Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Maciej Tomasz Matłok

Stopień dysplazji a stan niestabilności mikrosatelitarnego DNA w polipach gruczolakowych jelita grubego

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Danuta Karcz

Pracę wykonano w II Katedrze Chirurgii CM UJ

Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Danuta Karcz

Kraków 2009

Pragnę złożyć podziękowania

- prof. dr hab. med. Danucie Karcz, dzięki której ta praca doktorska miała szansę powstać i ujrzeć światło dzienne w obecnej postaci, zwłaszcza za nieustanne dopingowanie mnie do wytężonej pracy, krytyczną analizę maszynopisu oraz cenne rady i objaśnienia udzielane w trakcie dyskusji nad otrzymanymi wynikami

- dr n. biol. Monice Zazuli i pracownikom laboratorium patologii molekularnej Katedry Patomorfologii CM UJ, którzy z entuzjazmem wprowadzali mnie w tajniki metod badawczych biologii molekularnej

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006–2008 jako projekt badawczy

Badania wykonano:

Kolonoskopię – w Pracowni Endoskopii II Katedry Chirurgii CM UJ, kierownik Katedry prof. dr hab. med. Danuta Karcz

Badania histopatologiczne i genetyczne – w Katedrze Patomorfologii CM UJ, kierownik Katedry prof. dr hab. med. Jerzy Stachura, od października 2008 r. p.o. kierownik Katedry dr hab. med. Romana Tomaszewska

Badania biochemiczne, morfologię krwi, oznaczenie HbsAg i anty HCV – w Zakładzie Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, kierownik Zakładu prof. dr hab. med. Jerzy W. Naskalski

Analizy statystyczne – w Pracowni Statystyki Kliniki Toksykologii CM UJ, dr Bartosz Jenner

Lista skrótów

AFAP – Attenuated Familial Adenomatous Polyposis – poronna rodzinna polipowatość gruczolakowa

CHRPE – Congenital Hypertrophy of the Retinal Pigment Epithelium – wrodzony przerost nabłonka pigmentowego siatkówki

DCC – Deleted in Colon Cancer – gen ulegający delecji w raku jelita grubego

DNA – Deoxirybonucleic Acid – kwas deoksyrybonukleinowy

EMR – Endoscopic Mucosal Resection – endoskopowa resekcja błony śluzowej

ESD – Endoscopic Submucosal Dissection – endoskopowe rozwarstwienie śluzówki

FAP – Familial Adenomatous Polyposis – rodzinna polipowatość gruczolakowa

HDTV – High Definition Television – telewizja wysokiej rozdzielczości

HE – barwienie z wykorzystaniem hematoksyliny i eozyny

HNPCC – Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer – zespół Lyncha

HPC – Hereditary Prostate Cancer – gen dziedzicznego raka stercza

LINE – Long Interspersed Nuclear Elements – długie rozproszone sekwencje jądrowe

LOH – Loss of Heterozygosity – utrata heterozygotyczności

MMR – Mismatch Repair – naprawa niezgodności parowania zasad

MSI-H – High-Frequency MSI – niestabilność mikrosatelitarnego DNA wysokiego stopnia

MSI-L – Low-Frequency MSI – niestabilność mikrosatelitarnego DNA niskiego stopnia

MSS – Microsatellite Stability – brak niestabilności mikrosatelitarnego DNA

NIBP – Non-Invasive Blood Pressure – nieinwazyjny automatyczny sposób pomiaru ciśnienia tętniczego krwi

PCR – Polymerase Chain Reaction – reakcja łańcuchowa polimerazy

PTT – Protein Truncation Test – test przedwczesnej terminacji translacji

pz – para zasad

SINE – Short Interspersed Nuclear Elements – krótkie rozproszone sekwencje jądrowe

SSCP – Single-Strand Conformation Polymorphism – polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów DNA

WHO – World Health Organization – Światowa Organizacja Zdrowia

Spis treści

1. Wprowadzenie 10
   1.1. Polipy jelita grubego 10
      1.1.1. Polipy gruczolakowe 11
         1.1.1.1. Polipy cewkowe 11
         1.1.1.2. Polipy kosmkowe 12
         1.1.1.3. Polipy cewkowo-kosmkowe 12
   1.2. Rak jelita grubego w utkaniu polipa 12
   1.3. Metody wykrywania polipów jelita grubego 13
      1.3.1. Rys historyczny 13
      1.3.2. Obraz kliniczny 14
      1.3.3. Kolonoskopia 14
      1.3.4. Nowe metody wideoendoskopowe 14
         1.3.4.1. Wideooendoskopia wysokiej rozdzielczości 14
         1.3.4.2. Wideoendomikroskopia 15
         1.3.4.3. Kapsułka endoskopowa 15
         1.3.4.4. Aer-o-scope 15
         1.3.4.5. NeoGuide 16
         1.3.4.6. ColonSight 16
         1.3.4.7. Invendo 16
         1.3.4.8. CathCam 17
      1.3.5. Badania radiologiczne 17
         1.3.5.1. Wlew dwukontrastowy 17
         1.3.5.2. Wirtualna kolonoskopia tomografii komputerowej 17
         1.3.5.3. Wirtualna kolonoskopia rezonansu magnetycznego 18
   1.4. Endoskopowe metody usuwania polipów jelita grubego 19
      1.4.1. Polipektomia kleszczykami biopsyjnymi 19
      1.4.2. Polipektomia pętlowa 19
      1.4.3. Endoskopowa mukozektomia 20
      1.4.4. Endoskopowa resekcja błony śluzowej 20
   1.5. Przemiana gruczolaka w gruczolakoraka 21
   1.6. Niestabilność mikrosatelitarnego DNA 22
      1.6.1. Definicja 22
      1.6.2. Rodzaje satelitarnego DNA 22
         1.6.2.1. Minisatelitarny DNA 23
         1.6.2.2. Mikrosatalitarny DNA 23
         1.6.2.3. Satelitarny DNA 24
         1.6.2.4. Megasatelitarny DNA 25
      1.6.3. Kompleksy białek biorące udział w naprawie parowania zasad 26
      1.6.4. Mechanizm powstawania niestabilności mikrosatelitarnego DNA 27
   1.7. Niestabilność chromosomalna 29
   1.8. Inne zaburzenia genetyczne na szlaku przemian gruczolak–gruczolakorak 29
      1.8.1. Zaburzenia w obrębie genu APC 29
      1.8.2. Zaburzenia w obrębie genu p53 30
      1.8.3. Zaburzenia w obrębie genu K-ras 30

1.8.4. Zaburzenia w obrębie DCC/SMAD 31
1.8.5. Ścieżka gruczolaka ząbkowanego 31
1.8.6. Ścieżka epigenetyczna 31
1.9. Genetycznie uwarunkowane zespoły związane z większym ryzykiem zachorowania na raka jelita grubego 32
1.9.1. Rodzinna polipowatość gruczolakowa 32
1.9.2. Poronna rodzinna polipowatość gruczolakowa 32
1.9.3. Zespół Turcota 33
1.9.4. Dziedziczny rak jelita grubego bez polipowatości 33
2. Założenia i cele pracy 35
3. Materiał 37
4. Metodyka 38
4.1. Wywiad 38
4.2. Badanie fizykalne 38
4.3. Badania pracowniane 38
4.4. Kolonoskopia 39
4.4.1. Przygotowanie do kolonoskopii 39
4.4.2. Badanie kolonoskopowe 39
4.4.3. Kolonoskopowa polipektomia 41
4.5. Badanie usuniętych polipów 41
4.5.1. Przygotowanie i ocena preparatów histopatologicznych 43
4.5.2. Badania molekularne 43
4.6. Analiza statystyczna 49
5. Wyniki 54
5.1. Liczba usuniętych polipów w badanej grupie 54
5.2. Lokalizacja oraz typ histopatologiczny usuniętych polipów 55
5.3. Stopień dysplazji usuniętych polipów 56
5.4. Zmiany genetyczne 58
5.4.1. Niestabilność mikrosatelitarnego DNA 58
5.4.2. Wiek i płeć a fenotyp polipów 58
5.4.3. Średnica polipów z uwzględnieniem ich fenotypu 63
5.4.4. Średnica polipów a stopień utraty heterozygotyczności 64
5.4.5. Mutacja genu K-ras 65
5.4.6. Zaburzenia genetyczne dla markera p53-penta 65
5.4.7. Zaburzenia genetyczne dla markera p53-di 66
5.4.8. Zaburzenia genetyczne dla amplikonu MET 66
5.4.9. Zaburzenia genetyczne dla markera DCC 67
5.4.10. Zaburzenia genetyczne dla markera hMSH2 67
5.4.11. Zaburzenia genetyczne dla markera APC 68
5.4.12. Zaburzenia genetyczne dla markera NM23 68
5.4.13. Zaburzenia genetyczne dla markera HPC1 69
5.4.14. Współwystępowanie zaburzeń w poszczególnych analizowanych markerach 71
5.5. Średnica polipów 72
5.5.1. Średnica polipów w poszczególnych odcinkach jelita grubego 72
5.5.2. Średnica polipów a rozpoznanie histopatologiczne 73
5.5.3. Średnica polipów a stopień ich dysplazji 74
5.5.4. Średnica polipów a mutacje w genie K-ras 75

5.5.5. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera p53-penta 76
5.5.6. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera p53-di 77
5.5.7. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera MET 78
5.5.8. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera DCC 79
5.5.9. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera hMSH2 81
5.5.10. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera APC 82
5.5.11. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera NM23 83
5.5.12. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera hMLH1 84
5.6. Pojawienie się nowych polipów gruczolakowych jelita grubego w badaniach kontrolnych 85
5.7. Podsumowanie wyników 89
6. Omówienie wyników i dyskusja 92
7. Wnioski 104
8. Streszczenie 105
Streszczenie w języku angielskim - Summary 109
9. Piśmiennictwo 112
10. Aneks 121

1. Wprowadzenie

Bezpośrednie przyczyny, które mogą prowadzić do rozwoju raka jelita grubego, nie są do końca poznane. Obecnie powszechnie akceptowana jest teoria jego rozwoju na podłożu polipów gruczolakowych [1]. Czas przemiany od zdrowej śluzówki do wystąpienia komórek typowych dla raka jelita grubego określany jest na około 10 lat. Taki okres przemiany stanowi dostateczne uzasadnienie dla prowadzenia zakrojonych na szeroką skalę badań przesiewowych w grupach wiekowych, w których najczęściej rozwijają się polipy gruczolakowe [2, 3].

W województwie małopolskim w okresie od 2002 r. do 2004 r. liczba nowych zachorowań na raka jelita grubego wzrosła w liczbach bezwzględnych u mężczyzn ze 152 do 193, tj. o około 21%, natomiast u kobiet ze 155 do 164, czyli o około 6% [4].

1.1. Polipy jelita grubego

Polipy jelita grubego są definiowane jako wyniosłości śluzówki do światła przewodu pokarmowego. Można je wykryć w badaniu endoskopowym lub w badaniu radiologicznym [5].

Pojęcie „polip" jest określeniem makroskopowym, powszechnie używanym w opisie badań endoskopowych przewodu pokarmowego. Ze względu na wygląd zewnętrzny rozróżnia się polipy: uszypułowane, wyniosłe (nazywane czasem także „siedzącymi") oraz płaskie [6].

Istotnym zagadnieniem dla zrozumienia zmian wiążących się z polipami jelita grubego jest uwzględnienie ich typu określonego na podstawie badania histopatologicznego. Aktualnie powszechnie akceptowana jest klasyfikacja polipów jelita grubego zaproponowana w 1998 r. przez Coopera. Uwzględnił on w swoim opracowaniu podział na polipy nienowotworowe oraz nowotworowe. Do pierwszej grupy zostały zaliczone polipy: hiperplastyczne, Peutza i Jeghersa, zapalne, młodzieńcze oraz limfoidalne. Wśród zmian nowotworowych Cooper wyróżnił gruczolaki: cewkowe, kosmkowe oraz cewkowo-kosmkowe. Coraz częściej do grupy

polipów nowotworowych włączane są gruczolaki ząbkowane (*adenoma serratum*) oraz polipy hiperplastyczne z obecnością utkania gruczolaka cewkowego (*adenoma mixtum*) [5, 6].

Gruczolaki jelita grubego są niezłośliwymi nowotworami pochodzenia nabłonkowego. Ryzyko ich wystąpienia w populacji zwiększa się wraz z wiekiem. Uważa się, iż 50–65% populacji po 65. roku życia znajduje się w grupie ryzyka wystąpienia tego rodzaju zmian.

Cechą charakterystyczną w ocenie mikroskopowej wszystkich gruczolaków jest dysplazja nabłonka gruczołowego, określana jako zmiana przedrakowa – stan mający bezpośrednią potencjalną zdolność przemiany w gruczolakoraka. Według definicji WHO dysplazja to zmiany histologiczne cechujące się zaburzeniami dojrzewania (różnicowania) komórek oraz zaburzeniami architektoniki nabłonka. Tak WHO, jak i National Polyp Study zalecają używanie trójstopniowego podziału dysplazji – na małego, średniego i dużego stopnia. Aktualnie jednak coraz częściej można się spotkać z podziałem dwustopniowym – na „low grade dysplasia" oraz „high grade dysplasia" – dysplazję małego i dużego stopnia [6].

1.1.1. Polipy gruczolakowe

1.1.1.1. Gruczolaki cewkowe (*adenoma tubulare*)

Zdecydowana większość gruczolaków cewkowych lokalizuje się w jelicie grubym, choć mogą występować także w żołądku i jelicie cienkim. W ponad połowie przypadków są zmianami pojedynczymi, uszypułowanymi, zazwyczaj małymi, rzadko przekraczającymi średnicę 2,5 cm. Szyja polipów cewkowych ma typowo utkanie włóknisto-mięśniowe z obecnością naczyń krwionośnych dochodzących z błony podśluzowej; pokryta jest zazwyczaj normalną śluzówką [5, 6].

1.1.1.2. Gruczolaki kosmkowe (*adenoma villosum*)

Gruczolaki kosmkowe są większe, częściej występują u osób starszych, zazwyczaj w odbytnicy i esicy, są zmianami płaskimi, mogą osiągać średnicę do 10 cm, a powierzchnia polipa często jest nieregularna [6].

1.1.1.3. Gruczolaki cewkowo-kosmkowe (*adenoma tubulovillosum*)

Gruczolaki cewkowo-kosmkowe są polipami o mieszanych cechach charakterystycznych dla obu opisanych powyżej typów zmian. Mogą być zmianami małymi, płaskimi, jak i dużymi, uszypułowanymi. Ryzyko zezłośliwienia rośnie wraz ze zwiększeniem się odsetka komponentu kosmkowego [6].

1.2. Rak jelita grubego w utkaniu polipa

Rak wewnątrzśluzówkowy dotyczy jedynie błony śluzowej i jej nie przekracza. Uważa się, iż w sytuacji gdy rak nacieka błonę podśluzową istnieje ryzyko wystąpienia przerzutów.

Z rakiem naciekającym w gruczolaku mamy do czynienia wówczas, gdy nacieka on poza blaszkę mięśniową śluzówki. Stan ten powinien być odróżniany od raka wewnątrzśluzówkowego.

W 1985 r. Haggit zaproponował klasyfikację pomocną w ocenie głębokości naciekania raka w polipie gruczolakowym. Wyróżnił następujące poziomy:

poziom 0 – naciek raka dochodzi do blaszki mięśniowej błony śluzowej,

poziom 1 – rak nacieka przez blaszkę mięśniową błony śluzowej do błony podśluzowej jedynie w obrębie głowy gruczolaka,

poziom 2 – rak zajmuje szyjkę gruczolaka (pogranicze głowy i szypuły),

poziom 3 – rak nacieka dowolną część szypuły gruczolaka,

poziom 4 – rak nacieka warstwę podśluzówkową ściany jelita pod gruczolakiem [7].

Oprócz skali Haggita w praktyce klinicznej bywa także używany podział zaproponowany przez naukowców z Japonii. Jest to skala trójstopniowa:
stopień sm1 – naciek w obrębie górnej 1/3 warstwy podśluzowej,
stopień sm2 – naciek w obrębie środkowej 1/3 warstwy podśluzowej,
stopień sm3 – naciek w obrębie dolnej 1/3 warstwy podśluzowej.

Obie skale wykorzystywane są dla oceny ryzyka wznowy miejscowej oraz określenia prawdopodobieństwa pojawienia się przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych oraz narządach odległych.

1.3. Metody wykrywania polipów jelita grubego

1.3.1. Rys historyczny

Chęć poznania wnętrza ludzkiego ciała towarzyszy medycynie od najdawniejszych czasów. Znaleziska pochodzące z greckiego Epidauros (głównego ośrodka rozwoju starożytnej myśli medycznej) potwierdzają, iż już ówcześni medycy interesowali się badaniami endoskopowymi. W kolekcji muzeum medycyny w tym greckim mieście (wpisanym na światową listę dziedzictwa kultury UNESCO) znajdują się specjalne lejki wykorzystywane niegdyś jako wzierniki umożliwiające badanie odbytnicy.

Jednak dopiero wprowadzenie metod endoskopowych przez krakowskiego chirurga prof. Jana Mikulicza Radeckiego pod koniec XIX w. umożliwiło lekarzom wgląd w niedostępne wcześniej odcinki przewodu pokarmowego. Rozwój endoskopowych metod obrazowania jelita grubego nastąpił w drugiej połowie XX w., kiedy to w 1957 r. Robert Turell wykonał i opisał pierwsze badanie endoskopowe jelita grubego. Dynamiczny postęp w tej formie diagnostyki dolnego odcinka przewodu pokarmowego dokonał się pod koniec XX w. i zbiegł się w czasie ze wzrostem zachorowalności na raka jelita grubego. Unikalne możliwości, jakie dają techniki endoskopowe, sprawiły, iż dziś tak kolonoskopia, jak i rektoskopia mają ugruntowaną pozycję w wykrywaniu oraz leczeniu chorób jelita grubego.

1.3.2. Obraz kliniczny

Spośród informacji możliwych do uzyskania podczas wywiadu na pierwszy plan wysuwają się zgłaszane przez chorych epizody obecności krwi w stolcu, zaburzenia rytmu wypróżnień, czy też niecharakterystyczne dolegliwości bólowe w zakresie jamy brzusznej.

1.3.3. Kolonoskopia

Stawiane aktualnie używanym kolonoskopom wymagania techniczne dopuszczają wykorzystywanie jedynie instrumentów wideoendoskopowych. Każdy wideokolonoskop jest instrumentem elastycznym o średnicy nieprzekraczającej 13,2 mm, minimalnej długości 130 cm, o polu widzenia minimum 140° oraz mającym 1 lub 2 kanały robocze, przez które wprowadzane są kleszczyki biopsyjne, pętle do polipektomii, klipsy, końcówki umożliwiające współpracę z bimerem argonowym.

Wideokolonoskopia jest metodą uznawaną obecnie za „złoty standard" w badaniu jelita grubego, umożliwia bowiem nie tylko zbadanie śluzówki tego odcinka przewodu pokarmowego, lecz także pobranie wycinków bądź usunięcie zmian.

1.3.4. Nowe metody wideoendoskopowe

W ostatnich latach można zaobserwować wyraźne trendy w dynamicznym rozwoju technologii wykorzystywanych w budowie endoskopów.

1.3.4.1. Wideoendoskopia wysokiej rozdzielczości

Dzięki pracy wielu badaczy zostały skonstruowane instrumenty wykorzystujące tzw. telewizję wysokiej rozdzielczości (HDTV), pozwalającą na uzyskanie obrazu o parametrach >800 000 pikseli. Kolejną innowacją wprowadzoną do kolonoskopii są aparaty umożliwiające powiększenie obrazu nawet 20x w porównaniu z tradycyjną kolonoskopią. Wszystkie te udogodnienia zwiększają czułość kolonoskopii w wykrywaniu niewielkich, zwłaszcza płaskich zmian śluzówki [8].

1.3.4.2. Wideoendomikroskopia

Novum w wideoendoskopii są urządzenia pozwalające na pracę w trybie tzw. endomikroskopii dzięki powiększeniu optycznemu i cyfrowemu oraz wbudowaniu w kolonoskop mikroskopu. Urządzenia tego typu umożliwiają tzw. biopsję optyczną.

1.3.4.3. Kapsułka endoskopowa

Metodą umożliwiającą nieinwazyjne badanie światła jelita grubego jest zastosowanie tzw. kapsułki kolonoskopowej (ang. *PillCam*). Urządzenie to w formie kapsułki o rozmiarach 11 x 32 mm jest wyposażone w dwie mikrokamery pozwalające na akwizycję obrazów ściany jelita grubego z częstością 4 obrazów na sekundę poprzez bezprzewodowy system nadawczo-odbiorczy. Zapis z kapsułki poddawany jest następnie analizie w specjalnej stacji roboczej. Czułość tej metody w wykrywaniu zmian jelita grubego szacowana jest na 76–77% przy swoistości sięgającej około 70%. Metoda ta jest przeciwwskazana u chorych, u których podejrzewa się zwężenia przewodu pokarmowego. Nie jest także możliwe pobranie wycinków do weryfikacji histopatologicznej [9].

1.3.4.4. Aer-o-scope

Inną metodą badania jelita grubego, budzącą duże zainteresowanie, jest urządzenie o nazwie aer-o-scope opracowane przez zespół naukowców izraelskich. Jest to samoporuszający się przez światło jelita grubego jednorazowy aparat, a jego zasadniczym elementem jest dwuczęściowy silikonowy balon o średnicy 19 mm, w którym oprócz diodowego systemu oświetlenia zamontowana jest mikrokamera telewizyjna połączona cienkim przewodem ze stacją bazową. W literaturze opisano dotychczas 12 chorych poddanych badaniu z wykorzystaniem aer-o-scope [10].

Wadą tego systemu, podobnie jak i kapsułki endoskopowej, jest brak możliwości pobrania wycinków do weryfikacji histopatologicznej.

1.3.4.5. NeoGuide

Zespół badaczy amerykańskich opracował endoskop oparty na technologii NeoGuide Endoscopy System (NES). Instrument ten jest sterowany za pomocą układu cięgieł i pokręteł, a jego pancerz wyposażony jest w liczne czujniki odczytujące i zapamiętujące kolejne ruchy endoskopu. Pozwala to na pomiar nacisku rury aparatu na ścianę jelita grubego i umożliwia płynną zmianę sztywności sondy endoskopowej poprzez jej elastyczne odgięcie, możliwe na całej długości roboczej [11].

1.3.4.6. ColonSight

Amerykańska firma Stryker Endoscopy zaprezentowała niedawno kolonoskopy skonstruowane w oparciu o technologię ColonSight System [8]. Urządzenia te wykorzystują diodowe źródła światła oraz procesor wizyjny. Instrument wyposażony jest w system podwójnej insuflacji – oprócz podawania gazu przez kanał roboczy do światła jelita możliwe jest napompowanie osłonki otaczającej rurę endoskopu; pozwala to na łatwiejszą penetrację proksymalną.

1.3.4.7. Invendo

Badacze z Niemiec opracowali jednorazowy kolonoskop hydrauliczny Invendo. To w pełni elastyczne urządzenie, zbudowane z rur z tworzyw sztucznych, napełniane jest podczas wprowadzania do jelita grubego ściśliwą cieczą. Urządzeniem steruje się za pomocą elektronicznego dżojstika. Dzięki wykorzystaniu układu hydraulicznego aparat cechuje się dużą elastycznością oraz zakresem ruchu końcówki wynoszącym 180° w każdym kierunku. Wyposażenie urządzenia w kanał roboczy o średnicy 3,2 mm umożliwia pobieranie wycinków. Dotychczas badaniom z wykorzystaniem kolonoskopu Invendo poddano około 30 chorych. Kątnicę osiągnięto w 75% badań [8].

1.3.4.8. CathCam

Firma Ethicon zaproponowała użytkownikom urządzenie o nazwie CathCam opracowane w Londynie przez Paula Swaina. Kolonoskop systemu CathCam zbudowany jest z wielokanałowego cewnika o średnicy 11 mm, na końcu którego znajduje się kamera telewizyjna przekazująca obraz na monitor oraz diodowe źródło światła. Aparat prowadzony jest w świetle jelita grubego po prowadniku o średnicy 0,024 mm pod kontrolą rentgenowską. System nie oferuje żadnej możliwości manualnej kontroli położenia dystalnego końca endoskopu. Okazuje się on bardzo przydatny w pokonywaniu stenotycznie zwężonych odcinków jelita [12].

1.3.5. Badania radiologiczne

1.3.5.1. Wlew dwukontrastowy

Ta – opracowana w latach 50. XX stulecia – technika obrazowania jelita grubego polega na przezodbytniczym podaniu roztworu zawierającego baryt, który przemieszcza się w świetle jelita dzięki zmianie pozycji ciała badanej osoby. W kolejnym etapie badania insuflowane jest do jelita grubego powietrze. Wykonanie serii zdjęć rentgenowskich pozwala na wykrycie zmian w zakresie śluzówki jelita grubego. W następstwie licznych ulepszeń, których autorami byli m.in. Gianturco, Wellin czy niemiecki uczony Altaras, zwiększyła się wydolność diagnostyczna tej metody. Do dziś, mimo dynamicznego rozwoju endoskopowych metod obrazowania jelita grubego, dwukontrastowy wlew z wykorzystaniem barytu ma swoje miejsce w algorytmie diagnostycznym [13]. Stosowany bywa u osób, u których nie udaje się wykonać kolonoskopii lub które nie akceptują tej metody.

1.3.5.2. Wirtualna kolonoskopia tomografii komputerowej

Dzięki pojawieniu się wielorzędowych tomografów komputerowych pracujących w technice spiralnej oraz opracowaniu nowych programów

przetwarzających uzyskane obrazy stało się możliwe wykorzystanie tej techniki rentgenowskiej do diagnostyki chorób jelita grubego.

Dla zapewnienia bezpiecznej insuflacji powietrza lub dwutlenku węgla do jelita grubego opracowano specjalne urządzenia dozujące mieszaninę gazów z odpowiednim ciśnieniem oraz ograniczające dzięki specjalnemu zestawowi czujników ryzyko przedziurawienia jelita grubego. Po odpowiednim wypełnieniu jelita gazem rozpoczyna się proces akwizycji obrazów przeprowadzany u chorego leżącego na plecach.

Czułość wirtualnej kolonoskopii w wykrywaniu zmian o średnicy przekraczającej 10 mm mieści się w przedziale 50–90%. Różnica w czułości związana jest z wykorzystaniem platform badawczych różnych producentów oraz z doświadczeniem ośrodka wykonującego badanie. Czułość w przypadku polipów o średnicy 6–9 mm nie przekracza 70%, a dla zmian o średnicy nieprzekraczającej 5 mm wynosi <30% [14, 15]. Swoistość tej metody obrazowania określana jest na około 90%. Wykrycie jakiejkolwiek zmiany stanowi wskazanie do wykonania tradycyjnej kolonoskopii z pobraniem wycinków do analizy histopatologicznej lub do jej usunięcia.

1.3.5.3. Wirtualna kolonoskopia rezonansu magnetycznego

Inną techniką radiologiczną wykrywania zmian w jelicie grubym jest wirtualna kolonoskopia rezonansu magnetycznego.

Do badania wykorzystywane jest zazwyczaj urządzenie z polem magnetycznym o mocy przynajmniej 1,5 T, współpracujące z dwiema cewkami umieszczanymi na plecach chorego ułożonego na brzuchu. Czułość tej metody w wykrywaniu zmian polipowatych o średnicy >20 mm jest bliska 100%, jednak dla zmian o rozmiarach 10–19 mm nie przekracza 40%, a dla polipów o średnicy <10 mm wynosi około 17%.

1.4. Endoskopowe metody usuwania polipów jelita grubego

1.4.1. Polipektomia kleszczykami biopsyjnymi

W przypadku niewielkich zmian, o średnicy <10 mm, wykonywana jest tzw. polipektomia kleszczykami biopsyjnymi. W praktyce wykorzystuje się dwa rodzaje tych narzędzi – bez i z możliwością koagulacji. Najczęściej stosowane są te pierwsze (tzw. zimna biopsja), rzadziej kleszczyki współpracujące z generatorem koagulacyjnym, pozwalające poprzez koagulację na zatamowanie ewentualnego krwawienia w miejscu polipektomii (tzw. biopsja gorąca).

Zwolennicy pierwszej metody podnoszą fakt, iż usuwany niewielki polip nie podlega uszkodzeniu termicznemu.

1.4.2. Polipektomia pętlowa

Zmiany uszypułowane usuwane są metodą tzw. polipektomii pętlowej. Heksagonalną pętlę wprowadza się przez kanał roboczy endoskopu, jej koniec narzuca się po otwarciu na polip i zaciska na jego szypule. Po podłączeniu elektrodiatermii odcina się go i wydobywa w koszyku do usuwania ciał obcych lub specjalną siateczką EndoRoth®. W przypadku zmian o dużej średnicy możliwe jest – przed założeniem pętli koagulacyjnej – zaopatrzenie szypuły polipa podwiązką z tworzywa sztucznego tzw. EndoLoop®.

Odmiennego postępowania wymagają zmiany przysadziste lub płaskie. W tych przypadkach powszechnie stosowaną praktyką jest podstrzyknięcie polipa roztworem soli fizjologicznej i adrenaliny, często z dodatkiem błękitu metylenowego. Tworząca się w ten sposób pseudoszypuła ułatwia usunięcie zmiany pętlą do polipektomii, a podany w okolice nasady roztwór ma dodatkowo działanie hemostatyczne i zmniejsza ryzyko krwawienia.

1.4.3. Endoskopowa mukozektomia

Zmiany płaskie usuwane są techniką zwaną mukozektomią. Końcówkę kolonoskopu wyposaża się w specjalną nasadkę z przeźroczystego tworzywa sztucznego. Jej zakończenie może przebiegać równolegle do czoła roboczego instrumentu lub też skośnie, zazwyczaj pod kątem 45°. Do nasadki wprowadzana jest specjalna pętla, która opiera się o jej brzegi. Po zlokalizowaniu zmiany zbliża się do niej nasadkę wraz z endoskopem, zasysa ją wraz z sąsiadującą niezmienioną śluzówką i odcina pętlą z wykorzystaniem koagulacji.

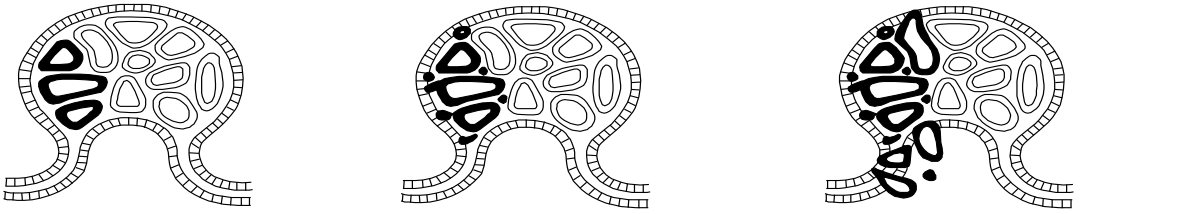
1.4.4. Endoskopowa resekcja błony śluzowej

Inną metodą stosowaną w usuwaniu zmian polipowatych jest endoskopowa resekcja błony śluzowej (*endoscopic mucosal resection* – EMR) oraz endoskopowe rozwarstwienie śluzówki (*endoscopic submucosal dissection* – ESD). Pierwsza z metod polega na zamarkowaniu koagulacją na błonie śluzowej jelita zakresu zabiegu. Następnie podaje się pod zmianę około 10–30 ml roztworu soli fizjologicznej z adrenaliną lub kwasu hialuronowego, co pozwala na jej uniesienie i oddzielenie od warstwy mięśniowej.
Pętla koagulacyjna znajduje się w plastikowej nasadce na końcu endoskopu. Błonę śluzową zasysa się do nasadki, a następnie odcina przy użyciu pętli.

W ostatnich latach coraz częściej wykorzystywana jest nowsza metoda – ESD, która polega na rozwarstwieniu i odreparowaniu warstwy podśluzówkowej pod zmianą chorobową specjalnym nożem endoskopowym zakończonym ceramiczną końcówką izolującą (*insulation-tipped electrosurgical knife* – IT knife). Metoda ta pozwala na wycięcie większych zmian patologicznych z adekwatnym marginesem zdrowej tkanki.

1.5. Przemiana gruczolaka w gruczolakoraka

W myśl powszechnie dziś akceptowanej teorii opublikowanej w 1990 r. przez Vogelsteina karcynogeneza raka jelita grubego obejmuje szereg występujących po sobie zmian rozpoczynających się w zdrowej śluzówce jelita grubego i przechodzących przez stadium nadmiernej proliferacji w błonie śluzowej aż do raka [1]. Na każdym etapie tej przemiany dochodzi do zaburzeń genetycznych. Ludzki genom zawiera liczne geny regulatorowe odpowiedzialne m.in. za hamowanie wzrostu komórek nowotworowych (antyonkogeny) oraz geny kodujące produkcję białek odpowiedzialnych za proliferację komórek (protoonkogeny). Inaktywacja lub utrata antyonkogenów może skutkować rozwojem grup komórek nowotworowych, podobnie jak pojawienie się mutacji przekształcającej protoonkogeny w onkogeny.



Rycina nr 1. Schemat przemiany gruczolaka w gruczolakoraka (cyt. za: [16])

Aktualnie opisywane są dwie główne ścieżki przemian genetycznych na szlaku gruczolak–gruczolakorak. Jedna z nich polega na utracie stabilności chromosomalnej, którą charakteryzuje utrata alleli, druga natomiast wiąże się z występowaniem niestabilności mikrosatelitarnego DNA [1, 17, 18].

Oba wymienione powyżej szlaki przemian są powszechnie akceptowane, mimo to pojawiają się obecnie coraz liczniejsze doniesienia o nowych ścieżkach mogących prowadzić do rozwoju raka jelita grubego. Są to tzw. teoria epigenetyczna oraz przemiany zachodzące w gruczolakach o typie gruczolaków drzewkowatych (*adenoma serratum*).

1.6. Niestabilność mikrosatelitarnego DNA

1.6.1. Definicja

Niestabilność mikrosatelitarnego kwasu deoksyrubonukleinowego (DNA) ma miejsce, gdy dochodzi do nieprawidłowego funkcjonowania mechanizmów kontrolujących poprawność i dokładność parowania zasad w czasie replikacji DNA lub też niewłaściwego działania polimeraz. Może to prowadzić do niekontrolowanego skrócenia lub wydłużenia łańcucha nukleotydów. Proces ten najczęściej występuje w rejonach zbudowanych z dużej liczby monotonnych, powtarzających się, krótkich sekwencji DNA zwanych mikrosatelitami.

Mikrosatelity należą do tzw. satelitarnego DNA i wykazują znaczny polimorfizm w zakresie długości fragmentów DNA.

Niestabilność mikrosatelitów można zdefiniować jako sytuację, w której długość sekwencji DNA występującego w komórkach patologicznych różni się od długości tychże sekwencji otrzymanych z komórek zdrowych.

1.6.2. Rodzaje satelitarnego DNA

Chromatyna znajdująca się w jądrze komórkowym zawiera powtarzające się sekwencje DNA, które w normalnych warunkach nie ulegają transkrypcji. Można wśród nich wyróżnić rozproszone sekwencje DNA oraz sekwencje, które się powtarzają tandemowo i bywają nazywane satelitarnym DNA. Cechą charakterystyczną sekwencji rozproszonych jest występowanie określonych sekwencji w różnych, często odległych od siebie miejscach w genomie, mogących stanowić nawet do 30% całkowitej długości ludzkiego DNA. Znamienne jest dla nich występowanie określonych grup sekwencji w specyficznych lokalizacjach – np. rodzina Alu należąca do klasy SINE (*short interspersed nuclear elements*) jest najczęściej występującą sekwencją w genomie człowieka – około 1 000 000 kopii rozproszonych we wszystkich chromosomach. Inny przykład stanowi klasa LINE (*long interspersed nuclear elements*) występująca w obrębie ciemnych prążków G chromosomów.

Sekwencje satelitarne występują w grupach składających się z kilku do nawet kilkudziesięciu sąsiadujących ze sobą powtórzeń, a w zależności od długości podstawowej sekwencji można wyróżnić kilka klas satelitarnego DNA.

1.6.2.1. Minisatelitarny DNA

Ten typ DNA zbudowany jest z krótkich sekwencji DNA (typowo krótszych od 150 pz), rozrzuconych w całym genomie (w częściach telomerowych chromosomów), i jest zazwyczaj nietranskrybowany w prawidłowych komórkach. Hiperzmienne sekwencje minisatelitarne bywają wykorzystywane jako markery genetyczne. Znajdują zastosowanie w medycynie sądowej jako molekularne „odciski palców" (*DNA fingerprints*). Pojedyncza sonda molekularna o sekwencji komplementarnej do wspólnego dla hiperzmiennych minisatelitów rdzenia umożliwia ich oznakowanie w licznych *loci* i zdobycie typowego i specyficznego dla osobnika wzoru prążków w reakcji metodą Southerna.

Telomerowy mikrosatelitarny DNA zbudowany jest z heksanukleotydowych motywów (TTAGGG) dołączanych do nici DNA przez telomerazę. Sekwencje te są wyjątkowo konserwatywne. Aktywność telomerazy zapobiega degradacji obwodowych odcinków chromosomów i utracie roli, jaką odgrywają w trakcie dokowania chromosomów do wewnętrznej powierzchni błony jądrowej.

1.6.2.2. Mikrosatelitarny DNA

Mikrosatelitarny DNA, obejmujący bloki sekwencji krótsze niż 150 pz, mieści się przede wszystkim wewnątrz intronów lub między genami.

Patogenna ekspresja sekwencji mikrosatelitarnych leżących w obrębie eksonów może odpowiadać za rzadko spotykane choroby dziedziczne. Zazwyczaj wykazują także tendencję do akumulowania się w kolejnych pokoleniach, doprowadzając do tzw. antycypacji, czyli stopniowego

przyspieszania ujawniania się objawów klinicznych u coraz młodszych chorych.

Do rozwinięcia się niestabilności mikrosatelitarnego DNA w trakcie karcynogenezy może dochodzić także w inny sposób. Mianowicie, ekspresja białek biorących udział w naprawie błędów parowania zasad, np. LMLH1, może być inaktywowana na skutek delecji (obserwowanej jako utrata heterozygotyczności [*loss of heterozygocity* – LOH]) w wyniku mutacji punktowej lub na skutek metylacji DNA, której szczególnie łatwo ulegają sekwencje dinukleotydowe CpG [19, 20].

Jeśli zatem w okolicy promotora genu (jak w przypadku hMLH1, CDKN2A, VHL, RB1) występuje sekwencja CpG, łatwo może dojść do metylacji i na skutek tego do zahamowania ekspresji genu [21]. I tak np. w przypadku raka jelita grubego nieprawidłową metylację w promotorze genu hMLH1 opisano w 84% guzów wykazujących niestabilność mikrosatelitów [22].

Znany jest także region obejmujący 70 pz, zidentyfikowany w liniach komórkowych pochodzących z raków jelita grubego. Położony jest on w obrębie promotora genu hMLH1, który w grupie nowotworów z wysokim stopniem niestabilności był zawsze zmetylowany (od –248 do –1787 pz w stosunku do miejsca inicjacji transkrypcji) [23].

1.6.2.3. Satelitarny DNA

Satelitarny DNA składa się z długich odcinków powtarzających się sekwencji nukleotydów. Nie ulega on transkrypcji i zazwyczaj znajduje się w okołocentromerowych rejonach chromosomów.

Krótkie odcinki satelitarnego DNA można podzielić na trzy klasy zawierające innego rodzaju rodziny sekwencji satelitarnych: satelitarny DNA klasy 1 (1,687 g/cm^3), satelitarny DNA klasy 2 (1,693 g/cm^3) oraz satelitarny DNA klasy 3 (1,697 g/cm^3).

Dłuższe odmiany satelitarnego DNA – alfa i beta – uzyskuje się po strawieniu DNA endonukleazami restrykcyjnymi. Satelitarny DNA alfa

stanowi rdzeń centromerowej chromatyny i obejmuje 3–5% całkowitego DNA w każdym chromosomie. Spośród wszystkich rodzin satelitarnego DNA jedynie alfa DNA jest obecny we wszystkich chromosomach i może być w nim wiązane specyficzne białko centromerowe – CENP-B.

1.6.2.4. Megasatelitarny DNA

Ten rodzaj DNA zbudowany jest z bloków długości kilkuset par zasad i może występować w różnych miejscach genomu.

Informacje dotyczące opisanych powyżej klas satelitarnego DNA przedstawione są zbiorczo w tabeli nr 1.

Tabela nr 1. Klasy satelitarnego DNA (cyt. za: [24])

Klasa satelitarnego DNA	**Całkowita długość sekwencji**	**Rozmiar powtarzającego się motywu**	**Lokalizacja**
Mikrosatelitarny DNA	Bloki zazwyczaj krótsze od 150 pz	1–5 pz	Cały genom
Minisatelitarny DNA	Bloki 0,1–20 kpz	6–64 pz	Telomery
Telomerowy	Zmienna	6 pz	Telomery
Hiperzmienny	Zmienna	9–64 pz	Zwykle w okolicy telomerów
Satelitarny DNA	Bloki 100 kpz – kilka Mpz	5–171 pz	Głównie centromery
Alfa	Zmienna	171 pz	Heterochromatyna centromerowa wszystkich chromosomów
Beta	Zmienna	68 pz	Heterochromatyna centromerowa chromosomów 1, 9, 13, 14, 15, 21, 22, Y
DNA satelitarny 1	Zmienna	25–48 pz	Heterochromatyna centromerowa większości chromosomów
DNA satelitarny 2	Zmienna	5 pz	Większość chromosomów
DNA satelitarny 3	Zmienna	5 pz	Większość chromosomów
Megasatelitarny DNA	Bloki do kilkuset pz	Kilka – kilkanaście kpz	Różne miejsca

1.6.3. Kompleksy białek biorące udział w naprawie błędów parowania zasad

Naprawa niezgodności parowania zasad (*mismatch repair* – MMR) dokonywana jest u ludzi przez kompleksy białek kodowane przez 5 genów analogicznych do MutS występujących u bakterii (hMSH2–hMSH6) oraz kilka genów homologicznych do MutL (hMLH1, hMLH3, hPMS1, hPMS2) [25, 26].

Białka MMR funkcjonują jako heterodimery – odpowiedniki bakteryjnego kompleksu MutS składającego się z dimeru białek hMSH2/hMSH6 (MutSa) oraz dimeru białek hMSH2/hMSH3 (MutSb). hMLH1 tworzy trzy heterodimery z hMLH3, hPMS1 i hPMS2. Spośród nich dimer hMLH1/hPMS2 (MutL) odgrywa zasadniczą rolę w naprawie niezgodności parowania zasad [25, 27].

Białko hMSH2 to białko MMR, które jest niezbędne w rozpoznawaniu pętli DNA tworzących się podczas zaburzenia prawidłowej replikacji materiału genetycznego. Białko to ma zdolność wiązania ATP, a w jego pobliżu działa molekularna obejma (ang. *clamp*), dzięki której możliwe jest przyłączenie DNA. Heterodimer złożony z hMSH2 i hMSH6 ma zdolność do przesuwania się wzdłuż cząsteczki DNA aż do napotkania nieprawidłowej struktury, np. pętli, gdzie się zatrzymuje. Dochodzi do wymiany cząsteczki ADP na ATP, a to z kolei indukuje zmianę konformacji przestrzennej hMSH2/hMSH6 oraz przyłączenie nici DNA. Hydroliza ATP umożliwia uwolnienie łańcucha DNA [26].

Białko hMLH1 zbudowane jest z dwóch głównych domen. N-koniec charakteryzuje się aktywnością ATPazy, która wymaga wiązania jonów Mg^{2+} i składa się z 390 aminokwasów. Na C-końcu znajduje się miejsce przyłączania homologów hMLH1 oraz białek innych rodzin, takich jak:

1. Kompleks BASC tworzony przez MSH2, MSH6, MLH1, ATM, BLM, czynnik replikacyjny C oraz kompleks RAD50–hMRE11–NBS1. Komponenty tego systemu mają za zadanie pełnić funkcję „stróża molekularnego" rozpoznającego i informującego o występowaniu uszkodzeń i nieprawidłowych struktur DNA.

2. Kompleks ATP–kinazy GHKL. Struktura, w obrębie której ATPaza utrzymuje cząsteczkę ATP, jest elementem wspólnym dla białka hMLH1, klasy gyraz z rodziny topoizomeraz, chaperonu HSp90 i innych białek kompleksu MutL. Białka te mogą być określone jako superrodzina ATPaz/kinaz GHKL.

1.6.4. Mechanizm powstawania niestabilności mikrosatelitarnego DNA

W *loci* mikrosatelitarnych mutacje występują z częstością od zera do 3 x 10^{-3} [28, 29]. Powszechnie przyjmuje się, iż przyczyną zmian długości nie jest niezrównoważony mechanizm *crossover* stanowiący główną przyczynę mutacji satelitów i minisatelitów, ale ześlizgiwanie się polimerazy DNA w czasie tworzenia komplementarnej nici na powtarzających się odcinkach [17, 30].

W mechanizmie tym może dojść zarówno do wbudowania, jak i pominięcia dodatkowych nukleotydów, czego efektem jest odpowiednio wydłużenie lub skrócenie całej sekwencji.

Poprawność parowania zasad na komplementarnych niciach DNA kontrolowana jest przez kompleks wyspecjalizowanych białek, których nieprawidłowe funkcjonowanie odgrywa istotną i znaczącą rolę w procesie karcynogenezy. Błędy parowania rozpoznawane są przez przynajmniej dwa kompleksy białkowe. Pierwszy z nich zbudowany jest z hMSH2 i hMSH6, drugi z hMSH2 i hMSH3.

W przypadku wykrycia nieprawidłowości przez ww. kompleksy dochodzi do uaktywnienia białek hMLH1 oraz PMS, które rozpoczynają rekrutację kompleksu białkowego zbudowanego m.in. z helikazy, egzonukleazy, a także polimerazy DNA. Kompleks ten z kolei naprawia błędy w kodzie DNA [25, 26, 30].

Do wystąpienia niestabilności mikrosatelitarnego DNA w trakcie karcynogenezy może dochodzić także w odmienny od przedstawionego powyżej sposób. Mianowicie, ekspresja genów odpowiedzialnych za naprawę błędów parowania zasad (np. MLH1) może być hamowana na skutek mutacji

punktowej, delecji (obserwowanej jako utrata heterozygotyczności [LOH]), ale także metylacji DNA [19, 20]. Szczególnie łatwo ulegają metylacji sekwencje dinukleotydowe CpG. Jeśli w regionie promotora genu (jak np. w przypadku hMLH1) występuje łańcuch CpG, łatwo może dojść do metylacji, co skutkuje zahamowaniem ekspresji genu [21].

Do zaburzenia wzoru metylacji genomu dochodzi w wielu nowotworach, np. w raku jelita grubego opisano ją w 84% guzów wykazujących niestabilność mikrosatelitów [22]. Tego typu zaburzenie wyłączające ekspresję genu jest mechanizmem epigenetycznym, a więc niezmieniającym sekwencji DNA.

Niestabilność mikrosatelitarna występuje nie tylko w regionach niekodujących genomu, ale także w obrębie genów zawierających sekwencje mikrosatelitarne, takich jak np. BAX, hMSH6, i zazwyczaj prowadzi do zaburzenia ekspresji lub nawet jej zahamowania.

U chorych z zespołem Lyncha (*hereditary non-polyposis colorectal cancer* – HNPCC) stwierdzono wrodzone mutacje w obrębie genów hMSH2 i hMLH1, których skutkiem jest konstytutywna dysfunkcja kompleksu białkowego naprawiającego błędy polimerazy [31]. W DNA chorych z zespołem Lyncha w wielu *loci* występuje niestabilność mikrosatelitów.

Według aktualnie obowiązujących kryteriów opublikowanych przez National Cancer Institue Workshop sporadyczne polipy jelita grubego wykazujące niestabilność mikrosatelitów (*micorsatellite instabilty* – MSI) dzieli się na polipy z niestabilnością mikrosatelitarnego DNA niskiego stopnia (MSI-L) oraz z niestabilnością mikrosatelitarnego DNA wysokiego stopnia (MSI - H) [32]. Podział ten zależy od tego, czy niestabilność stwierdza się w więcej bądź mniej niż 30–40% przebadanych *loci*. Polipy niewykazujące niestabilności określa się jako stabilne mikrosatelitarnie (*microsatellite stability* – MSS).

1.7. Niestabilność chromosomalna

W czasie podziału komórki może dochodzić do nieprawidłowości w rozdziale materiału genetycznego pomiędzy komórki potomne na poziomie chromosomalnym. Skutkuje to niewłaściwym podziałem chromosomów w całości bądź we fragmencie, a co za tym idzie – nieprawidłową liczbą chromosomów w komórkach potomnych. Opisane wyżej zjawisko określane jest mianem niestabilności chromosomalnej.

Fearon i Vogelstein zaproponowali wieloetapowy model karcynogenezy raka jelita grubego. Zmiany zapoczątkowywane są mutacją w genie APC (*adenomatous polyposis coli gene*) zachodzącą we wczesnym stadium rozwoju polipów gruczolakowych jelita grubego. Następnie wraz ze wzrostem gruczolaka pojawiają się mutacje genu K-ras, co prowadzi do przejścia w zmianę o charakterze gruczolakoraka. W tym stadium dochodzi dodatkowo do takich przemian, jak mutacja genu p53 oraz delecja długiego ramienia chromosomu 18 (18q) [1].

Ten szereg zdarzeń związanych z utratą alleli w obrębie chromosomów 5q (APC), 7p (p53) oraz 18q (DCC/SMAD4) określany jest ścieżką niestabilności chromosomalnej (*chromosomal instability pathway* – CIN).

1.8. Inne zaburzenia genetyczne na szlaku przemian gruczolak–gruczolakorak

1.8.1. Zaburzenia w obrębie genu APC

APC jest genem supresorowym zlokalizowanym na chromosomie 5q. Jego mutacja germinalna prowadzi do rozwoju rodzinnej polipowatości gruczolakowej [33, 34]. Białko APC, stanowiące część ścieżki sygnałowej WNT, w normalnych warunkach wiąże się z β-kateniną, tworząc kompleks z aksyną i GSK-3 β, który podlega degradacji poprzez ubikwitylację [35–37].

β-katenina, nieinaktywowana na drodze ubikwitylacji, przemieszcza się z okolic błony komórkowej do jądra, gdzie prowadzi do zainicjowania

transkrypcji licznych genów odpowiedzialnych za wzrost i inwazję nowotworów.

Mutacje genu APC identyfikowane są w około 30–70% sporadycznych gruczolaków i w 34–72% sporadycznych gruczolakoraków jelita grubego [38–42].

1.8.2. Zaburzenia w obrębie genu p53

p53 jest genem supresorowym, który najczęściej ulega mutacjom w różnych guzach nowotworowych przewodu pokarmowego. Białko p53 odpowiada za zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. Pojawienie się w gruczolaku jelita grubego mutacji genu p53 zazwyczaj wiąże się z przemianą gruczolaka w gruczolakoraka [1]. Większość mutacji p53 to mutacje typu zmiany sensu (zamiana GC na AT), zachodzące najczęściej w kodonach 175, 245, 248, 273 i 282 [43].

Mutacje p53 identyfikowane są w 40–50% sporadycznych gruczolakoraków jelita grubego; częściej dotyczą zmian zlokalizowanych w dystalnych odcinkach jelita grubego, takich jak esica czy odbytnica [44, 45]. Uważa się, że chorzy na raka jelita grubego, ze stwierdzonymi mutacjami genu p53, obarczeni mogą być gorszym rokowaniem mierzonym odsetkiem przeżyć pięcioletnich aniżeli osoby na raka jelita grubego, w którego komórkach nie można wykazać tego typu mutacji [46].

1.8.3. Zaburzenia w obrębie genu K-ras

Mutacje genu K-ras wykazano w licznych nowotworach złośliwych przewodu pokarmowego, najczęściej w raku jelita grubego, trzustki i dróg żółciowych.

Obserwowane są także w 15–68% sporadycznych gruczolaków jelita grubego oraz w 40–65% raków jelita grubego [47–49]. Mutacje tego genu zachodzą najczęściej w kodonach 12, 13 i 64.

Zmutowane białko K-ras aktywuje liczne drogi efektorowe, które prowadzą do niekontrolowanego wzrostu komórek, oraz związane jest z zaburzeniem dróg komunikacji międzykomórkowej.

1.8.4. Zaburzenia w obrębie DCC/SMAD

Utrata allela na chromosomie 18q obserwowana jest w około 70% gruczolakoraków jelita grubego, szczególnie w stadiach o wysokim zaawansowaniu, niejednokrotnie w chwili stwierdzenia ognisk odległych o charakterze przerzutów w wątrobie [1]. Punktowe mutacje genu DCC stwierdzono w około 6% raków jelita grubego [50].

1.8.5. Ścieżka gruczolaka ząbkowanego

Uwagę badaczy zajmujących się tematyką zmian genetycznych leżących u podstaw rozwoju raka jelita grubego zwracają ostatnimi czasy polipy hiperplastyczne oraz zmiany o typie *adenoma serratum*. Te ostatnie to zmiany o wyglądzie polipów hiperplastycznych, mające jednak w swoim utkaniu cechy charakterystyczne dla gruczolaków. Badania dowodzą, że nawet 30–50% zmian o typie *adenoma serratum* może cechować się utratą heterozygotyczności (zazwyczaj o typie MSI-L) powiązaną z małym odsetkiem mutacji genu K-ras i APC [42, 51, 52].

1.8.6. Ścieżka epigenetyczna

Kilka badań z pogranicza patologii i biologii molekularnej dowodzi, że w rozwoju raka jelita grubego istotną rolę odgrywają zmiany związane z pojawieniem się hipermetylacji kodujących sekwencji DNA w rejonie 5'. Wiąże się to z obecnością licznych wysp CpG, co prowadzi do tzw. wyciszenia genów znajdujących się w pobliżu końca objętego hipermetylacją. Jest to tzw. teoria epigenetyczna.

Gruczolakoraki, w których wykrywa się hipermetylację, opisywane są jako CIMP-pozytywne. Genem, w pobliżu którego często dochodzi do hipermetylacji, jest hMLH1. Takie zaburzenie prowadzi do pojawienia się fenotypu typowego dla MSI-H [53].

1.9. Genetycznie uwarunkowane zespoły związane z większym ryzykiem zachorowania na raka jelita grubego

1.9.1. Rodzinna polipowatość gruczolakowa

Rodzinna polipowatość gruczolakowa jelita grubego (*familial adenomatous polyposis* – FAP) jest chorobą dziedziczoną w sposób autosomalny dominujący. Charakteryzuje się występowaniem w jelicie grubym znacznej liczby polipów gruczolakowych (>100). Częstość występowania FAP określa się na 1:10 000 urodzeń. Szacuje się, że FAP stanowi około 1% wszystkich zachorowań na raka jelita grubego.

Wystąpienie FAP związane jest z mutacją jednego z dwóch alleli genu APC zlokalizowanego w chromosomie 5q21.

Występujące w tej chorobie polipy jelita grubego mają zazwyczaj utkanie gruczolaków cewkowych, rzadziej gruczolaków kosmkowych.

Charakterystyczną cechą FAP jest występowanie zmian pozaokrężniczych obejmujących: guzy włókniste (*fibroma desmoides*), torbiele epidermoidalne, kostniaki, zębiaki, wrodzony przerost nabłonka pigmentowego siatkówki (*congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium* – CHRPE) oraz polipy innych odcinków przewodu pokarmowego (np. brodawki Vatera, żołądka, dwunastnicy).

Nosicieli zmutowanego genu APC można zidentyfikować z wykorzystaniem analizy sprzężeń genetycznych lub bezpośredniej analizy mutacji (np. test przedwczesnej terminacji translacji [*protein truncation test* – PTT]).

1.9.2. Poronna rodzinna polipowatość gruczolakowa

Poronna rodzinna polipowatość gruczolakowa (*attenuated familial adenomatous polyposis* – AFAP) to przebiegający podobnie jak FAP zespół chorobowy, lecz charakteryzujący się występowaniem mniejszej liczby polipów jelita grubego (5–100).

Choroba ta jest związana z germinalną mutacją genu APC prowadzącą do produkcji skróconego białka APC.

Rozwijające się w przypadku AFAP polipy jelita grubego lokalizują się zazwyczaj proksymalnie od zgięcia śledzionowego, mają morfologiczny wygląd zmian płaskich i przysadzistych.

U chorych na AFAP występują zmiany pozaokrężnicze o typie niezłośliwych polipów żołądka, gruczolaków i raków okolicy okołobrodawkowej, wątrobiaka zarodkowego i raka sutka.

1.9.3. Zespół Turcota

Choroba związana z jednoczesnym występowaniem polipowatości jelita grubego i guzów mózgu, rozwijająca się zazwyczaj w pierwszej lub drugiej dekadzie życia, nosi nazwę zespołu Turcota (*brain tumors–polyposis*). Zmiany obserwowane w jelicie grubym mają charakter pojedynczych lub mnogich polipów gruczolakowych.

W I typie zespołu stwierdza się glejaki mózgu (80%) oraz niewielką liczbę gruczolaków okrężnicy bez polipowatości. Zespół Turcota typu II w 60% przypadków dotyczy chorych z nabłoniakami rdzeniowymi współistniejącymi z FAP. U osób z zespołem Turcota typu II zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym pojawiają się przed wystąpieniem polipowatości.

1.9.4. Dziedziczny rak jelita grubego bez polipowatości

Dziedziczny rak jelita grubego bez polipowatości (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*), nazywany także zespołem Lyncha, to dziedziczona autosomalnie dominująco choroba predysponująca do rozwoju raka jelita grubego [31].

Rak jelita grubego rozwija się zazwyczaj w prawej połowie okrężnicy u osób w wieku 40–50 lat.

Można wyróżnić dwa typy tej choroby: zespół Lyncha I wiąże się z występowaniem raka jelita grubego w kątnicy, wstępnicy i poprzecznicy

bez polipowatości oraz zespół Lyncha II, który wiąże się z występowaniem raka okrężnicy oraz nowotworów pozaokrężniczych, takich jak rak: trzonu macicy, jajników, sutka, żołądka, jelita cienkiego, wątroby, dróg żółciowych, dróg moczowych. Genetyczne podłoże HNPCC stanowią mutacje terminalne w genach MMR odpowiedzialnych za rozpoznawanie i naprawę uszkodzonych nukleotydów DNA. Charakterystyczny fenotyp RER+ zwany jest także niestabilnością mikrosatelitarną (MSI). Uwidacznia się na skutek mutacji terminalnej jednego allela MMR wraz z mutacją somatyczną drugiego allela. Uważa się, że z HNPCC mają związek cztery geny MMR: hMSH2, hMLH1, hPMS1 oraz hPMS2 [54]. W 1990 r. opracowane zostały tzw. kryteria amsterdamskie rozpoznania HNPCC (tabela nr 2).

Tabela nr 2. Kryteria amsterdamskie

Kryteria amsterdamskie
Wystąpienie raka jelita grubego u co najmniej trzech krewnych, z których jeden jest w pierwszym stopniu pokrewieństwa z pozostałymi dwoma; wszystkie przypadki raka zostały zweryfikowane histopatologicznie.
Co najmniej dwie z tych osób to krewni pierwszego stopnia w dwóch różnych pokoleniach.
Przynajmniej u jednej z tych osób rozpoznano raka jelita grubego przed 50 rokiem życia.
U badanej osoby wykluczono zespół rodzinnej polipowatości gruczolakowej.

2. Założenia i cele pracy

Proces przemiany gruczolaka jelita grubego w raka jest często przedstawiany w literaturze jako model kilkustopniowej karcynogenezy, w której główną rolę odgrywają zaburzenia w funkcjonowaniu onkogenów i genów supresorowych [1, 17, 18]. Najczęściej wymienia się mutacje genów APC, p53 i K-ras oraz utratę alleli w obrębie chromosomów 5q, 17p, 18q, 1p, 8p, 22q [44, 47, 55–57]. Nie można jednak pominąć doniesień podnoszących istnienie dwóch głównych ścieżek genetycznych wyjaśniających procesy zachodzące podczas przemian gruczolaka w raka jelita grubego – teorii niestabilności chromosomowej oraz niestabilności mikrosatelitarnego DNA. Niestabilność chromosomowa jest często spotykana w połączeniu z utratą heterozygotyczności *loci* genów odpowiedzialnych za powstanie nowotworów lub mutacjami genów p53 oraz K-ras. Aneuploidia często uznawana jest jako wskaźnik podatności polipów jelita grubego na zezłośliwienie i przejście utkania gruczolaka w raka. Większość polipów jelita grubego w Europie wykazuje zmiany w genotypie tworzących je komórek o charakterze utraty heterozygotyczności [27]. Niestabilność genomu jest rezultatem zaburzeń, które występują w działaniu mechanizmów sprawdzających dokładność parowania zasad w czasie replikacji DNA lub mechanizmów naprawczych. W takiej sytuacji może dojść do niekontrolowanego skrócenia lub wydłużenia łańcucha nukleotydowego. Zjawisko to szczególnie łatwo występuje w rejonach składających się z dużej liczby powtarzalnych, krótkich sekwencji DNA, zwanych mikrosatelitami.

Jak wykazują badania epidemiologiczne, problem chorób jelita grubego w coraz większym stopniu dotyczy polskiego społeczeństwa [4]. Jest to zapewne związane ze zmianą trybu życia.

Dostępne są liczne wyniki badań analizujących zjawisko niestabilności mikrosatelitarnego DNA w nowotworach jelita grubego. Powszechnie akceptowana jest teoria tłumacząca rozwój raka jelita grubego na podłożu gruczolaków. W tych warunkach zyskuje na znaczeniu dokładne poznanie istoty zmian zachodzących w polipach jelita grubego, bezpośrednio

poprzedzających wystąpienie nowotworu, dlatego podjęto badania, których celem było:

1. Określenie częstości występowania poszczególnych typów histopatologicznych wśród polipów gruczolakowych jelita grubego.

2. Określenie częstości występowania poszczególnych stopni dysplazji oraz zbadanie, czy ich występowanie wiąże się z typem histopatologicznym polipów gruczolakowych jelita grubego.

3. Określenie częstości występowania niestabilności mikrosatelitarnego DNA w polipach gruczolakowych jelita grubego oraz zbadanie, czy jej występowanie wiąże się z wiekiem, płcią chorych i lokalizacją gruczolaków.

4. Wskazanie grup chorych zagrożonych zwiększonym ryzykiem pojawienia się nowych polipów jelita grubego.

3. Materiał

W okresie od czerwca 2004 r. do lutego 2007 r. w II Katedrze Chirurgii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wykonano kolonoskopię u 2880 osób (tj. u 1764 kobiet i u 1116 mężczyzn). Polipy gruczolakowe jelita grubego wykryto u 259 z nich (8,99%). Dalszymi badaniami objęto grupę 97 osób, które – świadomie i dobrowolnie – wyraziły zgodę na udział w nich, u których usunięto łącznie 207 polipów gruczolakowych jelita grubego oraz u których uzyskane z wywiadu i dokumentacji medycznej dane kliniczne nie wskazywały na rodzinne występowanie raka jelita grubego ani żadnego innego nowotworu przewodu pokarmowego.

Tabela nr 3. Charakterystyka demograficzna badanej grupy

Płeć	Liczba osób (n)	Przedział wieku (lata)	Średni wiek (lata)	Odchylenie standardowe (lata)
Kobiety	30	42–93	65	10,4
Mężczyźni	67	41–86	65,3	10,6
Łącznie	**97**	**41–93**	**65,1**	**10,5**

W badanej grupie znalazło się 30 kobiet w średniej wieku 65 lat oraz 67 mężczyzn w średniej wieku 65,3 lat; dla całej grupy 97 osób średnia wieku wynosiła 65,1 lat (tabela nr 3).

4. Metodyka

4.1. Wywiad

Z każdym chorym przed włączeniem do badania przeprowadzono pełny, układowy wywiad lekarski, ze szczególnym uwzględnieniem objawów związanych z funkcjonowaniem przewodu pokarmowego, oraz wywiad rodzinny w celu wykluczenia rodzinnego występowania raka jelita grubego, zespołu rodzinnej polipowatości jelita grubego oraz rodzinnego niedziedzicznego raka jelita grubego. Chorym zadawano także pytania dotyczące przyjmowanych leków. Każda osoba została przed włączeniem do badania poinformowana o jego istocie, planie oraz o możliwych powikłaniach związanych z wykonaniem kolonoskopii i endoskopowej polipektomii, a na udział w badaniu wyrażała pisemną zgodę.

4.2. Badanie fizykalne

Wykonanie kolonoskopii poprzedzane było badaniem fizykalnym, które obejmowało ocenę układu krążenia i układu oddechowego oraz badanie jamy brzusznej (w tym badanie palcem przez odbyt). Protokół badania fizykalnego stanowił integralną część dokumentacji projektu badawczego.

4.3. Badania pracowniane

Przed zakwalifikowaniem do kolonoskopii chorym pobierano krew obwodową w celu wykonania takich badań, jak: morfologia krwi z obrazem odsetkowym leukocytów, badania biochemiczne obejmujące oznaczenie w osoczu stężenia glukozy, mocznika, sodu i potasu oraz badania wirusologiczne na obecność antygenu HBsAg i przeciwciał antyHCV.

4.4. Kolonoskopia

4.4.1. Przygotowanie do kolonoskopii

Chorzy byli przygotowywani do kolonoskopii z wykorzystaniem roztworu Fleet Phospho-Soda® w trybie ambulatoryjnym. W dniu poprzedzającym badanie o godzinie 7:00 zamiast śniadania wypijali co najmniej jedną szklankę niegazowanej wody mineralnej. O godzinie 8:00 mieszali zawartość pierwszej butelki preparatu Fleet Phospho-Soda® o objętości 45 ml ze 120 ml zimnej wody, a otrzymany w ten sposób roztwór popijali 250 ml wody. O godzinie 13:00 zamiast obiadu wypijali trzy pełne szklanki niegazowanej wody mineralnej, a o godzinie 19:00 jedną szklankę wody oraz roztwór Fleet Phospho-Soda® z drugiej (fabrycznie zapakowanej) butelki. Chorzy odczuwający pragnienie mogli pić wodę lub inne płyny do godziny 3:00. Następnego dnia w godzinach 8:00–13:30 przeprowadzano badanie endoskopowe.

4.4.2. Badanie kolonoskopowe

Kolonoskopię wykonywano wideoendoskopem firmy Olympus (modele CF-Q145L lub CF-Q165L) podłączonym do toru wizyjnego zbudowanego z wideoprocesora CV160 oraz źródła światła kryptonowego CLV 160. Obraz analizowano na monitorze firmy Sony (model Trinitron HD) o przekątnej ekranu 23 cale, a do zapisu wybranych obrazów użyto cyfrowego wideorejestratora firmy Panasonic, umożliwiającego zapis w standardzie DVD.

U części chorych kolonoskopię przeprowadzano w analgosedacji po dożylnym podaniu leków w dawkach frakcjonowanych. W tym celu stosowano krótko działającą benzodiazepinę – midazolam w dawce 2–7 mg, a u osób w wieku powyżej 65 lat nie większej niż 4 mg, oraz w kolejnych dawkach frakcjonowanych po 0,5–1 mg.

Innym stosowanym lekiem był fentanyl w dawkach frakcjonowanych 0,1–0,3 mg. Spośród leków nasennych używano propofol, podawany dożylnie

w dawce 0,5–1,5–3 mg/kg m.c. Dawkę dobierano w zależności od wieku, masy ciała, stanu układu krążenia. Wszystkie badania w analgosedacji przeprowadzono z udziałem specjalisty w dziedzinie anestezjologii i intensywnej terapii. Pracownia Endoskopii II Katedry Chirurgii CM UJ wyposażona jest w aparat do znieczulenia ogólnego, centralne źródło tlenu, zestaw do intubacji dotchawiczej oraz monitor podstawowych funkcji życiowych firmy Mennen Medical (model Ennvoy) umożliwiający: nieinwazyjny pomiar ciśnienia tętniczego krwi (*non-invasive blood pressure* – NIBP), zapis elektrokardiograficzny oraz pomiar i zapis tętna i saturacji krwi (pulsoksymetria).

Kolonoskopy były po każdym badaniu dezynfekowane w myjni automatycznej Olympus ETD2.

Wszystkie używane w trakcie zabiegów akcesoria endoskopowe były sterylnymi i fabrycznie zapakowanymi narzędziami jednorazowymi.

Kolonoskopię rozpoczynano w ułożeniu lewobocznym Simsa od badania palcem przez odbyt. Końcówkę instrumentu pokrytą żelem z 1% lidokainą wprowadzano do odbytnicy. Dalsze etapy badania prowadzone były pod kontrolą wzroku. Po dojściu endoskopu do kątnicy z uwidocznieniem zastawki Bauhina i podstawy wyrostka robaczkowego rozpoczynano drugi etap badania – wysuwanie instrumentu, w czasie którego dokonywano oceny błony śluzowej jelita grubego. Mierzono czas od chwili rozpoczęcia wycofywania się do chwili usunięcia endoskopu z odbytnicy. Czas ten wynosił średnio 10 minut i zawierał się w przedziale 8–14 minut. W przypadku stwierdzenia obecności polipa określano jego lokalizację, typ morfologiczny (siedzący *vs* uszypułowany), średnicę i odległość od odbytu (z wykorzystaniem podziałki centymetrowej umieszczonej na pancerzu endoskopu). Dane te były podstawą do kwalifikacji do jednego z rodzajów polipektomii endoskopowej.

4.4.3. Kolonoskopowa polipektomia

Polipy, których średnica nie przekraczała 10 mm, kwalifikowano do polipektomii z użyciem kleszczyków biopsyjnych. Zmiany uszypułowane o średnicy do 20 mm usuwano pętlą podłączoną do generatora diatermicznego. Wykorzystywano zestaw firmy ERBE składający się z diatermii VIO 300D, rozbudowany o przystawkę argonową APC2. Zmiany uszypułowane, których średnica przekraczała 20 mm, zaopatrywano w pierwszym etapie, zakładając u podstawy szypuły elastyczny ligator EndoLoop® firmy Olympus, a następnie odcinano pętlą podłączoną do generatora diatermicznego. Polipy siedzące przed odcięciem podstrzykiwano u podstawy roztworem adrenaliny (1 ml leku w 1 ml 10% roztworu NaCl oraz 8 ml 0,9% roztworu NaCl). Tak wytworzona pseudoszypuła umożliwiała bezpieczną polipektomię pętlą koagulacyjną.

Stosowano również metodę polipektomii kęsowej. Odcięte polipy usuwano w koszykach do ewakuacji ciał obcych lub siateczkach RothNet®.

Chorym, u których wykonano endoskopową polipektomię, pobierano z żyły obwodowej 4,7 ml krwi żylnej (do probówki próżniowej z EDTA), którą wraz z usuniętym polipem przekazywano do Katedry Patomorfologii CM UJ.

Po zabiegu polipektomii chorzy poddawani byli kilkugodzinnemu nadzorowi w warunkach sali obserwacyjnej.

Wszystkim chorym poddanym endoskopowej polipektomii zaproponowano wykonanie kolonoskopii kontrolnej po 90–360 dniach po pierwszym badaniu.

4.5. Badanie usuniętych polipów

Po usunięciu polipa dokonywano oceny makroskopowej radykalności zabiegu. Mierzono średnicę polipa oraz określano długość szypuły. Niezwłocznie po dokonaniu pomiarów umieszczano go w 0,9% roztworze NaCl.

Czas, jaki mijał od chwili usunięcia polipa do chwili pobrania i zabezpieczenia materiału do badań w Katedrze Patomorfologii CM UJ,

wynosił średnio 16 minut i zawierał się w przedziale 8–18 minut. Fragment polipa zabezpieczano do dalszych badań molekularnych oraz rozpoczynano rutynowe utrwalenie i przygotowanie do badań histopatologicznych. Fragmenty tkanek przeznaczone do badań molekularnych oraz krew obwodową zamrażano bezpośrednio po dostarczeniu w temperaturze –80°C. Fragmenty tkanek przeznaczone do badań histopatologicznych poddawano rytynowej preparatyce.

4.5.1. Przygotowanie i ocena preparatów histopatologicznych

Wszystkie polipy usunięte podczas kolonoskopowej polipektomii poddawane były rutynowej preparatyce histopatologicznej. Po ich utrwaleniu w kostkach parafinowych wykonano typowe barwienie hematoksyliną i eozyną, a następnie oceniano typ histopatologiczny polipa. Polipy gruczolakowe zaliczano na podstawie obrazu mikroskopowego do jednego z typów (gruczolaki: cewkowy, kosmkowy, cewkowo-kosmkowy) oraz oceniano stopień zróżnicowania (mały, średni, duży).

4.5.2. Badania molekularne

Do badań przeprowadzonych w Katedrze Patomorfologii CM UJ wykorzystywano wycinki z polipów gruczolakowych oraz próbkę krwi obwodowej zamrażane bezpośrednio po otrzymaniu w temperaturze –80°C.

Ekstrakcję DNA wykonywano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu QIAmp Mini Kit (firmy Qiagen), nieznacznie modyfikując oryginalny protokół (tabela nr 4).

Tabela nr 4. Protokół ekstrakcji DNA ze świeżego materiału tkankowego

1. W półtoramililitrowej probówce umieścić 20 mg rozdrobnionej tkanki i dodać 180 µl buforu ATL.
2. Do probówki dodać 20 µl proteinazy K, zmieszać i inkubować w temperaturze 56°C, aż do zupełnej lizy tkanki.
3. Krótko wirować i dodać 200 µl buforu AL, mieszać przez 15 s, następnie inkubować w temperaturze 70°C przez 10 min i odwirować.
4. Dodać 200 µl 96% etanolu, zamieszać i odwirować.
5. Mieszaninę starannie przelać do kolumny separacyjnej QIAmp, zamknąć i wirować w warunkach 6000 g (8000 obrotów/min) przez 1 min; przefiltrowany roztwór zlać.
6. Do kolumny filtracyjnej dodać 500 µl roztworu buforu AW1, zamknąć i wirować w warunkach 6000 g (8000 obrotów/min) przez 1 min; przefiltrowany roztwór zlać.
7. Do kolumny filtracyjnej dodać 500 µl roztworu buforu AW2, zamknąć i wirować w warunkach 20 000 g (14 000 obrotów/min) przez 3 min; przefiltrowany roztwór zlać.
8. Do kolumny filtracyjnej dodać 200 µl buforu AE, inkubować w temperaturze pokojowej przez 1 min i wirować w warunkach 6000 g (8000 obrotów/min) przez 1 min.
9. Uzyskany roztwór zawierający oczyszczone DNA (10–30 µl) przechowywać w temperaturze +4°C

Wyizolowany materiał DNA wykorzystano jako matrycę w reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR) w celu

amplifikacji badanych fragmentów DNA, z wykorzystaniem panelu dziewięciu primerów (tabela nr 5).

Tabela nr 5. Sekwencja primerów wykorzystanych w badaniu PCR

Primer	**Sekwencja**
T53-Di	5'-HEX-AATTCCCACTGCCACTCCTTG-3' 5'-ATACTATTCAGCCCGAGGTGCGTG-3'
D1S2883	5'-FAM-AAATCTGGTCTTCTGTTTTCACTAT-3' 5'-TTCCAAATGTTGACTCTGC-3'
D7S501	5'-TET-CACCGTTGTGATGGCAGAG-3' 5'-GCCACTCAGGGAAAGGGGAAC-3'
NM23	5'-FAM-TTGACCGGGGTAGAGAACTC-3' 5'TCTCAGTACTTCCCGTGACC-3'
D18S35	5'-TET-AGCTAGATTTTTACTTCTCTG-3' 5'-CTGGTTGTACATGCCTGAC-3'
D3S1611	5'-TAT-ACACGTTACTTCAGTTTGCTC-3' 5'-ATTTGCCACCATGCCTGG-3'
D5S346	5'-FAM-ACTCACTCTAGTGATAAATCG-3' 5'-AGCAGATAAGACAACTATTATAGTT-3'
D2S123	5'-TET-GGACAAAAACAGGATGCCTG-3' 5'-CCCTTTCTGACTTGGATACCATC-3'
TP53-penta	5'-FAM-GAATCCGGGAGGAGGTTG-3' 3'-AACAGCTCCTTTAATGGCAG-3'

We wszystkich przypadkach DNA analizowano pod kątem obecności niestabilności mikrosatelitarnego DNA przy użyciu urządzenia ABI PRISM 310 Genetic Analyser sterowanego oprogramowaniem GeneScan i GenoTyper firmy Applera Corporation. Wykorzystywano panel dziewięciu znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi primerów flankujących sekwencję mikrosatelitarną (tabela nr 6) wokół genów: APC, DCC, NM23, hMLH1, hMSH2, HPC1, MET, p53 (primery dimerowych i pentamerowych sekwencji mikrosatelitarnych).

Zgodnie z zaleceniami WHO, za wysoce niestabilne (MSI-H) przyjmowano polipy wykazujące MSI w przynajmniej 30% badanych *loci*, za polipy MSI-L polipy wykazujące MSI przynajmniej w jednym badanym *locus* z wykluczeniem zmian MSI-H. Pozostałe polipy uznano za polipy mikrosatelitarnie stabilne (MSS).

Tabela nr 6. Zestaw znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi dziewięciu primerów flankujących sekwencje mikrosatelitarne

Marker	Chromosom/gen	Amplikon [pz]	Znacznik primera	Opis markera wg producenta
NM23	17q21/NM23-H1	95–105	FAM/niebieski	Gen supresorowy NM23-H1 koduje dwufosforanową kinazę nukleozydową, której zmniejszoną ekspresję obserwuje się w guzach przerzutowych
D18S35	18q21/DCC	104–126	TET/zielony	Gen supresorowy DCC ulega częściowemu zaburzeniu ekspresji w rakach jelita grubego
TP 53-Dint	17p13/p53	106–138	HEX/żółty	Produkt genu p53 odgrywa zasadniczą rolę w regulacji cyklu komórkowego i zaburzenia jego ekspresji są częste w wielu nowotworach
D2S123	2p16/hMSH2	150–180	TET/zielony	Gen MSH2 koduje białko kontrolujące naprawę niedokładności parowania zasad w DNA; jego mutacja jest związana z występowaniem MSI
TP 53-Penta	17p13/p53	140–175	FAM/niebieski	Produkt genu p53 odgrywa zasadniczą rolę w regulacji cyklu komórkowego i zaburzenia jego ekspresji są częste w wielu nowotworach
D5S346	5q21/APC	107–137	FAM/niebieski	APC to gen supresorowy, którego mutacja jest przyczyną polipowatości okrężnicy
D1S2883	1q24/HPC1	179–199	FAM/niebieski	Mutacje genu HPC1 odgrywaję ważną rolę w rozwoju dziedzicznego raka stercza
D3S1611	3p22/hMLH1	184–200	TET/zielony	Mutacja genu MLH1 jest związana z występowaniem MSI, a także dziedzicznego niepolipowatego raka jelita grubego (HNPCC)
D7S501	7q31/MET	217–233	TET/zielony	Protoonkogen MET koduje kinazę tyrozynową stanowiącą wewnątrzbłonową część receptora dla czynników zrostu hepatocytów

W każdym badanym polipie oprócz niestabilności mikrosatelitarnego DNA (MSI) odnotowywano utratę heterozygotyczności (LOH).

Pierwszym etapem analizy mutacji genu K-ras była amplifikacja wybranych fragmentów genu metodą PCR. Amplifikacji poddano eksony 1, 2 genu K-ras. Dla amplikonów K-ras1, K-ras2 wykorzystano sekwencje primerów opublikowane w literaturze (tabela nr 7) [58].

Tabela nr 7. Sekwencje primerów zastosowane do amplifikacji wybranych fragmentów genów

Gen /ekson	**Para primerów**	**Długość produktu PCR [pz]**	**Ta [°C]**
K-ras1	5'-GACTGAATATAAACTTGTGG 5'-CTGTATCAAAGAATGGTCCT	163	55
K-ras2	5'-GACTGTGTTTCTCCCTTCT 5'-TGGCAAATACACAAAGAAAG	161	55

Reakcję amplifikacji dla amplikonów K-ras1, K-ras2 przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej o składzie:

- 12,78 µl woda destylowana
- 2 µl bufor RedTaq (10x stężony; zawiera 11 mM $MgCl_2$) (Sigma-Aldrich)
- 0,4 µl dNTP (10 mM)
- 0,32 µl $MgCl_2$ (25 mM) (stężenie w mieszaninie 1,5 mM)
- 1 µl primer F (20 µM)
- 1 µl primer R (20 µM)
- 0,5 µl polimeraza RedTaq (1 U/µl) (Sigma-Aldrich)
- 2 µl DNA.

Warunki termiczne dla tych reakcji były następujące (Termocykler T3; Biometra GmbH):

95°C – 5 minut

95°C – 30 sekund
Ta°C – 30 sekund
72°C – 30 sekund
} 35 cykli

72°C – 7 minut

Obecność produktów reakcji PCR sprawdzano poprzez elektroforezę na 2% żelu agarozowym (110 V; 15 minut).

Kolejnym etapem wykrywania mutacji była analiza SSCP (*single-stranded conformational polymorphism*). Jednoniciowy DNA przybiera konformację przestrzenną zależną od sekwencji zasad. Mobilność elektroforetyczna takich fragmentów zależy od ich konformacji. W tej metodzie wykorzystuje się odmienną migrację elektroforetyczną jednoniciowych fragmentów DNA różniących się konformacją, a tym samym sekwencją. Istotne jest zachowanie stałych, niedenaturujących warunków elektroforezy, tak aby jednoniciowe fragmenty DNA zachowały właściwą sobie konformację.

Produkt PCR (5 µl) wymieszano z 5 µl formamidu (Applera Corporation) i poddano denaturacji w 95°C przez 10 minut. Dodanie formamidu zapobiegało odtwarzaniu wiązań wodorowych między komplementarnymi fragmentami. Próbki przenoszono następnie na lód na co najmniej 5 minut. Po schłodzeniu nakładano próbki na żel MDE w celu rozdziału elektroforetycznego. Sposób przygotowania żeli przedstawiono poniżej:

- 5,6 ml buforu TBE 5x
- 14 ml MDE 2x (Cambrex Inc) – żel 0,8 ml lub 10,5 ml MDE 2x – żel 0,6 ml
- dopełnienie wodą dejonizowaną do 35 ml
- 300 µl 10% APS (Sigma-Aldrich)
- 35 µl TEMED.

Żel polimeryzował przez godzinę między szklanymi płytami.

Elektroforezę przeprowadzono aparatem Protean II XI Cell (Bio-Rad Laboratories) w buforze TBE 1x. Stałą temperaturę żeli osiągnięto poprzez zastosowanie systemu chłodzenia MultiTemp III (Amersham Pharmacia Biotech).

Żele wizualizowano metodą srebrzenia po zakończonej elektroforezie. Warunki zostały zmodyfikowane względem srebrzenia żeli akrylamidowych, stosowanych przy detekcji niestabilności mikrosatelitarnego DNA. Uzyskany obraz prążków odpowiadał migracji jednoniciowych fragmentów DNA. Protokół tej metody przedstawiono poniżej.

Srebrzenie żelu MDE

Po zakończonej elektroforezie żel odklejono od szklanych płyt i umieszczono w kuwecie.

1. Płukanie żelu w 10% etanolu przez 5 minut.
2. Płukanie żelu w 1% kwasie azotowym przez 3 minuty.
3. Płukanie żelu w wodzie destylowanej nie dłużej niż 1 minutę.

4. Płukanie żelu w 0,012 M roztworze azotanu srebra w ciemności przez 20 minut.
5. Płukanie żelu 2 minuty wodą destylowaną.
6. Płukanie żelu w roztworze 0,28 M węglanu sodu nie dłużej niż 1 minutę.
7. Płukanie żelu w roztworze 0,28 M węglanu sodu i formaliny w stężeniu 0,02% (Sigma-Aldrich) do uzyskania ciemnego zabarwienia roztworu. Wymiana roztworu.
8. Płukanie w świeżym, bezbarwnym roztworze węglanu sodu i formaliny (wymiana roztworu w przypadku ciemnego zabarwienia) aż do pojawienia się prążków DNA (15–20 minut).
9. Płukanie żelu w 10% kwasie octowym przez 2 minuty (zatrzymanie reakcji).
10. Płukanie żelu 2 minuty wodą destylowaną.
11. Suszenie żelu w 80°C przez 50 minut.

Wysrebrzony żel przenoszono na bibułę filtracyjną (Whatman) i suszono w suszarce do żeli 583 Gel Dryer (Bio-Rad Laboratories) połączonej z pompą próżniową Hydro-Tech (Bio-Rad Laboratories).

4.6. Analiza statystyczna

W niniejszej pracy zmiennymi zależnymi były:

- wielkość polipa,
- liczba polipów u chorego,
- prawdopodobieństwo wystąpienia nowych polipów u chorego,
- zaburzenia genetyczne MSI i LOH w poszczególnych markerach mikrosatelitarnych.

W toku analizy statystycznej starano się ustalić związek między tymi zmiennymi a płcią chorych, ich wiekiem, lokalizacją polipów, rozpoznaniem histopatologicznym i stopniem dysplazji. Analiza wymienionych powyżej zmiennych zależnych wymagała odmiennych technik statystycznych.

Wstępna analiza wielkości polipów ujawniła, że ich rozkład ma niestabilną wariancję, w związku z tym właściwe modelowanie przeprowadzono nie na danych oryginalnych, lecz na danych przekształconych za pomocą transformacji logarytmicznej. Porównywanie średnich logarytmów naturalnych obliczonych dla badanych grup wiązało się z inną interpretacją oszacowanych parametrów modeli.

W pierwszym wariancie analizowano wszystkie polipy, lecz po stronie zmiennych niezależnych zabrakło w modelu informacji o zaburzeniach genetycznych typu MSI i LOH w poszczególnych markerach. Model ten uwzględniał fakt współzależności niektórych pomiarów – można przypuszczać, że polipy mierzone u danego chorego będą bardziej do siebie podobne pod względem rozmiaru niż polipy pochodzące od dwóch różnych pacjentów [59]. Interpretacje oparto na następującym modelu:

lnsize = rozpoznanie + st_dysplazji + lokalizacja + płeć + ilość + wiek + pojawienie się nowych polipów + chory

gdzie: chory – czynnik losowy; w modelu tym uwzględniono także różny stopień zmienności wielkości polipów w zależności od lokalizacji zmiany

(transformacja logarytmiczna zmniejszyła, lecz nie do końca wyeliminowała problem skorelowania średniej i odchylenia standardowego).

W drugim wariancie przeprowadzono analizę tylko dla tych polipów, w przypadku których wykonano analizę genetyczną (130 polipów). Model statystyczny uwzględniał badanie 10 spośród 11 markerów, gdyż dla jednego z markerów nie stwierdzono obecności zaburzeń o typie MSI lub LOH.

Wartości tych czynników odpowiadały zaburzeniom genetycznym o typie MSI lub LOH, ich współwystępowaniu lub braku zaburzeń o typie MSI lub LOH. Dalej, w ramach tego modelu średnie logarytmy wielkości polipów badano za pomocą kontrastów porównujących zmiany (w danym markerze) ze stanem bez zmian. Interpretacje wyników oparto na następującym modelu statystycznym:

lnsize = rozpoznanie + st_dysplazji + lokalizacja + płeć + ilość + wiek + pojawienie się nowych polipów + K_RAS + DCC + APC + P53PENTA + hMSH2 + NM23 + MET + hMLH1 + P53DI + HPC1 + chory

W trzecim wariancie analizowano ilościowo zaburzenia o typie utraty heterozygotyczności i niestabilności mikrosatelitarnego DNA.

Liczbę polipów u pojedynczego chorego modelowano za pomocą zmodyfikowanego modelu regresji Poissona [60]. Modyfikacja wynika z faktu, że wśród chorych zabrakło osób z zerową liczbą polipów. Tymczasem rozkład Poissona przewiduje możliwość występowania obserwacji z zerową liczbą zliczeń. Brak w grupie osób z zerową liczbą polipów nie wpływa znacząco na dokładność oszacowania parametrów modelu, gdy przeciętna liczba zliczeń jest wysoka. Sytuacja ta jednak nie dotyczy analizowanego problemu. Przyjęto w związku z tym tzw. obcięty rozkład Poissona (*truncated Poisson distribution*). W pracy rozważano wyniki uzyskane z parametryzacji następującego modelu.

Ln (liczba polipów) = wiek + wiek*wiek + płeć + pojawienie się nowych polipów + płeć* pojawienie się nowych polipów

Badanie zaburzeń genetycznych w zakresie LOH i MSI zrealizowano w 4 wariantach.

Wariant 1. Za pomocą regresji logistycznej badano, od czego zależą prawdopodobieństwa skategoryzowanych ogólnych miar stabilności mikrosatelitarnego DNA i utraty heterozygotyczności. Rozważano dwa następujące modele.

logit(MSI_STAT) = płeć + wiek + rozpoznanie + lokalizacja + nawrót + stopień_dysplazji
logit(LOH_STAT) = płeć + wiek + rozpoznanie + lokalizacja + nawrót + stopień_dysplazji

Wariant 2. Skonstruowano dwie ogólne miary stopnia zaburzeń.

Miarę pierwszą otrzymano przez podliczenie, w ilu markerach nastąpiły zaburzenia (nie rozgraniczano, czy zaburzenia te dotyczyły MSI, czy LOH). Każdy z polipów cechował się wartością tego wskaźnika między 0 a 6. Przyjęto, że rozkład tego wskaźnika można scharakteryzować rozkładem wielomianowym porządkowym (*multinomial ordered*) i w odniesieniu do tej nowej zmiennej można zastosować uogólniony model regresji logistycznej [61]. Modelowano prawdopodobieństwo, że w danym polipie zaburzenia dotyczyć będą przynajmniej 1 *locus*.

logit(N zmienionych *loci*) = płeć + rozpoznanie + pojawienie się nowych polipów + stopień_dysplazji + wiek + lokalizacja_polipa

Według drugiej miary stopnia uszkodzenia badanych polipów rozgraniczono zaburzenia typu MSI i LOH i za każdą zmianę polip mógł otrzymać po jednym „punkcie karnym". Rozkład liczby „punktów karnych" zawierał się między 0 a 15. Uznano, że taka rozpiętość pozwala z zadowalającym przybliżeniem zastosować model regresji Poissona.

Modelowano średnią liczbę zaburzeń przypadającą na polip.

ln (liczba mutacji) = płeć + rozpoznanie + pojawienie się nowych polipów + stopień_dysplazji + wiek + lokalizacja_polipa

Wariant 3. Do zbadania, które markery częściej charakteryzowały się wystąpieniem zaburzeń MSI/LOH oraz czy częściej występują zaburzenia w zakresie LOH bądź MSI, użyto modelu regresji logistycznej w odmianie dla powtarzanych pomiarów. Przy parametryzowaniu tego modelu użyto algorytmu GEE (*generalized equation estimatation*). Przyjęto, że strukturę macierzy korelacji między badanymi markerami można zadowalająco przybliżyć za pomocą macierzy złożonej symetrii (*compound symmetry*) [62].

logit(zmiana) = gen + loh_msi + płeć + lokalizacja + rozpoznanie + stopień_dysplazji + wiek

Wariant 4. Do zbadania, czy zaburzenia występujące w poszczególnych markerach są niezależne, czy też współwystępują razem w pewnych stałych grupach, zastosowano tzw. analizę klastrową. Badanie to pozwoliło także ustalić, czy występowanie zaburzenia o typie LOH towarzyszy zaburzeniom typu MSI (w obrębie tego samego markera). Informacje o mutacjach w 9 amplikonach zakodowano w 18 zmiennych tak, że informacja o każdym z markerów była przechowywana w dwóch zmiennych binarnych. Jedna z tych zmiennych przechowywała informację o LOH, druga o MSI. Obliczono podobieństwa pomiędzy wszystkimi 18 zmiennymi (odległości typu Manhatan, grupowanie klastrów przeprowadzono na podstawie algorytmu Warda). Jeśli LOH i MSI współwystępują w jednym markerze częściej niż wynikałoby to z przypadku, wówczas obie zmienne danego markera powinny się znaleźć we wspólnym klastrze końcowym. Jeśli jakieś dwa markery cechują się jednoczesnym wystąpieniem MSI lub LOH, to na diagramie drzewa (forma ilustracji wyników analizy klastrowej) powinny być w położonych blisko siebie klastrach.

Dodatkowo, dla obu typów zaburzeń obliczono oddzielne macierze odległości między markerami. Założono, że jeśli dany typ zaburzenia będzie się pojawiał (lub nie) w obu markerach jednocześnie, to będzie się to przejawiać w wysokiej wartości korelacji miedzy tymi dwiema macierzami. Do badania korelacji między tymi macierzami użyto korelacji Mantela [63].

Do zbadania czynników wpływających na prawdopodobieństwo wystąpienia nowych polipów w jelicie grubym użyto modelu regresji logistycznej [61]. W pracy zostaną przedstawione rezultaty wynikające z przyjęcia następującego modelu:

logit(pojawienie się nowych polipów) = wiek + płeć + MSI_STAT + LOH_STAT

Przyjęto też konwencję, że wartości oczekiwane przedstawiane na wykresach otoczone są 95% przedziałami ufności.

Do analizy statystycznej badanego materiału użyto programów SAS (modele liniowe) i STATISTICA (analiza klastrowa). Korelację Mantela oraz jej istotność obliczono, posługując się programem BIODIVERSITY 4.0.

5. Wyniki

5.1. Liczba usuniętych polipów w badanej grupie

W badanej grupie liczącej 97 osób usunięto łącznie 207 polipów gruczolakowych. W żadnym z tych polipów nie stwierdzono utkania gruczolakoraka. Badania genetyczne przeprowadzono na 130 polipach i ta grupa stanowi przedmiot dalszej analizy. Nieprzebadane genetycznie 77 polipów to zmiany, które nie kwalifikowały się z powodu zbyt małego rozmiaru do badań genetycznych (cały usunięty materiał tkankowy został wykorzystany do badania histopatologicznego).

Wśród 130 przebadanych genetycznie polipów znajdowały się zmiany pochodzące od wszystkich 97 osób.

Tabela nr 8. Minimalna i maksymalna liczba usuniętych polipów

Płeć	Liczba osób (n)	Minimalna liczba usuniętych polipów (n)	Maksymalna liczba usuniętych polipów (n)
Kobiety	30	1	6
Mężczyźni	67	1	8

W grupie 30 kobiet usunięto od 1 do 6 polipów. U 67 mężczyzn wycięto od 1 do 8 polipów (tabela nr 8).

U 1 chorego z analizowanej grupy osób, u których wykonano endoskopową polipektomię, wystąpiło krwawienie z miejsca polipektomii, które opanowano endoskopowo.

5.2. Lokalizacja oraz typ histopatologiczny usuniętych polipów

Tabela nr 9. Lokalizacja oraz typ histopatologiczny usuniętych polipów

Lokalizacja	Stopień dysplazji	Gruczolaki cewkowe	Gruczolaki cewkowo-kosmkowe	Gruczolaki kosmkowe	Łącznie
Kątnica	mały	2	2	0	4
	średni	0	1	0	1
	duży	1	1	1	3
Łącznie w kątnicy		**3**	**4**	**1**	**8**
Wstępnica	mały	3	0	0	3
	średni	1	1	0	2
	duży	0	3	0	3
Łącznie we wstępnicy		**4**	**4**	**0**	**8**
Poprzecznica	mały	7	2	0	9
	średni	7	2	0	9
	duży	4	0	1	5
Łącznie w poprzecznicy		**18**	**4**	**1**	**23**
Zstępnica	mały	7	0	0	7
	średni	3	3	5	11
	duży	2	8	0	10
Łącznie w zstępnicy		**12**	**11**	**5**	**28**
Esica	mały	11	3	0	14
	średni	7	7	0	14
	duży	8	9	4	21
Łącznie w esicy		**26**	**19**	**4**	**49**
Odbytnica	mały	0	1	0	1
	średni	3	2	0	5
	duży	2	4	2	8
Łącznie w odbytnicy		**5**	**7**	**2**	**14**
RAZEM		**68**	**49**	**13**	**130**

W kątnicy zlokalizowanych było 8 polipów gruczolakowych, w tym 3 gruczolaki cewkowe, 4 gruczolaki cewkowo-kosmkowe oraz 1 gruczolak kosmkowy. Wśród 8 gruczolaków usuniętych z wstępnicy 4 to gruczolaki cewkowe, a 4 to gruczolaki cewkowo-kosmkowe. We wstępnicy nie stwierdzono gruczolaków kosmkowych. Z poprzecznicy usunięto 23 gruczolaki, w tym 18 gruczolaków cewkowych, 4 gruczolaki cewkowo-

kosmkowe oraz 1 gruczolak kosmkowy. Ze zstępnicy usunięto 28 polipów gruczolakowych, przy czym 12 gruczolaków cewkowych, 11 gruczolaków cewkowo-kosmkowych oraz 5 gruczolaków kosmkowych.

W esicy zlokalizowanych było 49 polipów gruczolakowych, w tym 26 gruczolaków cewkowych, 19 gruczolaków cewkowo-kosmkowych oraz 4 gruczolaki kosmkowe. Gruczolaki usunięte z odbytnicy to: 5 gruczolaków cewkowych, 7 gruczolaków cewkowo-kosmkowych oraz 2 gruczolaki kosmkowe.

Łącznie we wszystkich odcinkach jelita grubego usunięto 68 gruczolaków cewkowych, 49 gruczolaków cewkowo-kosmkowych oraz 13 gruczolaków kosmkowych (tabela nr 9).

5.3. Stopień dysplazji usuniętych polipów

Tabela nr 10. Stopień dysplazji usuniętych polipów

Lokalizacja – odcinek jelita grubego	Stopień dysplazji			Łącznie
	mały	średni	duży	
Kątnica	4	1	3	8
Wstępnica	3	2	3	8
Poprzecznica	9	9	5	23
Zstępnica	7	11	10	28
Esica	14	14	21	49
Odbytnica	1	5	8	14
Łącznie	**38**	**42**	**50**	**130**

W kątnicy na 8 polipów 4 były zmianami o małym stopniu dysplazji, 1 o średnim stopniu dysplazji, a 3 o dużym stopniu dysplazji.

We wstępnicy wśród 8 polipów 3 to zmiany o małym stopniu dysplazji, 2 o średnim stopniu dysplazji oraz 3 o dużym stopniu dysplazji.

W poprzecznicy na 23 gruczolaki 9 to zmiany o małym stopniu dysplazji, 9 o średnim stopniu dysplazji, a 5 o dużym stopniu dysplazji.

Analizując stopień dysplazji polipów ze zstępnicy, zaobserwowano, iż 7 gruczolaków to zmiany o małym, 11 o średnim, a 10 o dużym stopniu dysplazji.

Na 49 polipów usuniętych z esicy 14 cechowało się małym, 14 średnim, a 21 dużym stopniem dysplazji.

Wśród 14 gruczolaków usuniętych z odbytnicy 1 był polipem o małym stopniu dysplazji, 5 zmianami o średnim, a 8 o dużym stopniu dysplazji.

Łącznie 38 polipów wykazywało cechy zmian o małym stopniu dysplazji, 42 polipy to zmiany o średnim stopniu dysplazji, a 50 usuniętych zmian zaliczono do grupy polipów o dużym stopniu dysplazji (tabela nr 10).

Tabela nr 11. Typ histopatologiczny a stopień dysplazji usuniętych polipów

Typ histopatologiczny	Stopień dysplazji			Łącznie
	mały	średni	duży	
Gruczolak cewkowy	30	21	17	68
Gruczolak cewkowo-kosmkowy	8	16	25	49
Gruczolak kosmkowy	0	5	8	13
Łącznie	**38**	**42**	**50**	**130**

W analizowanej grupie 30 gruczolaków cewkowych charakteryzowało się małym, 21 średnim, a 17 dużym stopniem dysplazji. Wśród 49 gruczolaków cewkowo-kosmkowych 8 to zmiany o małym, 16 o średnim, a 25 o dużym stopniu dysplazji. Pośród gruczolaków kosmkowych nie było zmian wykazujących mały stopień dysplazji, natomiast 5 polipów gruczolakowych zaliczono do zmian o średnim, a 8 o dużym stopniu dysplazji (tabela nr 11).

5.4. Zmiany genetyczne

5.4.1. Niestabilność mikrosatelitarnego DNA

Tabela nr 12. Niestabilność mikrosatelitarnego DNA w usuniętych polipach

Status mikrosatelitarnego DNA		Liczba polipów (n)	Odsetek zmian	
Niestabilny	MSI-H	6	4,62%	16,16%
	MSI-L	15	11,54%	
Stabilny	MSS	106	81,54%	
Brak amplifikacji		3	2,30%	
Łącznie		**130**	**100,00%**	

Zaobserwowano, że 6 spośród 130 polipów (4,62%) to według kryteriów WHO polipy o fenotypie MSI-H, natomiast 15 (11,54%) to polipy MSI-L. Łącznie zmiany, w których stwierdzono niestabilność mikrosatelitarnego DNA, reprezentowało 21 gruczolaków (16,16%). Spośród 130 usuniętych polipów 106 (81,54%) uznano za mikrosatelitarnie stabilne (MSS). W przypadku 3 zmian nie udało się uzyskać amplifikacji materiału genetycznego (tabela nr 12).

5.4.2. Wiek i płeć a fenotyp polipów

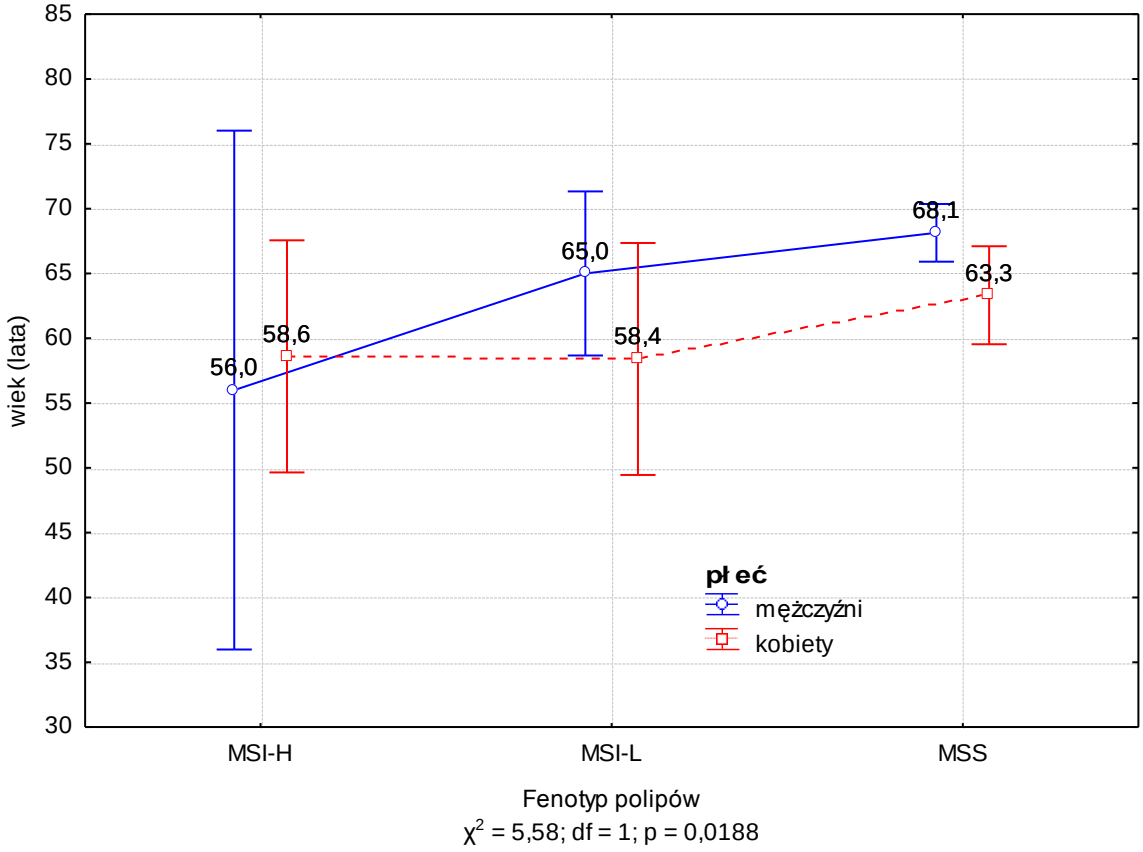
Tabela nr 13. Wiek i płeć a fenotyp polipów

Płeć/ Średni wiek (lata)	Fenotyp polipów		
	MSI-H	MSI-L	MSS
Kobiety	58,6	58,4	63,3
Mężczyźni	56	65	68,1

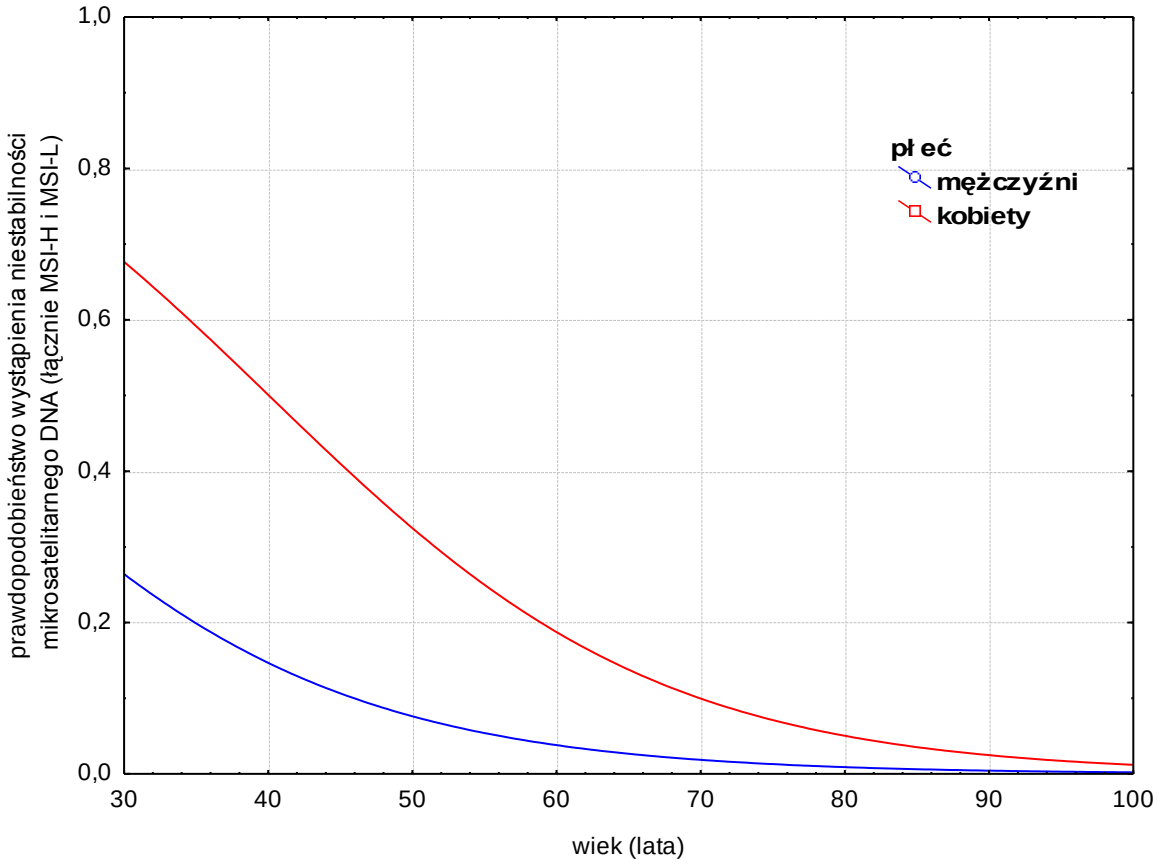
Średnia wieku kobiet, u których nie wykryto niestabilności mikrosatelitarnego DNA w tkance polipów, wynosiła 63,3 lat, mężczyzn –

68,1 lat. Kobiety, u których stwierdzono MSI-L w polipach gruczolakowych, cechowała średnia wieku 58,4 lat, natomiast mężczyzn – 65 lat. Kobiety wykazujące fenotyp MSI-H w tkance polipów stanowią grupę o średniej wieku 58,6 lat, a mężczyźni – 56 lat (tabela nr 13, wykres nr 1). Obserwowane różnice w średniej wieku między przedstawionymi grupami są istotne statystycznie ($x^2 = 5,58$; df = 1; p = 0,0188).

Wykres nr 1. Wiek i płeć a fenotyp polipów



Wykres nr 2. Prawdopodobieństwo wystąpienia niestabilności mikrosatelitarnego DNA (MSI-H oraz MSI-L) z uwzględnieniem wieku i płci



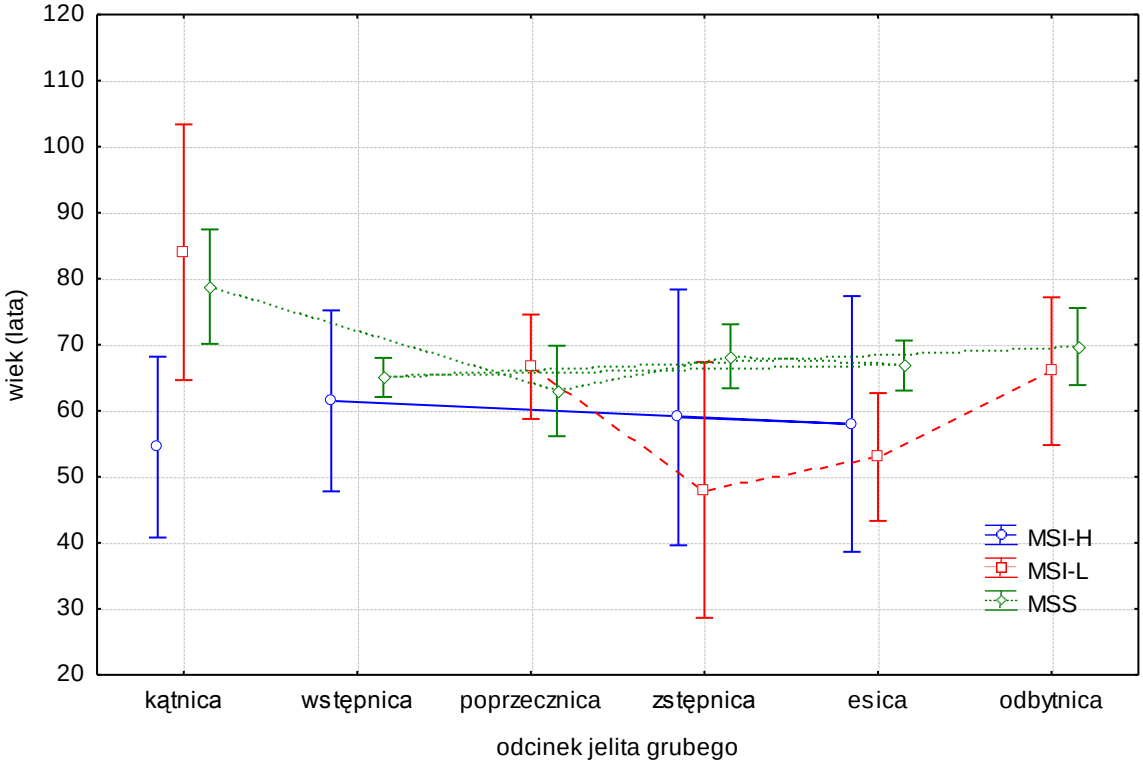
Analizując częstość występowania niestabilności mikrosatelitarnego DNA z uwzględnieniem wieku i płci, stwierdzono, iż prawdopodobieństwo wystąpienia niestabilności mikrosatelitarnego DNA było większe u kobiet niż u mężczyzn, przy czym w obu grupach zmniejszało się wraz z wiekiem (wykres nr 2).

Tabela nr 14. Średnia wieku chorych z uwzględnieniem lokalizacji oraz fenotypu polipów (dla obu płci łącznie)

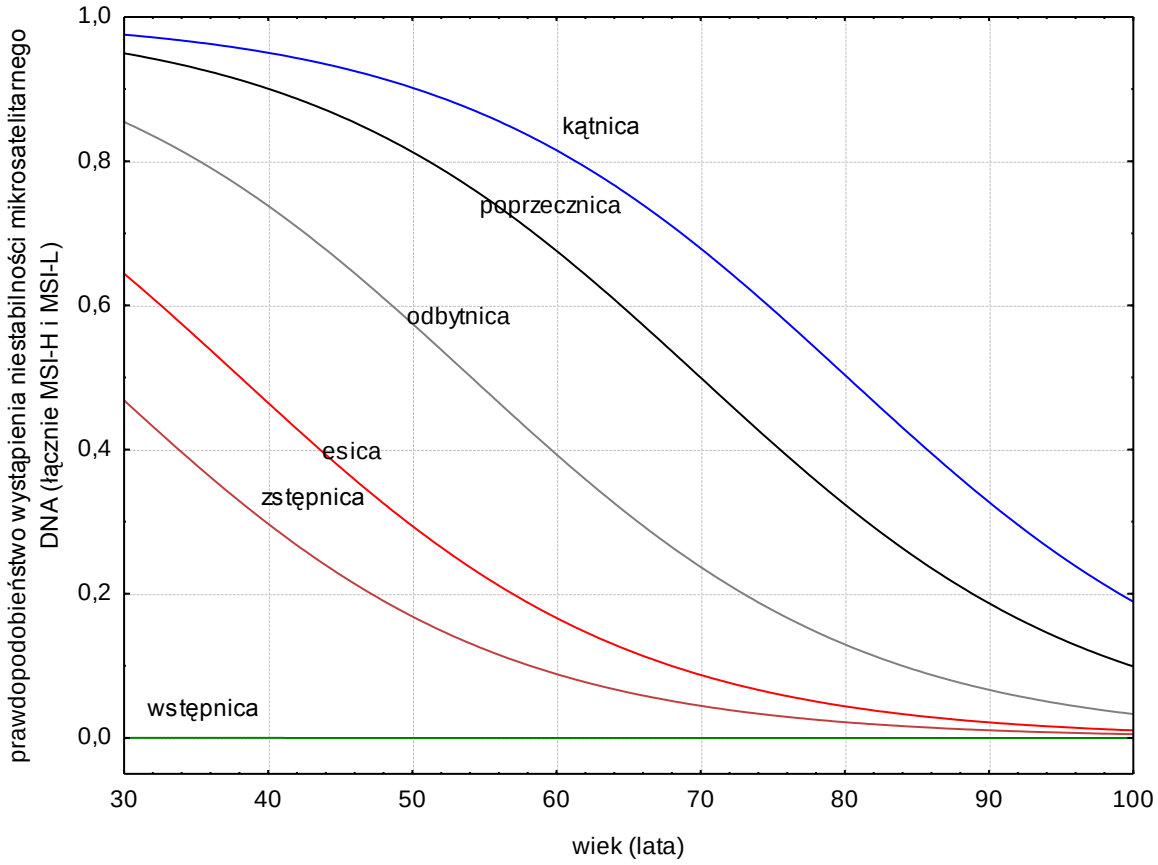
Lokalizacja /średni wiek (lata)	Fenotyp polipów		
	MSI-H	MSI-L	MSS
Kątnica	54,5 lat	84 lata	78,8 lat
Wstępnica	61,5 lat	brak polipów	65 lat
Poprzecznica	brak polipów	66,7 lat	63 lata
Zstępnica	59 lat	48 lat	68,3 lat
Esica	58 lat	53 lata	66,8 lat
Odbytnica	brak polipów	66 lat	69,7 lat

Najwyższą średnią wieku (84 lata) charakteryzowali się chorzy z polipami o niskim stopniu niestabilności mikrosatelitarnego DNA zlokalizowanymi w kątnicy, natomiast najmłodszą grupę (średnio 48 lat) tworzyli pacjenci z polipami MSI-L umiejscowionymi w zstępnicy (tabela nr 14, wykres nr 3).

Wykres nr 3. Średnia wieku chorych z uwzględnieniem lokalizacji oraz fenotypu polipów (dla obu płci łącznie)



Wykres nr 4. Prawdopodobieństwo wystąpienia niestabilności mikrosatelitarnego DNA (MSI-H oraz MSI-L) z uwzględnieniem wieku i lokalizacji polipów (dla obu płci łącznie)



Biorąc pod uwagę lokalizację polipów, w których wykryto zaburzenia stabilności mikrosatelitarnego DNA, najczęściej stwierdzano je w kątnicy oraz poprzecznicy, natomiast najrzadziej obserwowano je we wstępnicy. Uwzględniając wiek, lokalizację polipów w poszczególnych odcinkach jelita grubego oraz status mikrosatelitarnego DNA, obliczono prawdopodobieństwo wystąpienia fenotypów MSI-H oraz MSI-L z uwzględnieniem wieku i lokalizacji (wykres nr 4).

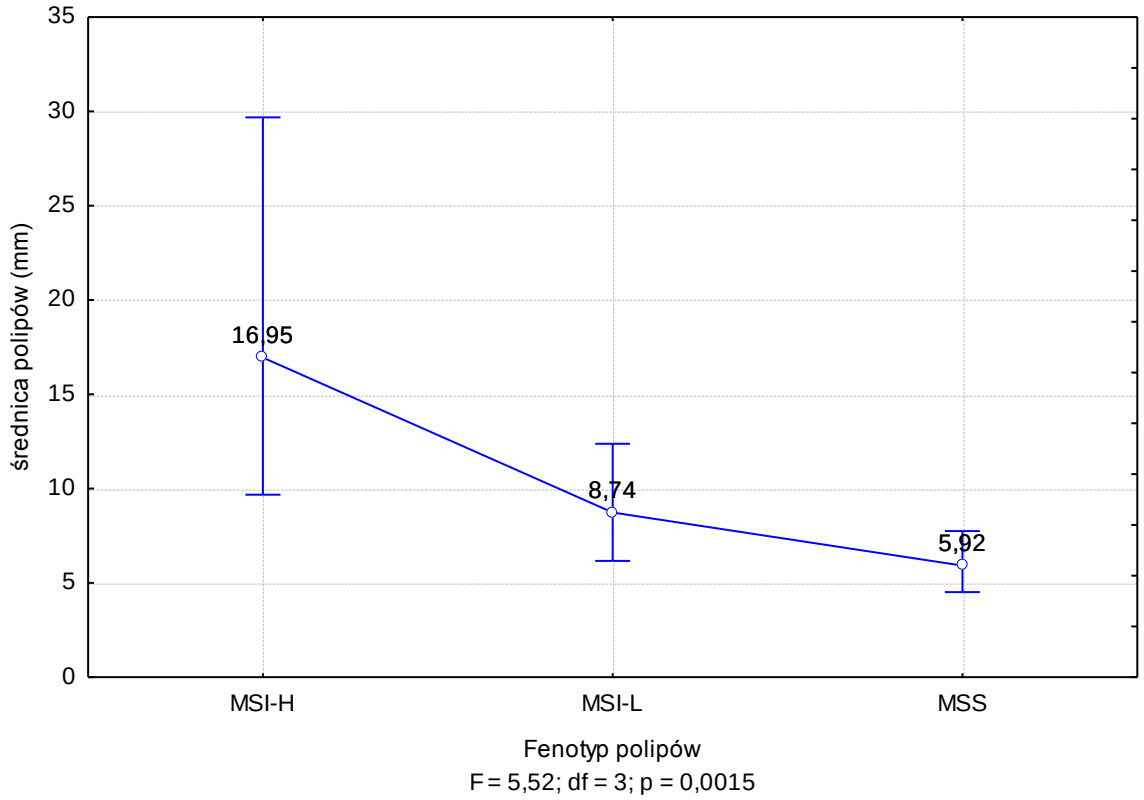
5.4.3. Średnica polipów z uwzględnieniem ich fenotypu

Tabela nr 15. Średnica polipów z uwzględnieniem ich fenotypu

	Fenotyp polipów		
	MSI-H	MSI-L	MSS
Średnica	16,95 mm	8,73 mm	5,92 mm

Polipy mikrosatelitarnie stabilne (MSS) są mniejsze aniżeli polipy o niskim stopniu niestabilności mikrosatelitarnego DNA (MSI-L) i polipy o wysokim stopniu niestabilności mikrosatelitarnego DNA (MSI-H). Średnica polipów o fenotypie MSI-H wynosiła 16,95 mm, a o fenotypie MSI-L – 8,73 mm, natomiast polipów mikrosatelitarnie stabilnych 5,92 mm (F = 5,52; df = 3; p = 0,0015) (tabela nr 15, wykres nr 5).

Wykres nr 5. Średnica polipów z uwzględnieniem ich fenotypu



5.4.4. Średnica polipów a stopień utraty heterozygotyczności

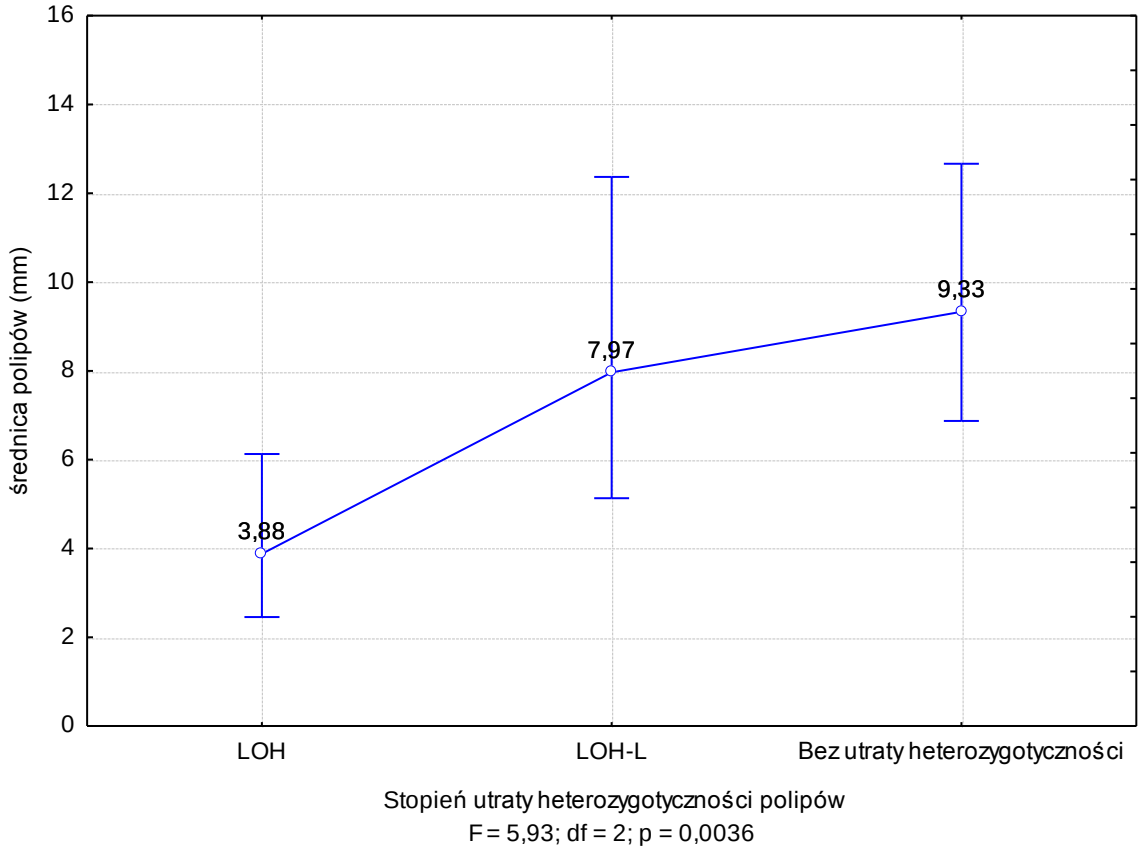
Tabela nr 16. Średnica polipów a stopień utraty heterozygotyczności

	Stopień utraty heterozygotyczności w polipach		
	LOH	LOH-L	Bez utraty heterozygotyczności
Średnica	3,88 mm	7,97 mm	9,33 mm

Wraz z postępującą utratą heterozygotyczności dla badanych amplikonów zaznaczała się tendencja do zmniejszenia się średnicy polipów.

I tak, średnica polipów bez utraty heterozygotyczności wynosiła średnio 9,33 mm, podczas gdy zmiany, w tkankach których stwierdzono utratę heterozygotyczności, osiągały średnicę 3,88 mm (F = 5,93; df =2; p = 0,0036) (tabela nr 16, wykres nr 6).

Wykres nr 6. Średnica polipów a stopień utraty heterozygotyczności



5.4.5. Mutacja genu K-ras

Tabela nr 17. Mutacje genu K-ras w usuniętych polipach

Analiza obecności mutacji w genie K-ras	Liczba polipów (n)	Odsetek zmian
Mutacja w eksonie 1	27	20,77%
Mutacja w eksonie 2	7	5,38%
Brak mutacji	96	73,85%
Łącznie	**130**	**100,00%**

Mutację w genie K-ras zaobserwowano w eksonie 1 w 27 przypadkach (20,77%), a w eksonie 2 w 7 polipach gruczolakowych (5,38%). Nie wykryto jej w 96 polipach (73,85%) (tabela nr 17).

5.4.6. Zaburzenia genetyczne dla markera p53-penta

Tabela nr 18. Zaburzenia genetyczne dla markera p53-penta

	Liczba polipów (n)	Odsetek zmian
MSI	2	1,54%
LOH	0	0%
MSI + LOH	2	1,54%
Bez zmian	126	96,92%
Łącznie	**130**	**100,00%**

Analizując zaburzenia genetyczne dla markera p53-penta, niestabilność mikrosatelitarnego DNA wykryto w 2 polipach (1,54%). Niestabilność, której towarzyszyła utrata heterozygotyczności, stwierdzono w 2 przypadkach (1,54%). Nie obserwowano samoistnego występowania utraty heterozygotyczności. W znaczącej większości gruczolaków (126 – 96,92%) nie wykryto żadnych zaburzeń w zakresie MSI i LOH (tabela nr 18).

5.4.7. Zaburzenia genetyczne dla markera p53-di

Tabela nr 19. Zaburzenia genetyczne dla markera p53-di

	Liczba polipów (n)	Odsetek zmian
MSI	8	6,15%
LOH	19	14,62%
MSI + LOH	17	13,08%
Bez zmian	86	66,15%
Łącznie	**130**	**100,00%**

Niestabilność mikrosatelitarnego DNA dla markera p53-di obserwowano w 8 polipach (6,15%), utratę heterozygotyczności w 19 polipach (14,62%), a współwystępowanie utraty heterozygotyczności oraz niestabilności mikrosatelitarnej w 17 gruczolakach (13,08%). Brak zaburzeń genetycznych w zakresie MSI i LOH charakteryzował 86 polipów (66,15%) (tabela nr 19).

5.4.8. Zaburzenia genetyczne dla amplikonu MET

wykaz nr 20. Zaburzenia genetyczne dla amplikonu MET

	Liczba polipów (n)	Odsetek zmian
MSI	4	3,08%
LOH	6	4,62%
MSI + LOH	3	2,31%
Bez zmian	117	90%
Łącznie	**130**	**100,00%**

Utratę heterozygotyczności dla amplikonu MET zaobserwowano w 6 polipach (4,62%). Niestabilność mikrosatelitarnego DNA stwierdzono w 4 polipach (3,08%), współwystępowanie utraty heterozygotyczności z niestabilnością mikrosatelitarnego DNA wykryto w 3 polipach (2,31%). Brak zaburzeń w zakresie MSI i LOH cechowało 117 polipów (90%) (tabela nr 20).

5.4.9. Zaburzenia genetyczne dla markera DCC

Tabela nr 21. Zaburzenia genetyczne dla markera DCC

	Liczba polipów (n)	Odsetek zmian
MSI	6	4,62%
LOH	7	5,38%
MSI + LOH	7	5,38%
Bez zmian	110	84,62%
Łącznie	**130**	**100,00%**

W przypadku markera DCC utrata heterozygotyczności została wykazana w 7 polipach (5,38%), mikrosatelitarna niestabilność DNA w 6 gruczolakach (4,62%), a współobecność obu typów zaburzeń w 7 gruczolakach (5,38%). 110 polipów charakteryzował brak zmian genetycznych w zakresie MSI i LOH (tabela nr 21).

5.4.10. Zaburzenia genetyczne dla markera hMSH2

Tabela nr 22. Zaburzenia genetyczne dla markera hMSH2

	Liczba polipów (n)	Odsetek zmian
MSI	5	3,85%
LOH	5	3,85%
MSI + LOH	4	3,08%
Bez zmian	116	89,23%
Łącznie	**130**	**100,00%**

Analizując marker hMSH2, nie stwierdzono zaburzeń w zakresie MSI i LOH w materiale genetycznym 116 polipów (89,23%), natomiast utratę heterozygotyczności i niestabilność mikrosatelitarną obserwowano w grupach liczących po 5 polipów (3,85%), współwystępowanie zaś obu typów zaburzeń genetycznych wykazano w 4 polipach (3,08%) (tabela nr 22).

5.4.11. Zaburzenia genetyczne dla markera APC

Tabela nr 23. Zaburzenia genetyczne dla markera APC

	Liczba polipów (n)	Odsetek zmian
MSI	1	0,77%
LOH	9	6,92%
MSI + LOH	4	3,08%
Bez zmian	116	89,23%
Łącznie	**130**	**100,00%**

W amplikonie odpowiadającym fragmentowi APC niestabilność mikrosatelitarnego DNA wykryto w 1 polipie (0,77%), natomiast niestabilność, której towarzyszyła utrata heterozygotyczności, zaobserwowano w 4 przypadkach (3,08%). Utratę heterozygotyczności stwierdzono w 9 polipach gruczolakowych jelita grubego (6,92%). Brak zaburzeń genetycznych w zakresie MSI i LOH dla markera APC stwierdzono w 116 polipach (89,23%) (tabela nr 23).

5.4.12. Zaburzenia genetyczne dla markera NM23

Tabela nr 24. Zaburzenia genetyczne dla markera NM23

	Liczba polipów (n)	Odsetek zmian
MSI	6	4,62%
LOH	10	7,69%
MSI + LOH	11	8,46%
Bez zmian	103	79,23%
Łącznie	**130**	**100,00%**

Badając polipy pod kątem zaburzeń genetycznych w zakresie amplikonu NM23, wykazano, że niestabilność mikrosatelitarna cechowała 6 polipów (4,62%), utratę heterozygotyczności stwierdzono w 10 gruczolakach (7,69%), a współwystępowanie obu zaburzeń –

w 11 polipach (8,46%). Pozostałe 103 polipy nie miały tego typu zaburzeń (79,23%) (tabela nr 24).

5.4.13. Zaburzenia genetyczne dla markera HPC1

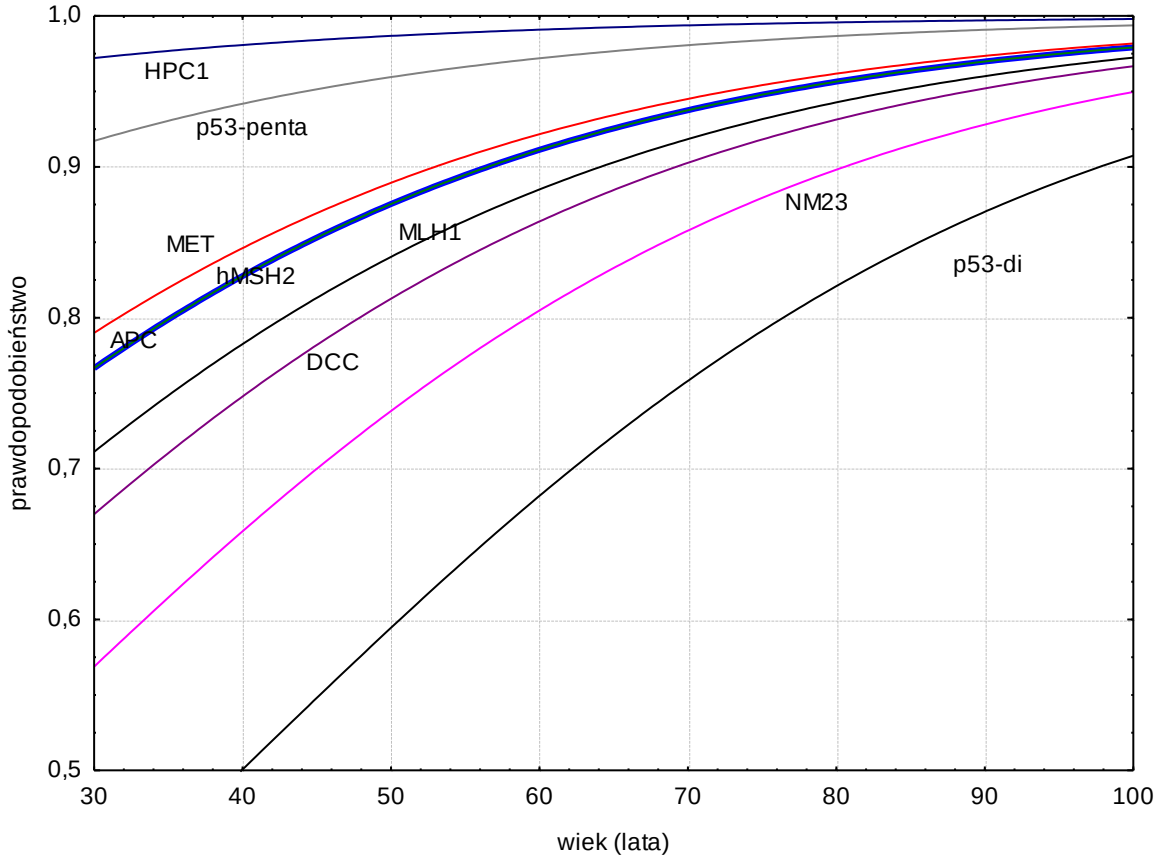
Tabela nr 25. Zaburzenia genetyczne dla markera HPC1

	Liczba polipów (n)	Odsetek zmian
MSI	0	0%
LOH	2	1,54%
MSI + LOH	0	0%
Bez zmian	128	98,46%
Łącznie	**130**	**100,00%**

Z analizy zmian związanych z markerem HPC1 wynika, że zdecydowana większość, bo aż 128 polipów (98,46%), nie wykazywała jakichkolwiek zmian. Jedynie w 2 gruczolakach (1,54%) zaobserwowano utratę heterozygotyczności. Innych zaburzeń genetycznych w zakresie MSI i LOH nie stwierdzono (tabela nr 25).

Kolejnym etapem badań polipów było określenie prawdopodobieństwa, że w analizowanych markerach nie dojdzie do zaburzeń genetycznych.
Biorąc pod uwagę przedstawione powyżej wyniki dla wszystkich przebadanych amplikonów, wyliczono prawdopodobieństwo niewystąpienia zaburzenia genetycznego w zakresie analizowanych markerów. Prawdopodobieństwo to zwiększa się wraz z wiekiem dla wszystkich przebadanych markerów, osiągając najwyższe wartości dla markera HPC1, a najniższe dla markera p53di (wykres nr 7).

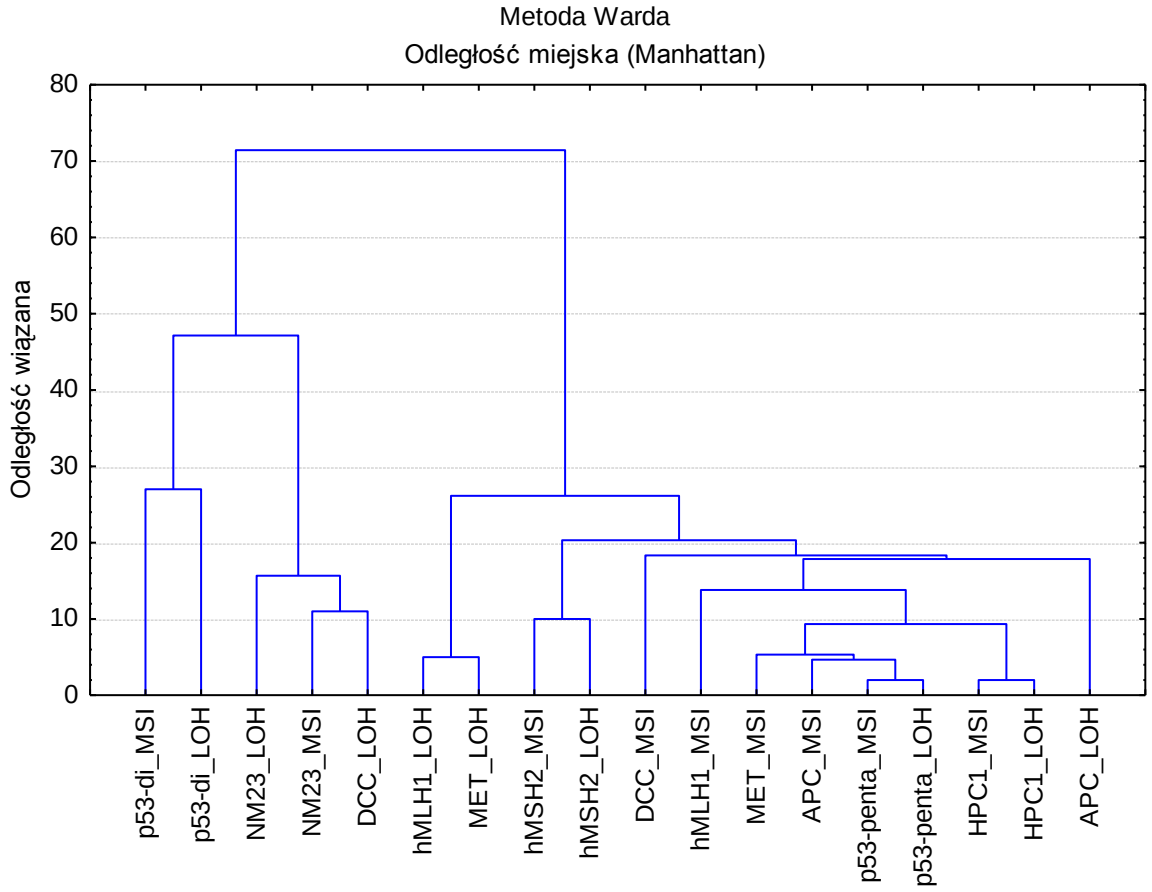
Wykres nr 7. Prawdopodobieństwo, że nie dojdzie do zaburzenia w analizowanych markerach (MSI lub LOH) z uwzględnieniem wieku



5.4.14. Współwystępowanie zaburzeń w poszczególnych analizowanych markerach

Z wykorzystaniem analizy klastrowej zbadano, czy obserwowane dla poszczególnych markerów zaburzenia o charakterze niestabilności mikrosatelitarnego DNA (MSI) oraz utraty heterozygotyczności (LOH) były względem siebie niezależne, czy też współwystępowały. Uznano, że zmiany te były względem siebie niezależne, gdy w terminalnych klastrach znajdowały się różne analizowane *loci*. Wyniki przedstawione na wykresie nr 7 sugerują, że zmiany w zakresie danego fragmentu polegały najczęściej na utracie heterozygotyczności oraz na pojawieniu się niestabilności w zakresie mikrosatelitarnego DNA (wykres nr 8).

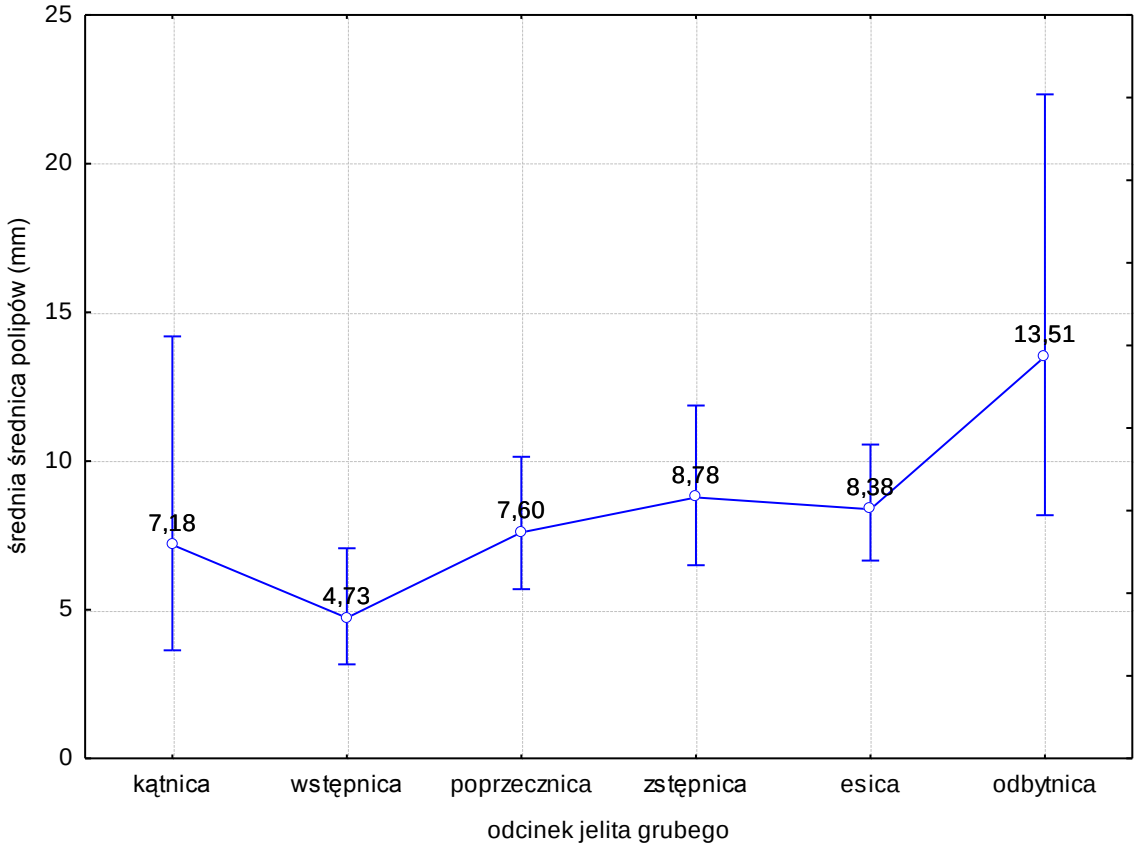
Wykres nr 8. Diagram drzewa analizy klastrowej dla zbadania współwystępowania zaburzeń w poszczególnych analizowanych markerach



5.5. Średnica polipów

5.5.1. Średnica polipów w poszczególnych odcinkach jelita grubego

Wykres nr 9. Średnica polipów w poszczególnych odcinkach jelita grubego



Średnica usuniętych polipów mieściła się w przedziale 4–90 mm. Średnio średnica usuniętych polipów wynosiła 12 mm.

Największe rozmiary osiągały polipy zlokalizowane w odbytnicy (średnio 13,51 mm), natomiast najmniejsze polipy stwierdzano we wstępnicy (średnio 4,73 mm). Średnia średnica polipów w pozostałych odcinkach jelita grubego wynosiła odpowiednio: w kątnicy 7,18 mm, w poprzecznicy 7,60 mm, w zstępnicy 8,78 mm, w esicy 8,38 mm. Obserwowane różnice między średnicami polipów w poszczególnych odcinkach jelita grubego są istotne statystycznie ($F = 2,85$; $df = 5$; $p = 0,0192$) (wykres nr 9).

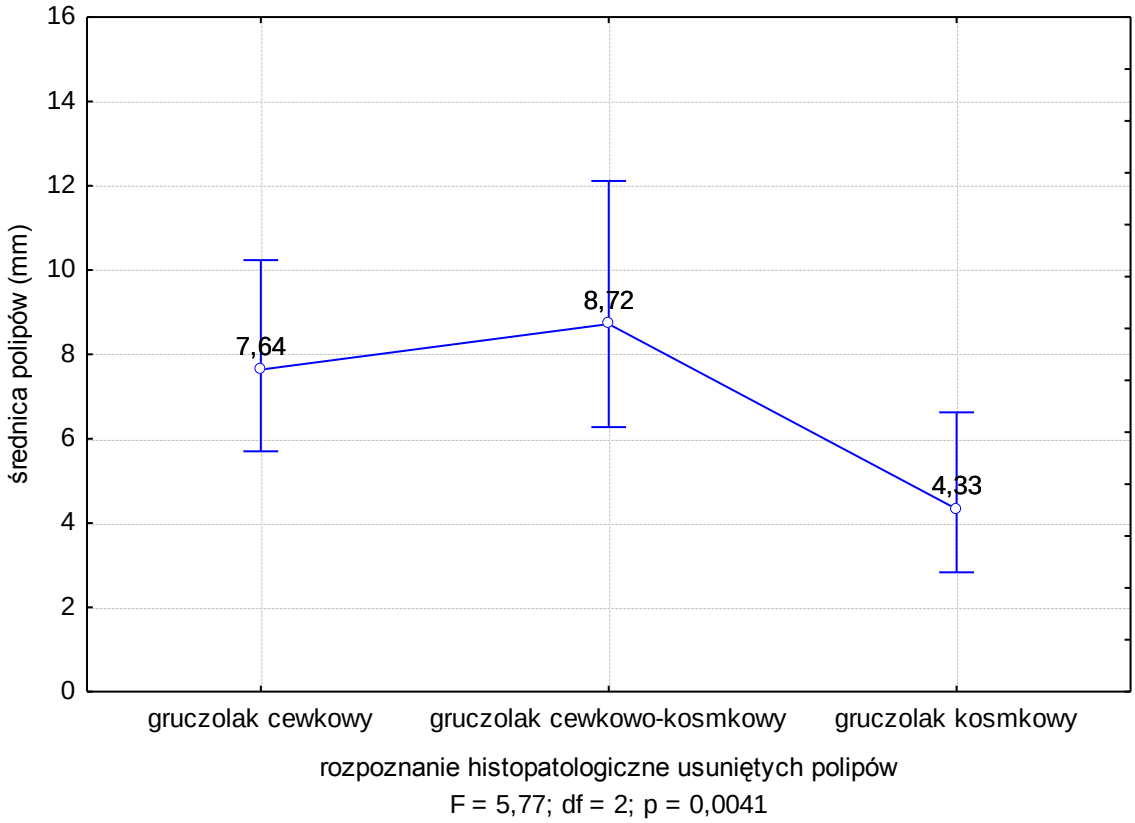
5.5.2. Średnica polipów a rozpoznanie histopatologiczne

Tabela nr 26. Średnica polipów a rozpoznanie histopatologiczne

	Gruczolak cewkowy	Gruczolak cewkowo-kosmkowy	Gruczolak kosmkowy
Średnica polipów (średnio)	5–80 mm (7,64 mm)	5–90 mm (8,72 mm)	4–90 mm (4,33 mm)

Rozmiary polipów z histopatologicznym rozpoznaniem jako gruczolak cewkowy (a*denoma tubulare*) wynosiły 5–80 mm, średnio 7,64 mm. Gruczolaki cewkowo-kosmkowe (*adenoma tubulovillosum*) charakteryzowały się średnicą w granicach 5–90 mm, średnio 8,72 mm. Natomiast średnica zmian o typie gruczolaków kosmkowych wynosiła 4–90 mm, średnio 4,33 mm (F = 5,77; df = 2; p = 0,0041) (tabela nr 26, wykres nr 10).

Wykres nr 10. Średnica polipa a rozpoznanie histopatologiczne



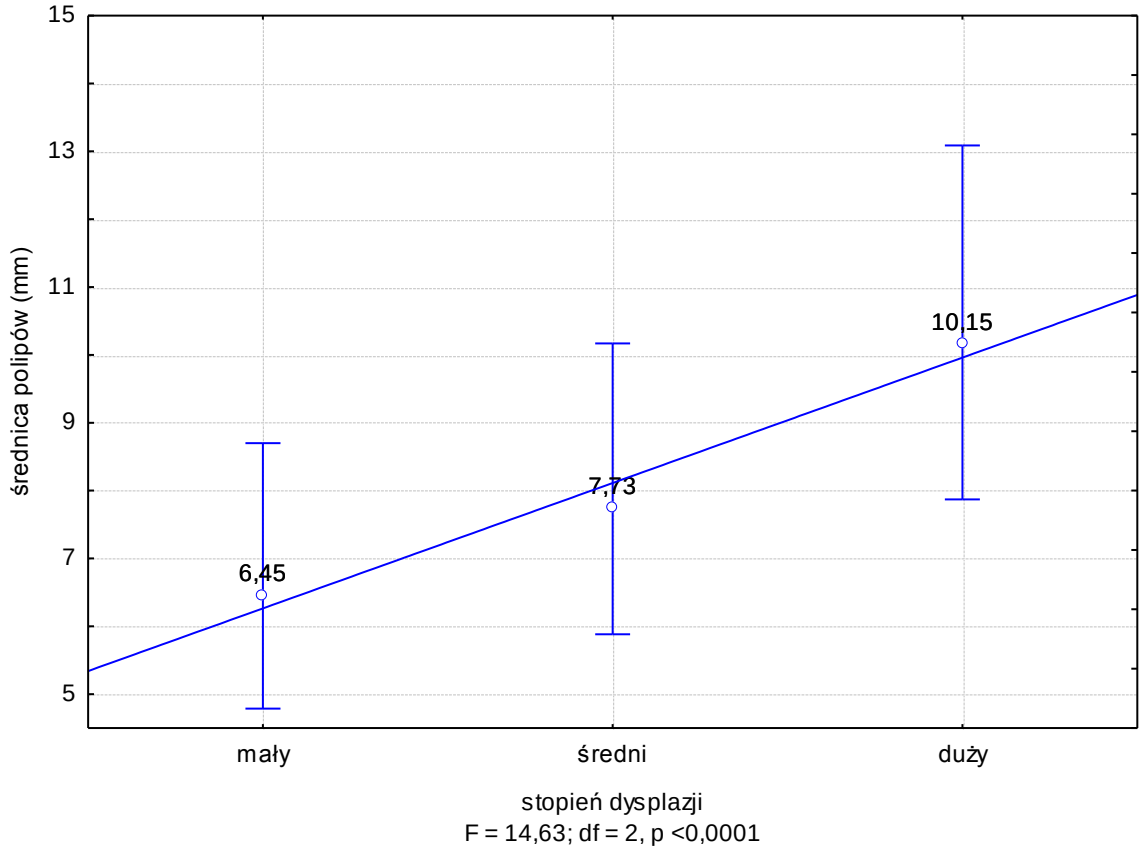
5.5.3. Średnica polipów a stopień ich dysplazji

Tabela nr 27. Średnica polipów a stopień ich dysplazji

Stopień dysplazji	Mały	Średni	Duży
Średnica polipów	6,45 mm	7,73 mm	10,15 mm

Wśród wszystkich usuniętych polipów wraz ze wzrostem określanego podczas badania histopatologicznego stopnia dysplazji zaznaczył się wyraźny trend do zwiększania się średnicy polipów. I tak, zmiany o małym stopniu dysplazji osiągały średnio średnicę 6,45 mm, średnim – 7,73 mm, a o dużym – 10,15 mm (F = 14,63; df = 2; p <0,0001) (tabela nr 27, wykres nr 11).

Wykres nr 11. Średnica polipów a stopień ich dysplazji



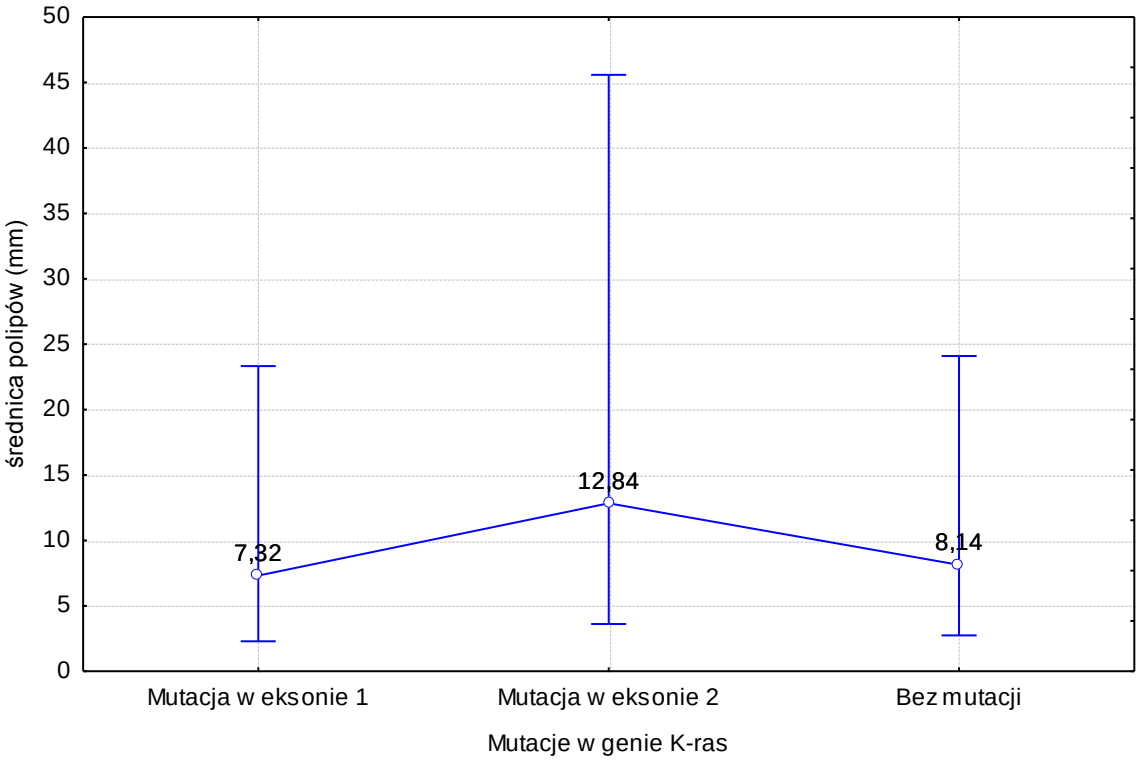
5.5.4. Średnica polipów a mutacje w genie K-ras

Tabela nr 28. Średnica polipów a mutacje w genie K-ras

	Mutacja w eksonie 1	Mutacja w eksonie 2	Brak mutacji
Średnica	7,32 mm	12,84 mm	8,14 mm

Podczas analizy średnicy polipów zauważono, że polipy, w których wykryto obecność mutacji w genie K-ras w eksonie 2, charakteryzowały się większym rozmiarem (12,84 mm) aniżeli polipy bez mutacji (8,14 mm) lub z mutacją w eksonie 1 (7,32 mm) (tabela nr 28, wykres nr 12).

Wykres nr 12. Średnica polipów a mutacje w genie K-ras



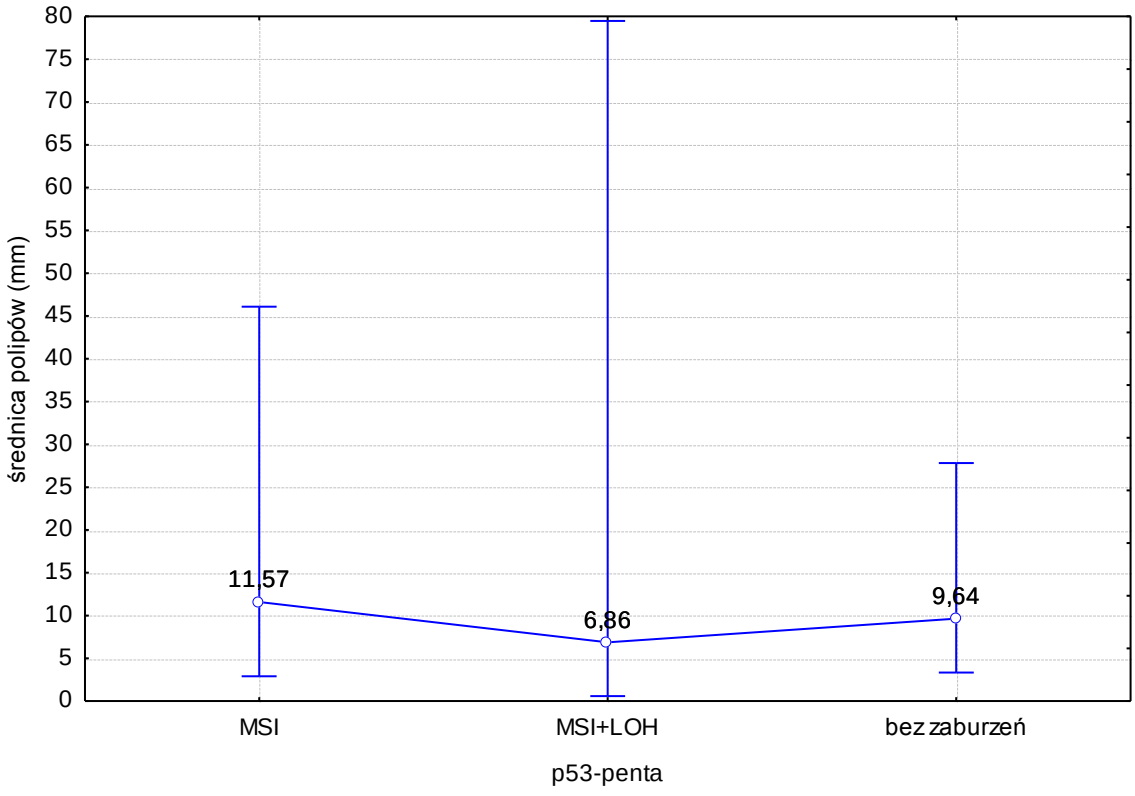
5.5.5. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera p53-penta

Tabela nr 29. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera p53-penta

	MSI	LOH + MSI	Bez zaburzeń
Średnica	11,57 mm	6,86 mm	9,64 mm

Dla pentameru p53 polipy o typie MSI charakteryzowały się średnicą 11,57 mm, gruczolaki ze współwystępującą niestabilnością mikrosatelitarnego DNA oraz utratą heterozygotyczności były mniejsze i osiągały średnicę 6,86 mm, natomiast średnica polipów bez zaburzeń o typie MSI lub LOH wynosiła przeciętnie 9,64 mm (tabela nr 29, wykres nr 13).

Wykres nr 13. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera p53-penta



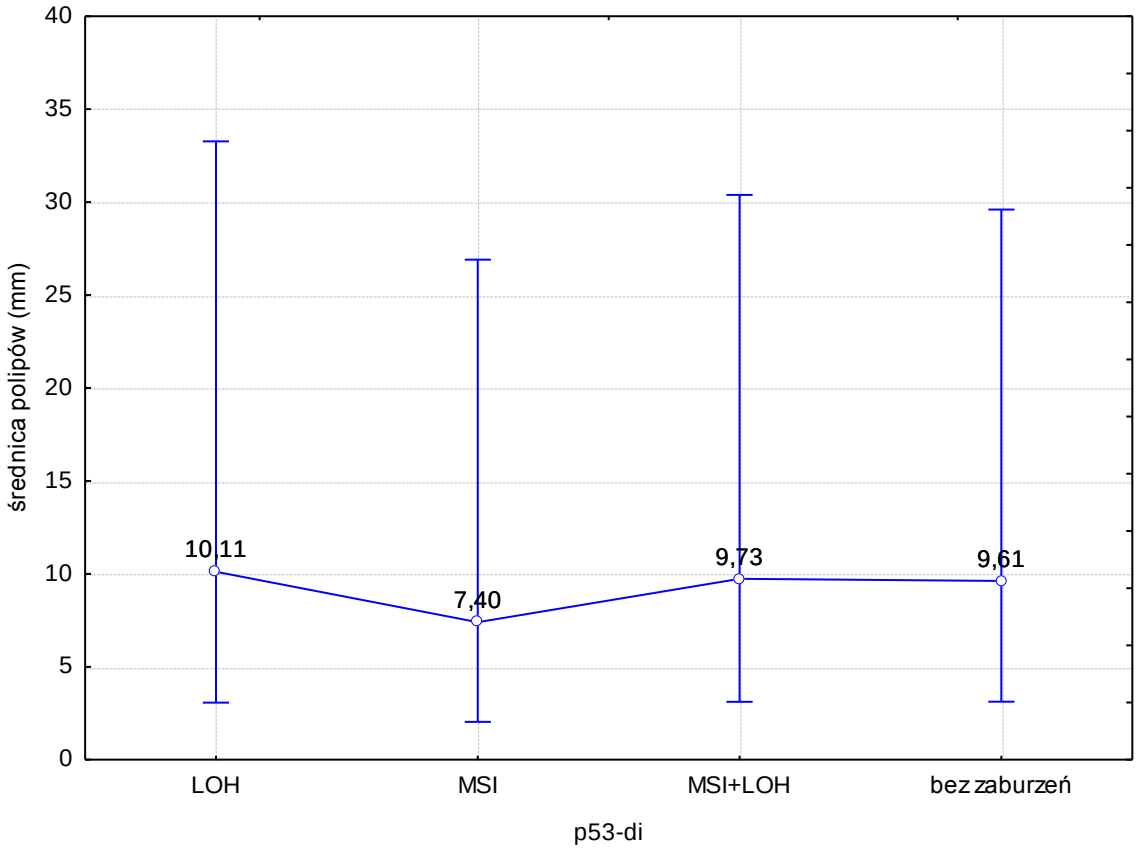
5.5.6. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera p53-di

Tabela nr 30. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera p53-di

	LOH	MSI	LOH + MSI	Bez zaburzeń
Średnica	10,11 mm	7,40 mm	9,73 mm	9,61 mm

Podczas analizy fragmentu p53-di zaobserwowano, że gruczolaki ze stwierdzoną LOH cechowały się średnią wielkością 10,11 mm, z MSI – 7,4 mm, a przy współwystępowaniu LOH oraz MSI średni rozmiar usuniętych polipów wynosił 9,73 mm. Przy braku powyższych zaburzeń genetycznych polipy osiągały średnicę 9,61 mm (tabela nr 30, wykres nr 14).

Wykres nr 14. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera p53-di



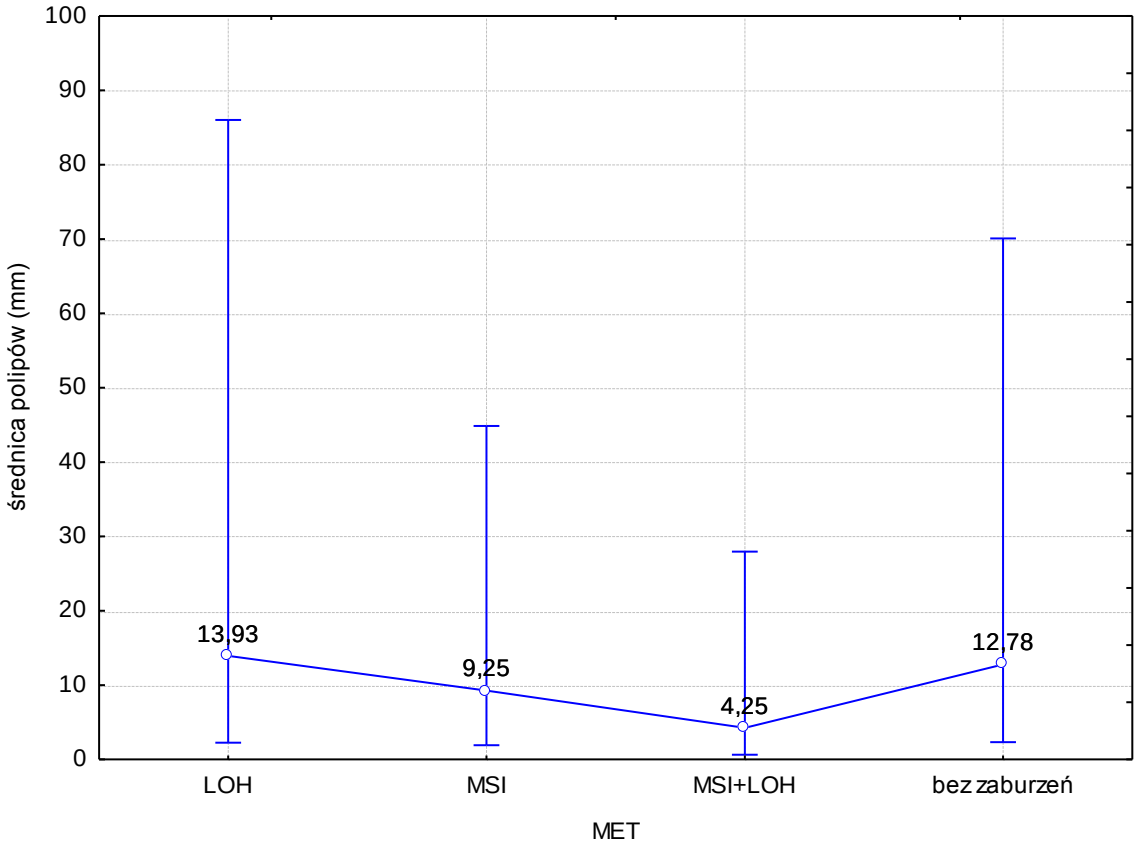
5.5.7. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera MET

Tabela nr 31. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera MET

	LOH	MSI	LOH + MSI	Bez zaburzeń
Średnica	13,93 mm	9,25 mm	4,25 mm	12,78 mm

W obrębie amplikonu MET w przypadku braku zmian MSI i LOH obserwowano polipy o średniej wielkości wynoszącej 12,78 mm. Gruczolaki wykazujące w tym *loci* utratę heterozygotyczności charakteryzowały się średnim rozmiarem 13,93 mm, w przypadku zaś MSI osiągały średnio 9,25 mm. Polipy, w których oba zaburzenia współwystępowały, były mniejsze (średnio 4,25 mm) (tabela nr 31, wykres nr 15).

Wykres nr 15. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera MET



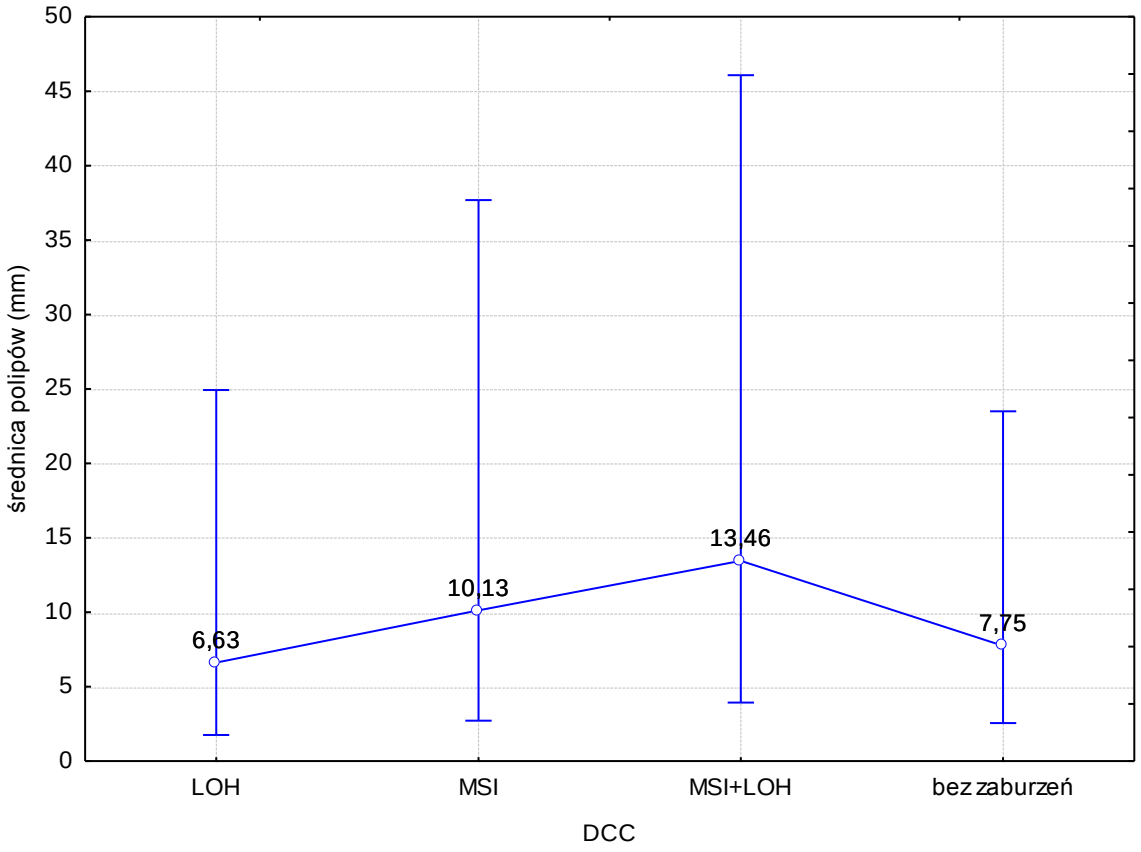
5.5.8. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera DCC

Tabela nr 32. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera DCC

	LOH	MSI	LOH + MSI	Bez zaburzeń
Średnica	6,63 mm	10,13 mm	13,46 mm	7,75 mm

Polipy z wykrytą utratą heterozygotyczności (LOH) osiągały średni rozmiar 6,63 mm, a zmiany z niestabilnością mikrosatelitarnego DNA – 10,13 mm. Współwystępowanie w danym polipie obu typów zaburzeń wiązało się ze zwiększeniem średniego rozmiaru do 13,46 mm. Polipy, w których nie stwierdzono w markerze DCC zaburzeń genetycznych, cechowała średnica 7,75 mm (tabela nr 32, wykres nr 16).

Wykres nr 16. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera DCC



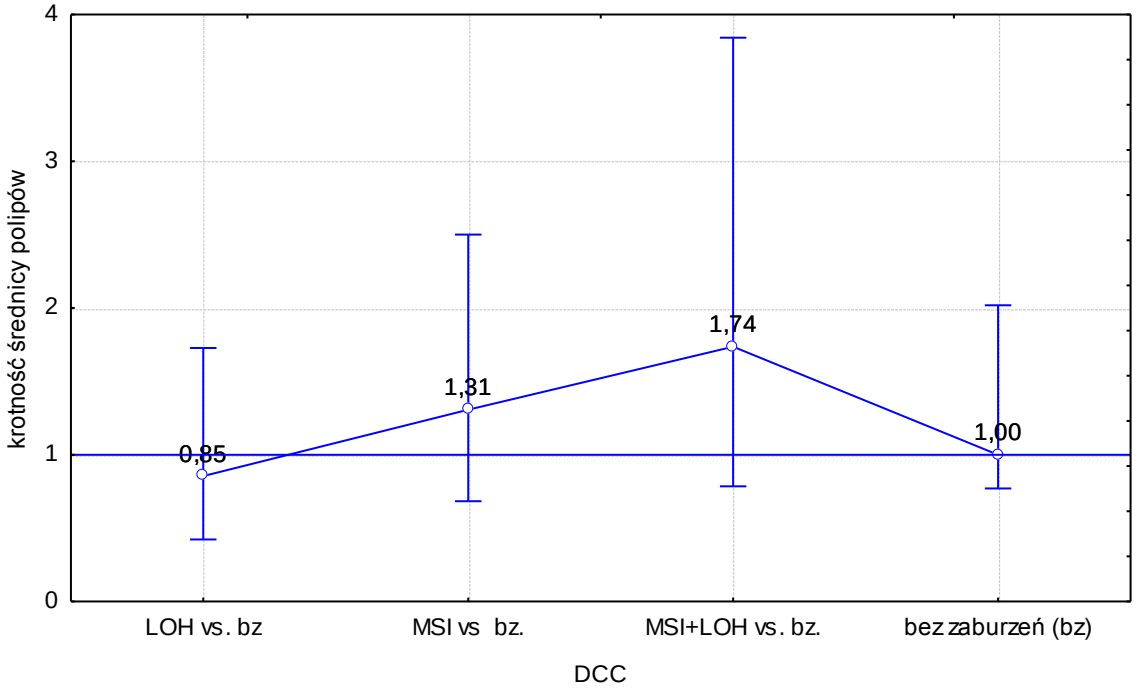
Krotność średnicy polipów

Tabela nr 33. Krotność średnicy polipów a zaburzenia genetyczne dla markera DCC

	LOH	MSI	LOH + MSI	Bez zaburzeń
Krotność średnicy	0,85	1,31	1,74	1,00

Wśród 130 polipów przebadanych genetycznie dla fragmentu DCC zmiany, w których stwierdzono utratę heterozygotyczności, były 0,85 raza mniejsze aniżeli zmiany bez tych zaburzeń. Polipy mikrosatelitarnie niestabilne były 1,31 raza większe aniżeli gruczolaki bez tego typu zaburzeń genetycznych. Współwystępowanie niestabilności mikrosatelitarnego DNA oraz utraty heterozygotyczności skutkowało niemal dwukrotnym zwiększeniem rozmiaru polipa (tabela nr 33, wykres nr 17).

Wykres nr 17. Krotność średnicy polipów a zaburzenia genetyczne dla markera DCC



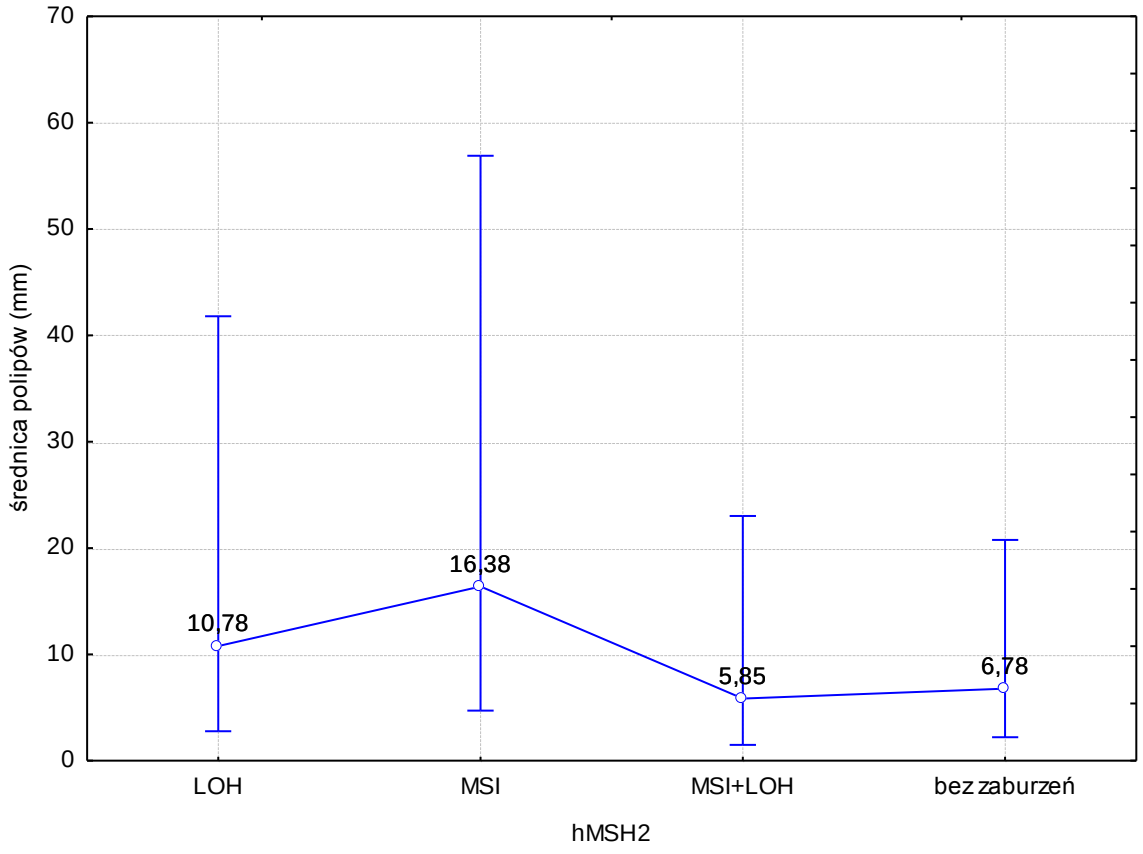
5.5.9. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera hMSH2

Tabela nr 34. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera hMSH2

	LOH	MSI	LOH + MSI	Bez zaburzeń
Średnica	10,78 mm	16,38 mm	5,85 mm	6,78 mm

W *locus* odpowiadającemu fragmentowi hMSH2 polipy bez zaburzeń genetycznych w zakresie LOH i MSI osiągały średnicę 6,78 mm, polipy z LOH 10,78 mm, gruczolaki z MSI 16,38 mm, podczas gdy współwystępowanie obu rodzajów zaburzeń prowadziło do zmniejszenia się średnicy polipów do 5,85 mm (tabela nr 34, wykres nr 18).

Wykres nr 18. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera hMSH2



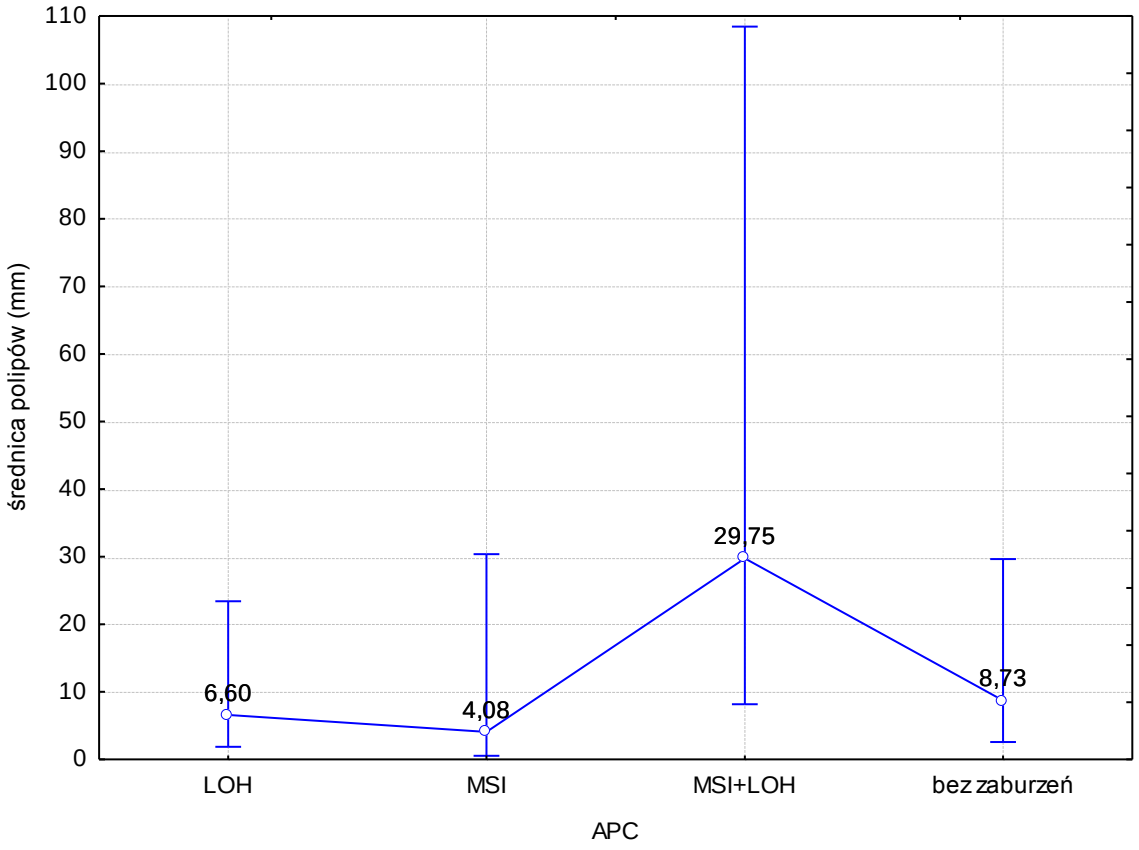
5.5.10. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera APC

Tabela nr 35. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera APC

	LOH	MSI	LOH + MSI	Bez zaburzeń
Średnica	6,60 mm	4,08 mm	29,75 mm	8,73 mm

Wśród zaburzeń genetycznych dla markera APC gruczolaki z utratą heterozygotyczności osiągały średnicę 6,60 mm, polipy niestabilne mikrosatelitarnie charakteryzowała średnica 4,08 mm, współwystępowanie MSI oraz LOH prowadziło do zwiększenia średnicy do średnio 29,75 mm, natomiast średnica polipów bez zaburzeń o typie MSI lub LOH wynosiła 8,73 mm (tabela nr 35, wykres nr 19).

Wykres nr 19. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera APC



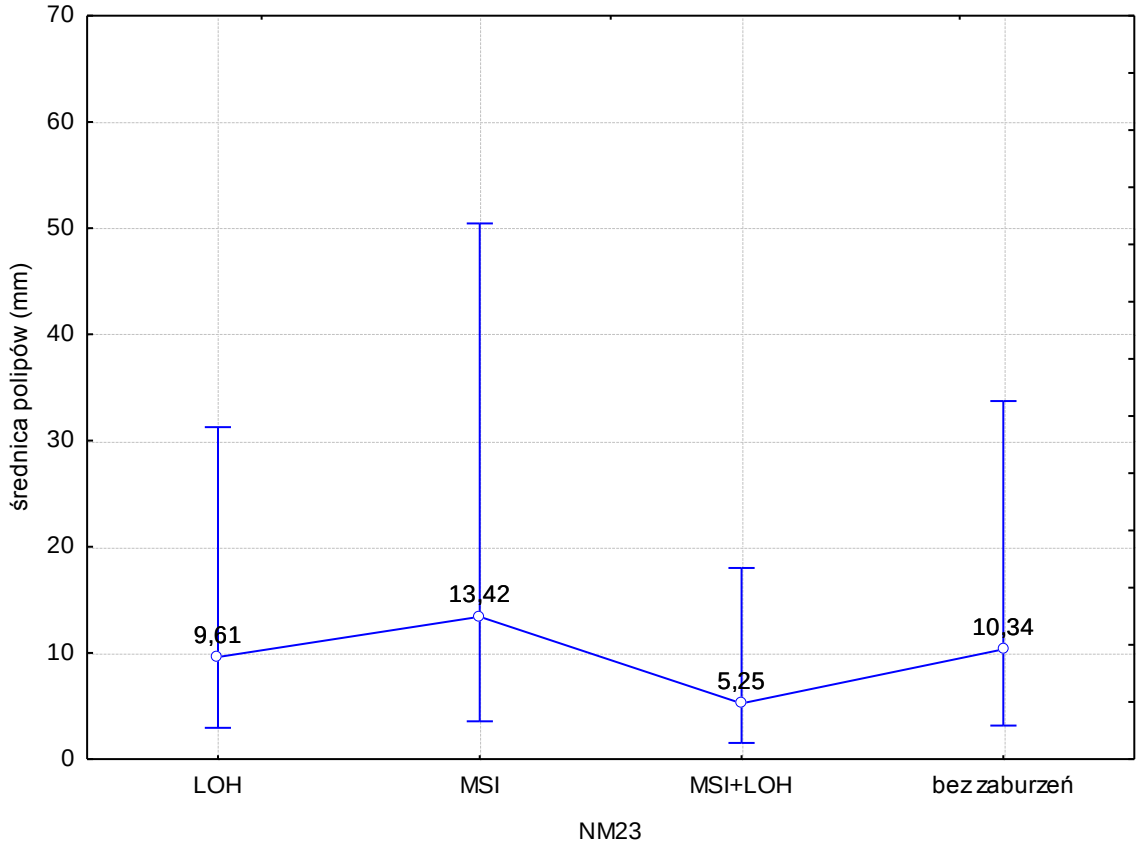
5.5.11. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera NM23

Tabela nr 36. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera NM23

	LOH	MSI	LOH + MSI	Bez zaburzeń
Średnica	9,61 mm	13,42 mm	5,25 mm	10,34 mm

Analizując zaburzenia genetyczne dla *locus* NM23, polipy bez zaburzeń genetycznych osiągnęły średni rozmiar 10,34 mm, polipy z LOH 9,61 mm, gruczolaki MSI 13,42 mm, natomiast polipy, w których zaobserwowano współwystępowanie MSI oraz LOH – 5,25 mm (tabela nr 36, wykres nr 20).

Wykres nr 20. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera NM23



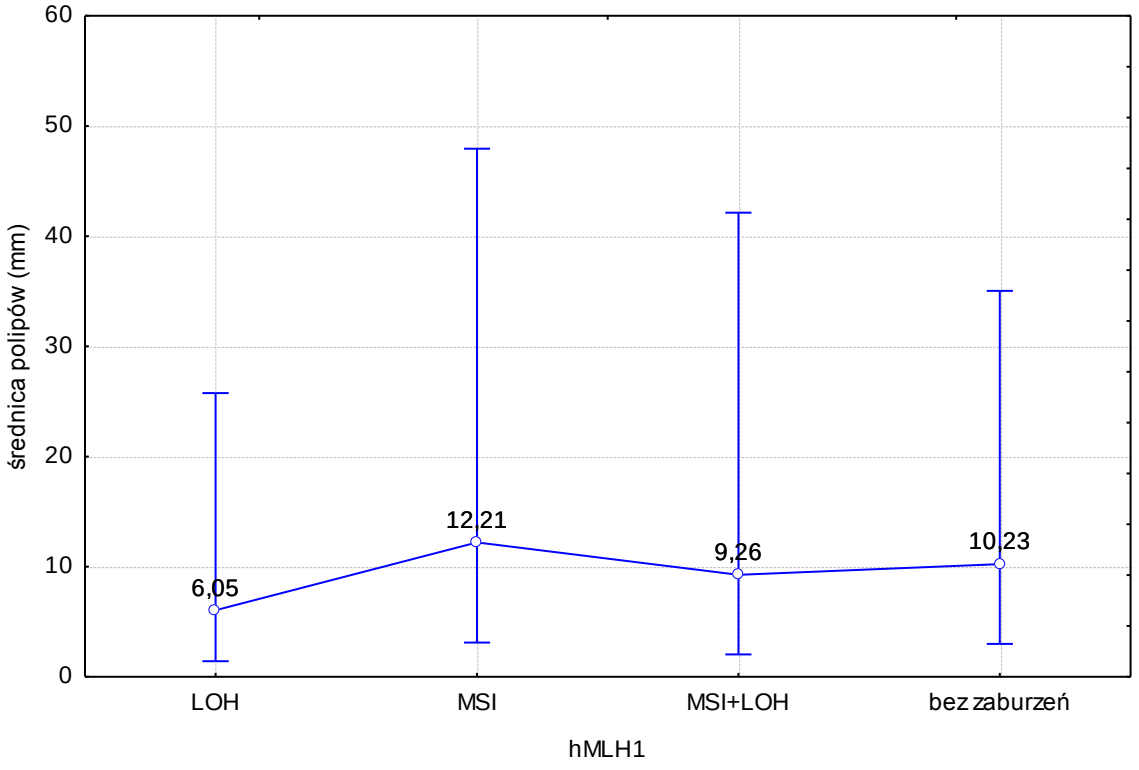
5.5.12. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera hMLH1

Tabela nr 37. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera hMLH1

	LOH	MSI	LOH + MSI	Bez zaburzeń
Średnica	6,05 mm	12,21 mm	9,26 mm	10,23 mm

Dla zaburzeń genetycznych w obrębie *locus* MLH1 stwierdzono, że polipy niewykazujące zaburzeń w obrębie tego markera osiągnęły średni rozmiar 10,23 mm. Polipy, w których stwierdzono LOH, mierzyły średnio 6,05 mm, natomiast polipy niestabilne mikrosatelitarnie osiągały wielkość 12,21 mm. Współobecność zaburzeń o typie MSI oraz LOH prowadziła do zwiększenia średnicy gruczolaków do średnio 9,26 mm (tabela nr 37, wykres nr 21).

Wykres nr 21. Średnica polipów a zaburzenia genetyczne dla markera hMLH1



5.6. Pojawienie się nowych polipów gruczolakowych jelita grubego w badaniach kontrolnych

Spośród 97 osób stanowiących badaną grupę (30 kobiet i 67 mężczyzn) zgodę na wykonanie kontrolnej kolonoskopii w okresie 90–360 dni po pierwszym badaniu wyraziło 86 osób (21 kobiet i 67 mężczyzn), tj. 88,65% badanych.

Tabela nr 38. Pojawienie się nowych polipów w badanej grupie

	Osoby, które zgłosiły się do kontroli	Nowe polipy
Kobiety	21 (70%)	2 (9,52%)
Mężczyźni	67 (100%)	13 (19,40%)
Łącznie	**86 (88,65%)**	**15 (17,44%)**

W kontrolnych badaniach kolonoskopowych pojawienie się nowych polipów jelita grubego stwierdzono u 15 osób (2 kobiet i 13 mężczyzn), tj. u 17,44% badanych (tabela nr 38).

Nowe polipy stwierdzono u 2 spośród 21 kobiet (9,52%), które zgłosiły się na badanie kontrolne, i u 13 spośród 67 ponownie przebadanych mężczyzn (19,4%) (tabela nr 38); nie zaobserwowano, by prawdopodobieństwo wystąpienia nowych polipów było związane z płcią ($x^2 = 2,92$; df = 1; p = 0,1368).

U żadnej z osób, u których stwierdzono obecność nowych polipów w kontrolnej kolonoskopii, nowe polipy nie pojawiły się w lokalizacji, w której znajdował się polip pierwotny. U 6 osób nowe polipy pojawiły się proksymalnie w stosunku do zmiany pierwotnej, a u 9 osób dystalnie w stosunku do lokalizacji polipa, który został usunięty podczas pierwszej kolonoskopii (tabela nr 39).

Tabela nr 39. Charakterystyka grupy osób, u których w kontrolnej kolonoskopii uwidoczniono nowe polipy

Lp	Inicjały chorego	Wiek (lata)	Płeć	Pierwsza kolonoskopia					Kolonoskopia kontrolna			
				Lokalizacja polipów w pierwszej kolonoskopii	Średnica usuniętego polipa (mm)	Typ histopatologiczny	Stopień dysplazji	Zaburzenia genetyczne	Lokalizacja polipa w kolonoskopii kontrolnej	Średnica usuniętego polipa (mm)	Typ histopatologiczny	Stopień dysplazji
1	K.W.	84	M	Kątnica	20	Gruczolak cewkowo-kosmkowy	Duży	MSI	Poprzecznica	5	Gruczolak cewkowy	Mały
2	T.D	60	M	Wstępnica	5	Gruczolak cewkowo-kosmkowy	Duży		Esica	7	Gruczolak kosmkowy	Mały
3	S.K.	73	M	Esica	10	Gruczolak kosmkowy	Duży		Odbytnica	5	Gruczolak kosmkowy	Średni
4	J.S.	60	M	Esica	15	Gruczolak cewkowy	Mały		Odbytnica	6	Gruczolak cewkowy	Mały
5	E.H.	50	M	Poprzecznica	7	Gruczolak cewkowy	Średni	MSI/ LOH	Esica	8	Gruczolak cewkowo-kosmkowy	Średni
6	K.M.	59	M	Poprzecznica	7	Gruczolak cewkowo-kosmkowy	Mały		Zstępnica	6	Gruczolak kosmkowy	Średni
7	C.A.	67	M	Esica	7	Gruczolak cewkowy	Średni	MSI/ LOH	Poprzecznica	5	Gruczolak kosmkowy	Mały
8	Z.S.	58	M	Zstępnica	30	Gruczolak kosmkowy	Średni		Esica	9	Gruczolak cewkowo-kosmkowy	Średni
9	S.M.	27	K	Wstępnica	5	Gruczolak cewkowy	Mały	LOH	Kątnica	10	Gruczolak cewkowo-kosmkowy	Średni
10	M.M.	60	M	Zstępnica	20	Gruczolak cewkowy	Mały		Odbytnica	5	Gruczolak kosmkowy	Mały
11	J.S.	64	M	Odbytnica	45	Gruczolak kosmkowy	Duży	MSI	Wstępnica	6	Gruczolak cewkowy	Mały
12	M.C.	79	M	Esica	20	Gruczolak kosmkowy	Duży		Wstępnica	7	Gruczolak cewkowo-kosmkowy	Mały
13	M.S.	61	K	Poprzecznica	15	Gruczolak cewkowo-kosmkowy	Średni		Zstępnica	10	Gruczolak cewkowy	Mały
14	R.M.	63	M	Wstępnica	5	Gruczolak cewkowy	Mały	LOH	Esica	5	Gruczolak cewkowy	Średni
15	F.A.	56	M	Odbytnica	8	Gruczolak cewkowy	Średni		Kątnica	7	Gruczolak cewkowy	Średni

W grupie osób, u których pojawiły się nowe polipy, podczas pierwszej kolonoskopii stwierdzono obecność 7 zmian o typie gruczolaków cewkowych, 4 zmian o typie gruczolaków kosmkowych i 4 zmian o typie gruczolaków cewkowo-kosmkowych. Dysplazja małego stopnia wystąpiła w 5 zmianach, średniego stopnia – w 5 przypadkach, dużego stopnia również w 5 zmianach (tabela nr 39).

Tabela nr 40. Pojawienie się nowych polipów a niestabilność mikrosatelitarnego DNA w polipie pierwotnym

	Osoby, które zgłosiły się do kontroli	Nowe polipy
MSI-H	16	4 (25%)
MSS	70	11 (15,71%)
Łącznie	**86**	**15 (17,44%)**

Wśród 16 chorych z grupy osób poddanych kontrolnej kolonoskopii, u których w pierwszym badaniu stwierdzono obecność polipów o wysokim stopniu niestabilności mikrosatelitarnego DNA, nowe zmiany zaobserwowano u 4 osób (25%), natomiast w grupie 70 chorych z polipami stabilnymi mikrosatelitarnie nowe zmiany pojawiły się u 11 z nich (15,71%) (tabela nr 40).

Nie dowiedziono, by prawdopodobieństwo pojawienia się nowych zmian zależało w istotny statystycznie sposób od obecności niestabilności mikrosatelitarnego DNA ($x^2 = 0,93$; df = 1; p = 0,33).

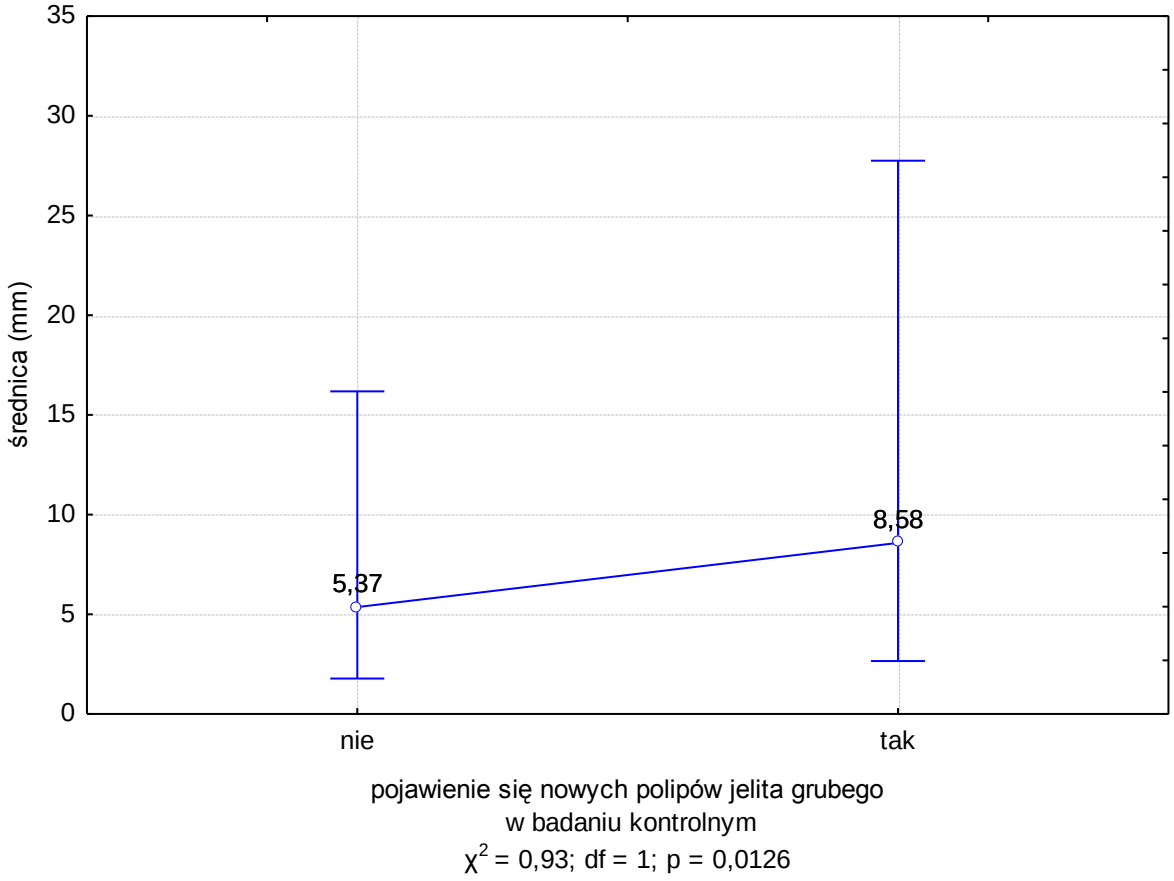
Tabela nr 41. Pojawienie się nowych polipów a utrata heterozygotyczności w polipie pierwotnym

	Osoby, które zgłosiły się do kontroli	Nowe polipy
LOH	16	4 (25%)
Bez LOH	70	11 (15,71%)
Łącznie	**86**	**15 (17,44%)**

Spośród 16 chorych, u których w pierwszym badaniu stwierdzono utratę heterozygotyczności, pojawienie się nowych zmian zaobserwowano u 4 z nich (25%), natomiast w grupie 70 chorych, które nie utraciły heterozygotyczności, nowe polipy zaobserwowano u 11 pacjentów (15,71%) (tabela nr 41). Nie dowiedziono, by prawdopodobieństwo pojawienia się nowych zmian zależało w istotny statystycznie sposób od utraty heterozygotyczności ($x^2 = 0,93$; df = 1; p = 0,33).

Interesujących informacji dostarcza analiza zależności pomiędzy średnicą usuniętych zmian a pojawieniem się nowych. Nowe polipy gruczolakowe zaobserwowano u pacjentów, u których w pierwszej kolonoskopii wykryto polipy o większej średnicy (x^2 = 0,93; df = 1; p = 0,0126) (wykres nr 22).

Wykres nr 22. Średnica polipa a pojawienie się nowych zmian w badaniu kontrolnym



5.7. Podsumowanie wyników

Tabela nr 42. Częstość zaburzeń w poszczególnych markerach

Marker	Zaburzenie	Liczba polipów (n)	Odsetek zmian (%)
p53-penta	MSI	2	1,54
	LOH	0	0
	MSI + LOH	2	1,54
	Bez zmian	126	96,92
Łącznie		130	100
p53-di	MSI	8	6,15
	LOH	19	14,62
	MSI + LOH	17	13,08
	Bez zmian	86	66,15
Łącznie		130	100
MET	MSI	4	3,08
	LOH	6	4,62
	MSI + LOH	3	2,31
	Bez zmian	117	90
Łącznie		130	100
DCC	MSI	6	4,62
	LOH	7	5,38
	MSI + LOH	7	5,38
	Bez zmian	110	84,62
Łącznie		130	100
NM23	MSI	6	4,62
	LOH	10	7,69
	MSI + LOH	11	8,46
	Bez zmian	103	79,23
Łącznie		130	100
hMLH1	MSI	0	0
	LOH	2	1,54
	MSI + LOH	0	0
	Bez zmian	128	98,46
Łącznie		130	100
hMSH2	MSI	5	3,85
	LOH	5	3,85
	MSI + LOH	4	3,08
	Bez zmian	116	89,23
Łącznie		130	100
HPC	MSI	0	0
	LOH	0	0
	MSI + LOH	0	0
	Bez zmian	130	100
Łącznie		130	100

Tabela nr 43. Średnica polipów a zaburzenia w poszczególnych markerach

Marker	Zaburzenie	Średnica polipów (mm)
p53-penta	MSI	6,86
	LOH	0
	MSI + LOH	13,16
	Bez zmian	7,75
P53-di	MSI	10,11
	LOH	7,4
	MSI + LOH	9,73
	Bez zmian	9,61
MET	MSI	9,25
	LOH	13,93
	MSI + LOH	4,25
	Bez zmian	12,78
DCC	MSI	10,13
	LOH	6,63
	MSI + LOH	13,46
	Bez zmian	7,75
NM23	MSI	13,42
	LOH	9,61
	MSI + LOH	5,25
	Bez zmian	10,34
hMLH1	MSI	12,21
	LOH	6,05
	MSI + LOH	9,26
	Bez zmian	10,23
APC	MSI	4,08
	LOH	6,60
	MSI + LOH	29,75
	Bez zmian	8,73
hMSH2	MSI	16,38
	LOH	10,78
	MSI + LOH	5,85
	Bez zmian	6,78

Tabela nr 44. Zestawienie wyników

Analizowany parametr	**Istotność statystyczna**
Niestabilność mikrosatelitarnego DNA a wiek	**Istotne statystycznie** $x^2 = 5,58$; df = 1; p = 0,0188
Niestabilność mikrosatelitarnego DNA a średnica polipów gruczolakowych	**Istotne statystycznie** F = 5,52; df = 3; p = 0,0015
Utrata heterozygotyczności a średnica polipów gruczolakowych	**Istotne statystycznie** F = 5,93; df = 3; p = 0,0036
Średnica polipów gruczolakowych a ich lokalizacja w poszczególnych odcinkach jelita grubego	**Istotne statystycznie** F = 2,85; df = 5; p = 0,0192
Średnica polipów gruczolakowych a ich typ histopatologiczny	**Istotne statystycznie** F =5,77; df =2; p =0,0041
Średnica polipów gruczolakowych a ich stopień dysplazji	**Istotne statystycznie** F = 14,63; df = 2; p <0,0001
Częstość pojawienia się nowych polipów gruczolakowych a płeć	nieistotne statystycznie $x^2 = 2,92$; df = 1; p = 0,1368
Częstość pojawienia się nowych polipów gruczolakowych a niestabilność mikrosatelitarnego DNA	nieistotne statystycznie $x^2 = 0,93$; df = 1; p = 0,33
Częstość pojawienia się nowych polipów gruczolakowych a utrata heterozygotyczności	nieistotne statystycznie $x^2 = 0,93$; df = 1; p = 0,33
Częstość pojawienia się nowych polipów gruczolakowych a wielkość gruczolaka w badaniu pierwotnym	**istotne statystycznie** $x^2 = 0,93$; df = 1; p = 0,0126

6. Omówienie wyników i dyskusja

Z badań epidemiologicznych wynika, że problem chorób jelita grubego w coraz większym stopniu dotyczy polskiego społeczeństwa [4]. Jest to zapewne związane ze zmianą trybu życia. Proces przemiany gruczolaka jelita grubego w raka jest dość dobrze (aczkolwiek nie do końca) zbadany i często przedstawiany w literaturze jako model kilkustopniowej karcynogenezy, w której główną rolę odgrywają zaburzenia w funkcjonowaniu onkogenów i genów supresorowych [1]. Najczęściej wymienia się mutacje genów APC, p53 i K-ras oraz utratę alleli w obrębie chromosomów 5q, 17p, 18q, 1p, 8p, 22q. Nie można jednak pominąć doniesień podnoszących istnienie dwóch głównych ścieżek genetycznych wyjaśniających procesy zachodzące podczas przemian gruczolaka w raka jelita grubego, tj. teorii niestabilności chromosomowej oraz niestabilności mikrosatelitarnego DNA. Niestabilność chromosomowa jest często spotykana w połączeniu z utratą heterozygotyczności *loci* genów odpowiedzialnych za powstanie nowotworów lub mutacjami genów p53 oraz K-ras. Niestabilność genomu jest rezultatem zaburzeń, które występują w działaniu mechanizmów sprawdzających dokładność parowania zasad w czasie replikacji DNA lub mechanizmów naprawczych. W takiej sytuacji może dojść do niekontrolowanego skrócenia lub wydłużenia łańcucha nukleotydowego. Zjawisko to szczególnie łatwo występuje w rejonach składających się z dużej liczby powtarzalnych, krótkich sekwencji DNA, zwanych mikrosatelitami.

W tych warunkach zyskuje na znaczeniu dokładne poznanie istoty zmian zachodzących w polipach jelita grubego, bezpośrednio poprzedzających wystąpienie raka.

W okresie od czerwca 2004 r. do lutego 2007 r. w II Katedrze Chirurgii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wykonano kolonoskopię u 2880 osób (1764 kobiety, 1116 mężczyzn). Polipy gruczolakowe jelita grubego wykryto u 259 (8,99%) chorych. Dalszymi badaniami objęto grupę 97 osób, które wyraziły – świadomie i dobrowolnie – zgodę na udział w nich oraz u których uzyskane z wywiadu i dokumentacji

medycznej dane kliniczne nie wskazywały na rodzinne występowanie raka jelita grubego ani żadnego innego nowotworu przewodu pokarmowego. Większość tych osób stanowili mężczyźni (67, tj. 69,07%); kobiet było ponad dwukrotnie mniej (30, tj. 30,93%). Średni wiek badanej grupy wyniósł 65,1 lat, odpowiednio: dla mężczyzn – 65,3 lat, dla kobiet – 65 lat. Należy podkreślić, że cała grupa była badana przez ten sam zespół endoskopistów, preparaty histopatologiczne oceniane były w tym samym ośrodku patomorfologicznym, natomiast badania genetyczne wykonano w jednym laboratorium biologii molekularnej.

W badaniach Liebermana grupa osób, u których wykonano kolonoskopię, składała się w niemal równych proporcjach z kobiet i mężczyzn (odpowiednio: kobiety – 47,8%, mężczyźni – 52,2%) [64]. Z doniesień Reguły wynika, że badaniem dotyczącym kolonoskopii wykorzystywanej jako metody badań przesiewowych objęto grupę osób, w której kobiety stanowiły 62,08%, a mężczyźni 37,92% [3]. W badaniach Banaszkiewicza średnia wieku osób, u których wykryto polipy, to 65 lat [65]. W badaniach Liebermana średnia wieku nie przekraczała 60 lat, natomiast w badaniach Reguły średnia wieku wynosiła 55,2 lat [3, 64]. Przytoczne dane świadczą, że grupy chorych, u których stwierdzono polipy jelita grubego, różnią się między sobą. Analizowana w niniejszej pracy grupa pacjentów nie była w szczególny sposób wyselekcjonowana, lecz stanowiła rzeczywistą grupę chorych z polipami jelita grubego.

Polipy gruczolakowe jelita grubego wykryto u 8,99% chorych, u których wykonano kolonoskopię. Reguła stwierdził polipy gruczolakowe u 9,5% badanych chorych, z badań Poxa natomiast wynika, że częstość występowania polipów gruczolakowych w populacji niemieckiej wynosi 20% [2, 3]. Porównując przytoczone wyniki, należy zauważyć, że częstość występowania polipów – nawet w podobnych przedziałach wiekowych – różni się w zależności od kraju, z którego pochodzi badana grupa. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy zbliżone są do zaprezentowanych przez Regułę, który prowadził swoje badania na populacji polskiej. Wydaje się, że miarę

upływu czasu i wydłużania się okresu oddziaływania współczesnych wzorców dietetycznych na polską populację częstość wykrywania polipów gruczolakowych będzie się zwiększać.

Shinya podaje w swojej pracy (podobnie jak Gillespie), że polipy gruczolakowe jelita grubego najczęściej lokalizują się w esicy [66, 67]. Banaszkiewicz w wynikach dotyczących lokalizacji polipów gruczolakowych nie uwzględnia precyzyjnego podziału na poszczególne odcinki jelita grubego, lecz jedynie podaje, że 91,76% wszystkich zmian gruczolakowych zlokalizowane było w lewej połowie okrężnicy [65]. Velayos także nie podaje dokładnej lokalizacji usuniętych zmian, ograniczając się do podziału na zmiany zlokalizowane od kątnicy do zgięcia śledzionowego (61%) oraz od zgięcia śledzionowego do odbytnicy (39%) [68]. W grupie chorych objętych analizą w niniejszej pracy polipy stwierdzano najczęściej w esicy (37,69%), oraz kolejno: w zstępnicy (21,53%), w poprzecznicy (17,69%) i w odbytnicy (10,79%). Uzyskane wyniki dotyczące rozmieszczenia gruczolaków są zatem zgodne z danymi prezentowanymi przez innych autorów. Należy zauważyć, że polipy gruczolakowe występowały we wszystkich odcinkach jelita grubego. Informacja ta zyskuje na znaczeniu szczególnie w kontekście pojawiającej się dyskusji o przydatności wykorzystania sigmoideoskopii w badaniach przesiewowych w kierunku raka jelita grubego. Na podstawie przedstawionych wyżej wyników należy uznać, że jedyną metodą pozwalającą na wykluczenie obecności polipów gruczolakowych w tym odcinku przewodu pokarmowego jest dokładne zbadanie całego jelita grubego, czyli pełna kolonoskopia do kątnicy.

Banaszkiewicz w swojej pracy określa częstość poszczególnych typów polipów gruczolakowych następująco: cewkowe – 65%, cewkowo-kosmkowe – 27%, kosmkowe – 8%, natomiast Shinya podaje, że gruczolaki cewkowe stanowiły 64,37%, cewkowo-kosmkowe 26,65%, a kosmkowe 8,98% [7, 66]. Wyniki badań Koha wskazują, że 80% wykrytych polipów gruczolakowych stanowiły polipy cewkowe, natomiast 20% – cewkowo-kosmkowe [69]. Biorąc pod uwagę typ histopatologiczny usuniętych polipów stanowiących

przedmiot pracy, 68 z nich (52,3%) to gruczolaki cewkowe, 49 (37,7%) to gruczolaki cewkowo-kosmkowe, a 13 (10%) to gruczolaki kosmkowe.

Uzyskane wyniki są zgodne z przedstawionymi w cytowanej literaturze. Dokładna ocena histopatologiczna wykrytych w kolonoskopii gruczolaków usuwanych w trakcie polipektomii ma kluczowe znaczenie. Po pierwsze, pozwala na określenie radykalności zabiegu, po drugie zaś dostarcza informacji o potencjalnym ryzyku przemiany gruczolaka w gruczolakoraka. W opinii wielu autorów największe ryzyko rozwoju raka na podłożu gruczolaka występuje w przypadku gruczolaków kosmkowych [3, 5, 6, 70]. Uzyskanie zatem informacji o braku radykalności polipektomii, szczególnie w przypadku gruczolaków kosmkowych, powinno stanowić podstawę do podjęcia decyzji o natychmiastowym wykonaniu kontrolnej kolonoskopii i poszerzeniu rozległości zabiegu endoskopowego lub też kwalifikacji do leczenia operacyjnego.

Elementem oceny histopatologicznej gruczolaków jelita grubego jest także określenie stopnia dysplazji. Odniesienie się w dyskusji do tego zagadnienia jest o tyle utrudnione, że różne ośrodki stosują dla określenia stopnia dysplazji odmienne skale oceny. I tak, Reguła przyjmuje w swojej pracy podział na zmiany o niskim i wysokim stopniu dysplazji, przy czym do drugiej grupy zalicza także polipy gruczolakowe ze śródśluzówkowym ogniskiem gruczolakoraka. W opisanej przez niego grupie chorych zmiany z tak określonym wysokim stopniem dysplazji wystąpiły w 23,47% usuniętych gruczolaków [3]. Van Stolk, analizując w swojej pracy stopień dysplazji gruczolaków jelita grubego, podzieliła badaną grupę na dwie podgrupy. Do pierwszej, obejmującej 95% badanych zmian, zaliczyła polipy gruczolakowe z małym i średnim stopniem dysplazji. W 4% zmian wykryła dysplazję dużego stopnia, a w 1% – ogniska gruczolakoraka śródśluzówkowego [71]. Rubio posługuje się w swoich badaniach klasyfikacją wiedeńską, określając częstość występowania poszczególnych stopni dysplazji w zależności od typu histopatologicznego gruczolaka jelita grubego. Do grupy o małym i średnim stopniu dysplazji zalicza zmiany odpowiadające

w klasyfikacji wiedeńskiej kategorii 3, do grupy o dużym stopniu dysplazji – kategorii 4.1. I tak, 52,6% gruczolaków cewkowych to zmiany o małym i pośrednim stopniu dysplazji, 44,2% natomiast o dużym stopniu dysplazji. Pozostałe 3,2% przypadków to zmiany z ogniskiem śródśluzówkowego raka jelita grubego i obejmujące pozostałe stopnie klasyfikacji wiedeńskiej. Spośród gruczolaków cewkowo-kosmkowych 23,6% to zmiany o małym i średnim stopniu dysplazji, 68,1% to gruczolaki o dużym stopniu dysplazji, a 8,3% to zmiany obejmujące utkanie gruczolakoraka wewnątrzśluzówkowego i inne stopnie klasyfikacji wiedeńskiej. Wśród polipów kosmkowych 20,9% zmian cechuje dysplazja małego i średniego stopnia, a 49,5% gruczolaków – dysplazja dużego stopnia [72].

Analizując stopnie dysplazji w badanej grupie, należy stwierdzić, że ogółem w 38 (29,25%) polipach gruczolakowych wystąpiła dysplazja małego stopnia, w 42 (32,30%) – dysplazja średniego stopnia, a w 50 (38,45%) – dysplazja dużego stopnia. Biorąc pod uwagę poszczególne typy histopatologiczne gruczolaków jelita grubego, należy wskazać, że 30 (44,11%) spośród 68 gruczolaków cewkowych cechował mały, 21 (30,88%) – średni, a 17 (25,01%) – duży stopień dysplazji. Wśród 49 gruczolaków cewkowo-kosmkowych 8 polipów (16,32%) to zmiany o małym, 16 (32,65%) o średnim, a 25 (51,03%) o dużym stopniu dysplazji. Wśród 13 gruczolaków kosmkowych nie wystąpiły zmiany o małym stopniu dysplazji, 5 (38,46%) polipów miało dysplazję średniego stopnia, a 8 (61,54%) dysplazję dużego stopnia. Uzyskane wyniki są zbieżne ze wskazanymi w cytowanych publikacjach. Zwraca uwagę duży odsetek zmian o wysokim stopniu dysplazji, szczególnie wśród gruczolaków kosmkowych.

W ostatnich latach coraz wyraźniejsza staje się tendencja do poszerzania diagnostyki patomorfologicznej (obejmującej tradycyjne badanie histopatologiczne do oceny polipów gruczolakowych jelita grubego) o dodatkowe metody diagnostyczne, takie jak badania immunohistochemiczne czy – coraz popularniejsze – badania molekularne.

Barry w swojej pracy analizowała częstość występowania mutacji genu K-ras w grupie obejmującej 207 osób, u których usunięto łącznie 303 polipy gruczolakowe [55]. W przeprowadzonych przez nią badaniach częstość występowania mutacji genu K-ras wyniosła średnio 3%, przy czym mutacja genu K-ras była częstsza w podgrupie polipów o średnicy >0,5 cm (10,8%) aniżeli w podgrupie polipów gruczolakowych o średnicy nieprzekraczającej 0,5 cm (0,8%). Uznała zatem, że częstość występowania mutacji genu K-ras wiąże się ze wzrostem średnicy i stopnia dysplazji polipów gruczolakowych. Nie podała jednak szczegółów dotyczących miejsc, w których doszło do mutacji. Wyniki uzyskane przez grupę badawczą kierowaną przez Haradę określają częstość występowania mutacji genu K-ras w gruczolakach jelita grubego na 41% [73]. Kinoshita w pracy analizującej częstość występowania mutacji genu K-ras uznaje występowanie mutacji w tym genie w komórkach raka jelita grubego za dowód potwierdzający kluczową rolę sekwencji gruczolak–gruczolakorak w rozwoju raka jelita grubego [74]. Saraga wykryła istnienie mutacji genu K-ras w 57% przebadanych gruczolaków jelita grubego [75].

W naszych badaniach mutacja genu K-ras w obrębie eksonu 1 wystąpiła u 27 chorych (20,77%), a w obrębie eksonu 2 u 7 chorych (5,38%). W ostatnim czasie coraz częściej pojawiają się doniesienia o częstości występowania mutacji genu K-ras, co ma związek z przydatnością ich oznaczania w planowaniu leczenia systemowego z wykorzystaniem monoklonalnych przeciwciał anty-EGFR u chorych na raka jelita grubego. Nie są aktualnie znane jednoznaczne wyniki badań pozwalające na ocenę przydatności oznaczania mutacji genu K-ras w przypadku polipów gruczolakowych. Wystąpienie mutacji genu K-ras u chorych na raka jelita grubego łączone jest z gorszym rokowaniem i opornością na terapię monoklonalnymi przeciwciałami anty-EGFR [76, 77]. Obserwowane jest niekiedy współwystępowanie niektórych mutacji w obrębie genu K-ras z niestabilnością mikrosatelitarnego DNA [58].

W ostatnich latach ukazało się wiele publikacji na temat niestabilności mikrosatelitarnego DNA w rakach jelita grubego, natomiast tylko nieliczne traktują o częstości niestabilności mikrosatelitarnego DNA w polipach gruczolakowych. Ricciardiello określa częstość występowania niestabilności mikrosatelitarnego DNA w polipach gruczolakowych jelita grubego na 45,7% (MSI-H – 17,1%, MSI-L – 28,6%) [78]. Niektórzy badacze uważają, iż zjawisko to występuje znacznie rzadziej; np. Samowitz podaje, że niestabilność mikrosatelitarnego DNA w występuje w 1,8% polipów gruczolakowych jelita grubego, natomiast według Aaltonena – w 3% przypadków [79, 80]. Sasaki wykrył niestabilność mikrosatelitarnego DNA u 33% osób z objętej badaniem grupy chorych z licznymi polipami jelita grubego [81]. Z badań Iino wynika natomiast, że niestabilność mikrosatelitarnego DNA występuje w 13% polipów gruczolakowych [51].

W grupie stanowiącej przedmiot niniejszej pracy niestabilność mikrosatelitarnego DNA stwierdzono w 21 polipach gruczolakowych (16,16%), przy czym w przypadku 6 (4,62%) badanych zmian była to niestabilność wysokiego stopnia (MSI-H), a w 15 (11,54%) niestabilność niskiego stopnia (MSI-L).

W badanej grupie chorych stwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy średnią wieku i płcią a fenotypem polipów. I tak, chorzy z niestabilnością mikrosatelitarnego DNA wysokiego stopnia byli statystycznie znamiennie młodsi (kobiety – 58,6 lat, mężczyźni – 56 lat) aniżeli osoby z polipami, w których nie wykryto niestabilności (kobiety – 63,3 lat, mężczyźni – 68,1 lat). W dostępnej literaturze brak danych dotyczących tego typu zależności w polipach gruczolakowych jelita grubego.

Ishiguro donosi, że polipy z MSI-H mają większą średnicę (10 mm) niż polipy z MSI-L (6,1 mm) [82]. W naszej pracy również wykazano istnienie istotnej statystycznie zależności pomiędzy średnicą polipów a obecnością i stopniem mikrosatelitarnej niestabilności w polipach gruczolakowych. Polipy z mikrosatelitarną niestabilnością wysokiego stopnia (MSI-H) są większe (średnio 16,95 mm) aniżeli polipy, w których niestabilności (MSS)

nie wykryto (średnio 5,92 mm) lub wykryto niestabilność niskiego stopnia, tj. MSI-L (8,74 mm). W literaturze można znaleźć informacje, z których wynika, iż guzy o charakterze raka jelita grubego, w komórkach których wykryto wysokiego stopnia niestabilność mikrosatelitarnego DNA (MSI-H), mają większą średnicę niż raki, w których komórkach nie wykryto niestabilności mikrosatelitarnego DNA (MSS) lub wykryto niestabilność niskiego stopnia (MSI-L) [83–85].

W badanej grupie chorych wykazano, że polipy gruczolakowe bez utraty heterozygotyczności są większe (9,33 mm) aniżeli polipy, w których wykryto utratę heterozygotyczności (3,88 mm). Trudno odnieść się do wyników innych autorów, gdyż w dostępnej literaturze brak jest informacji o przeprowadzeniu podobnych badań.

W objętej analizą grupie chorych stwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy lokalizacją polipów a ich średnicą. I tak, polipy gruczolakowe o największej średnicy stwierdzono w odbytnicy (średnio 13,51 mm) i kątnicy (średnio 7,18 mm), natomiast najmniejsze zmiany obserwowano we wstępnicy (średnio 4,73 mm). Polipy gruczolakowe w poprzecznicy osiągały średnicę średnio 7,6 mm, w zstępnicy – 8,78 mm, a w esicy – 8,38 mm. Waye w swoich badaniach wykazał, że jedynie 1% polipów gruczolakowych jelita grubego osiąga średnicę >35 mm. Zaobserwował on ponadto, że polipy o większych rozmiarach zlokalizowane w lewej połowie okrężnicy częściej są uszypułowane aniżeli polipy o tym samym rozmiarze w kątnicy czy wstępnicy, nie opisał jednak dokładnie różnic w średnicy polipów w poszczególnych odcinkach okrężnicy [86]. Gillespie natomiast donosi, że 48% badanych polipów gruczolakowych miało średnicę <1 cm, 34,6% – 1–2 cm, a 17,3% – >2 cm [67]. Nie podał jednak danych o przeciętnej średnicy polipów gruczolakowych, ograniczając się do stwierdzenia, że najwięcej zmian o średnicy >2 cm było zlokalizowanych w esicy (22,08%) [67].

W niniejszej pracy określono średnicę polipów gruczolakowych dla ich poszczególnych typów histopatologicznych. Gruczolaki cewkowe osiągały

średnicę średnio 7,64 mm, gruczolaki cewkowo-kosmkowe – 8,72 mm, a gruczolaki kosmkowe – 4,33 mm. Zaobserwowane różnice nie mają cech znamienności statystycznej. Gillespie w swoich badaniach zaobserwował, że najwięcej zmian o średnicy >2 cm to gruczolaki cewkowe (47,5%), następnie gruczolaki cewkowo-kosmkowe (38,2%) oraz gruczolaki kosmkowe (11,5%) [67]. Z kolei w badaniach Shinyi zmianami o największej średnicy (>3 cm) były najczęściej gruczolaki kosmkowe (33%), rzadziej natomiast gruczolaki cewkowe (27,5%), a najrzadziej gruczolaki cewkowo-kosmkowe (21,4%) [66]. Jak zatem widać, istnieją rozbieżności pomiędzy wynikami prezentowanymi przez poszczególnych autorów. Wynika to zapewne z różnej charakterystyki demograficznej badanej grupy.

Bardzo ważnym zagadnieniem, wokół którego toczą się gorące dyskusje wśród naukowców zajmujących się tematyką polipów gruczolakowych jelita grubego, jest pojawienie się nowych polipów gruczolakowych u chorych poddanych radykalnej endoskopowej polipektomii. Bonithon-Kopp określił częstość pojawiania się nowych polipów w kontrolnej kolonoskopii wykonywanej w 4. miesiącu po endoskopowej polipektomii na 5,5–18,1% [87]. Martinez donosi o pojawieniu się nowych polipów w badaniu endoskopowym wykonywanym rok po endoskopowej polipektomii u 9,4–16,6% chorych [88]. Noshirwani w kontrolnych kolonoskopiach wykonywanych w okresie 10–42 miesięcy po usunięciu polipa gruczolakowego wykrył nowe polipy u 3–34,5% chorych [89]. Van Stolk wykonała kontrolną kolonoskopię u chorych z grupy objętej badaniem 4 lata po polipektomii. Pojawienie się nowych polipów stwierdziła u 3,2–6% pacjentów [71]. Natomiast Winawer podaje w swej publikacji, że nowe zmiany o charakterze polipów gruczolakowych pojawiły się u 36,5% osób poddanych endoskopowej polipektomii [90].

W naszym badaniu kontrolną kolonoskopię wykonano u 86 spośród 97 chorych (88,65%) stanowiących badaną grupę. Pojawienie się nowych polipów zaobserwowano u 15 z nich, co stanowi 17,44%. Nowe polipy pojawiły się u 13 spośród 67 mężczyzn (19,4%) oraz u 2 spośród 21 kobiet

(9,52%), jednakże zaobserwowane różnice w zależności od płci nie noszą cech znamienności statystycznej, co należy wiązać z różną liczebnością mężczyzn i kobiet w badanej grupie. Jednakowoż dwukrotnie częstsze wystąpienie nowych polipów wśród mężczyzn niż u kobiet powinno skłonić do baczniejszej obserwacji mężczyzn i ustalenia w tej grupie chorych częstszych badań kontrolnych.

Wśród czynników związanych z większym odsetkiem nowych polipów, które się pojawiły po uprzednio wykonanej endoskopowej polipektomii, Fossi wymienia średnicę polipa gruczolakowego wynoszącą >1 cm [91]. Podobnie uważają Martinez i Noshirwani [88, 89]. Winawer natomiast twierdzi, że prawdopodobieństwo pojawienia się nowych gruczolaków jest większe już przy średnicy polipa >0,6 cm [90]. W naszej grupie chorych zaobserwowano, że z polipami o średnicy >8,7 mm wiąże się statystycznie znamiennie istotnie większe ryzyko pojawienia się nowych zmian aniżeli z mniejszymi polipami. Z tego względu dokładne i staranne określenie średnicy usuwanego polipa powinno się stać stałym elementem opisu wyniku badania kolonoskopowego.

Pod uwagę brany był również stopień dysplazji jako czynnik mający pomóc w określeniu ryzyka pojawiania się nowych polipów w kontrolnej kolonoskopii. Bonithon-Kopp w swoich badaniach nie wykazał istotnej statystycznie zależności pomiędzy częstością pojawienia się nowych polipów gruczolakowych w kolonoskopii kontrolnej a stopniem dysplazji polipów usuwanych podczas pierwszej kolonoskopii [87]. Również Van Stolk nie wykazała, aby pojawienie się nowych polipów gruczolakowych miało związek ze stopniem dysplazji zmian usuniętych w trakcie endoskopowej polipektomii wykonywanej podczas wyjściowego badania kolonoskopowego [71]. W naszej grupie nowe polipy pojawiły się u 5 osób, u których polipy usunięte podczas pierwszej kolonoskopii cechowała dysplazja małego stopnia, a także u 5 chorych z polipami z dysplazją średniego stopnia i u 5 z polipami z dysplazją dużego stopnia. Nasze badania – potwierdzając obserwacje innych naukowców – wskazują na fakt, że oznaczanie stopnia dysplazji, choć

konieczne, nie może być uwzględniane jako wskaźnik określający ryzyko pojawienia się nowych zmian w kontrolnej kolonoskopii.

Zaobserwowaliśmy ponadto, że wśród 16 badanych, u których wykryto polipy gruczolakowe z wysokiego stopnia niestabilnością mikrosatelitarnego DNA, nowe polipy pojawiły się u 4 z nich (25%), natomiast wśród 70 badanych, u których stwierdzono polipy mikrosatelitarnie stabilne, nowe polipy pojawiły się u 11 z nich (15,71%). Brak w dostępnej aktualnie literaturze wyników badań, do których można byłoby odnieść uzyskane przez nas wyniki. Aspekt ten z pewnością powinien skłonić do podjęcia dalszych badań. Obserwowana w naszej pracy różna częstość występowania nowych polipów u osób z polipami z niestabilnością mikrosatelitarnego DNA oraz u chorych z polipami mikrosatelitarnie stabilnymi skłania do rozważenia oceny niestabilności mikrosatelitarnego DNA jako jednego z parametrów pozwalających określić ryzyko pojawienia się nowych polipów.

Nie są nam także znane wyniki badań, które traktowałyby o wpływie utraty heterozygotyczności przez komórki polipów gruczolakowych na pojawienie się nowych gruczolaków w badaniu kontrolnym. W grupie 16 chorych, u których stwierdzono w pierwszym badaniu utratę heterozygotyczności, nowe zmiany pojawiły się u 4 z nich (25%), natomiast wśród 70 chorych, u których nie doszło do utraty heterozygotyczności, nowe polipy zaobserwowano u 11 z nich (15,71%).

Naszym zdaniem, celowe są dalsze badania i obserwacje, które umożliwią wykorzystanie informacji o występowaniu w komórkach polipów gruczolakowych usuwanych metodą endoskopowej polipektomii niestabilności mikrosatelitarnego DNA oraz utraty heterozygotyczności dla określenia częstości wykonywania kontrolnych kolonoskopii.

Martinez, Noshirwani i van Stolk na podstawie własnych doświadczeń proponują, aby osoby, u których usunięto endoskopowo polipy gruczolakowe jelita grubego, przyszeregować do jednej z dwóch grup [71, 88, 89]. Do grupy tzw. wysokiego ryzyka proponują zaliczyć osoby z polipami o średnicy >10 mm, o utkaniu gruczolaka kosmkowego oraz osoby z gruczolakami

o wysokim stopniu dysplazji niezależnie od typu histopatologicznego. Do drugiej zaś, określanej jako grupa niskiego ryzyka, proponują zaliczyć wszystkich pozostałych chorych. Winawer zaś proponuje, aby o czasie wykonywania kontrolnej kolonoskopii decydowała liczba i wielkość usuniętych polipów gruczolakowych jelita grubego [92]. U osób, u których usunięto 1 lub 2 polipy o średnicy <10 mm, należy wykonać kontrolną kolonoskopię po upływie 5 lat. Natomiast chorzy, u których stwierdzono więcej niż 3 gruczolaki o średnicy >10 mm i z cechami dysplazji dużego stopnia, powinni się poddać kontrolnej kolonoskopii po upływie 3 lat.

Szacuje się, że aktualnie około 25–50% wszystkich wykonywanych w ośrodkach endoskopowych kolonoskopii to badania kontrolne u osób po endoskopowej polipektomii [93, 94]. Precyzyjne określenie czasu wykonania kontrolnych badań kolonoskopowych zyskuje na znaczeniu szczególnie wobec wciąż utrudnionego dostępu do badań endoskopowych oraz ryzyka powikłań związanego z wykonywaniem kolonoskopii. Wzbogacenie kryteriów umożliwiających zaszeregowanie chorych do poszczególnych grup ryzyka nawrotów polipów gruczolakowych jelita grubego o wyniki badań niestabilności mikrosatelitarnego DNA mogłoby pozwolić na jeszcze bardziej precyzyjne ich określenie, a jednocześnie wskazanie grupy chorych w największym stopniu zagrożonych rozwojem nowych gruczolaków, na podłożu których może dojść do rozwoju gruczolakoraka.

7. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że:

1. Najczęstszym typem polipów gruczolakowych jelita grubego w badanej grupie są gruczolaki cewkowe (52,3%), a następnie: gruczolaki cewkowo-kosmkowe (37,7%) oraz gruczolaki kosmkowe (10%).
2. W stanowiącej przedmiot badań grupie gruczolaki o małym stopniu dysplazji stanowią 29,23%, o średnim stopniu dysplazji – 32,3%, natomiast o dużym stopniu dysplazji – 38,47%. Dysplazja dużego stopnia dotyczy najczęściej polipów kosmkowych (61,54%).
3. a. Niestabilność mikrosatelitarnego DNA stwierdzono w 16,16% badanych polipów gruczolakowych, przy czym w 4,62% tych zmian zaobserwowano niestabilność mikrosatelitarnego DNA wysokiego stopnia, a w 11,54% – niestabilność mikrosatelitarnego DNA niskiego stopnia.
   b. Niestabilność mikrosatelitarnego DNA częściej występuje u osób młodszych.
   c. Prawdopodobieństwo wystąpienia niestabilności mikrosatelitarnego DNA jest większe w przypadku kobiet niż mężczyzn.
   d. Niestabilność mikrosatelitarnego DNA występuje najczęściej w polipach gruczolakowych zlokalizowanych w kątnicy.
4. Zwiększonym ryzykiem pojawienia się nowych polipów jelita grubego obarczone są osoby płci męskiej, u których polipy osiągają średnicę >8 mm i w których wykryto niestabilność mikrosatelitarnego DNA wysokiego stopnia lub utratę heterozygotyczności.

   Naszym zdaniem, celowe są dalsze badania i obserwacje, które umożliwią wykorzystanie informacji o występowaniu w komórkach polipów gruczolakowych usuwanych metodą endoskopowej polipektomii niestabilności mikrosatelitarnego DNA oraz utraty heterozygotyczności dla określenia częstości wykonywania kontrolnych kolonoskopii.

8. Streszczenie

Proces przemiany gruczolaka jelita grubego w raka jest często przedstawiany w literaturze jako model kilkustopniowej karcynogenezy, w której główną rolę odgrywają zaburzenia w funkcjonowaniu onkogenów i genów supresorowych (APC, p53, K-ras), utrata alleli w obrębie chromosomów 5q, 17p i 18q, a także dwie główne ścieżki genetyczne (tj. teoria niestabilności mikrosatelitarnego DNA i teoria niestabilności chromosomalnej).

Do podjęcia badań, których celem było określenie częstości występowania poszczególnych typów histopatologicznych polipów gruczolakowych jelita grubego wraz z określeniem odsetka konkretnych stopni dysplazji, skłoniła zwiększająca się w polskiej populacji liczba chorych na nowotwory jelita grubego. Ważnym aspektem badań było określenie częstości występowania niestabilności mikrosatelitarnego DNA w polipach gruczolakowych jelita grubego oraz zbadanie, czy jej występowanie wiąże się z płcią i wiekiem osób z badanej grupy oraz lokalizacją i średnicą gruczolaków. Na podstawie uzyskanych wyników podjęto próbę wskazania chorych obarczonych największym ryzykiem pojawienia się nowych polipów gruczolakowych jelita grubego.

W okresie od czerwca 2004 r. do lutego 2007 r. w II Katedrze Chirurgii CM UJ w Krakowie wykonano kolonoskopię u 2880 osób (1764 kobiety, 1116 mężczyzn). Polipy gruczolakowe jelita grubego wykryto u 259 (8,99%) osób. Dalszymi badaniami objęto 97 osób, które – świadomie i dobrowolnie – wyraziły zgodę na udział w nich oraz u których uzyskane z wywiadu i dokumentacji medycznej dane kliniczne nie wskazywały na rodzinne występowanie raka jelita grubego ani żadnego innego nowotworu przewodu pokarmowego. W badanej grupie znalazło się 30 kobiet (średnia wieku 65,3 lat) oraz 67 mężczyzn (średnia wieku 65,1 lat). Średnia wieku dla całej 97-osobowej grupy wynosiła 65,1 lat.

Pobrany w trakcie endoskopowej polipektomii materiał weryfikowano histopatologicznie. Do badań molekularnych wykorzystywano wycinki z polipów gruczolakowych oraz próbki krwi obwodowej zamrażane

bezpośrednio po otrzymaniu w temperaturze –80°C. Ekstrakcję DNA wykonywano przy użyciu komercyjnego zestawu QIAmp Mini Kit. Wyizolowany materiał DNA służył jako matryca w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). We wszystkich przypadkach analizowano DNA pod kątem obecności niestabilności mikrosatelitarnego DNA przy użyciu urządzenia ABI PRISM 310 Genetic Analyser sterowanego oprogramowaniem GeneScan i GenoTyper firmy Applera Corporation. Wykorzystywano panel znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi primerów flankujących sekwencję mikrosatelitarną wokół genów: APC, DCC, NM23, hMLH1, hMSH2, HPC1, MET, p53 (primery dimerowych i pentamerowych sekwencji mikrosatelitarnych).

Zgodnie z zaleceniami WHO (World Health Organisation), za wysoce niestabilne (MSI-H) przyjmowano polipy wykazujące niestabilność mirosatelitarnego DNA (MSI) w przynajmniej 30% badanych *loci*, za zmiany z niskiego stopnia niestabilnością mikrosatelitarnego DNA (MSI-L) – polipy wykazujące MSI przynajmniej w jednym badanym *locus* z wykluczeniem zmian MSI-H. Pozostałe polipy uznano za polipy mikrosatelitarnie stabilne (MSS). W każdym badanym polipie oprócz MSI odnotowywano utratę heterozygotyczności (LOH). Ponadto każdy polip sprawdzono pod kątem występowania mutacji genu K-ras w zakresie eksonu 1 i 2 z wykorzystaniem metody SSCP (*single-stranded conformational polymorphism*). W okresie 90–360 dni od pierwszej kolonoskopii wykonano u 86 chorych (78,2%) ponowne badanie endoskopowe w celu poszukiwania nowych polipów jelita grubego.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programów SAS (modele liniowe) i STATISTICA (analiza klastrowa). Korelację Mantela oraz jej istotność obliczono przy użyciu programu BIODIVERSITY 4.0.

U 97 osób stanowiących badaną grupę usunięto łącznie 207 polipów gruczolakowych. W żadnym z tych polipów nie stwierdzono utkania gruczolakoraka. Badania genetyczne, których wyniki stanowiły przedmiot dalszej analizy, przeprowadzono na 130 polipach. Nie przebadano

genetycznie 77 polipów, były to bowiem zmiany, które nie kwalifikowały się do tych badań z powodu zbyt małych rozmiarów (cały usunięty materiał tkankowy został wykorzystany do badania histopatologicznego).

Wśród 130 przebadanych genetycznie polipów znajdowały się zmiany pochodzące od wszystkich 97 osób. Zmiany najczęściej występowały w esicy. Wśród wykrytych polipów gruczolaki cewkowe stanowiły 52,3%, gruczolaki cewkowo-kosmkowe 37,7%, a gruczolaki kosmkowe 10%. Gruczolaki o małym stopniu dysplazji stanowiły 29,23% badanej grupy, zmiany o średnim stopniu dysplazji – 32,3%, natomiast o dużym stopniu dysplazji – 38,47%. Dużym stopniem dysplazji cechowały się najczęściej polipy kosmkowe (61,54%). Niestabilność mikrosatelitarnego DNA stwierdzono w 16,16% objętych badaniem polipów gruczolakowych, przy czym w 4,62% tych polipów zaobserwowano niestabilność mikrosatelitarnego DNA wysokiego stopnia, a w 11,54% polipów niestabilność mikrosatelitarnego DNA niskiego stopnia. Niestabilność mikrosatelitarnego DNA najczęściej stwierdzono w polipach gruczolakowych zlokalizowanych w kątnicy, częściej u osób młodszych. Prawdopodobieństwo jej wystąpienia było większe w przypadku kobiet niż mężczyzn. Analizując występowanie utraty heterozygotyczności zaobserwowano, że wraz z postępującą LOH dla badanych amplikonów zaznaczała się tendencja do zmniejszania się średnicy polipów. Stwierdzono też, że mutacje genu K-ras w 20,77% polipów gruczolakowych jelita grubego występują w zakresie eksonu 1, a w 5,38% gruczolaków – w zakresie eksonu 2. W wykonanych po roku kontrolnych kolonoskopiach stwierdzono, że nowe polipy pojawiły się u 15% chorych (7% kobiet i 15% mężczyzn). Zwiększonym ryzykiem pojawienia się nowych polipów jelita grubego obarczone były osoby płci męskiej, u których polipy osiągały średnicę >8 mm i w których wykryto niestabilność mikrosatelitarnego DNA wysokiego stopnia lub utratę heterozygotyczności.

Naszym zdaniem, celowe są dalsze badania i obserwacje, które umożliwią wykorzystanie informacji o występowaniu w komórkach polipów

gruczolakowych, usuwanych metodą endoskopowej polipektomii, niestabilności mikrosatelitarnego DNA oraz utraty heterozygotyczności dla określenia częstości wykonywania kontrolnych kolonoskopii.

Summary

The progression of colorectal adenoma to colorectal carcinoma is often described as a model of multistep carcinogenesis, in which the major role play disrupted functions of oncogenes and tumor suppressor genes (APC, p-53, K-ras), allelic losses of 5q, 17p and 18q loci, as well as the existence of two genetic pathways – theories of microsatellite instability and chromosome instability.

The growing incidence of colorectal carcinoma in the Polish population encouraged us to conduct research aimed at determination of the frequency of different histopathological types of colorectal adenomas and the degree of particular stages of dysplasia. An important aspect of our research was the analysis of microsatellite instability frequency in colorectal adenomas, and determination whether microsatellite instability could be associated with gender and age of analyzed cohort, as well as with localization and diameter of adenoma. Basing on our findings, we tried to select a group of patients with the highest risk of new colorectal adenoma.

Between June 2004 and February 2007 in the Second Department of Surgery of Medical College of Jagiellonian University in Krakow colonoscopy was performed in 2880 people (1764 women, 1116 men). Colorectal adenomas were detected in 259 persons (8.99%). Further research was conducted in a group consisting of 97 individuals who gave informed consent prior to the study. In this group 207 colorectal adenoma were removed and the data obtained during an interview and from medical records indicated no familiar history of colorectal cancer or any other digestive system cancers incidence. The study group encompassed 30 women (mean age: 65.3 years) and 67 men (mean age: 65.1 years). The mean age for the whole group of 97 individuals was 65.1 years.

The samples obtained during endoscopic polypectomy were histopathologically verified. Biopsies from adenomas and peripheral blood samples, frozen immediately in -80°C after receiving, underwent molecular studies. DNA extraction was performed with application of QIAmp Mini Kit.

Isolated DNA was used as a template for polymerase chain reaction (PCR), performed to amplify DNA regions of interest, with application of nine primer set. In all cases DNA was analyzed for microsatellite instability, using ABI PRISM 310 Genetic Analyser, programs GeneScan and GenoTyper (Applera Corporation). A panel of fluorescent-dye-labeled primers flanking microsatellites surrounding genes: APC, DCC, NM23, hMLH-1, hMSH-2, HPC-1, MET, p-53 (primers for dimeric and pentameric microsatellites) was applied. According to WHO (World Health Organization) recommendations, polyps were defined as highly unstable (MSI–H) if they exhibited MSI at least in 30% of examined loci, and polyps classified as MSI-L were showing MSI at least in one of examined loci with exclusion of changes MSI-H. The remaining polyps were considered as polyps microsatellite stable (MSS). In each polyp apart from microsatellite instability (MSI) loss of heterozygosity was detected (LOH). In addition, each polyp was examined for the presence of K-ras gene mutations in exons 1 and 2, using SSCP (*Single-Stranded Conformational Polymorphism).* In the period of 90 to 360 days after the initial colonoscopy a follow-up endoscopy examination was performed in 86 patients (78.2%), to search for new polyps in the large intestine. Obtained results were analyzed with statistical programs, SAS (linear regression models) and STATISTICA (cluster analysis). Mantel correlation and its statistical significance were calculated using BIODIVERSITY 4.0.

In the 97-person-study group 207 adenomatous polyps were removed. In none of the polyps infiltration of adenocarcinoma was detected. Genetic analysis was performed in 130 polyps and this group was subjected to further analyses. 77 remaining polyps did not undergo genetic analysis because of too small size of samples due to utilization of the whole removed tissue material in histopathological analysis. Among 130 genetically examined polyps there were changes that originated in all 97 individuals. The most frequent localization of polyps was sigmoid colon. Tubular adenomas had a frequency of 52.3%, tubulovillous adenomas 37.7%, villous adenomas 10%. In the studied cohort, adenomas with mild dysplasia

constituted 29.23%, adenomas with moderate dysplasia 32.3% and adenomas with severe dysplasia 38.47%. Severe dysplasia occurred most frequently among villous adenomas (61.54%). Microsatellite instability was detected in 16.16% of adenomatous polyps. Among them 4.62% of adenomatous polyps were characterized by severe level of microsatellite instability, and 11.54% had moderate microsatellite instability. Microsatellite instability was most often found in adenomatous polyps localized in cecum, more often observed in younger individuals, and females were at higher risk of adenomatous polyps than males. During the loss of heterozygosity analysis, we observed that progressing loss of heterozygosity in analyzed amplicons was associated with a tendency towards decreasing diameter of polyps. 20.77% of adenomatous polyps had mutations in exon1 and 5.38% in exon 2 of K-ras gene. In the second colonoscopy, performed one year after the initial one, new polyps were detected in 15% of the patients (7% females, 15% males). Males, whose polyps reached the diameter >8 mm and with detected microsatellite instability of high degree or loss of heterozygosity, had an increased risk of new polyps of the large intestine.

Further analyses and observations, enabling utilization of information about microsatellite instability and loss of heterozygosity in adenomatous polyps, removed by endoscopic polypectomy, are necessary to determine the frequency of control colonoscopies.

9. Piśmiennictwo

1. Fearon E.R., Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990: 61(5): 759–767.
2. Pox C., Schmiegel W.: Colorectal screening in Germany. Z. Gastroenterol. 2008: 46 Suppl. 1: S31–32.
3. Reguła J., Rupiński M., Kraszewska E. et al.: Colonoscopy in colorectal-cancer screening for detection of advanced neoplasia. N. Engl. J. Med. 2006: 355(18): 1863–1872.
4. Rachtan J., Sokołowski A., Geleta M. i wsp.: Zachorowalność na nowotwory złośliwe w Krakowie w latach 2002–2004. 2006, Kraków: Centrum Onkologii Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Krakowie.
5. Stachura J.: Patologia chorób przewodu pokarmowego. W: Stachura J., Domagała W., red.: Patologia znaczy słowo o chorobie. 2005, Polska Akademia Umiejętności: Kraków. 799–806.
6. Trawiński J., Patera J., Stanek-Widera A. i wsp.: Zasady diagnostyki patomorfologicznej polipów jelita grubego. Pol. Merkuriusz Lek. 2007: 22(131): 454–456.
7. Banaszkiewicz Z., Tojek K., Jawień A.: Gruczolaki jelita grubego. Przew. Lek. 2002: 4: 34–36.
8. Eickhoff A., Riemann J.F.: Koloskopiesysteme der Zukunft. Gastroenterologe 2007: 2: 118–125.
9. Eliakim R., Fireman Z., Gralnek I.M. et al.: Evaluation of the PillCam Colon capsule in the detection of colonic pathology: results of the first multicenter, prospective, comparative study. Endoscopy 2006: 38(10): 963–970.
10. Vucelic B., Rex D., Pulanic R. et al.: The aer-o-scope: proof of concept of a pneumatic, skill-independent, self-propelling, self-navigating colonoscope. Gastroenterology 2006: 130(3): 672–677.
11. Eickhoff A., van Dam J., Jakobs R. et al.: Computer-assisted colonoscopy (the NeoGuide Endoscopy System): results of the first

human clinical trial („PACE study"). Am. J. Gastroenterol. 2007: 102(2): 261–266.

12. Fritscher-Ravens A., Fox S., Swain C.P. et al.: CathCam guide wire-directed colonoscopy: first pilot study in patients with a previous incomplete colonoscopy. Endoscopy 2006: 38(3): 209–213.
13. Rollandi G.A., Biscaldi E., DeCicco E.: Double contrast barium enema: technique, indications, results and limitations of a conventional imaging methodology in the MDCT virtual endoscopy era. Eur. J. Radiol. 2007: 61(3): 382–387.
14. Blachar A., Sosna J.: CT colonography (virtual colonoscopy): technique, indications and performance. Digestion 2007: 76(1): 34–41.
15. Reguła J., Polkowski M.: CT colonography versus colonoscopy for the detection of advanced neoplasia. N. Engl. J. Med. 2008: 358(1): 88–89; author reply: 90.
16. Karcz D.: Chirurgia endoskopowa. 2007, Kraków: Wydawnictwo Medyczne.
17. Atkin N.B.: Microsatellite instability. Cytogenet. Cell Genet. 2001: 92(3–4): 177–181.
18. Cappell M.S.: From colonic polyps to colon cancer: pathophysiology, clinical presentation, screening and colonoscopic therapy. Minerva Gastroenterol. Dietol. 2007: 53(4): 351–373.
19. Garinis G.A., Patrinos G.P., Spanakis N.E. et al.: DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. Hum. Genet. 2002: 111(2): 115–127.
20. Versteeg R.: Aberrant methylation in cancer. Am. J. Hum. Genet. 1997: 60(4): 751–754.
21. Jones P.A., Laird P.W.: Cancer epigenetics comes of age. Nat. Genet. 1999: 21(2): 163–167.
22. Herman J.G., Umar A., Polyak K. et al.: Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998: 95(12): 6870–6875.

23. Deng G., Chen A., Hong J. et al.: Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. Cancer Res. 1999: 59(9): 2029–2033.
24. Strachan T.R., Read A.P.: Human Molecular Genetics 2. 1999/2000, Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd.
25. Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B.: Genetic instabilities in human cancers. Nature 1998: 396(6712): 643–649.
26. Wheeler J.M., Bodmer W.F., Mortensen N.J.: DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. Gut 2000: 47(1): 148–153.
27. Ilyas M., Tomlinson I.P.: Genetic pathways in colorectal cancer. Histopathology 1996: 28(5): 389–399.
28. Mahtani M.M., Willard H.F.: A polymorphic X-linked tetranucleotide repeat locus displaying a high rate of new mutation: implications for mechanisms of mutation at short tandem repeat loci. Hum. Mol. Genet. 1993: 2(4): 431–437.
29. Weber J.L., Wong C.: Mutation of human short tandem repeats. Hum. Mol. Genet. 1993: 2(8): 1123–1128.
30. Kolodner R.D., Marsischky G.T.: Eukaryotic DNA mismatch repair. Curr. Opin. Genet. Dev. 1999: 9(1): 89–96.
31. Lynch H.T., Taylor R.J., Lynch J.F. et al.: Multiple primary cancer, including transitional cell carcinoma of the upper uroepithelial tract in a multigeneration HNPCC family: molecular genetic, diagnostic, and management implications. Am. J. Gastroenterol. 2003: 98(3): 664–670.
32. Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R. et al.: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer. Res. 1998: 58(22): 5248–5257.
33. Kinzler K.W., Nilbert M.C., Su L.K. et al.: Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. Science 1991: 253(5020): 661–665.

34. Nishisho I., Nakamura Y., Miyoshi Y. et al.: Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. Science 1991: 253(5020): 665–669.
35. Behrens J., Jerchow B.A., Wurtele M. et al.: Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. Science 1998: 280(5363): 596–599.
36. Rubinfeld B., Souza B., Albert I. et al.: Association of the APC gene product with beta-catenin. Science 1993: 262(5140): 1731–1734.
37. Su L.K., Vogelstein B., Kinzler K.W.: Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. Science 1993: 262(5140): 1734–1737.
38. Cottrell S., Bicknell D., Kaklamanis L. et al.: Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. Lancet 1992: 340(8820): 626–630.
39. De Filippo C., Luceri C., Caderni G. et al.: Mutations of the APC gene in human sporadic colorectal cancers. Scand. J. Gastroenterol. 2002: 37(9): 1048–1053.
40. Diergaarde B., van Geloof W.L., van Muijen G.N. et al.: Dietary factors and the occurrence of truncating APC mutations in sporadic colon carcinomas: a Dutch population-based study. Carcinogenesis 2003: 24(2): 283–290.
41. Powell S.M., Zilz N., Beazer-Barclay Y. et al.: APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature 1992: 359(6392): 235–237.
42. Sawyer E.J., Cerar A., Hanby A.M. et al.: Molecular characteristics of serrated adenomas of the colorectum. Gut 2002: 51(2): 200–206.
43. Iacopetta B.: TP53 mutation in colorectal cancer. Hum. Mutat. 2003: 21(3): 271–276.
44. Baker S.J., Fearon E.R., Nigro J.M. et al.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. Science 1989: 244(4901): 217–221.

45. Hamelin R., Laurent-Puig P., Olschwang S. et al.: Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. Gastroenterology 1994: 106(1): 42–48.
46. Russo A., Bazan V., Iacopetta B. et al.: The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. J. Clin. Oncol. 2005: 23(30): 7518–7528.
47. Ando M., Maruyama M., Oto M. et al.: Higher frequency of point mutations in the c-K-ras 2 gene in human colorectal adenomas with severe atypia than in carcinomas. Jpn. J. Cancer Res. 1991: 82(3): 245–249.
48. Delattre O., Olschwang S., Law D.J. et al.: Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. Lancet 1989: 2(8659): 353–356.
49. McLellan E.A., Owen R.A., Stepniewska K.A. et al.: High frequency of K-ras mutations in sporadic colorectal adenomas. Gut 1993: 34(3): 392–396.
50. Cho K.R., Oliner J.D., Simons J.W. et al.: The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. Genomics 1994: 19(3): 525–531.
51. Iino H., Jass J.R., Simms L.A. et al.: DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer? J. Clin. Pathol. 1999: 52(1): 5–9.
52. Konishi K., Yamochi T., Makino R. et al.: Molecular differences between sporadic serrated and conventional colorectal adenomas. Clin. Cancer Res. 2004: 10(9): 3082–3090.
53. Takayama T., Miyanishi K., Hayashi T. et al.: Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. J. Gastroenterol. 2006: 41(3): 185–192.

54. Pistorius S., Schackert H.K., Saeger H.-D.: Erbliche Tumoren im Gastrointestinaltrakt. Onkologe 2008: 14: 303–314.
55. Barry E.L., Baron J.A., Grau M.V. et al.: K-ras mutations in incident sporadic colorectal adenomas. Cancer 2006: 106(5): 1036–1040.
56. Hiyama T., Yokozaki H., Shimamoto F. et al.: Frequent p53 gene mutations in serrated adenomas of the colorectum. J. Pathol. 1998: 186(2): 131–139.
57. Kakar S., Deng G., Cun L. et al.: CpG island methylation is frequently present in tubulovillous and villous adenomas and correlates with size, site, and villous component. Hum. Pathol. 2008: 39(1): 30–36.
58. Wójcik P., Kulig J., Okoń K. et al.: KRAS mutation profile in colorectal carcinoma and novel mutation – internal tandem duplication in KRAS. Pol. J. Pathol. 2008: 59(2): 93–96.
59. Litterll R.C., Milliken G.A., Stroup W.W. et al.: SAS for mixed models. 2006, Cary: SAS Institue Inc.
60. Zelterman D.: Advanced log-linear models using SAS. 2002, Cary: SAS Publishing.
61. Allison P.D.: Logistic regression using the SAS system. Theory and application. 1999, Cary: SAS Publishing.
62. Stokes M.E., Davis C.S., Koch G.G.: Categorical data analysis using the SAS system. 2003, San Francisco: W.H. Freeman.
63. Manly B.F.J.: Multivariantive statistical methods. A primer. 1986, Londyn: Chapman & Hall.
64. Lieberman D.A., Holub J.L., Moravec M.D. et al.: Prevalence of colon polyps detected by colonoscopy screening in asymptomatic black and white patients. JAMA 2008: 300(12): 1417–1422.
65. Banaszkiewicz Z., Jarmocik P., Rydzykowski M. i wsp.: Leczenie raka w polipie jelita grubego – 10-letnie doświadczenie. Valetudinaria – Post. Med. Klin. Wojsk. 2004: 9(2): 76–80.
66. Shinya H., Wolff W.I.: Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps. Ann. Surg. 1979: 190(6): 679–683.

67. Gillespie P.E., Chambers T.J., Chan K.W. et al.: Colonic adenomas – a colonoscopy survey. Gut 1979: 20(3): 240–245.
68. Velayos F.S., Allen B.A., Conrad P.G. et al.: Low rate of microsatellite instability in young patients with adenomas: reassessing the Bethesda guidelines. Am. J. Gastroenterol. 2005: 100(5): 1143–1149.
69. Koh D.C., Luchtefeld M.A., Kim D.G. et al.: Microsatellite instability and MLH1 hypermethylation – incidence and significance in colorectal polyps in young patients. Colorectal Dis. 2007: 9(6): 521–526.
70. Marshall J.B.: Polipy jelita grubego – odpowiedzi na najważniejsze pytania. Med. Dypl. 1993: 2(2): 26–32.
71. van Stolk R.U., Beck G.J., Baron J.A. et al.: Adenoma characteristics at first colonoscopy as predictors of adenoma recurrence and characteristics at follow-up. The Polyp Prevention Study Group. Gastroenterology 1998: 115(1): 13–18.
72. Rubio C.A., Nesi G., Messerini L. et al.: The Vienna classification applied to colorectal adenomas. J. Gastroenterol. Hepatol. 2006: 21(11): 1697–1703.
73. Harada K., Hiraoka S., Kato J. et al.: Genetic and epigenetic alterations of Ras signalling pathway in colorectal neoplasia: analysis based on tumour clinicopathological features. Br. J. Cancer. 2007: 97(10): 1425–1431.
74. Kinoshita H., Yanagisawa A., Watanabe T. et al.: Increase in the frequency of K-ras codon 12 point mutation in colorectal carcinoma in elderly males in Japan: the 1990s compared with the 1960s. Cancer Sci. 2005: 96(4): 218–220.
75. Saraga E., Bautista D., Dorta G. et al.: Genetic heterogeneity in sporadic colorectal adenomas. J. Pathol. 1997: 181(3): 281–286.
76. Hassan A.B., Paraskeva C.: Colorectal cancer prognosis: is it all mutation, mutation, mutation? Gut 2005: 54(9): 1209–1211.

77. Lievre A., Bachet J.B., Le Corre D. et al.: KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer Res. 2006: 66(8): 3992–3995.
78. Ricciardiello L., Goel A., Mantovani V. et al.: Frequent loss of hMLH1 by promoter hypermethylation leads to microsatellite instability in adenomatous polyps of patients with a single first-degree member affected by colon cancer. Cancer Res. 2003: 63(4): 787–792.
79. Samowitz W.S., Slattery M.L.: Transforming growth factor-beta receptor type 2 mutations and microsatellite instability in sporadic colorectal adenomas and carcinomas. Am. J. Pathol. 1997: 151(1): 33–35.
80. Aaltonen L.A., Peltomaki P., Mecklin J.P. et al.: Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. Cancer Res. 1994: 54(7): 1645–1648.
81. Sasaki S., Masaki T., Umetani N. et al.: Microsatellite instability is associated with the macroscopic configuration of neoplasms in patients with multiple colorectal adenomas. Jpn. J. Clin. Oncol. 1998: 28(7): 427–430.
82. Ishiguro K., Yoshida T., Yagishita H. et al.: Epithelial and stromal genetic instability contributes to genesis of colorectal adenomas. Gut 2006: 55(5): 695–702.
83. Gafa R., Maestri I., Matteuzzi M. et al.: Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. Cancer 2000: 89(10): 2025–2037.
84. Niv Y.: Microsatellite instability and MLH1 promoter hypermethylation in colorectal cancer. World J. Gastroenterol. 2007: 13(12): 1767–1769.
85. Soreide K., Janssen E.A., Soiland H. et al.: Microsatellite instability in colorectal cancer. Br. J. Surg. 2006: 93(4): 395–406.
86. Waye J.D.: Colonoscopic polypectomy. Diagn. Ther. Endosc. 2000: 6(3): 111–124.

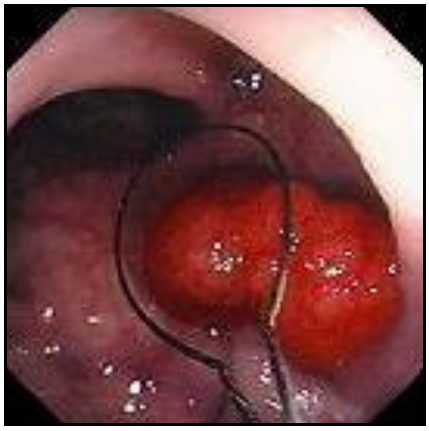
87. Bonithon-Kopp C., Piard F., Fenger C. et al.: Colorectal adenoma characteristics as predictors of recurrence. Dis. Colon Rectum 2004: 47(3): 323–333.
88. Martinez M.E., Sampliner R., Marshall J.R. et al.: Adenoma characteristics as risk factors for recurrence of advanced adenomas. Gastroenterology 2001: 120(5): 1077–1083.
89. Noshirwani K.C., van Stolk R.U., Rybicki L.A. et al.: Adenoma size and number are predictive of adenoma recurrence: implications for surveillance colonoscopy. Gastrointest. Endosc. 2000: 51(4 Pt 1): 433–437.
90. Winawer S.J., Zauber A.G., O'Brien M.J. et al.: Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. The National Polyp Study Workgroup. N. Engl. J. Med. 1993: 328(13): 901–906.
91. Fossi S., Bazzoli F., Ricciardiello L. et al.: Incidence and recurrence rates of colorectal adenomas in first-degree asymptomatic relatives of patients with colon cancer. Am. J. Gastroenterol. 2001: 96(5): 1601–1604.
92. Winawer S., Fletcher R., Rex D. et al.: Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale. Update based on new evidence. Gastroenterology 2003: 124(2): 544–560.
93. Lieberman D.A., De Garmo P.L., Fleischer D.E. et al.: Patterns of endoscopy use in the United States. Gastroenterology 2000: 118(3): 619–624.
94. Rex D.K.: Postpolypectomy and post-cancer resection surveillance. Rev. Gastroenterol. Disord. 2003: 3(4): 202–209.

10. Aneks

Rycina nr 2. Makroskopowy obraz wybranych polipów gruczolakowych jelita grubego: A – uszypułowany polip gruczolakowy; B – polip „siedzący” (obrazy wykonane podczas kolonoskopii. Kolonoskop Olympus CF-165L)

A. *B.*

Rycina nr 3. Etapy polipektomii pętlowej: A – uszypułowany polip jelita grubego; B – wprowadzenie do jelita grubego pętli heksagonalnej; C – odcięcie polipa u jego podstawy; D – stan po wykonanej polipektomii. Polipektomia makroskopowo radykalna (histopatologicznie: gruczolak cewkowo-kosmkowy, z dysplazją dużego stopnia, szypuła polipa bez cech dysplazji)

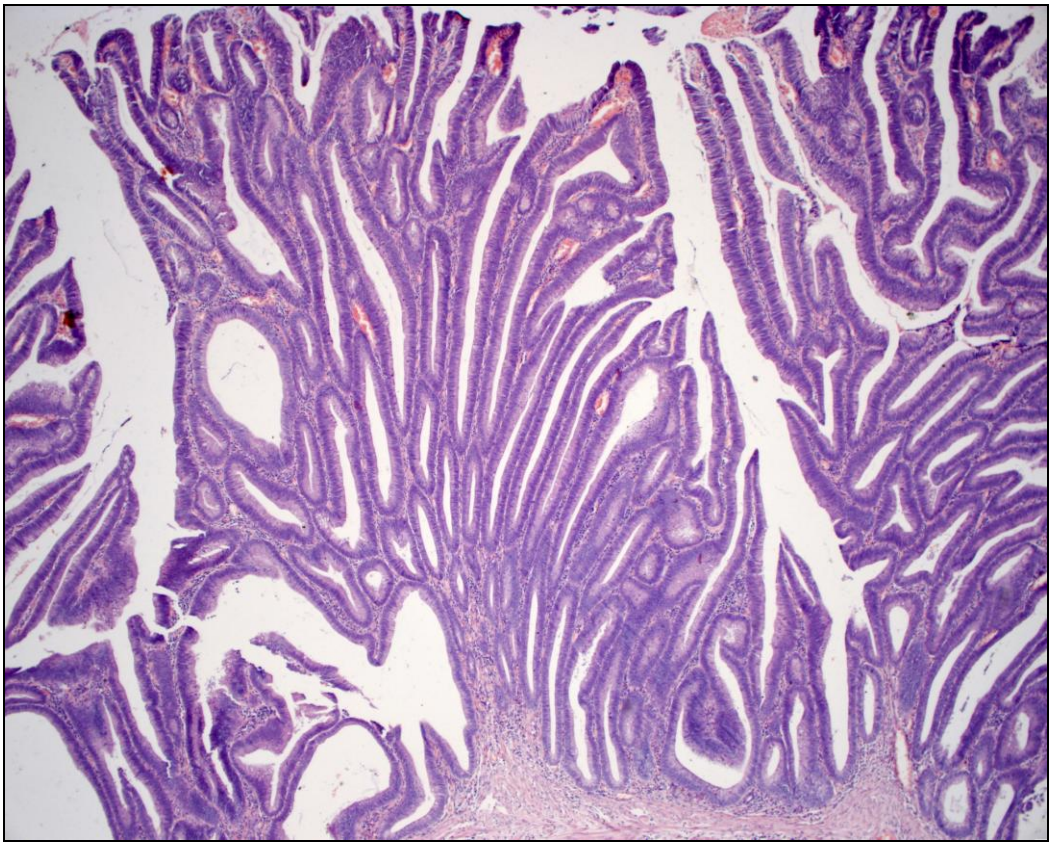
A. *B.* 

C. *D.*

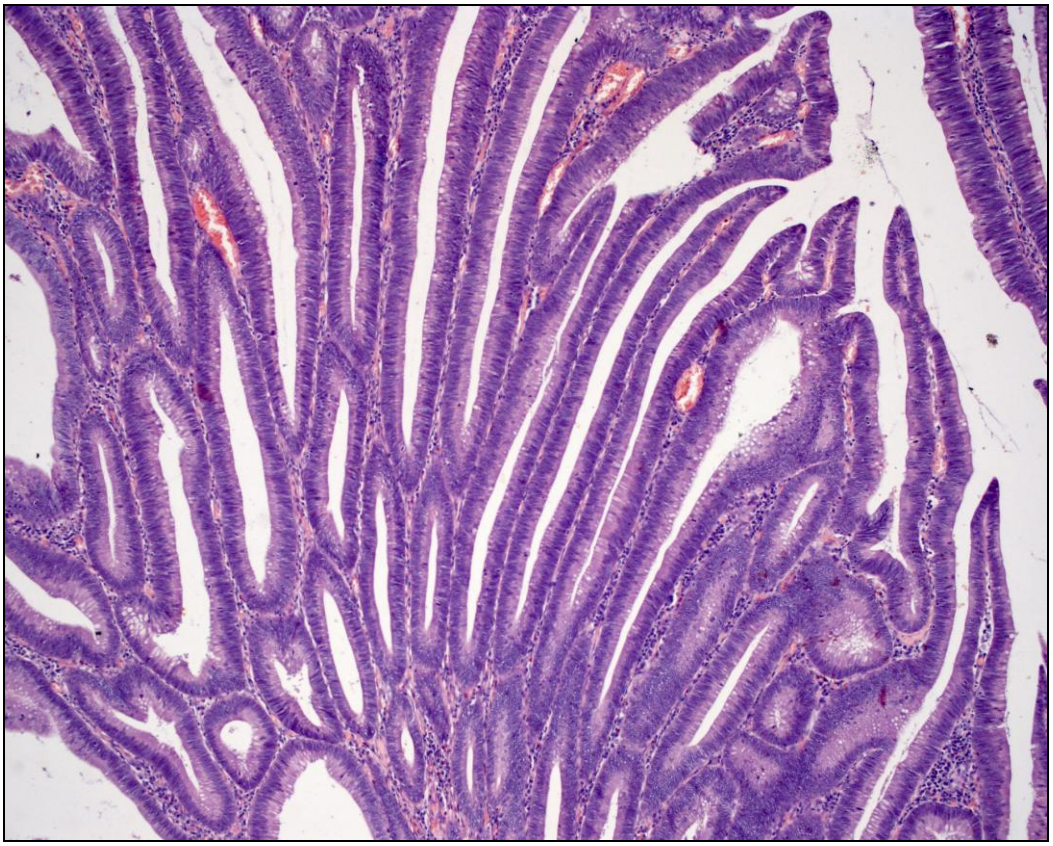
Rycina nr 4. Gruczolak cewkowy z dysplazją małego stopnia (badanie nr 1255603, barwienie HE)

Rycina nr 5. Gruczolak cewkowy z dysplazją małego stopnia (badanie nr 1255603, barwienie HE)

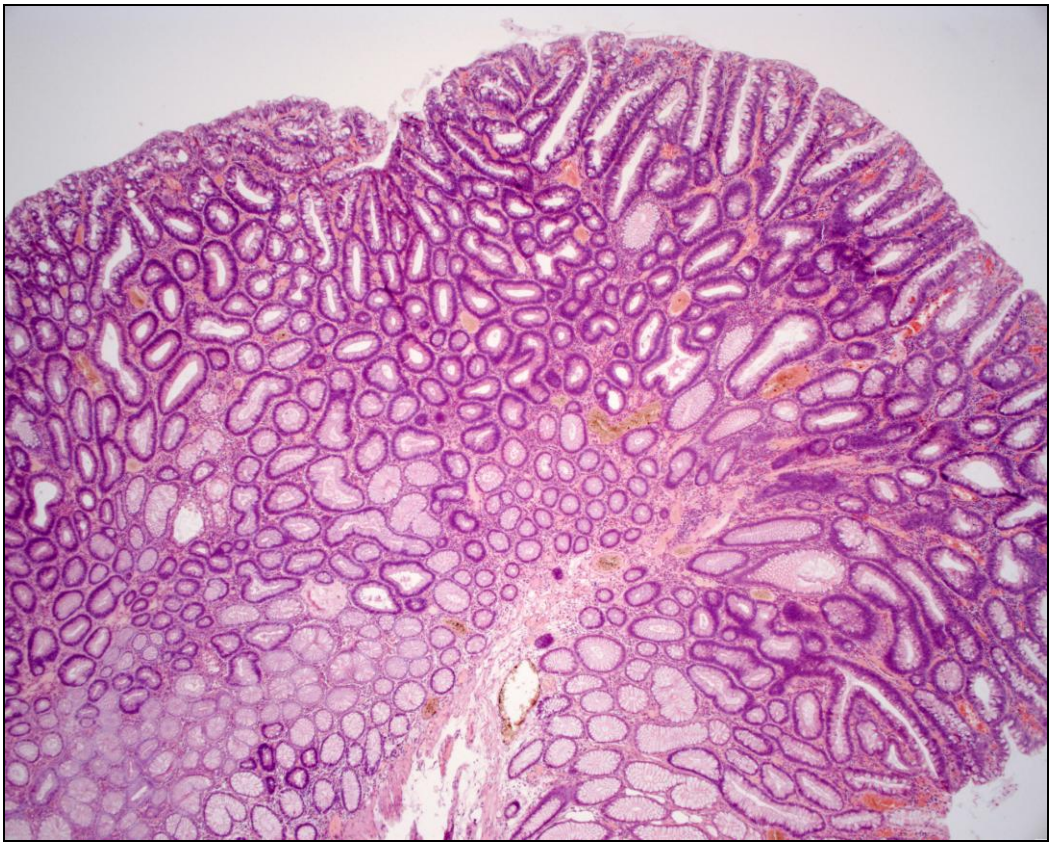
Rycina nr 6. Gruczolak kosmkowy z dysplazją dużego stopnia (badanie nr P.20, barwienie HE)



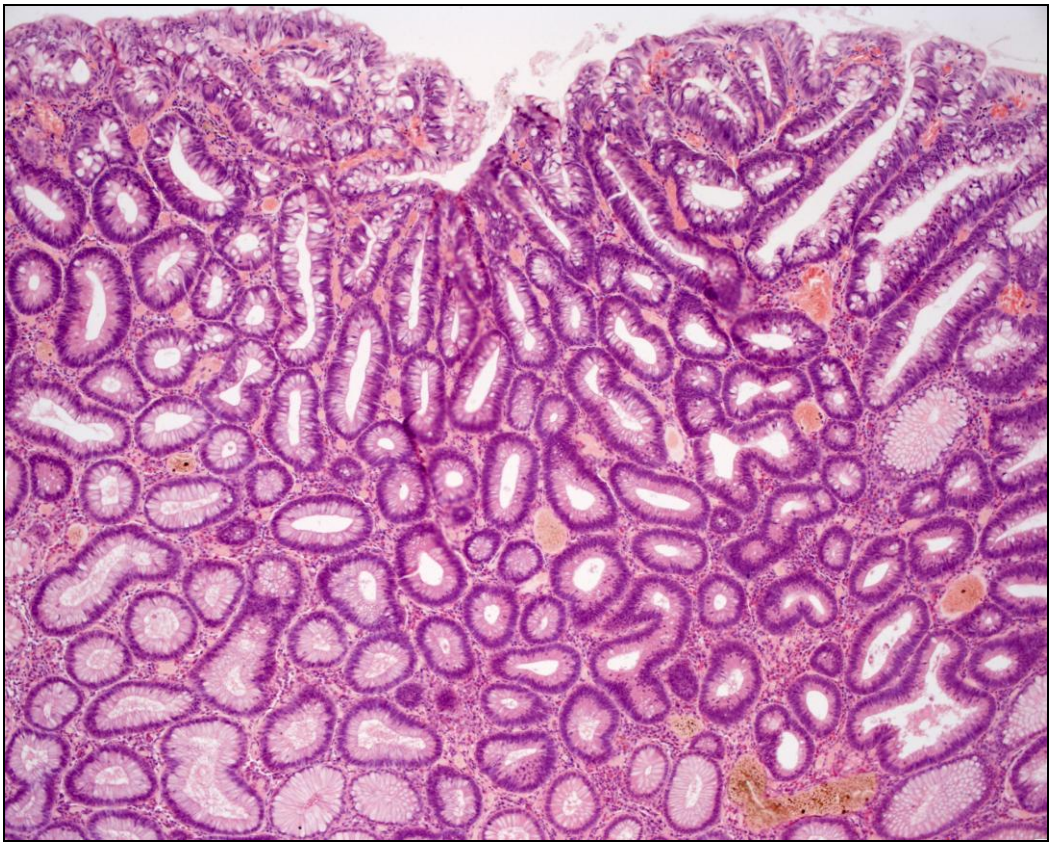
Rycina nr 7. Gruczolak kosmkowy z dysplazją dużego stopnia (badanie nr P.20, barwienie HE)



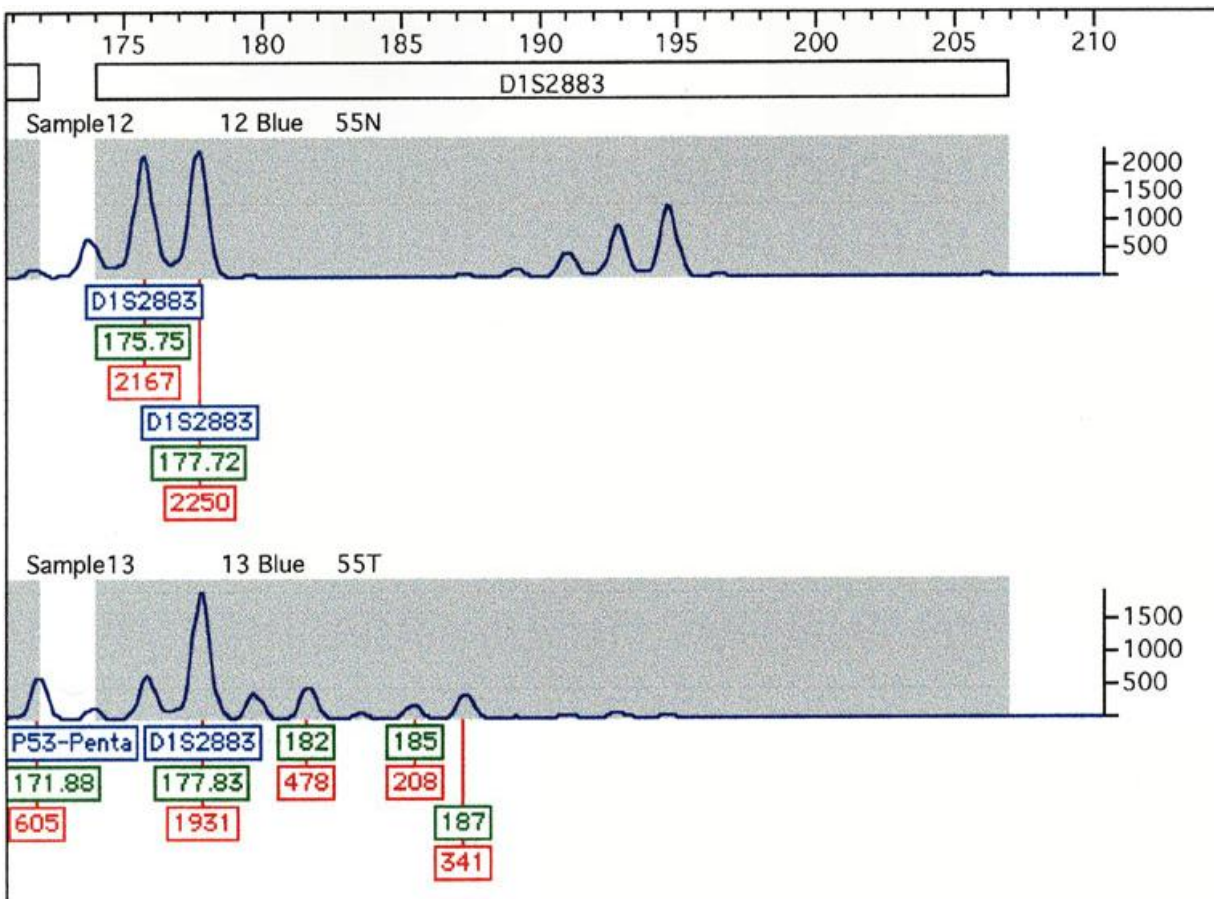
Rycina nr 8. Gruczolak cewkowo-kosmkowy z dysplazją średniego stopnia (badanie nr 1298807, barwienie HE)



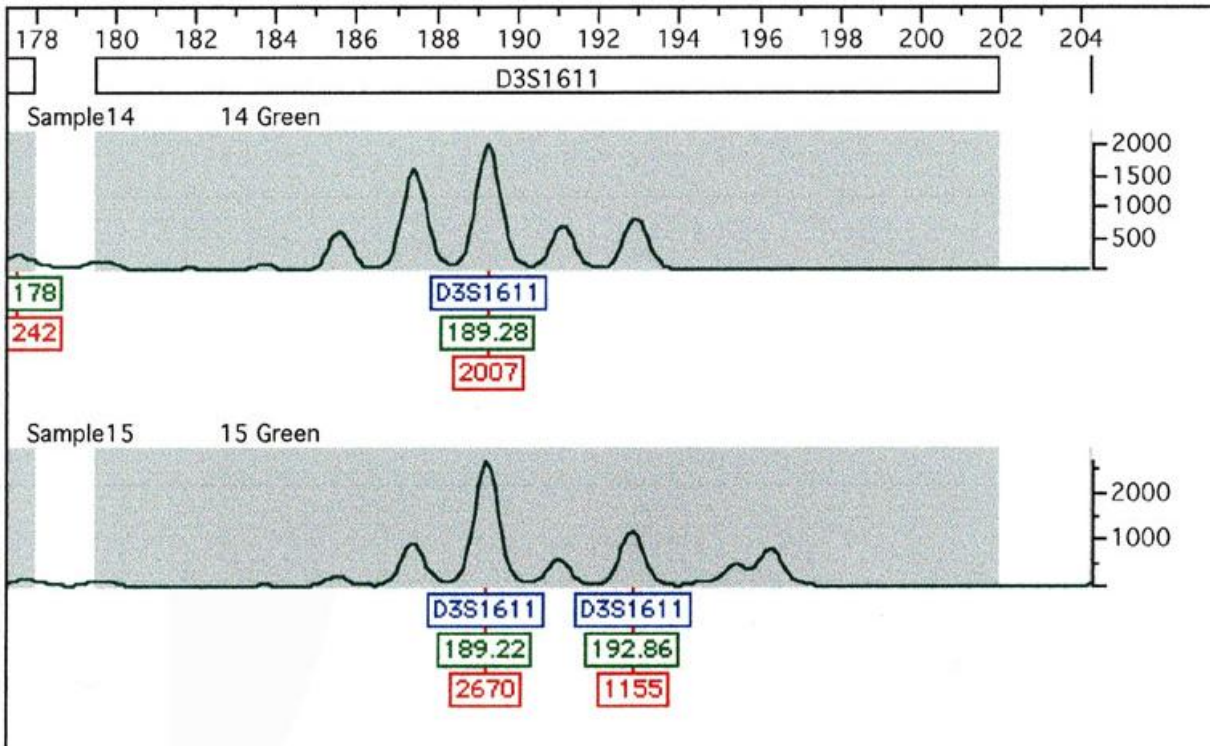
Rycina nr 9. Gruczolak cewkowo-kosmkowy z dysplazją średniego stopnia (badanie nr 1298807, barwienie HE)



Rycina nr 10. Obraz niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) z jednoczesną utratą heterozygotyczności (LOH) w DNA; „sample 12” – materiał z krwi obwodowej, „sample 13” – materiał z polipa (wykres z sekwenatora ABI Prism 310 Genetic Analyser. Materiał od chorego JK)



Rycina nr 11. Obraz niestabilności mikrosatelitarnej (MSI); „sample 14” – materiał z krwi obwodowej, „sample 15” – materiał z polipa (wykres z sekwenatora ABI Prism 310 Genetic Analyser. Materiał od chorego MK)



Rycina nr 12. Mutacja w eksonie 1 genu K-ras (próbki nr 14 i 18).
Żel MDE. Elektroforeza metodą SSCP, temp. 18°C, napięcie 170 V, czas elektroforezy 20 h.