w chorych: nie ma różnic w przeżyciach pacjentów z obecną mutacją w *genie CDH1* oraz bez niej. Stan funkcjonalny układu ECCU znacznie lepiej odzwierciedlają odczyny immunohistochemiczne: nieprawidłowa ekspresja któregoś z białek układu ma wpływ na długość przeżycia chorego po operacji. Przeżycia w grupie pacjentów, u których potwierdzono nieprawidłowości ekspresji białka E-kadheryny lub β -kateniny różnią się od średniej długości przeżycia u chorych z prawidłową ekspresją białek kompleksu ECCU. (wykres 7, str. 68) Wynik nie osiągnął istotności statystycznej, stwierdzono jednak występowanie trendu i można przypuszczać, iż po przebadaniu większej liczby pacjentów i powiększeniu liczebności porównywanych grup wynik byłby istotny statystycznie. W analizie wieloczynnikowej Coxa ekspresja białek układu ECCU, obok stanu węzłów chłonnych, wieku pacjenta i typu raka wg Goseki jest niezależnym czynnikiem rokowniczym w zaawansowanym raku żołądka. Wyniki te są zgodne z doniesieniami Jawhari i wsp., którzy stwierdzili, iż zmiana ekspresji białek układu ECCU łączy się ze skróceniem przeżycia chorych na raka żołądka. [119] W powyższej pracy w analizie wieloczynnikowej Coxa nieprawidłowa ekspresja β -kateniny okazała się być niezależnym czynnikiem rokowniczym, natomiast zaburzenie ekspresji E-kadheryny znalazło się na granicy istotności statystycznej.

Obecność akumulacji białka p-53 w powiązaniu z innymi cechami raka żołądka

Mutacje w *genie p-53* są jedną z najczęściej opisywanych pojedynczych zmian genetycznych u człowieka. [141] Część badaczy stwierdziła zależność pomiędzy jądrową akumulacją białka p-53 a pogorszeniem rokowania pacjentów z rakiem żołądka. [177-180], w innych pracach nie stwierdzono takich zależności zarówno w analizie jednoczynnikowej jak i w tworzonych modelach Coxa. [181] W pojedynczych pracach wykazano, iż obecność jądrowej akumulacji białka p-53 łączy się z nieznacznym przedłużeniem przeżyć i poprawą rokowania. [182] Uważa się, iż akumulacja białka p-53 jest wynikiem przedłużenia jego żywotności w komórce, a to najczęściej wiąże się z obecnością mutacji w *genie p-53*. Możliwa jest także jądrowa akumulacja niezmutowanego białka p-53, np. na drodze epigenetycznej na skutek pobudzenia promotora genu. Tamura i wsp. [116] zbadali 26 rozlanych, niskozróżnicowanych raków żołądka i tylko w jednym raku (4% przypadków) stwierdzili obecność mutacji w *genie p-53*. Również niski procent mutacji w *genie p-53* stwierdzili Rugge i wsp. badając ponad sto przypadków raków żołądka u osób poniżej 40 roku życia. [183] Bataille i wsp. stwierdzili obecność mutacji w *genie p-53* w 32% badanych raków (8 przypadków z 25) i równocześnie jądrową akumulację białka p-53 w 55% badanych przypadków. [182] Wyniki te odbiegają znacznie od danych mówiących o akumulacji jądrowej białka p-53 stwierdzanej za pomocą immunohistochemii, która w pojedynczych pracach obecna była w nawet w 60- 75%

badanych przypadków [150,181] i mogą być potwierdzeniem koncepcji, iż do jądrowej akumulacji białka p-53 dochodzi także na drodze aktywacji mechanizmów epigenetycznych bez obecności mutacji w genie p-53.

Wykorzystywane przez mnie przeciwciała przeciwko białku p-53 wykrywa każde zakumulowane, zarówno zmutowane jak i prawidłowe, białko p-53. W badanym materiale stwierdzono zjawisko akumulacji i co za tym idzie nadmiernej ekspresji jądrowej powyższego białka w 30% badanych raków żołądka. Podobne procentowo wyniki uzyskane przy pomocy immunohistochemii podają także inni autorzy. [140,141] Lee i wsp. [141] stwierdzili występowanie niezależnej od stopnia zaawansowania raka zależności pomiędzy nadmierną ekspresją jądrową p-53 i skróceniem przeżyć u pacjentów, jednak zależność ta mieściła się na granicy istotności statystycznej. W badanej przez mnie grupie również wystąpiło zróżnicowanie przebiegu krzywych przeżyć pacjentów bez oraz z obecną ekspresją p-53: jądrowa akumulacja białka p-53 korelowała ze skróceniem przeżyć pacjentów. Powyższa różnica nie osiągnęła poziomu wymaganej istotności statystycznej, mieściła się natomiast w definicji trendu (w teście χ^2 $p=0,095$). W analizie wieloczynnikowej w modelu Coxa jądrowa akumulacja białka p-53 nie miała wpływu na długość przeżycia chorych z zaawansowanym rakiem żołądka.

Gen p53 może ulegać mutacjom zarówno w rakach typu jelitowego jak i rozlanego. [97] Lee i wsp. [141] oraz Gabbert i wsp. [181] stwierdzili, iż w grupie raków z jądrową akumulacją białka p-53 dominowały wysokozróżnicowane raki typu jelitowego oraz raki mieszane wg podziału Laurena, mniej natomiast było niskozróżnicowanych raków rozlanych. W moim materiale akumulacja białka p-53 została stwierdzona we wszystkich trzech grupach raka wg Laurena. Wystąpiła ona nieco częściej w rakach typu jelitowego (35%) niż typu rozlanego (24%) czy mieszanego (29%), lecz różnice nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej. Tym samym uzyskane przez mnie wyniki nie potwierdziły powyższych doniesień, są natomiast zgodne z pracą Rugge i wsp., którzy nie znaleźli zależności pomiędzy akumulacją białka p-53 a typem raka wg Laurena. [183]

Lu i wsp. stwierdzili istnienie zależności pomiędzy obecnością ekspresji surviviny a jądrową akumulacją białka p-53. [140] Autorzy wysunęli przypuszczenie, iż p-53 może mieć hamujący wpływ na survivinę, a pojawienie się mutacji w *genie p-53* ogranicza wcześniejszy, hamujący wpływ na *gen surviviny*, prowadząc do pojawienia się w danym przypadku ekspresji wspomnianego białka. W badanym przez mnie materiale akumulacja białka p-53 także stwierdzona została częściej w rakach wykazujących pozytywną reakcję w kierunku surviviny niż w rakach survivino-negatywnych (odpowiednio 38% i 20% przypadków), jednak różnice między grupami nie osiągnęły wymaganego poziomu istotności statystycznej i tym samym nie potwierdziły przypuszczenia

przedstawionego przez Lu i wsp. Nie udało się także potwierdzić związku pomiędzy akumulacją p-53 i ekspresją surviviny w rakach jelita grubego [184] oraz rakach sutka. [185]

Obecność ekspresji surviviny w powiązaniu z innymi cechami raka żołądka

W większości dojrzałych tkanek organizmu człowieka, w tym również w prawidłowej błonie śluzowej żołądka ekspresja surviviny jest nieobecna [137,140], może się jednak pojawić w komórkach nowotworowych, szczególnie raków i chłoniaków. [133] W zależności od badanego nowotworu i typu używanego przeciwciała wystąpienie pozytywnego odczynu w kierunku surviviny opisywane było w cytoplazmie [140,186] lub jądrze badanych komórek nowotworowych. [187] W rakach żołądka pozytywny odczyn był opisywany w szerokim zakresie od 34,5% [140] do 82% przypadków [187]. Używane przeze mnie przeciwciała wymaga pojawienia się reakcji jądrowej, aby można ją było uznać za pozytywną. W ocenianej grupie raków odczyn jądrowy wystąpił w 58% badanych przypadków - wynik ten nieco odbiega od najwyższych, publikowanych wartości. [187] Należy jednak zauważyć, że obydwie grupy raków różniły się znacznie między sobą: w serii Okady i wsp. aż 35% przypadków było rakami wczesnymi, które w mojej serii w ogóle nie występowały. W mojej serii wyższy był procent raków w najwyższych stopniach zaawansowania (III i IV) oraz raków z obecnymi przerzutami w węzłach chłonnych. Można więc przypuszczać, iż rozbieżność dotycząca liczby przypadków „survivino-pozytywnych” przynajmniej po części wynika z niejednakowych cech klinicznych porównywanych grup. Nie ma zgodności co do znaczenia pojawienia się ekspresji surviviny w tkance nowotworowej. Część autorów wykazała istotny statystycznie związek pomiędzy dodatnią ekspresją surviviny i skróceniem przeżyć pacjentów chorych na raka jelita grubego. [184,188] Krzywe przeżyć chorych na raka sutka były niejednakowe, lecz różnica nie osiągnęła wymaganego poziomu istotności statystycznej. [185] Według Okada i wsp. pojawienie się pozytywnego odczynu w kierunku surviviny w badanych 133 rakach żołądka korelowało z przedłużeniem długości przeżycia chorych. [187] W badanej przeze mnie grupie raków wystąpienie pozytywnej reakcji jądrowej nie miało wpływu na rokowanie zarówno w analizie jednoczynnikowej jak i w modelu regresji proporcjonalnego hazardu Coxa.

Nasilenie angiogenezy w powiązaniu z innymi cechami raka żołądka

Nowotwory złośliwe, z definicji, charakteryzują się miejscowo agresywnym, niszczącym wzrostem oraz tworzeniem przerzutów odległych. W początkowych etapach wzrostu guz nowotworowy zaopatrywany jest w substancje odżywcze dzięki procesom dyfuzji z otaczających tkanek. Jednak po przekroczeniu średnicy kilku milimetrów droga ta przestaje być wystarczająca – utworzenie odpowiednio gęstej sieci naczyń krwionośnych na terenie rosnącego guza staje się

warunkiem koniecznym do dalszego, miejscowego wzrostu nowotworu, a także do zapoczątkowania powstania przerzutów odległych. [128] Pierwsze prace oceniające gęstość drobnych naczyń krwionośnych w obrębie nacieku raka i korelujące te wartości z rokowaniem u chorych dotyczyły raka sutka. [145] W rakach sutka wyższa gęstość drobnych naczyń krwionośnych w obrębie nacieku nowotworowego koreluje z obecnością przerzutów odległych oraz krótszymi przeżyciami pacjentów. [130,145,189] Dane dotyczące raka żołądka nie są już tak jednoznaczne, części autorom udało się wykazać, iż nasiloną angiogenezę w obrębie nacieku raka jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym, inni nie potwierdzili tych doniesień. [128,131,132, 190] Nie ma również zgodności, co do wpływu nasilenia angiogenezę na rokowanie w rakach jelita grubego. Część autorów stwierdziła pogorszenie rokowania w przypadku raków z dużą ilością drobnych naczyń w podścielisku [191], inni nie stwierdzili takiego związku [192]. Można znaleźć także prace, w których autorzy stwierdzili zależność pomiędzy nasileniem angiogenezę a poprawą rokowania u chorych na raka jelita grubego. [146]

W badanym przeze mnie materiale zaawansowanych raków żołądka nie wykazano zależności pomiędzy nasileniem angiogenezę a długością przeżyć pacjentów. Krzywe Kaplan-Meiera przedstawiające prawdopodobieństwo przeżycia chorych z grup o dużym i małym nasileniu angiogenezę praktycznie pokrywają się (wykres 8, str. 69). Nasilenie angiogenezę nie ma też znaczenia rokowniczego w analizie wieloczynnikowej w stworzonym modelu Coxa. Do podobnych wniosków doszła grupa Chen'a i wsp. [190] Wyniki te pozostają jednak w sprzeczności z doniesieniem Maeda i wsp., którzy stwierdzili, że nasilenie angiogenezę w raku żołądka jest istotnym czynnikiem rokowniczym zarówno w analizie jednoczynnikowej jak i w modelu Coxa. [131] Należy jednak zaznaczyć, iż analizowana przeze mnie grupa raków charakteryzuje się znacznie wyższym stopniem zaawansowania klinicznego. Najwyższy, IV stopień zaawansowania dotyczył tu ponad połowy (53%) ocenianych przypadków, podczas gdy w grupie Maeda stanowił on 30%. Raki w pierwszym stopniu zaawansowania to odpowiednio: 1% i 31% w ocenianej przeze mnie i Maeda grupie. Można przypuszczać, iż nasilenie angiogenezę w obrębie guza pierwotnego będzie miało znaczenie rokownicze w przypadkach raków żołądka o niskim stopniu zaawansowania klinicznego, do czasu, kiedy proces nowotworowy ograniczony jest do ściany żołądka. Mniejsza gęstość drobnych naczyń krwionośnych na terenie guza zwiększa szansę na przeprowadzenie operacji zanim komórki nowotworowe przedostaną się na obwód. Także Kakeji i wsp. wykazali, że nasilenie angiogenezę w raku żołądka jest niezależnym czynnikiem rokowniczym. [128] Cameron i wsp. oceniali nasilenie angiogenezę w rakach żołądka o niskim stopniu zaawansowania klinicznego. [132] Stwierdzili, że raki w stopniu IA (naciek nie przekracza błony podśluzowej, brak przerzutów w węzłach chłonnych i przerzutów odległych) mają znacząco mniejsze wartości

gęstości naczyń w porównaniu z rakami w stopniu IB i II. Nie stwierdzili jednak różnic pomiędzy grupami IB i II. Podobne wyniki przedstawiła inna grupa badaczy, która stwierdziła iż średnia gęstość naczyń w rakach o I stopniu zaawansowania jest niższa od raków o wyższych stopniach zaawansowania, jednak nie ma już różnic w gęstości naczyń w rakach o II i III stopniu zaawansowania klinicznego. [190] Analizując te prace można przypuszczać, że gęstość naczyń w raku żołądka zwiększa się jedynie na wczesnym etapie wzrostu i po osiągnięciu pewnego poziomu nie ulega już znaczącym zmianom. W przypadkach zaawansowanych raków żołądka nasilenie angiogenezy w obrębie guza pierwotnego nie ma już wpływu na dalszą dynamikę rozwoju procesu nowotworowego.

Maeda i wsp. stwierdzili również, że nasilenie angiogenezy w obrębie nacieku raka żołądka wzrasta wraz ze spadkiem stopnia zróżnicowania raka i różni się z zależności od typu raka wg Laurena. [131] Moje obserwacje nie potwierdzają tych doniesień.

Fakt, iż nasilenie angiogenezy jest istotnym czynnikiem rokowniczym w rakach sutka, i równocześnie zdaje się nie mieć wpływu na przeżycia w rakach przewodu pokarmowego (żołądka i jelita grubego) można próbować tłumaczyć różnicami w budowie powyższych narządów. Podścielisko sutka, zazwyczaj tłuszczowe lub ze zmianami typu „laesio fibrosa” zawiera mniej drobnych naczyń krwionośnych, niż bogatounaczyniona błona śluzowa i podśluzowa przewodu pokarmowego. Dlatego dla toczącego się w sutku procesu nowotworowego możliwość sprawnego generowania przez komórki nowotworowe sieci drobnych naczyń krwionośnych może mieć kluczowe znaczenie dla zapewnienia wzrostu guza i umożliwienia powstawania przerzutów odległych. Rak rosnący w obrębie ściany przewodu pokarmowego zdaje się nie być tak bardzo zależny od generowania wzrostu nowych naczyń. Wydaje się być prawdopodobne, że przynajmniej częściowo, wykorzystuje on obecność wcześniej istniejących w ścianie przewodu pokarmowego struktur naczyniowych.

Różnorodność obrazów histologicznych w nacieku pierwotnym w ścianie żołądka i w przerzutach do węzłów chłonnych

Średnia ilość preparatów histologicznych, na których widoczne było utkanie raka wynosiła 8,3 i wahała się w szerokich granicach od 3 do 21 w zależności od przypadku. Stwierdzono oczywistą zależność pomiędzy wielkością guza w centymetrach, a ilością szkiełek zajętych przez utkanie raka ($p=0,02$ dla testu korelacji rang Spearmana). Jest to zjawisko zrozumiałe i wynika z zasad pobierania materiału do oceny histologicznej – im większa średnica nowotworu, tym więcej wycinków. [193] Nie wykazano natomiast związku pomiędzy liczbą pobranych do badania wycinków, a ilością stwierdzonych w obrębie nacieku raka odrębnych histologicznie utkań, przy

założeniu, iż dane utkanie musi zajmować co najmniej 10% objętości nowotworu ($p=0,75$ dla testu korelacji rang Spearmana). W rutynowym badaniu histologicznym nie mamy prostej możliwości oceny objętości nacieku, dlatego przyjąłem zasadę pozwalającą włączyć dane utkanie do oceny, jeśli zajmowało ono co najmniej trzy czwarte standardowego preparatu patrząc w małym powiększeniu (5X), lub widoczne było na więcej niż pół pola widzenia w małym powiększeniu na co najmniej dwu preparatach.

Z morfologicznego punktu widzenia raki żołądka są grupą niezwykle heterogenną - obrazy jakie tworzą jego nacieki mogą być bardzo różnorodne. [86,87] Dlatego też ocena histologiczna i znalezienie jednej, uniwersalnej klasyfikacji są trudne. Oglądając raki żołądka zauważamy nie tylko ogromną zmienność obrazów morfologicznych pomiędzy kolejnymi przypadkami, ale także często różne obrazy w kolejnych wycinkach od tego samego pacjenta. Ta wyjątkowa różnorodność obrazów histologicznych zaowocowała powstaniem wielu odrębnych klasyfikacji histologicznych. Próbuje się one grupować raki żołądka opierając się na ocenie różnych cech: na stwierdzeniu obecności lub braku specyficznych struktur histologicznych (np. gruczołowych, papilarnych), charakterystycznych komórek, charakterystycznego sposobu wzrostu, pochodzenia histogenetycznego, lub kombinacji kilku wyżej wymienionych elementów równocześnie. W większości klasyfikacji, dla uproszczenia oceny bierze się pod uwagę utkanie dominujące w nacieku, pomijając mniejsze obszary o obrazach odbiegających od tego głównego [6,87] Moja praca pokazuje, iż prawie trzy czwarte raków żołądka ma budowę złożoną. Jedynie 28% przypadków zbudowanych jest wyłącznie z jednego utkania na obszarze całego nacieku nowotworu. Zbliżone wyniki podaje Carneiro i wsp. – w ocenianej przez nich serii 213 raków w prawie 60% przypadków znaleziono więcej niż jedno utkanie histologiczne. [87] Analiza statystyczna posiadanego przeze mnie materiału nie wykazała istnienia zależności długości przeżyć pacjentów od rosnącej ilości utkań w nacieku raka.

Raki zbudowane z kilku wyraźnie różniących się utkań zachowują tę różnorodność także w przerzutach do węzłów chłonnych. Pod względem histologicznym przerzuty raka żołądka w większości przypadków odpowiadają budowie histologicznej guza pierwotnego w ścianie żołądka. Obecność większej liczby utkań w obrębie guza pierwotnego skutkuje większą różnorodnością obrazów histologicznych przerzutów w węzłach chłonnych. Jedynie w trzech przypadkach na 73 z obecnymi przerzutami (4%) w obrębie węzła chłonnego stwierdzono przerzut o utkaniu nie występującym w nacieku w ścianie żołądka. W dwu przypadkach pojawiło się utkanie o budowie śluzowej i w jednym obszarze o budowie cewkowej. Prawdopodobnie pomimo dużej ilości pobieranych do badania wycinków otrzymane preparaty histologiczne nie uwidoczniły wszystkich obrazów morfologicznych raka w ścianie żołądka. Sytuacja taka dotyczy przede wszystkim raków

typu mieszanego. Stwierdzono również, iż część nisko zróżnicowanych raków typu jelitowego, które w obrębie guza pierwotnego prezentowały się głównie jako nacieki lite, z bardzo ograniczoną tendencją do tworzenia cew gruczołowych w przerzutach dawała obraz wysokozróżnicowanego raka gruczołowego z bardzo wyraźnym tworzeniem regularnych gruczołów. Stopień zróżnicowania nacieku raka w przerzucie odpowiadał: G1. Tak więc przerzuty powstające w danym przypadku raka żołądka mogą mieć, i zazwyczaj mają, zróżnicowany obraz morfologiczny, możliwe jest także powstanie przerzutu o cechach wyższego zróżnicowania niż naciek pierwotny w ścianie żołądka.

VI. Wnioski

1. Obecność nieprawidłowej ekspresji białek układu ECCU (E-kadheryny bądź E-kadheryny i β -kateniny) w sporadycznych, zaawansowanych rakach żołądka identyfikuje grupę pacjentów o gorszym oczekiwanym przeżyciu.
2. Statystycznie istotny związek łączy występowanie mutacji w *genie CDH1* z zaburzeniami ekspresji białka E-kadheryny, jednak część przypadków z mutacją nie wykazuje zaburzeń ekspresji tego produktu. Podobnie w części przypadków, w których stwierdzono nieprawidłowości ekspresji białka, nie potwierdzono obecności mutacji w *genie CDH1*, co pozwala przypuszczać, że część przypadków ze zmienioną ekspresją E-kadheryny ma podłoże epigenetyczne.
3. W serii przypadków obejmującej sporadyczne, zaawansowane raki żołądka stwierdzenie mutacji w *genie CDH1* nie identyfikuje grupy pacjentów o gorszym rokowaniu.
4. Spośród tradycyjnych czynników rokowniczych potwierdzono wartość: stanu węzłów chłonnych (N), obecności przerzutów odległych (M) oraz stopnia zaawansowania procesu (ang. „stage”) jako istotnych czynników prognostycznych, podczas gdy głębokość nacieku raka (T) okazała się nie mieć znaczenia rokowniczego w badanych, zaawansowanych rakach żołądka.
5. W analizie wieloczynnikowej Coxa klasyfikacja wg Goseki okazała się mieć wartość prognostyczną.
6. Stwierdzono występowanie trendu pomiędzy pojawieniem się jądrowej akumulacji białka p-53 i pogorszeniem rokowania chorych z zaawansowanym rakiem żołądka. Dodatkowe czynniki badane w niniejszej pracy: nasilenie angiogenezy, pojawienie się ekspresji surviviny, obecność nacieku zapalnego w tzw. „froncie inwazji” oraz w głębi utkania raka, ilość różnych utkań histologicznych w obrębie nacieku pierwotnego nie miały wpływu na rokowanie w zaawansowanych rakach żołądka.

VII. Streszczenie

Zarys problemu:

Rak gruczołowy żołądka jest najczęstszym nowotworem złośliwym tego narządu, rozpoznawanym typowo po 65 roku życia. Pomimo, iż współczynniki zapadalności na raka żołądka obniżają się, ciągle pozostaje on jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych, odpowiadając za znaczący procent zgonów z przyczyn nowotworowych. W zależności od rejonu geograficznego obserwuje się znaczne różnice w liczbie noworozpoznawanych przypadków, a także częstości występowania różnych typów histologicznych raka. Etiopatogeneza raka żołądka związana jest z licznymi, wzajemnie na siebie wpływającymi i modyfikującymi swoje oddziaływanie czynnikami środowiskowymi, których wpływy nakładają się na indywidualne uwarunkowania genetyczne. Do najlepiej poznanych czynników środowiskowych należą: specyficzne uwarunkowania dietetyczne oraz infekcja *H. pylori*, szczególnie szczepami *cagA*, jeśli miała ona miejsce we wczesnym dzieciństwie. Ogromna różnorodność i zmienność obrazów histopatologicznych nacieków raka żołądka obserwowana pomiędzy różnymi przypadkami, a także często w kolejnych wycinkach od tego samego pacjenta zaowocowała powstaniem licznych, opartych na różnych kryteriach, klasyfikacji i podziałów. Najszerszą akceptację zyskały: klasyfikacja Laurena, Goseki, WHO i Minga. Postacie makroskopowe raka żołądka opisuje klasyfikacja Bormanna. Większość używanych podziałów raka żołądka nie ma znaczenia rokowniczego. Pięcioletnie przeżycia najlepiej korelują ze stopniem zaawansowania klinicznego procesu nowotworowego – rak wczesny charakteryzuje się ponad 90% pięcioletnimi przeżyciami, podczas gdy w przypadkach zaawansowanych liczby te spadają do 10-15%. Istnieje jednak wiele dodatkowych czynników mogących mieć wpływ na rokowanie u chorych na raka żołądka. Jednym z nich wydają się być zmiany w obrębie białek układu ECCU, odpowiadających za utrzymanie procesów przylegania międzykomórkowego w tkankach nabłonkowych oraz za zapewnienie sygnalizacji między komórkami nabłonka.

Cel pracy:

W niniejszej pracy badano stan genu *CDHI* kodującego białko E-kadherynę oraz ekspresję białek E-kadheryny i β -kateniny w grupie 84 sporadycznych, zaawansowanych raków żołądka. Szukano zależności pomiędzy obecnością mutacji w powyższym genie i zaburzeniami ekspresji białek układu ECCU a cechami histologicznymi raka: stopniem zróżnicowania, typem wzrostu, obecnością i składem nacieku zapalnego, nasileniem angiogenezy, ekspresją białka p-53 i surviviny oraz długością przeżyć pacjentów po operacji.

Materiały i metody:

Materiał pochodził od pacjentów operowanych w I Klinice Chirurgii w Krakowie z powodu raka żołądka w latach 1996-2000 i obejmował grupę 84 zaawansowanych, sporadycznych raków żołądka. W pracy wykorzystano podstawowe techniki histopatologiczne (barwienie preparatów hematoksyliną-eozyną oraz Alcjan-PAS), immunohistochemię z wykorzystaniem specyficznych, monoklonalnych przeciwciał, a także techniki molekularne - reakcję PCR-SSCP pozwalającą na wykrywanie mutacji oraz umiejscowienie ich w konkretnym eksonie badanego genu. Do opracowania statystycznego danych wykorzystano program Statistica for Windows, 6.0.

Wyniki:

Analizując wzory otrzymanych na żelach prążków stwierdzono obecność mutacji w *genie CDHI* w 13% badanych raków. Biorąc pod uwagę jedynie raki rozlane i mieszane stwierdzono, iż mutacje w *genie CDHI* dotyczą 19% badanych raków tej grupy. Równocześnie stwierdzono, iż około 20% badanych raków (17 przypadków) wykazuje nieprawidłowości ekspresji białka E-kadheryny, a około 19% (16 przypadków) nieprawidłowości ekspresji białka β -kateniny. Stwierdzono występowanie istotnej statystycznie zależności pomiędzy obecnością mutacji w *genie CDHI* a zaburzeniami ekspresji białka E-kadheryny. Zauważono także, iż część sporadycznych, zaawansowanych raków żołądka ze stwierdzoną mutacją w *genie CDHI* nie wykazuje zaburzeń ekspresji białka E-kadheryny. W części przypadków, w których nie potwierdzono obecności mutacji w *genie CDHI* wystąpiły zaburzenia ekspresji białka - pozwala to przypuszczać, że część przypadków raków żołądka ze zmienioną ekspresją E-kadheryny (osłabioną lub o nieprawidłowej lokalizacji) ma podłoże epigenetyczne. Obecność nieprawidłowej ekspresji któregoś z badanych białek układu ECCU identyfikuje grupę pacjentów o gorszym oczekiwanym przeżyciu, podczas gdy stwierdzenie mutacji w *genie CDHI* nie ma znaczenia rokowniczego. Potwierdzono wartość rokowniczą tradycyjnych czynników rokowniczych: stanu węzłów chłonnych, obecności przerzutów odległych i stopnia zaawansowania procesu nowotworowego (ang. „stage”). W analizie wieloczynnikowej Coxa wykazano także istotną statystycznie wartość rokowniczą klasyfikacji Goseki. Stwierdzono występowanie trendu pomiędzy jądrową akumulacją białka p-53 a pogorszeniem rokowania w przypadkach sporadycznych, zaawansowanych raków żołądka. Nasilenie angiogenezy, pojawienie się ekspresji surviviny, obecność nacieku zapalnego na tzw. „froncie inwazji” oraz w głębi nacieku raka oraz ilość różnych utkań obserwowanych w wycinkach od danego pacjenta nie miały wpływu na długość przeżycia w badanej grupie raków.

Najistotniejszy wniosek z pracy:

Immunohistochemiczne stwierdzenie obecności nieprawidłowej ekspresji białek: E-kadheryny lub/i β -kateniny w obrębie nacieku raka żołądka identyfikuje grupę pacjentów o gorszej oczekiwanej długości przeżycia po operacji.

VIII. Summary

the study objectives

Gastric adenocarcinoma is the most frequent malignant neoplasm of this organ, typically diagnosed in people older than 65 years old. Despite the declining incidence of gastric cancer it remains one of the most common malignant neoplasm being responsible for a significant percent of cancer-related deaths. The incidence of gastric carcinoma and the relative frequency of its particular histological types show marked geographical variability. Etiopathogenesis of gastric cancer is connected to multiple environmental agents which influence each other and mutually modulate their effects, and are further influenced by individual genetical predispositions. The best known environmental agents are: special dietary habits and *Helicobacter pylori* infection, especially when acquired in childhood and/or caused by cag-A strains.

A marked inter- and intraindividual variability of gastric carcinoma histological patterns resulted in the development of numerous histological classifications of this neoplasm. The most widely accepted classifications system are: Lauren, Goseki, WHO and Ming classifications. Bormann classifications describes macroscopic forms of gastric cancer infiltrates. Most accepted gastric cancer classifications do not possess prognostic value. Prognosis in gastric cancer correlates with clinical stage of the disease – five years survival rate in so-called early gastric cancer is approximately 90%, whereas in advanced stages five years survival rate declines to 10-15%. There are probably numerous additional factors which can influence the prognosis in gastric cancer patients: among them are changes in E-cadherin-catenin unit (ECCU) proteins. These proteins are normally responsible for the maintenance of intracellular adhesion in epithelial tissues and for providing signal transduction between epithelial cells.

the aim of the study

Status of the *CDH1* gene coding E-cadherin protein and the expression of E-cadherin and β -catenin proteins were investigated in the group of 84 sporadic, advanced gastric cancers. The correlations between E-cadherin gene mutations, disturbances of immunohistochemical expression of ECCU proteins and histological features of neoplasm: cancer differentiation, type of growth, presence and composition of inflammatory infiltrate, angiogenesis, expression of p-53 and survivin proteins and the survival interval after operation were investigated.

materials and methods

The material was collected from the patients operated for gastric cancer between 1996-2000 in the First Surgical Department in Cracow. It consisted of 84 advanced, sporadic gastric cancers. Basic histopathological techniques: hematoxylin-eosin and Alcian-PAS staining as well as immunohistochemistry with specific, monoclonal antibodies and molecular techniques: PCR-SSCP reactions, which allowed to detect mutations and to locate them in a proper exon of the investigated gene were used in this work. Statistical analysis was done using computer program: Statistica for Windows 6.0.

results

Bands pattern analysis revealed presence of *CDH1* gene mutations in 13% of investigated gastric cancers. When only so-called diffuse and mixed types were taken under consideration, the mutations were present in 19% of investigated cases. Disturbances in expression of E-cadherin protein were detected immunohistochemically in about 20% (17 cases) and of β -catenin protein in about 19% (16 cases). Statistically significant correlation between the presence of E-cadherin gene mutation and disturbances in E-cadherin protein expression was found. It was noticed that a part of sporadic, advanced gastric cancers with detected mutation in *CDH1* gene do not show abnormal expression of the E-cadherin protein. Some cases with unmutated E-cadherin gene showed a deranged protein expression, most probably due to the epigenetic factors.

Deranged expression of proteins belonging to the ECCU identifies a group of patients with poorer overall survival. The E-cadherin mutation however, does not have any prognostic impact.

In the present study it was possible to confirm the value of traditional prognostic factors: the lymph node status, distant metastases, and the tumor stage. The Goseki classification was proved to have a prognostic impact by the Cox proportional hazard model. There was a trend toward poorer survival in the cases demonstrating the nuclear accumulation of the p53 protein. No prognostic significance was proven for the intensity of angiogenesis, survivin expression, inflammatory infiltrate at the tumor invasion front, and histological variability within an individual tumor.

the most important conclusion of the work

Disturbances in expression of E-cadherin and/or β -catenin proteins detected immunohistochemically in gastric cancer infiltrate define the group of patients with poorer overall survival.

IX. Piśmiennictwo

1. Ming Si-Chung, Goldman H. Pathology of the gastrointestinal tract. Williams and Wilkins 1998; 120-122, 607-647
2. Mills SE, Carter D, Reuter VE, Greenson JK, Stoler MH. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. Lippincott, Williams and Wilkins, 2004; (2): 1455-1459
3. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic Basis of Disease, Saunders Company, 1999; 787-802
4. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): definition, occurrence, pathology, differential diagnosis and molecular genetics. (Review) Pol J Pathol, 2003; 54 (1): 3-24
5. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Elsevier Inc., 2004; 662-711
6. Hamilton SR, Aaltonen LA. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive system, WHO Classification of Tumours. IARC Press Lyon, 2000; 3: 32-52, 6: 103-129
7. Parker SL, Tong T, Bolden S. Cancer statistics, 1997. CA Cancer J Clin 1997; 47: 5-27
8. Bevan S, Houlston RS. Genetic predisposition to gastric cancer - Review. QJM Oxford University Press, 1999; 92(1); 5-10
9. Kosary CL, Ries LAG, Miller BA. SEER cancer statistics review 1973-1992. Tables and graphs. Bethesda: National Cancer Institute. NIH Publ, 1996; 96: 2789-98
10. Didkowska J, Wojciechowska U, Tarkowski W, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 1999 roku. Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej – Curie. Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów. Krajowy Rejestr Nowotworów, Warszawa, 2002; 1-170
11. Zatoński W, Tyczyński J. Nowotwory złośliwe w Polsce w 1996 roku. Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej – Curie. Zakład Organizacji Walki z Rakiem i Epidemiologii Nowotworów. Krajowy Rejestr Nowotworów, Warszawa, 1999, 1-75
12. Howson CP, Hiyama T, Wynder EL. The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. Epidemiol Rev, 1986; 8: 1-27
13. Neugut AI, Hayek M, Howe G. Epidemiology of gastric cancer. Semin Oncol, 1995; 23: 281-291
14. Lambert R, Guilloux A, Oshima A, Miller CC. Incidence and mortality from stomach cancer in Japan, Slovenia and the USA. Int J Cancer, 2002; 97: 811-818
15. Vecchia La C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, Maisonneuve P, Levi F. Trends of cancer mortality in Europe, 1955-1989. Eur J Cancer, 1992; 28(1): 132-235
16. Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra JA. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000. Increase in the signet ring cell type. Arch Pathol Lab Med, 2004; 128: 765-770
17. Tyczyński JE, Wojciechowska U, Didkowska J, Tarkowski W, Zatoński W. Atlas umieralności na nowotwory złośliwe w Polsce w latach 1991-1995. Centrum Onkologii, Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa, 1998: 4-11, 34-44
18. Golematis B, Tzardis P, Hatzikostas P, Papadimitriou K, Haritopoulos N. Changing patterns of distribution of carcinoma of the stomach. Br J Surg, 1990; 74: 63-64
19. Craanen ME, Dekker W, Blok P, Ferwerda J, Tytgat GN. Time trends in gastric carcinoma: changing patterns of type and location. Am J Gastroenterol, 1992; 87: 572-579
20. Gulmann C, Grace A, Leader M, Butler D, Patchett S i wsp. Adenomatous polyposis coli gene, β -catenin and E-cadherin expression in proximal and distal gastric cancers and precursor lesions. (An immunohistochemical study using tissue microarrays). App Immunohistochem Mol Morphol, 2003; 11(3): 230-237
21. Fletcher C. Diagnostic histopathology of tumors (2nd edition). Churchill Livingstone 2000; 2, 313-368

22. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Path Microbiol Scand*, 1965; 64, 31-49
23. Tso PL, Bringaze WL 3rd, Danterive AH. Gastric carcinoma in the young. *Cancer*, 1987; 59: 1362-1365
24. Oliveira C, Suriano G, Ferreira P, Canedo P, Kaurah P i wsp. Genetic screening for familial gastric cancer. *Hereditary Cancer Clin Pract*, 2004; 2(2): 51-64
25. Nottingham J. Signet ring carcinoma of stomach in a child. *Histopathology*, 1994; 24: 490-491
26. Allum WH, Powell DJ, McConkey CC. Gastric cancer: a 25 year review. *Br J Surg*, 1989; 76: 535-540
27. Sue-Ling HM, Martin J, Griffith J. Early gastric cancer: 46 patients treated in one surgical department. *Gut*, 1992; 33: 1318-1322
28. Charlton A, Blair V, Shaw D, Parry S, Guilford P i wsp. Hereditary diffuse gastric cancer: predominance of multiple foci of signet ring cell carcinoma in distal stomach and transitional zone. *Gut*, 2004; 53(6): 814-820
29. Kelsen DP. Adjuvant and neoadjuvant therapy for gastric cancer. *Semin Oncol*, 1996; 23: 379 – 389
30. Stachura J, Domagała W. Patologia znaczy słowo o chorobie. *Polska Akademia Umiejętności, Wydział Lekarski*, 2003; Tom I- Patologia Ogólna: 16-18, 179-212
31. Richards FM, McKee SA, Rajpar MH, Cole TR, Evans DG i wsp. Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum Mol Genetics*, 1999; 8 (4): 607-610
32. Palli D, Galli M, Caporoso NE, Cipriani F, Decarli A i wsp. Family history and risk of stomach cancer in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994; 3: 15-18
33. Guilford P, Hopkins J, Grady W. E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum Mutat*, 1999; 14: 249-255
34. Oliveira C, Bordin MC, Grehan N, Huntsman D, Suriano G. Screening E-Cadherin in Gastric Cancer Families Reveals Germline Mutations Only in Hereditary Diffuse Gastric Cancer Kindred. *Hum Mutat*, 2002; 19: 510-517
35. Oliviera C, de Bruin J, Nabais S, Ligtenberg M, Moutinho C. Intragenic deletion of CDH1 as the inactivating mechanism of wild-type allele in an HDGC tumour. *Oncogene*, 2004; 23(12): 2236-2240
36. Chun YS, Lindor NM, Smyrk TC et al. Germline E-cadherin mutations: Is prophylactic gastrectomy indicated? *Cancer*, 2001; 92: 181-187
37. Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR. Early gastric cancer in young asymptomatic carriers of germline E-cadherin mutations. *N Engl J Med*, 2001; 344: 1904-1909
38. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum*, 1991; 34; 424-425
39. Shinmura K, Kohno T, Takahashi M, Sasaki A, Ochiai A. Familial gastric cancer: clinicopathological characteristics, RER, phenotype and germline p53 and E-cadherin mutations. *Carcinogenesis*, 1999; 20(6): 1127-1131
40. Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, Yokota J, Wiesner GL i wsp. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J Med Genet*, 1999; 36: 873-880
41. Yabuta T, Shinmura K, Tani M, Yamaguchi S, Yoshimura K i wsp. E-cadherin gene variants in gastric cancer families whose probands are diagnosed with diffuse gastric cancer. *Int J Cancer*, 2002; 101: 434-441
42. Gawdis-Wojnarska B, Brzesko M, Fliciński J, Marlicz K, Starzyńska T, Scott RJ, Lubiński J. Nuclear pedigree criteria for the identification of individuals suspected to be at risk of an inherited predisposition to gastric cancer. *Hereditary Cancer Clin Pract*, 2004; 2(2): 65-68

43. Stadtlander CTK, Waterbow JW. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis*, 1999; 12, 2195-2208
44. Nishi M, Ichikawa H, Nakajima T. Gastric cancer - (Epidemiology of stomach cancer). Springer, 1993: 2-15
45. Correa P. A Human Model of Gastric Carcinogenesis. *Cancer Res*, 1988; 48: 3554-3560
46. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer-principles and practice of oncology*. Lippinott-Raven Publishers, 1997; 1, 1021-1054
47. Weisburger JH, Horn CL. Human and laboratory studies on the causes and prevention of gastrointestinal cancer. *Scand J Gastroenterol*, 1985; 104: 15-26
48. Fenoglio-Preiser CM, Lantz PE, Listrom MB, Davis M, Rilke FO. *Gastrointestinal pathology – an atlas and text*. Raven Press 1989, 193-223
49. Charnley G, Tannebaum SR. Flow cytometric analysis of the effect of sodium chloride on gastric cancer risk in the rat. *Cancer Res*, 1985; 45: 5608-5616
50. Kono S, Ikeda M, Ogata M. Salt and geographical mortality of gastric cancer and stroke in Jpn *J Epidemiol Commun Health*, 1983; 37:43-46
51. Mirvish SS. The etiology of gastric cancer. Intra-gastric nitrosamide formation and other theories. *J Natl Cancer Inst*, 1983; 71: 629-647
52. Cuello C, Correa P, Haenszel W. Gastric cancer in Columbia. Cancer risk and suspect environmental agents. *J Natl Cancer Inst*, 1976; 57: 1015-1020
53. Schlag P, Bockler R, Peter M. Nitrite and nitrosamines in gastric juice: risk factors for gastric cancer? *Scand J Gastroenterol*, 1982; 17: 145-150
54. Fuchs CS, Mayer RJ. Medical Progress: Gastric Carcinoma. *New Engl J Med*, 1995; 333(1): 32-41
55. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, 1983; 1: 1273-1275
56. Blaser MJ. Hypothesis: The Changing Relationships of *Helicobacter pylori* and Humans: Implications for Health and Disease. *J Infect Diseases*, 1999; 179: 1523-1530
57. Sipponen P. *Helicobacter pylori*: a cohort phenomenon. *Am J Surg Pathol*, 1995; 19, (Suppl. 1): 30-36
58. Edit S, Stolte M, Fischer R. *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol*, 1994; 47: 436-439
59. Hansson LE, Engstrand L, Nyren O. *Helicobacter pylori* infection: Independent risk indicator of gastric adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 1993; 105: 1098-1103
60. Kuniyasu H, Yasui W, Yokozaki H, Tahara E. *Helicobacter pylori* infection and carcinogenesis of the stomach. *Langenbeck's Arch Surg*, 2000; 385: 69-74
61. Jorgensen M, Daskalopoulos G, Warburton V, Mitchell HM, Hazell S. Multiple strain colonization and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*-infected patients: identification from sequential and multiple biopsy specimens. *J Infect Dis*, 1996; 174: 631-635
62. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing CagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*, 1995; 55: 2111-2115
63. Echoes. *H. pylori* may trigger cancers by switching off a tumor suppressor. *J Clin Pathol*, 2003; 56(11): 849-856
64. Nomura A, Grove JS, Sternmermann GN. A prospective study of stomach cancer and its relation to diet, cigarettes and alcohol consumption. *Cancer Res*, 1990; 50: 627-631
65. Locke FB, King H. Cancer mortality risk among Japanese in the United States. *J Nat Cancer Inst*, 1980; 65: 1149-1156
66. Tomlinson I, Sasieni P, Bodmer W. How Many Mutations in a Cancer? *Am J Pathol*, 2002; 160 (3): 755-758

67. Blok P, Craanen ME, Offerhaus GJA, Tytgat GNJ. Gastric carcinoma: clinical, pathogenic and molecular aspects. *Queensland J Med*, 1997; 90(12): 735-749
68. Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene*, 1994; 9: 29-32
69. Thomsen M, Jorgensen F, Brandsborg M, Gimsing P, Nielsen JL i wsp. Association of pernicious anaemia and intrinsic factor antibody with HLA-D. *Tissue Antigens*, 1981; 17: 97-103
70. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N i wsp. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*, 1998; 392(6674): 402-405
71. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*, 2001; 121: 1348-1353
72. Keller G, Vogelsang H, Becker I, Hutter J, Ott K i wsp. Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *Am J Pathol*, 1999; 155(2): 337-441
73. Humar B, Toro T, Graziano F, Muller H, Dobbie Z i wsp. Novel germline CDH1 mutations in hereditary diffuse gastric cancer families. *Hum Mutat*, 2002; (19): 518-525
74. Lynch HT, Smyrk TC. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): an updated review. *Cancer*, 1996; 78: 1149-1167
75. Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ, Blattner A, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW. A cancer family syndrome in twenty four kindreds. *Cancer Res*, 1988, 48; 5358-5362
76. Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM i wsp. Very High Risk of Cancer in Familial Peutz-Jeghers Syndrome. *Gastroenterology*, 2000; 119: 1447-1453
77. Jakubowska A, Nej K, Huzarski T, Scott RJ, Lubiński J. BRCA2 gene mutations in families with aggregations of breast and stomach cancer. *Br J Cancer*, 2002; 87 (8): 888-891
78. Jakubowska A, Scott R, Mankiszak J, Gronwald J, Byrski T i wsp. A high frequency of BRCA2 gene mutations in Polish families with ovarian and stomach cancer. *Eur J Hum Genet*, 2003; 11 (12): 955-958
79. World Health Organisation. 1994 World Health Statistics Annual. Geneva: WHO, 1995; B396-B407
80. Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y. Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma. *Am J Pathol*, 1991, 139; 469-474
81. Nakamura S, Ueki T, Yao T. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma with lymphoid stroma. Special reference to its detection by the polymerase chain reaction and in situ hybridization in 99 tumors, including a morphologic analysis. *Cancer*, 1994; 73: 2239-2249
82. Czopek J, Stojak M, Sinczak A, Popiela T, Kulig J et all. EBV- positive gastric carcinomas in Poland. *Pol J Pathol*, 2003; 54(2) : 121-126
83. Gad A. Carcinoma of the resected stomach. In: Ming SC, Precursors of gastric cancer. Philadelphia: Praeger, 1984; 287-313
84. Jędrychowski W, Boeing H, Wahrendorf J. Vodka consumption, tobacco smoking and risk of gastric cancer in Poland. *Int J Epidemiol*, 1993; 22: 606-613
85. Japanese Research Society for Gastric Cancer. The general rules for the gastric cancer study in surgery and pathology. *Jpn J Surg*, 1981; 11: 127-145
86. Carneiro F. Classification of gastric carcinomas. *Curr Diagn Pathol*, 1997; 4: 51-59
87. Carneiro F, Seixas M, Sobrinho-Simoes M. New elements for an updated classification of the carcinomas of the stomach. *Path Res Pract*, 1995; 191: 571-574
88. Lauren PA, Nevalainen TJ. Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. *Cancer*, 1993; 71: 2926-2933

89. Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. *Gut*, 1992; 33: 606-612
90. Dixon MF, Martin IG, Sue-Ling HM, Wyatt JI, Quirke P, Johnston D. Goseki grading in gastric cancer: comparison with existing systems of grading and its reproducibility. *Histopathology*, 1994; 25, 309-316
91. Ming Si-Chung. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer*, 1977, 39, 2475-85
92. Domagała W, Kołodziej B. SNH – A new prognostic clinico-pathological classification of gastric carcinoma. *Pol J Pathol*, 2004; 55 (2): 12
93. Mulligan RM. Histogenesis and biologic behavior of gastric carcinoma. *Pathol Annu*, 1972, 7, 349-415
94. Kubo T, Scie DM. Histologic appearance of gastric carcinoma in high and low mortality countries: comparison between Kyushu, Japan and Minnesota, USA. *Cancer*, 1971, 28, 726-734
95. Jass J. Role of intestinal metaplasia in the histogenesis of gastric carcinoma. *J Clin Pathol*, 1980, 33, 801-810
96. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*, Mosby; 1999; 14.1-14.9
97. Wijnhoven BPL, Dinjens WNM, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer (Review). *Br J Surg*, 2000; 87(8), 992-1005
98. Ilyas M, Tomlinson IPM. The interactions of APC, E-cadherin and β -catenin in tumour development and progression – review article. *J Pathol*, 1997; 182: 128-137
99. Wijnhoven BPL, Pignatelli M, Massimo. E-cadherin-catenin: more than a “sticky” molecular complex. *Lancet*, 1999; 354(9176), 356-357
100. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 1991; 251; 1451-1455
101. Daniel JM, Reynolds AB. The tyrosine kinase substrate p210cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin. *Mol Cell Biol*, 1995; 15: 4819-4824
102. Pignatelli M, Vessey CJ. Adhesion molecules: novel molecular tools in tumor pathology. *Hum Pathol*, 1994; 25: 849-856
103. Dogan A, Wang ZD, Spencer J. E-cadherin expression in intestinal epithelium. *J Clin Pathol*, 1995; 48: 143-146
104. Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer*, 1996; 77 (8): 1605-1613
105. Kremer M, Quintanilla-Martinez L, Fuchs M, Gamboa-Dominguez A, Haye S i wsp. Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on tumorigenicity and metastasis. *Carcinogenesis*, 2003; 24(12): 1879-1886
106. van Aken E, de Wever O, Correia de Rocha AS, Mareel M. Defective E-cadherin /catenin complex in human cancer. *Virchows Arch*, 2002; 439: 725-751
107. Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and Catenin Alterations in Human Cancer. Review article. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2002; 34: 255-268
108. Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Elsevier Science*, 1999; 24: 73-76
109. Vermeulen SJ, Bruyneel EA, Bracke ME, De Bruyne GK, Vennekens KM i wsp. Transition from the noninvasive to the invasive phenotype and loss of α -catenin in human colon cancer cells. *Cancer Res*, 1995; 55: 4722-4728
110. Leckband D, Sivasankar S. Mechanism of homophilic cadherin adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 2000; 12 (5): 587-592

111. Tucker EL, Pignatelli M. Catenins and their associated proteins in colorectal cancer. *Histol Histopathol*, 2000; 15: 251-60
112. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarada H i wsp. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res*, 1994; 54(14): 3845-3852
113. Jawhari AU, Noda M, Farthing MJG, Pignatelli M. Abnormal expression and function of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma cell lines. *Br J Cancer*, 1999; 80(3/4): 322-330
114. Tetsu O, McCormick F. Beta – catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 1999; 398: 422-426
115. Mayer B, Johnson JP, Leitl F, Jauch KW, Heiss MM et al. E-Cadherin Expression in Primary and Metastatic Gastric Cancer: Down-Regulation Correlates with Cellular Dedifferentiation and Glandular Disintegration. *Cancer Res*, 1993; 53: 1690-1695
116. Tamura G, Sato K, Akiyama S, Tsuchiya T, Endoh Y i wsp. Molecular Characterization of Undifferentiated-Type Gastric Carcinoma. *Lab Inv*, 2001; 81(4): 593-598
117. Wang CX, Chen J, Yang Z, Song W, Du ZL. Correlation of E-cadherin beta-catenin and gamma-catenin gene expression with the invasion and metastasis of gastric carcinoma. *Di Yi Junyi Daxue Xuebao*, 2003; 23 (11): 1198-1201 (praca chińska - abstrakt po angielsku dostępny w internetowej bazie danych OMIM)
118. Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Bex G i wsp. E-cadherin gene (CDH1) promotor methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene*, 2001; 20: 1525-1528
119. Jawhari A, Jordan S, Poole S, Browne P, Pignatelli M i wsp. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. *Gastroenterology*, 1997; 112: 46-54
120. Bex G, Becker KF, Hofler H, van Roy F. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat*, 1998; 12(4): 226-237
121. Bukholm IK, Nesland JM, Karesen R, Jacobsen U, Borresen-Dale AL. E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenin protein expression in relation to metastasis in human breast carcinoma. *J Pathol*, 1998; 185: 262-266
122. St Croix B, Sheehan C, Rak JW, Florenes VA, Slingerland JM i wsp. E-cadherin dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *J Cell Biol*, 1998; 142: 557-571
123. Scartozzi M, Galizia E, Freddari F, Berardi R, Cellerino R, Cascinu S. Molecular biology of sporadic gastric cancer: prognostic indicators and novel therapeutic approaches. *Cancer Treatment Rev*, Elsevier Ltd, 2004; 30: 451-459
124. Brabletz T, Jung A, Kirchner T. Beta – catenin and the morphogenesis of colorectal cancer. *Virchows Arch*, 2002; 441: 1-11
125. Humar B, Graziano F, Cascinu S. Association of CDH1 haplotypes with susceptibility to sporadic diffuse gastric cancer. *Oncogene*, 2002; 21: 8192 – 8195
126. Saaristo A, Karpanen T, Alitalo K. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene*, 2000; 19: 6122-6129
127. Holash J, Weigand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: Dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietin and VEGF. *Oncogene*, 1999; 18: 5356-5362
128. Kakeji Y, Maehara Y, Sumiyoshi Y, Oda S, Emi Y. Angiogenesis as a target for gastric cancer. *Surgery*, 2002; 131: S48-S54
129. Nagyl JA, Brown LF, Senger DR. Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochem Biophys Acta*, 1989; 948: 305-326
130. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ i wsp. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol*, 1992; 23 (7) 755-761

131. Maeda BK, Chung Y, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T i wsp. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol*, 1995; 13 (2): 477-481
132. Cameron IC, Hetherington C, Landers RJ, Brown NJ, Reed MWR. Does microvessel density provide prognostic information after potentially curative resection of gastric cancer? *Br J Surg*, 2000; 87 (1): 11-19
133. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, 1997; 3(8): 917-922
134. Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Am Inc*, 2000; 7 (7): 602-608
135. Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Mueller W i wsp. Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *Br J Cancer*, 2002; 86: 737-743
136. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N i wsp. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases and anticancer drugs. *Cancer Res*, 1998; 58: 5315-5320
137. Yu J, Leung W, Ebert M, Ng E, Go M i wsp. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *Br J Cancer*, 2002; 87: 91-97
138. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J i wsp. Developmentally regulated expression of novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol*, 1998; 152: 43-49
139. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-delta Ex3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res*, 1999; 59: 6097-6102
140. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p-53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res*, 1998; 58: 1808-1812
141. Lee HS, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kim WH. Tumour suppressor gene expression correlates with gastric cancer prognosis. *J Pathol*, 2003; 200: 39-46
142. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. *AJCC (American Joint Committee on Cancer) - Cancer Staging Manual*. Springer, 2002: 99-106
143. Białas M, Okoń K, Czopek J. Assessing microvessel density in gastric carcinoma: a comparison of three markers. *Pol J Pathol*, 2003, 54(4); 249-252
144. AnalySIS Imaging C. *Soft-Imaging Software GmbH*. Munster, Germany, 1996
145. Weidner N, Semple JR, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*, 1991; 324: 1-8
146. Prall F, Gringmuth U, Nizze H, Barten M. Microvessel densities and microvascular architecture in colorectal carcinomas and their liver metastases: significant correlation of high microvessel densities with better survival. *Histopathology*, 2003; 42: 482-491
147. QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook, QIAGEN, 2001; 33-36
148. Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N, Highsmith WE Jr. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Review. Electrophoresis*, 1999, 20(6): 1177-1185
149. Yu J, Ebert MPA, Miehlke S, Rost H, Lendeckel U i wsp. α -catenin expression is decreased in human gastric cancers and in the gastric mucosa of first degree relatives. *Gut*, 2000; 46 (5): 639-644
150. Shepherd T, Tolbert D, Benedetti J, Macdonald J, Stemmermann G i wsp. Alterations in exon 4 of the p-53 gene in gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 2000; 118: 1039-1044
151. Endoh Y, Sakata K, Tamura G, Ohmura K, Ajioka Y i wsp. Cellular phenotypes of differentiated-type adenocarcinomas and precancerous lesions of the stomach are dependent on the genetic pathways. *J Pathol*, 2000; 191: 257-263, Author's reply 467-468

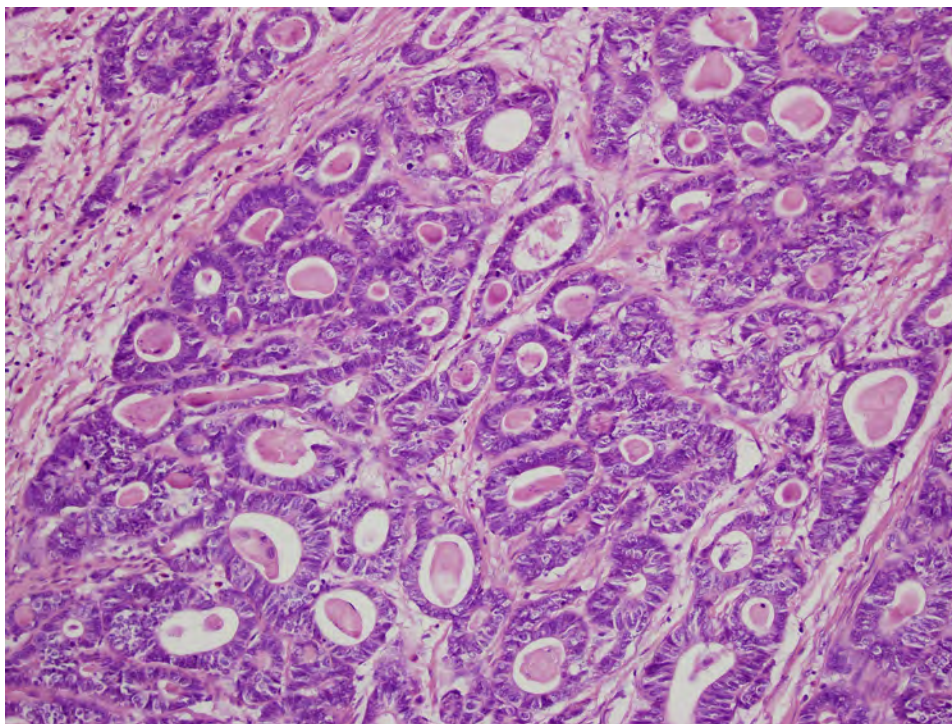
152. Muta H, Noguchi M, Kanai Y, Ochiai A, Nawata H i wsp. E-Cadherin Gene Mutations in Signet Ring Cell Carcinoma of the Stomach. *Jpn J Cancer Res*, 1999; 87: 843-848
153. Tamura G, Sakata K, Nishizuka S, Maesawa C, Suzuki Y i wsp. Inactivation of the E-Cadherin Gene in Primary Gastric Carcinomas and Gastric Carcinoma Cell Lines. *Jpn J Cancer Res*, 1996; 87: 1153-1159
154. Białas M. Association of E-cadherin gene mutations with histological features of gastric carcinoma. *Pol J Pathol*, 2004; 55 (2): 5
155. Slavotinek AM, Stone EM, Mykityn k, Heckenlively JR, Green JS. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nature Genetics*, 2000; 26: 16-17
156. Knudson A. Alfred Knudson and his two-hit hypothesis (interviewed by E. Hutchinson). *Lancet Oncol*, 2001; 2(10): 642-645
157. Kim HC, Wheeler JMD, Kim JC, Ilyas M, Beck NE i wsp. The E-cadherin gene (CDH1) variants T340A and L599V in gastric and colorectal cancer patients in Korea. *Gut*, 2000; 47(2):262-267
158. Bresciani C, Perez RO, Gama-Rodrigues J. Familial gastric cancer. *Arquivos Gastroenterologia*, 2003; 40(2): 114-117
159. Becker KF, Kremmer E, Eulitz M, Becker I, Handschuh G. Analysis of E-cadherin in Diffuse-Type Gastric Cancer Using a Mutation-Specific Monoclonal Antibody. *Am J Pathol*, 1999; 155: 1803-1809
160. Becker KF, Reich U, Schott C, Becker I, Berx G i wsp. Identification of eleven novel tumor-associated E-cadherin mutations. *Hum Mutat*, 1998; 13: 171- 180
161. Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91: 8263- 8267
162. Riethmacher D, Brinkmann V, Birchmeier C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92: 855-859
163. Ross J. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev*, 1995; 59: 423-450
164. Lehr HA, Folpe A, Yaziji H. Cytokeratin 8 immunostaining pattern and E-cadherin expression distinguish lobular from ductal breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 2000; 114: 190-196
165. Hirohashi S. Inactivation of the E-Cadherin-Mediated Cell Adhesion System in Human Cancers. *Am J Pathol*, 1998; 153 (2): 333-339
166. El-Bahrawy MA, Poulson R, Jeffery R, Talbot I, Alison MR. The expression of E-cadherin and catenins in sporadic colorectal carcinoma. *Hum Pathol*, 2001; 32(11): 1216-1224
167. Chu PG, Weiss LM. Immunohistochemical Characterization of Signet-Ring Cell Carcinoma of the Stomach, Breast and Colon. *Am J Clin Pathol*, 2004; 121: 884-892
168. Hugh TJ, Dillon SA, Taylor BA, Pignatelli M, Poston GJ. Cadherin-catenin expression in primary colorectal cancer: a survival analysis. *Br J Cancer*, 1999; 80: 1046-1051
169. Richmond PJ, Karayiannakis AJ, Nagafuchi A, Kaisary AV, Pignatelli M. Aberrant E-cadherin and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. *Cancer Res*, 1997; 57: 3189-3193
170. Strathdee G. Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol*, 2002; 12: 373-379
171. Zhou YN, Xu CP, Han B. Expression of E-cadherin and β -catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patients survival. *World J Gastroenterol*, 2002; 8: 987-993
172. Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T i wsp. E-cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst*, 2000; 92(7): 569-573

173. Oda T, Kanai Y, Oyama T, Yoshiura K, Shimoyama Y i wsp. E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91: 1958-1962
174. Gofuku J, Shiozaki H, Tsujinaka T, Inoue M, Tamura S i wsp. Expression of E-cadherin and alpha-catenin in patients with colorectal carcinoma. Correlation with cancer invasion and metastasis. *Am J Clin Pathol*, 1999; 111(1): 29-37
175. Schuhmacher Ch, Becker I, Oswald S, Atkinson MJ, Nekarda H. Loss of immunohistochemical E-cadherin expression in colon cancer is not due to structural gene alterations. *Virchows Arch*, 1999; 434: 489-495
176. Chew-Wun W, Chin-Wen C, Wen-chang L. Gastric cancer: prognostic and diagnostic advances. *Expert Reviews in Molecular Medicine – Cambridge University Press*, 2002, 1-12, (short code: txt001wlt)
177. Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer*, 1992; 50: 859-862
178. Starzynska T, Markiewski M, Domagała W, Marlicz K, Mietkiewski J i wsp. The Clinical Significance of p-53 Accumulation in Gastric Cancer. *Cancer*, 1996; 77(10): 2005-2012
179. Maehara Y. Prognostic value of p-53 protein expression for patients with gastric cancer – a multivariate analysis. *Br J Cancer*, 1999; 79: 1255-1261
180. Cascinu S, Graziano F, Del Ferro E. Expression of p53 protein and resistance to preoperative chemotherapy in gastric cancer. *Cancer*, 1998; 83: 1917 – 1922
181. Gabbert HE, Mueller W, Schneiders A, Meier S, Hommel G. The relationship of p-53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. *Cancer*, 1995; 76 (5): 720-726
182. Bataille F, Ruemmele P, Dietmaier W, Gaag D, Klebl F i wsp. Alterations in p-53 predict response to preoperative high dose chemotherapy in patients with gastric cancer. *Br Med J*, 2003; 56 (5): 286-292
183. Ruge M, Shiao YH, Busatto G, Cassaro M, Strobbe C i wsp. The p-53 gene in patients under the age of 40 with gastric cancer: mutation rates are low but are associated with a cardiac location. *Br Med J*, 2000; 53(4): 207-210
184. Sarela AI, Scott N, Ramsdale J, Markham AF, Guillou PJ. Immunohistochemical detection of anti-apoptosis protein, Survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol*, 2001; 8 (4): 305-310
185. Keitaro T, Shinji I, Goki G, Takehiro N, Mitsuhiko I, Nobuhiko T. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2000; 6: 127-134
186. Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RN, Altieri DC. Antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med*, 1999; 341: 452-453
187. Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C i wsp. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Letters*, 2001; 163: 109-116
188. Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T i wsp. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer*, 2001; 11 (91): 2026-2032
189. Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer*, 1993; 55: 371-374
190. Chen CN, Cheng YM, Lin MT, Hsieh FJ, Lee PO i wsp. Association of Color Doppler Vascularity Index and Microvessel Density With Survival in Patients with Gastric Cancer. *Ann Surg*, 2002; 235(4): 512-518
191. Takebayashi Y, Aklyama S, Yamada K, Akiba S, Aikou T. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer*, 1996; 78: 226-231

192. Pavlopoulos PM, Konstantinidou AE, Agapitos E, Kavantzas N, Nikolopoulou P i wsp. A morphometric study of neovascularization in colorectal carcinoma. *Cancer*, 1998; 83: 2067-2075
193. Stachura J, Bardadin K, Chosia M, Danilewicz M, Górzyńska E i wsp. Organizacja i wyposażenie pracowni patomorfologicznej oraz zasady postępowania z materiałami do badań histopatologicznych i cytologicznych. *Pol J Pathol*, 1999; 50 (4, supl.2), 22-23

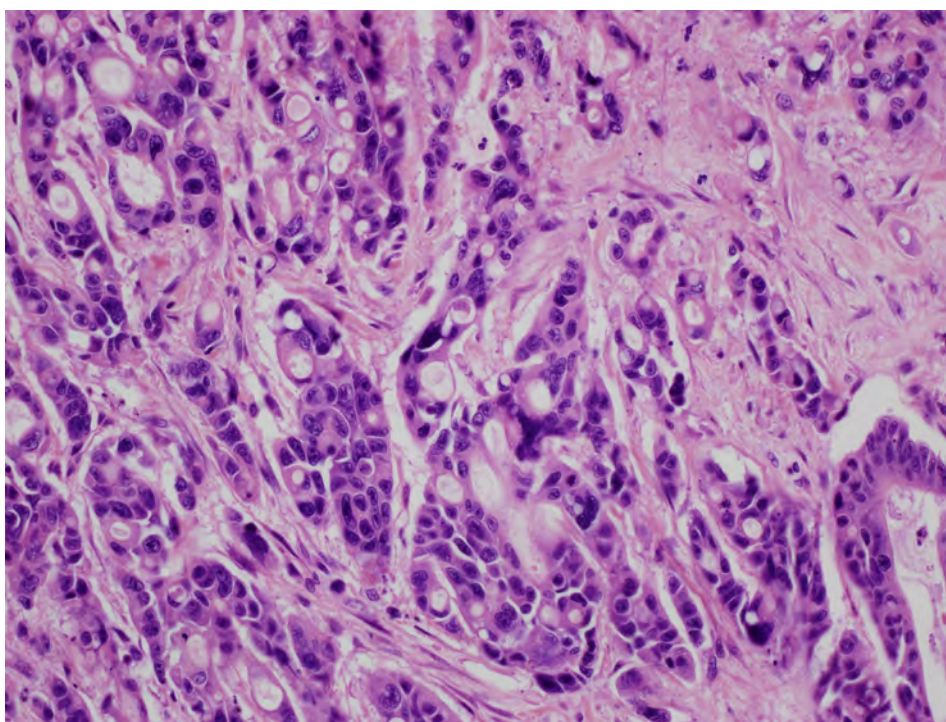
IX. Zdjęcia

zdj. nr 1



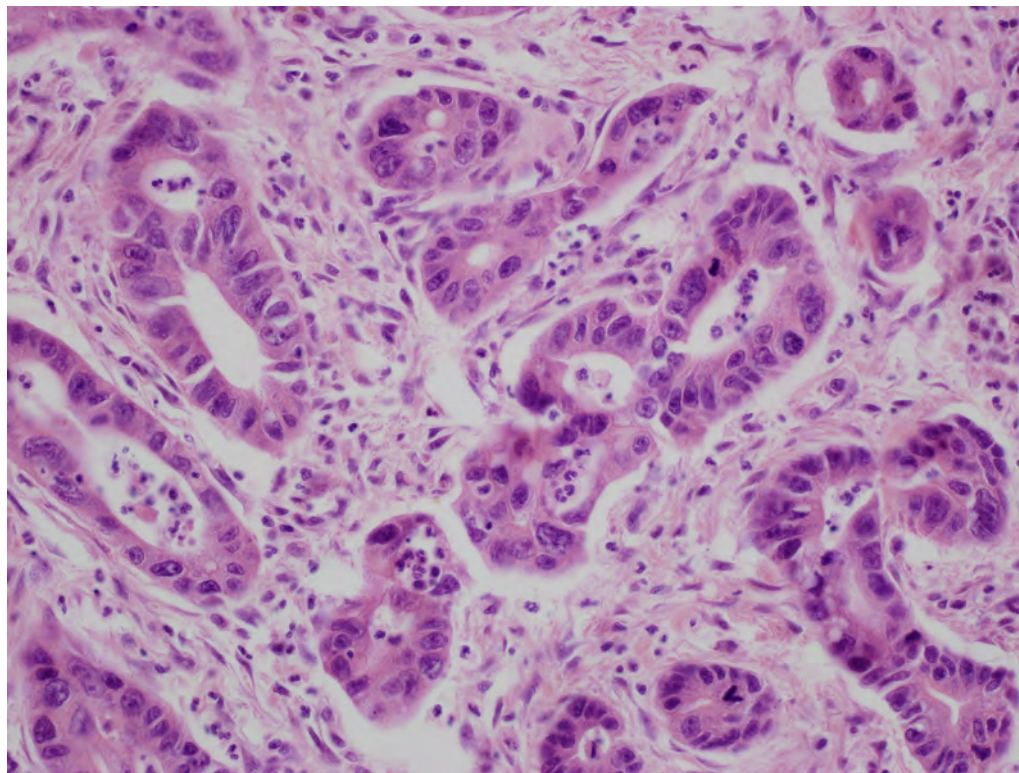
Naciek raka typu jelitowego wg Laurena, z widocznym wyraźnym tworzeniem regularnych cewek gruczołowych, o wysokim stopniu zróżnicowania (G1). W obrębie nacieku raka nie stwierdzono występowania komórek zapalnych.
Nr histologiczny preparatu: 1341865, barwienie H-E, pow. 20x

zdj. nr 2



Naciek raka typu jelitowego wg Laurena, z widocznym tworzeniem nieregularnych cewek gruczołowych. Rak o pośrednim stopniu zróżnicowania (G2). W obrębie nacieku raka nie stwierdzono występowania komórek zapalnych.
Nr histologiczny preparatu: 1363260, barwienie H-E, pow. 40x

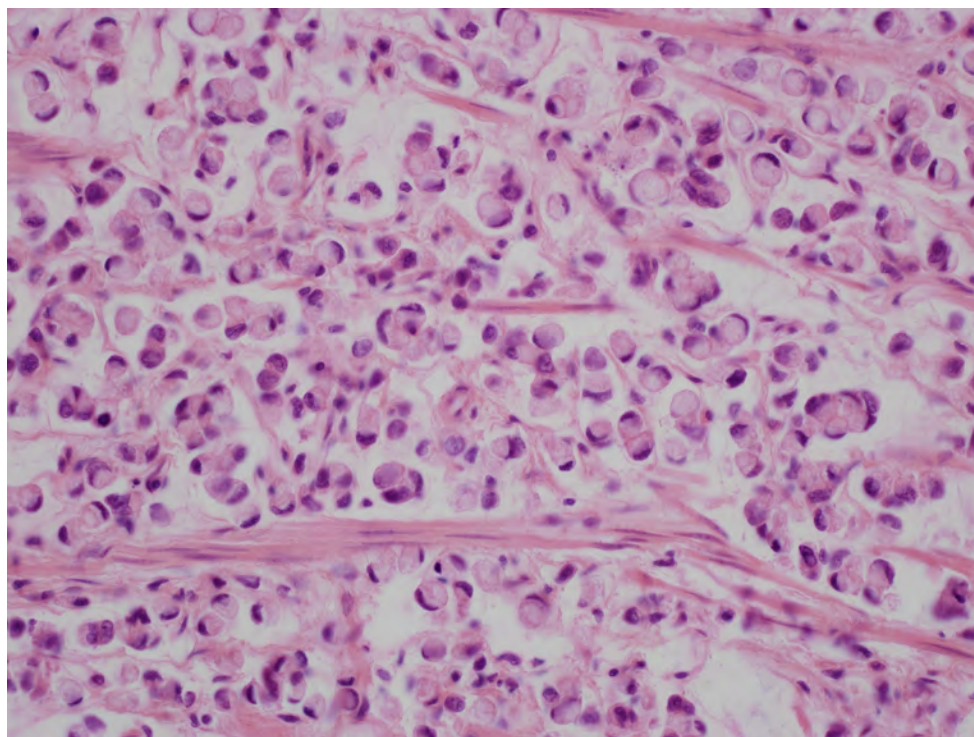
zdj. nr 3



Naciek raka typu jelitowego wg Laurena. Widoczne wyraźne, lecz nieregularne cewy gruczołowe zbudowane z komórek o znacznym polimorfizmie komórkowym i jądrowym. Liczne mitozy, w tym także nieprawidłowe.

Nr histologiczny preparatu: 1341865, barwienie H-E, pow. 40x

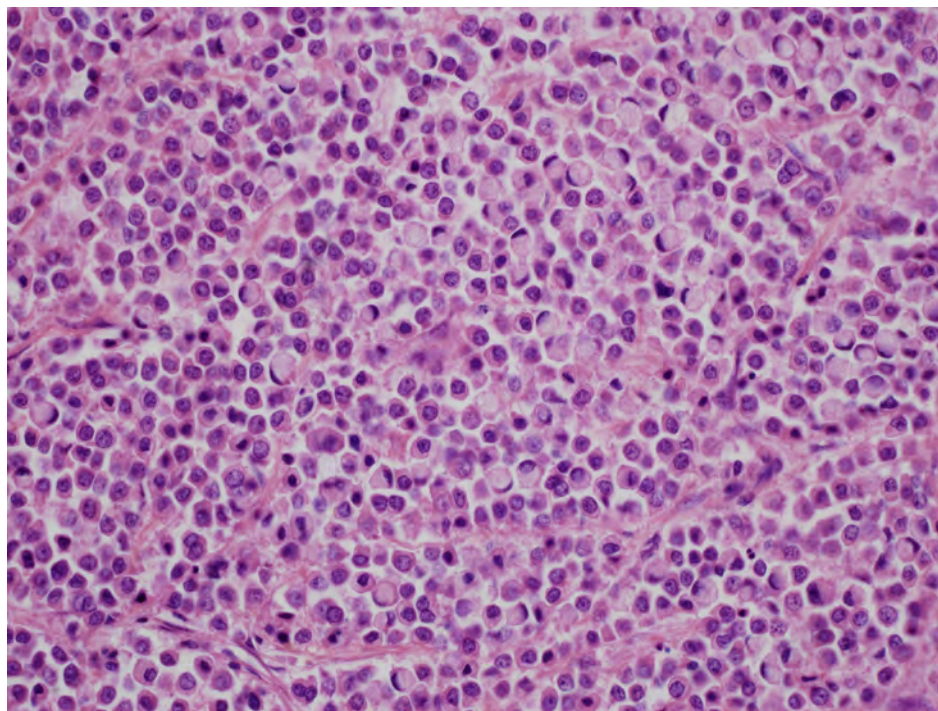
zdj. nr 4



Naciek raka typu rozlanego wg Laurena. Widoczne pojedynczo leżące komórki, w tym liczne komórki sygnetowate, które nie tworzą cew gruczołowych. Rak o niskim stopniu zróżnicowania (G3). W obrębie nacieku raka nie stwierdzono komórek zapalnych.

Nr histologiczny preparatu: 1381344, barwienie H-E, pow. 40x

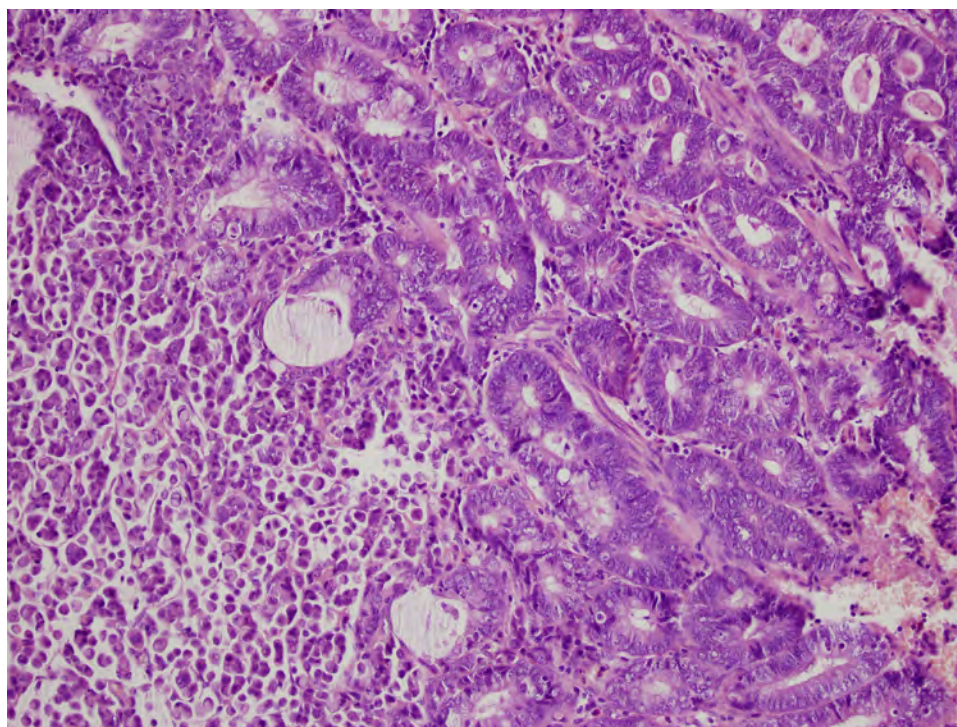
zdj. nr 5



Naciek raka typu rozlanego wg Laurena. Widoczne małe komórki o podobnych rozmiarach, które nie tworzą cew gruczołowych. Liczne komórki sygnetowate. Rak o niskim stopniu zróżnicowania (G3). W obrębie nacieku raka nie stwierdzono obecności komórek zapalnych.

Nr histologiczny preparatu: 1344083, barwienie H-E, pow. 40x

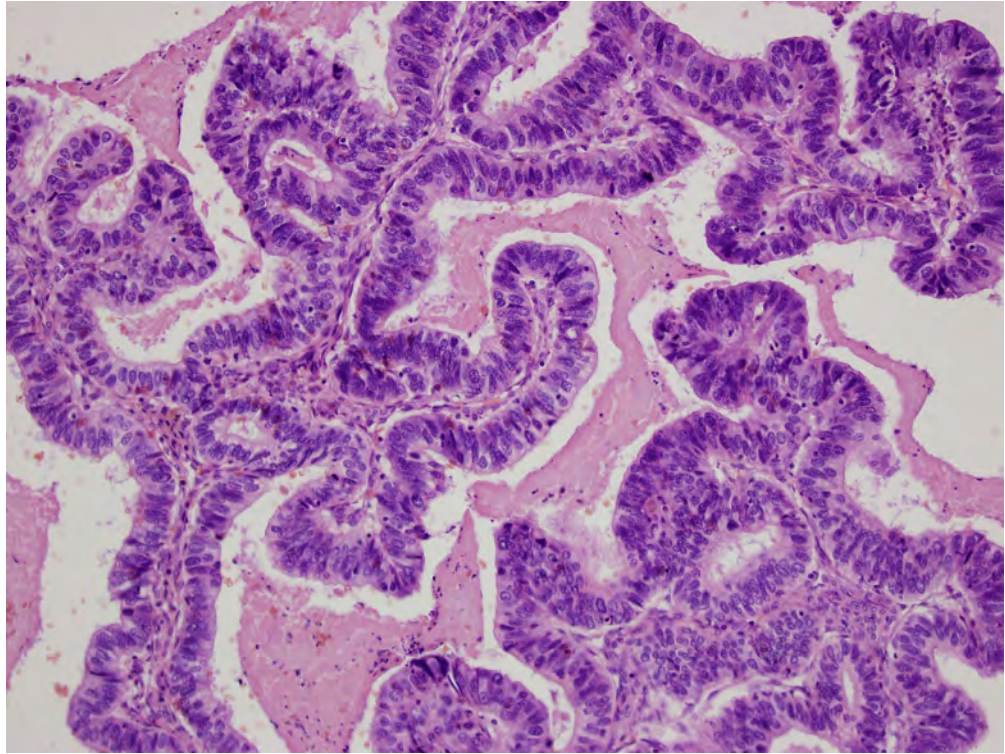
zdj. nr 6



Naciek raka typu mieszanego wg Laurena: po prawej stronie komponenta jelitowa z widocznymi nielicznymi komórkami nacieku zapalnego, po lewej rak typu rozlanego, bez obecności w utkaniu komórek zapalnych.

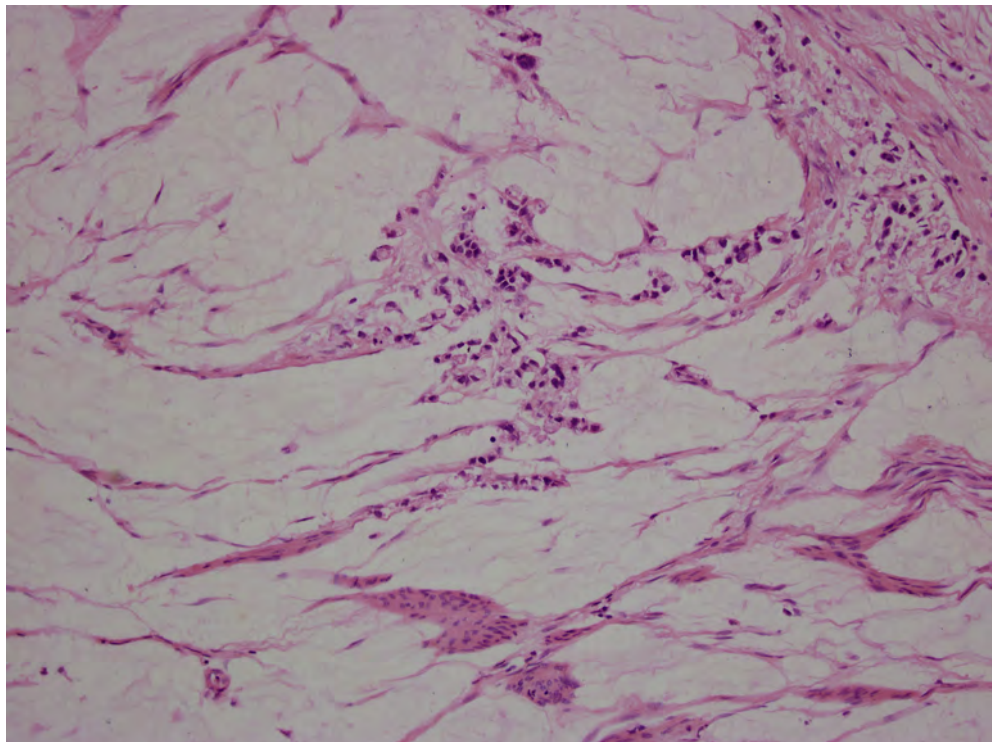
Nr histologiczny preparatu: 1442596, barwienie H-E, pow. 20x

zdj. nr 7



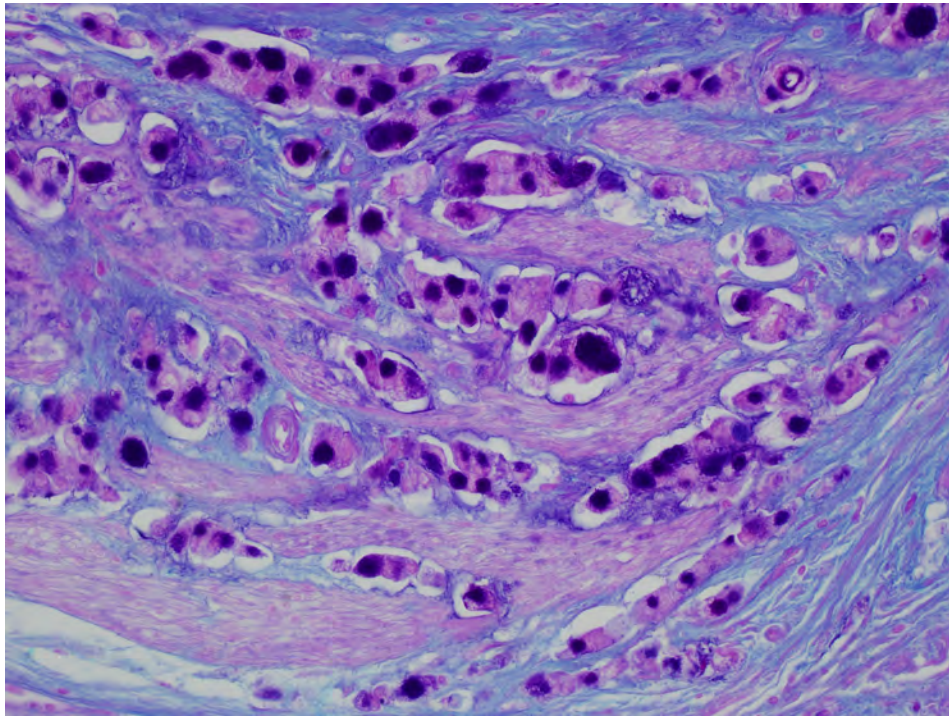
Rak typu brodawkowatego wg podziału WHO - widoczne wyraźne układy brodawkowate z centralnie położonym rdzeniem włóknisto-naczyniowym. Rak o wysokim stopniu zróżnicowania (G1), bez obecności komórek zapalnych. Nr histologiczny preparatu: 1403560, barwienie H-E, pow. 20x

zdj. nr 8



Rak typu śluzowego wg podziału WHO: widoczne rozległe „jeziorka” śluzowe, a w nich zawieszono grupy komórek raka. W obrębie nacieku raka nie stwierdzono występowania komórek zapalnych. Nr histologiczny preparatu: 1363459, barwienie H-E, pow. 10x

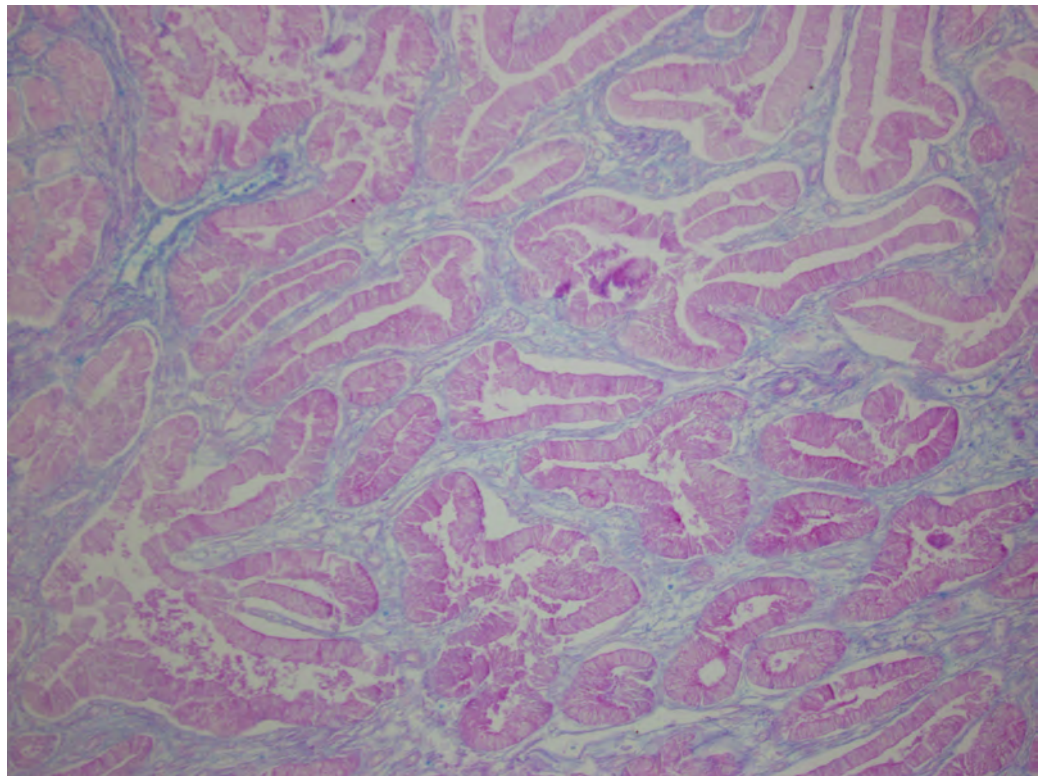
zdj. nr 9



Naciek raka typu rozlanego wg Laurena. Widoczne grupy komórek i pojedyncze komórki, a w ich cytoplazmie obfity śluz w większości w postaci pojedynczej kropli („kleks”). Wg Goseki typ IV.

Nr histologiczny preparatu: 1381134, barwienie: Alcjan-Pas, pow. 40x

zdj. nr 10

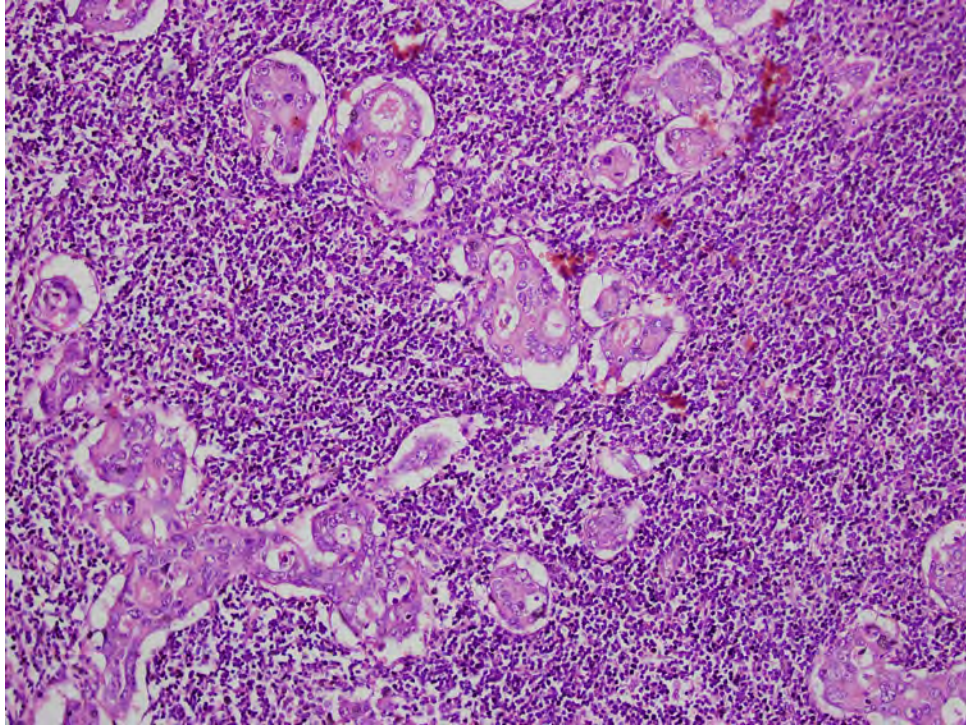


Naciek raka typu jelitowego wg Laurena , z widocznym tworzeniem nieregularnych cewek gruczołowych. W cytoplazmie komórek nie stwierdzono obecności śluzu.

Wg Goseki typ I.

Nr histologiczny preparatu: 1401595, barwienie: Alcjan-Pas, pow. 10x

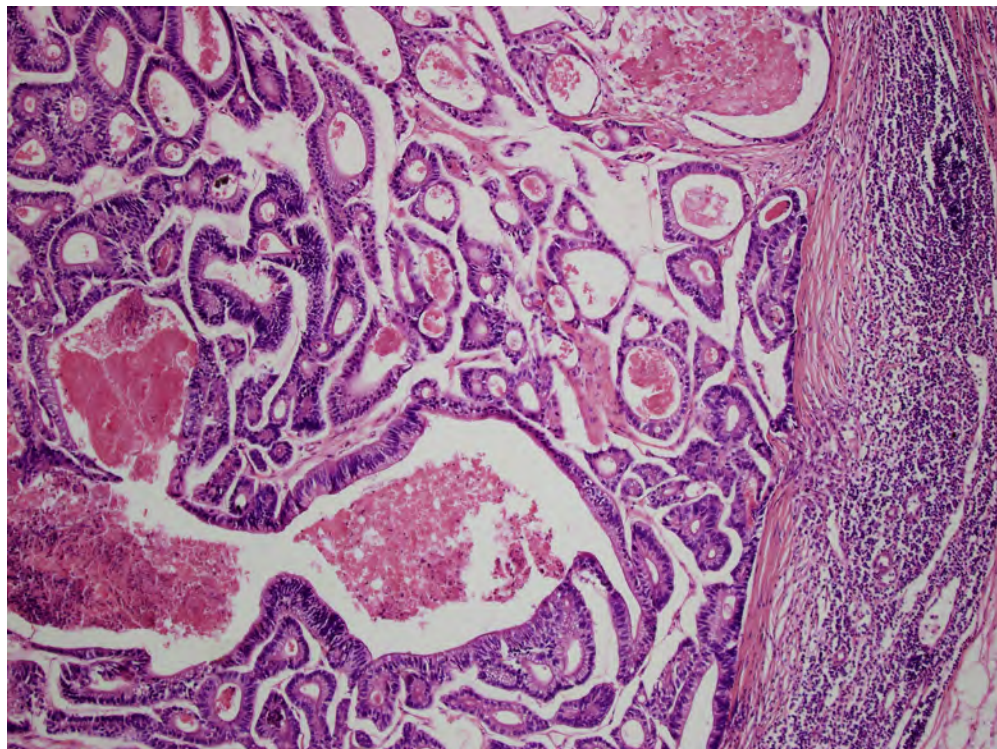
zdj. nr 11



Węzeł chłonny z przerzutem raka żołądka, w przetrzucie rak typu jelitowego wg Laurena (wg WHO: rak typu cewkowego).

Nr histologiczny preparatu: 1392717, barwienie H-E, pow. 20x

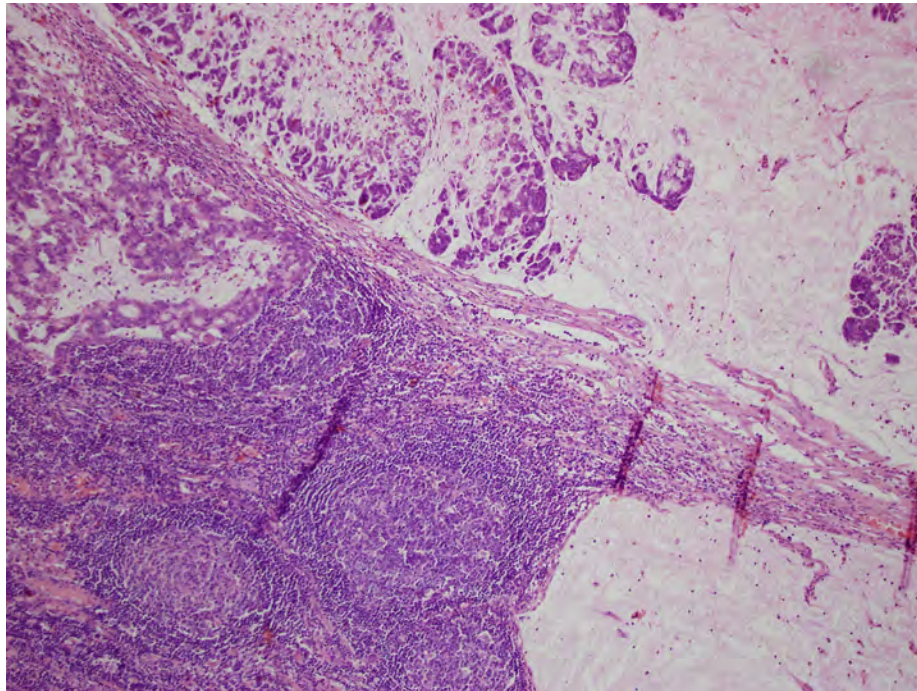
zdj. nr 12



Węzeł chłonny z przerzutem raka żołądka, w przetrzucie rak typu jelitowego wg Laurena (wg WHO: rak typu cewkowego).

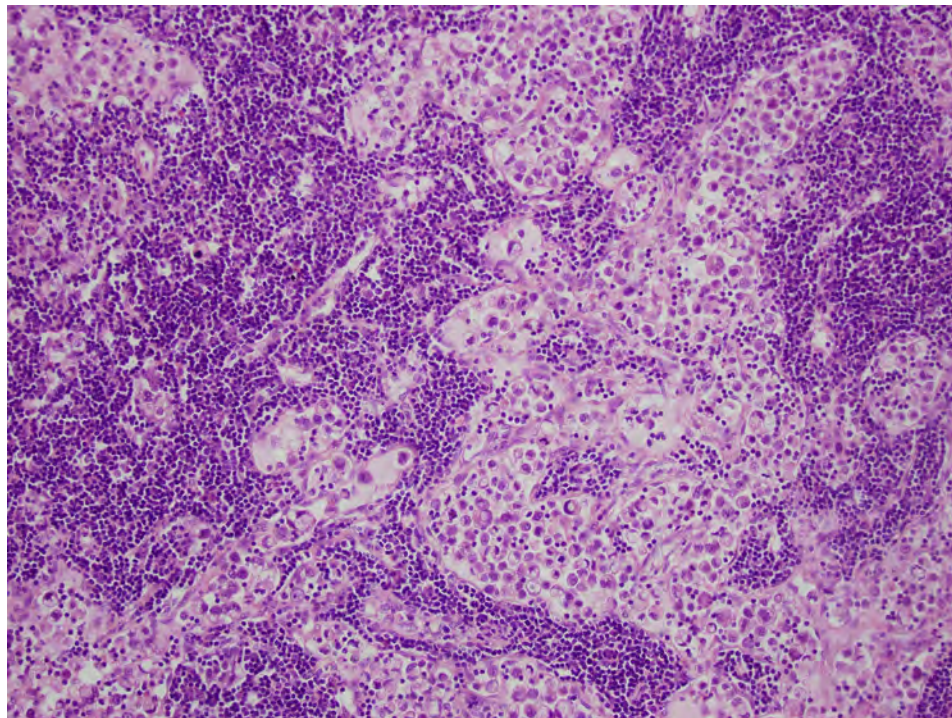
Nr histologiczny preparatu: 1363781, barwienie H-E, pow. 10x

zdj. nr 13



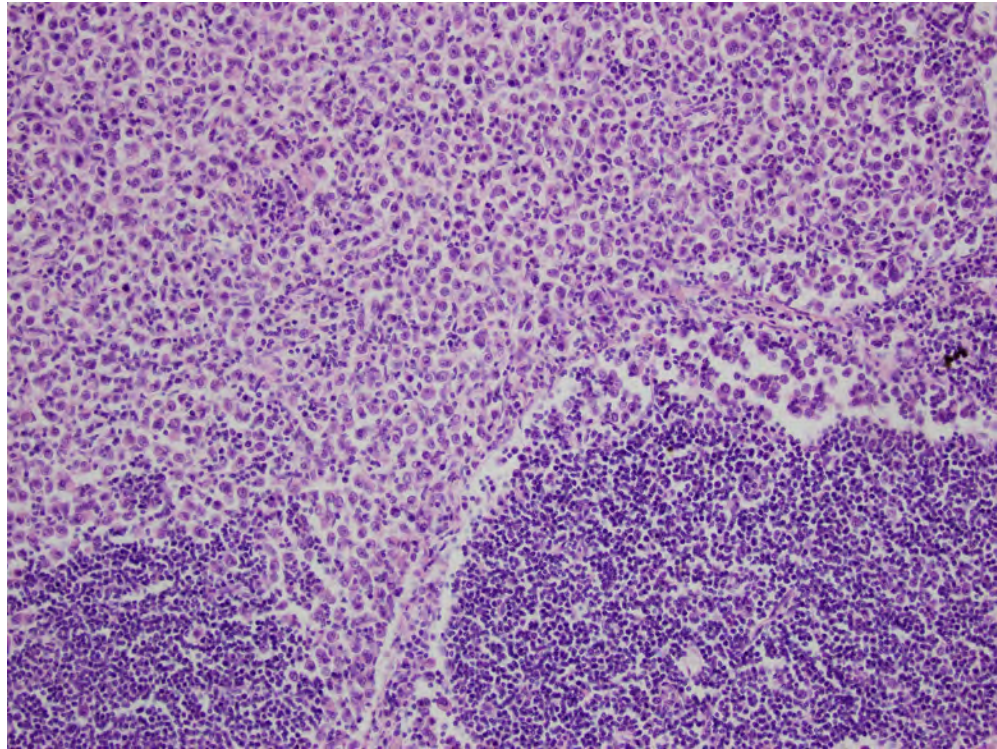
Węzeł chłonny z widocznym przerzutem raka żołądka, w przekroju rak typu śluzowego.
Nr histologiczny preparatu: 1407203, barwienie H-E, pow. 10x

zdj. nr 14



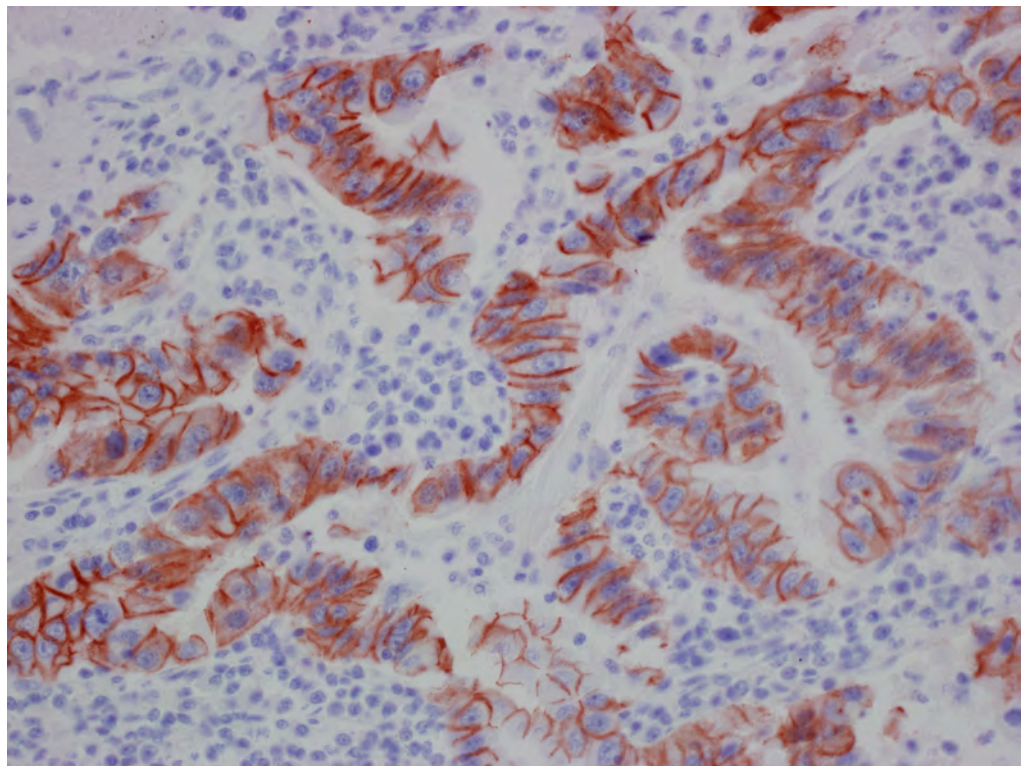
Węzeł chłonny z widocznym przerzutem raka żołądka, w przekroju rak typu rozlanego wg Laurena, (wg WHO: rak sygnetowatokomórkowy).
Nr histologiczny preparatu: 1421339, barwienie H-E, pow. 20x

zdj. nr 15



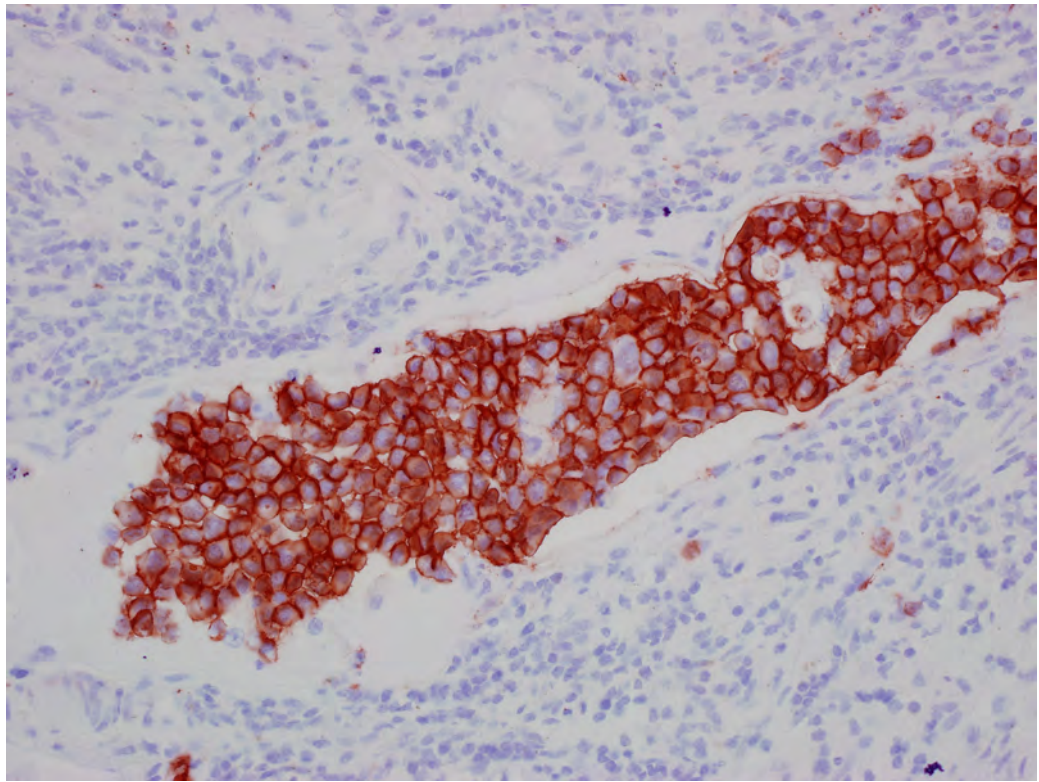
Węzeł chłonny z widocznym przerzutem raka żołądka, w przekroju rak o budowie litej.
Nr histologiczny preparatu: 1402020, barwienie H-E, pow. 20x

zdj. nr 16



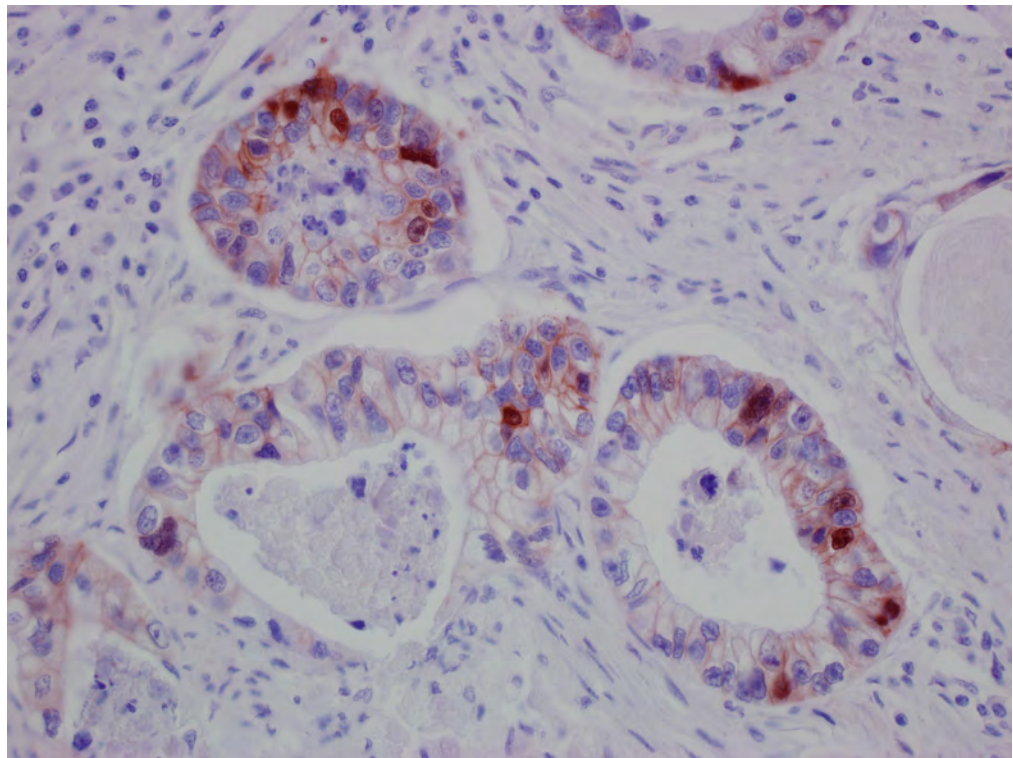
Naciek raka typu jelitowego wg Laurena tworzącego nieregularne cewki gruczołowe.
Widoczny silny, błonowy odczyn w kierunku E-kadheryny obecny we wszystkich
komórkach nowotworowych. Siła odczynu porównywalna z odczynem stwierdzonym w
komórkach prawidłowej błony śluzowej żołądka.
Nr histologiczny preparatu: 1401595, odczyn w kierunku E-kadheryny, pow. 40x

zdj. nr 17



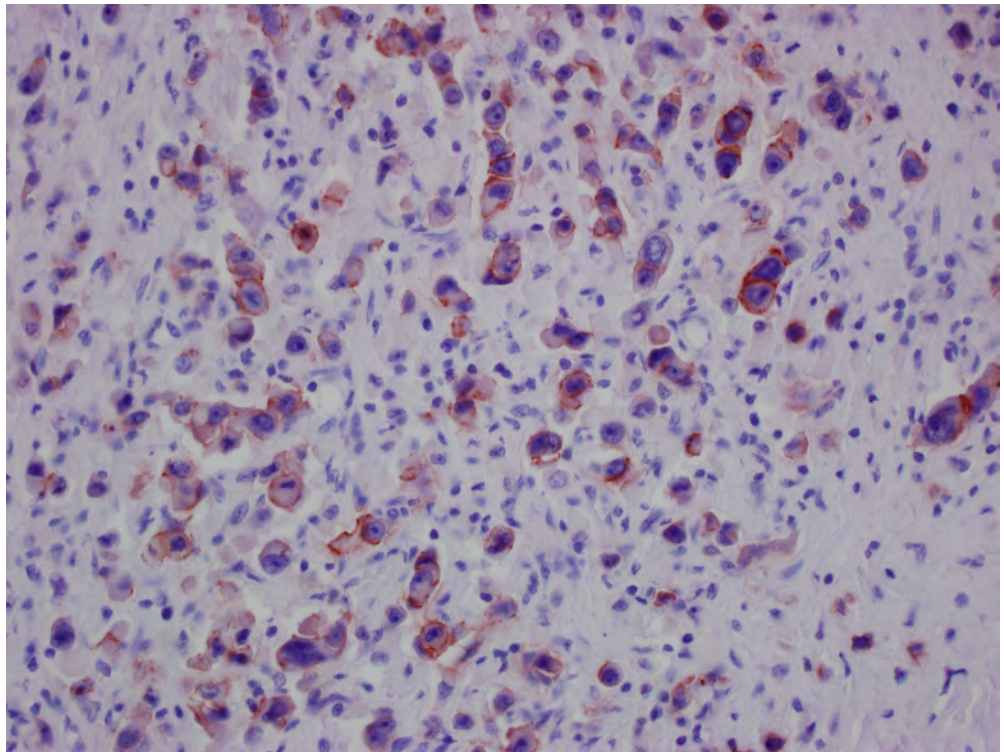
W naczyniu krwionośnym w ścianie żołądka widoczny jest zator z komórek nowotworowych. Wszystkie komórki raka żołądka wykazują silny, błonowy odczyn w kierunku β -kateniny o sile porównywalnej z odczynem stwierdzonym w komórkach prawidłowej błony śluzowej żołądka.
Nr histologiczny preparatu: 1422381, odczyn w kierunku β -kateniny, pow. 40x

zdj. nr 18



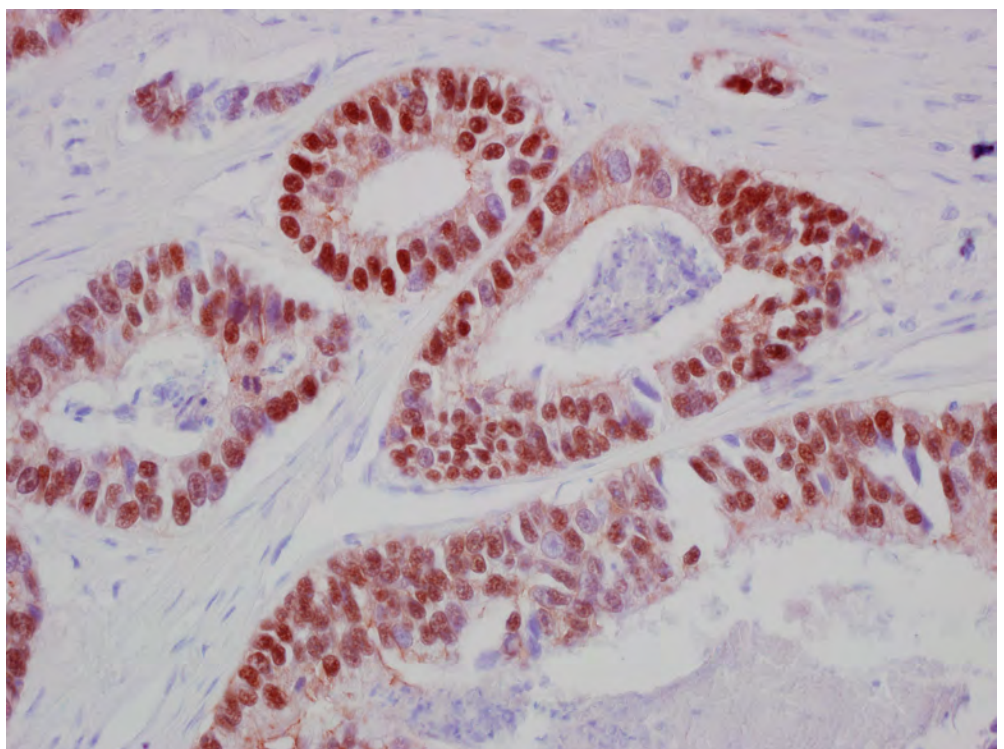
Naciek raka typu jelitowego wg Laurena.
Komórki raka wykazują osłabiony odczyn błonowy obecny w około 50% komórek oraz silny odczyn jądrowy obecny w około 10% komórek raka.
Nr histologiczny preparatu: 1341793, odczyn w kierunku β -kateniny, pow. 40x

zdj. nr 19



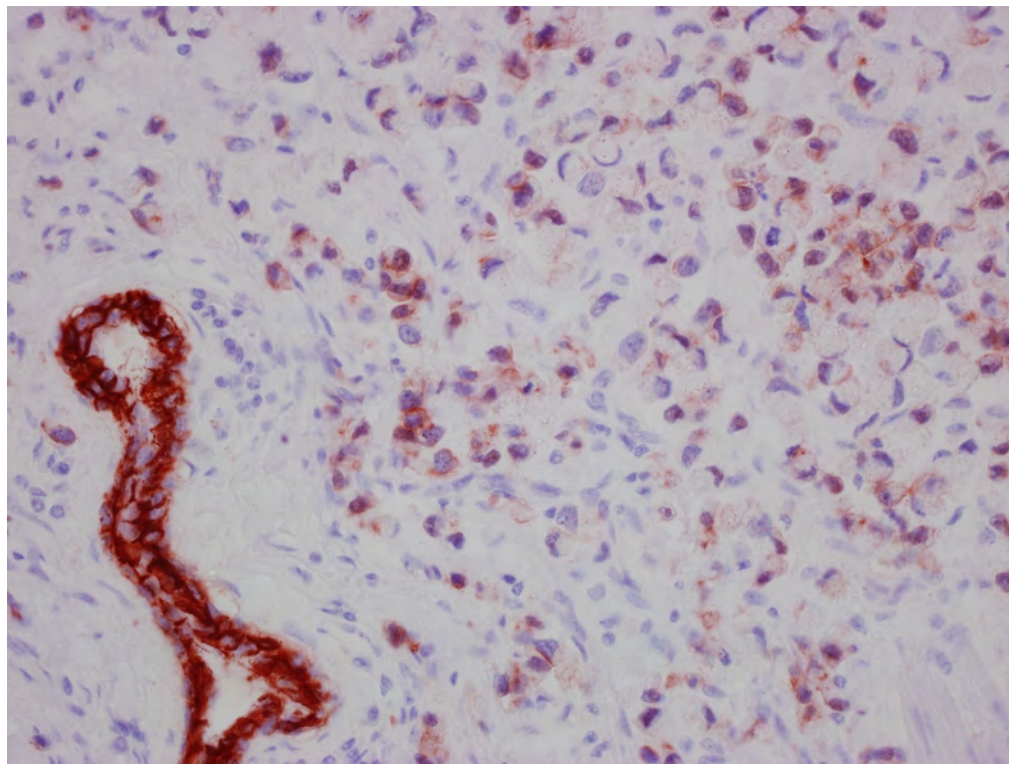
Naciek raka typu rozlanego wg Laurena.
Komórki raka wykazują osłabiony, błonowy odczyn w kierunku E-kadheryny obecny w większości komórek.
Nr histologiczny preparatu: 1400852, odczyn w kierunku E-kadheryny, pow. 40x

zdj. nr 20



Naciek raka typu jelitowego wg Laurena.
W ponad 90% komórek nowotworowych widoczny jest silny, jądrowy odczyn w kierunku β -kateniny.
Nr histologiczny preparatu: 1369359, odczyn w kierunku β -kateniny, pow.40x

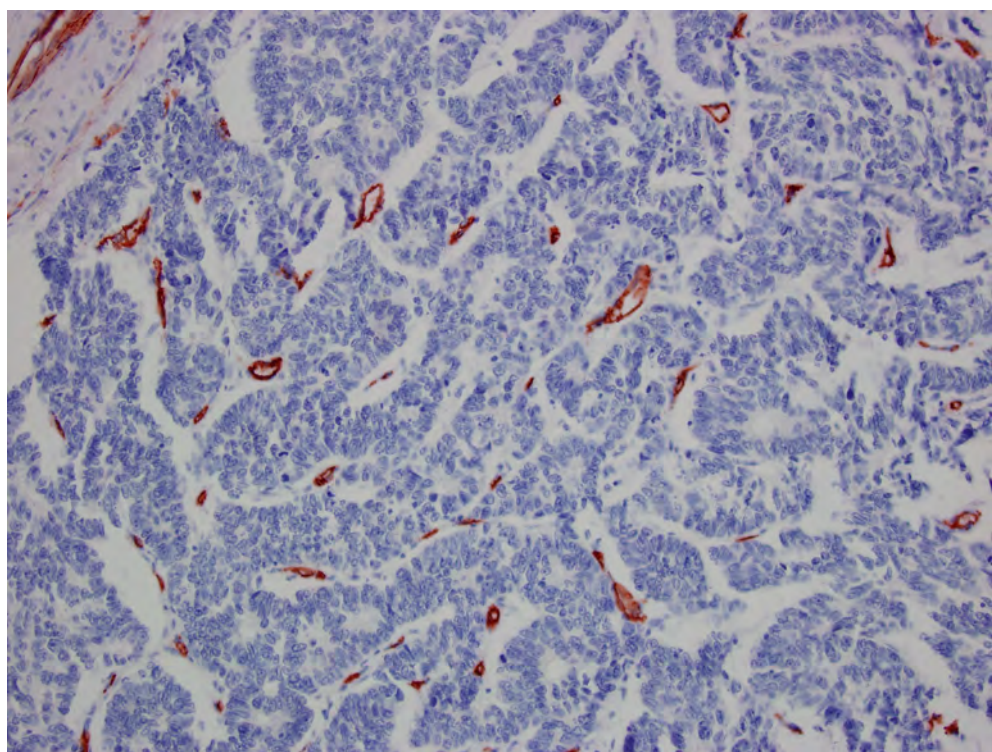
zdj. nr 21



Naciek raka typu rozlanego wg Laurena. W ponad 50% komórek nowotworowych widoczny jest słaby, błonowy odczyn w kierunku β -kateniny, ponadto w pojedynczych komórkach delikatne ziarnistości w cytoplazmie. W prawym górnym rogu pojedynczy gruczoł z widocznym silnym, błonowym odczynem stwierdzanym we wszystkich komórkach.

Nr histologiczny preparatu: 1381134, odczyn w kierunku β -kateniny, pow. 40x

zdj. nr 22

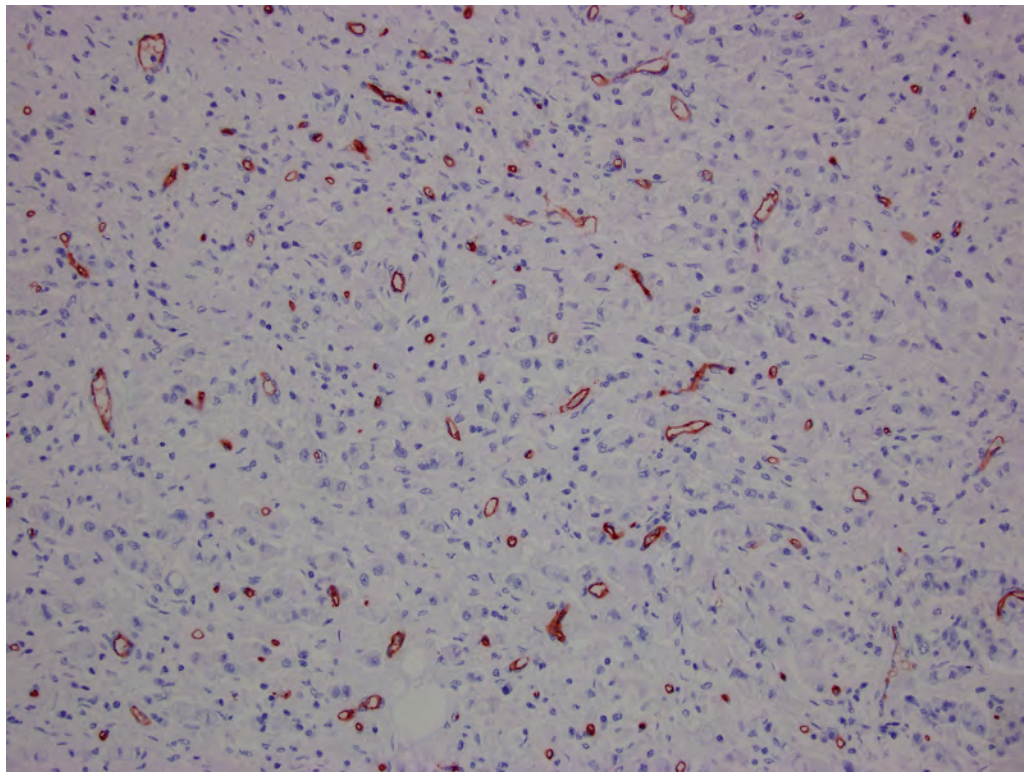


Naciek raka typu jelitowego wg Laurena.

Przy pomocy przeciwciała CD-34 uwidoczniono struktury naczyniowe.

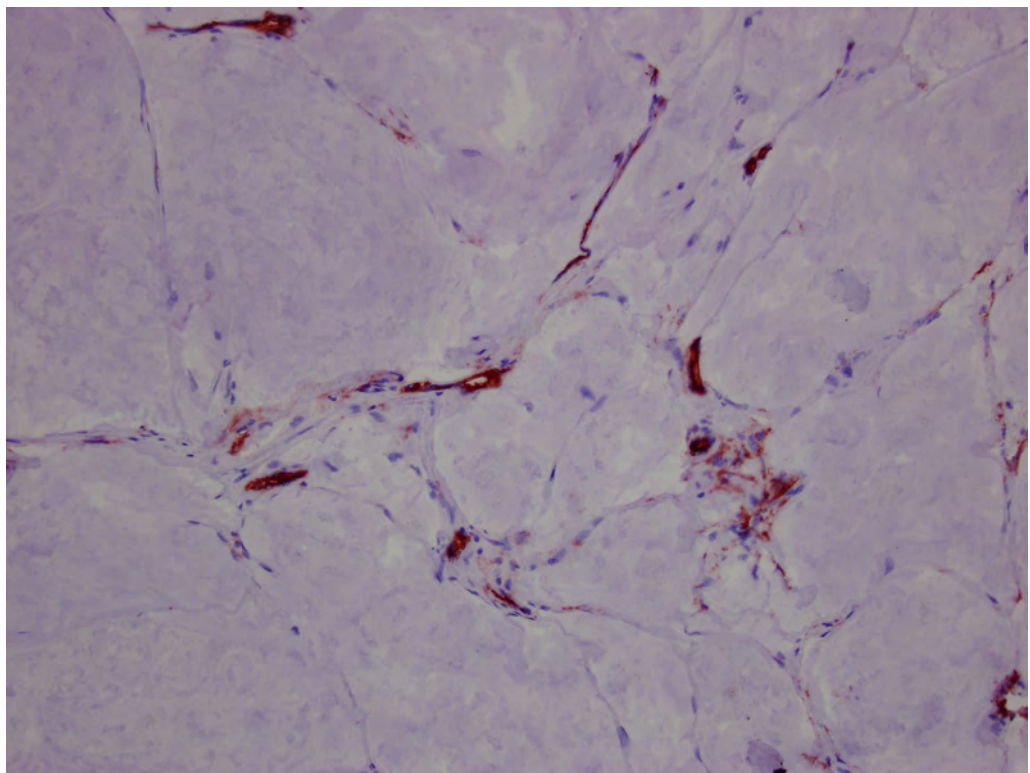
Nr histologiczny preparatu: 1344083, odczyn w kierunku CD-34, pow. 20x

zdj. nr 23



Nacieki raka typu rozlanego wg Laurena.
Przy pomocy przeciwciała CD-34 uwidoczniono struktury naczyniowe.
Nr histologiczny preparatu: 1442596, odczyn w kierunku CD-34, pow. 20x

zdj. nr 24



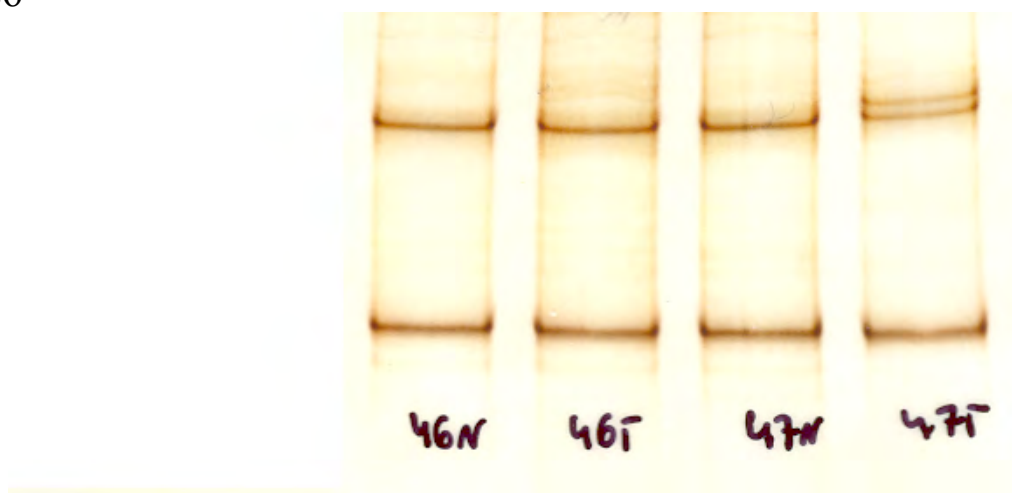
Nacieki raka typu śluzowego wg podziału WHO.
Przy pomocy przeciwciała CD-34 uwidoczniono struktury naczyniowe.
Nr histologiczny preparatu: 1364365, odczyn w kierunku CD-34, pow. 40x

zdj. nr 25



Żel MDE - widoczne są prążki uwidocznione przy pomocy srebrzenia, powstałe w wyniku przeprowadzenia całonocnej, pionowej elektroforezy zamplifikowanego odcinka DNA obejmującego jeden ekson *geny CDH1* wraz z krótkimi, przylegającymi odcinkami intronów (metoda SSCP). W przypadku oznaczonym numerem 41 widoczny jest dodatkowy prążek obecny tak w próbce DNA pochodzącej z niezmienionej błony śluzowej żołądka (N), jak i z nacieku raka (T). Taką sytuację określano mianem polimorfizmu w danym eksonie genu.

zdj. nr 26



Żel MDE - widoczne są prążki uwidocznione przy pomocy srebrzenia, powstałe w wyniku przeprowadzenia całonocnej, pionowej elektroforezy zamplifikowanego odcinka DNA obejmującego jeden ekson *geny CDH1* wraz z krótkimi, przylegającymi odcinkami intronów (metoda SSCP). W przypadku oznaczonym numerem 47 widoczny jest dodatkowy prążek obecny jedynie w próbce DNA pochodzącej z nacieku raka (T). Taką sytuację traktowano jako obecność mutacji w danym eksonie badanego genu.

