

Gdański Uniwersytet Medyczny

Katedra i Klinika Onkologii i Radioterapii

Analiza immunohistochemiczna białek z rodziny Wnt
(Wnt1, Wnt2), E-kadheryny i β -kateniny
oraz ich rokownicze znaczenie
w niedrobnokomórkowym raku płuca

lek. Anna Wrona

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Rafał Dziadziuszko, prof. nadzw. GUMed

Gdańsk, 2016

Spis treści

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	4
WSTĘP	10
1. Epidemiologia, klasyfikacja i etiologia raka płuca	10
2. Zasady postępowania w raku płuca	14
3. Ukierunkowane molekularnie leczenie raka płuca	16
4. Szlak transdukcji sygnału zależny od Wnt	19
4.1. Inhibitory szlaku transdukcji sygnału zależnego od Wnt	22
4.2. Rola szlaku sygnałowego zależnego od Wnt w biologii procesu nowotworowego	23
4.3. Wpływ przekazywania sygnału zależnego od Wnt na cykl życiowy oraz metabolizm nowotworowych komórek macierzystych	25
4.4. Znaczenie przekazywania sygnału zależnego od Wnt w rozwoju embrionalnym oraz etiopatogenezie chorób płuc	25
4.5. Znaczenie ścieżki sygnałowej Wnt w raku płuca	26
4.7. Wpływ szlaku przekazywania sygnału zależnego od Wnt na rozwój oporności na leczenie	33
4.8. Składowe szlaku przekazywania sygnału zależnego od Wnt jako cele terapii ukierunkowanych molekularnie	33
5. Metodologia badań immunohistochemicznych	35
6. Technika mikromacierzy tkankowych	37
CELE PRACY	40
MATERIAŁ I METODY	41
1. Opis badanej grupy	41
2. Opracowanie materiału tkankowego	45
3. Ocena immunoekspresji białka Wnt1, Wnt2, β-kateniny i E-kadheryny	46
3.1. Zastosowane przeciwciała pierwotne	46
3.2. Procedura barwień immunohistochemicznych	47
4. Analiza statystyczna	59
WYNIKI	61
1. Immunohistochemiczna ocena poziomu analizowanych białek	61
1.1. Ocena poziomu białka Wnt1	62
1.2. Ocena poziomu białka Wnt2	70
1.3. Ocena poziomu E-kadheryny	75
1.4. Ocena poziomu frakcji jądrowej β -kateniny	81

1.5. Ocena poziomu frakcji błonowej β -kateniny	83
1.6. Ocena poziomu frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny	87
2. Analiza przeżycia	91
OMÓWIENIE WYNIKÓW	100
1. Charakterystyka kliniczna i patologiczna badanej grupy chorych	101
2. Ocena poziomu białka Wnt1	102
3. Ocena poziomu białka Wnt2	105
4. Ocena poziomu E-kadheryny	106
5. Ocena poziomu β -kateniny	108
6. Analiza przeżycia	110
WNIOSKI	119
STRESZCZENIE	120
ABSTRACT	124
PIŚMIENNICTWO.....	127
SPIS RYCIN	145
SPIS TABEL.....	147

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AC – rakgruczołowy (ang. *Adenocarcinoma*)

ACS – Amerykańskie Towarzystwo Onkologiczne (ang. *American Cancer Society*)

AJCC – Amerykański Wspólny Komitet Raka (ang. *American Joint Committee on Cancer*)

AKT – serynowo-treoninowa kinaza AKT (ang. *Serine/Threonine Kinase*)

ALK – kinaza chłoniaka anaplastycznego (ang. *Anaplastic Lymphoma Kinase*)

AP1 – 1. białko aktywujące (ang. *Activating Protein 1*)

APC – polipowatość gruczolakowata jelita grubego (ang. *Adenomatous Polyposis Coli*)

CDK4 – 4. kinaza zależna od cykliny (ang. *Cyclin-Dependent Kinase 4*)

CI – przedział ufności (ang. *Confidence Interval*)

CKI α – kinaza kazeiny I α (ang. *Casein Kinase I α*)

COX2 – cyklooksygenaza 2 (ang. *Cyclooxygenase 2*)

CRD – domena bogata w reszty cysteinowe (ang. *Cysteine Rich Domain*)

CREBbp – białko wiążące CREB (ang. *CREB binding protein*)

CtBP – białko wiążące koniec C (ang. *C-Terminal Binding Protein*)

CTNNBIP1 – białko oddziałujące z β -kateniną 1 (ang. *Catenin Beta Interacting Protein 1*)

CYP – cytochrom P450 (ang. *Cytochrome P450*)

DAB – 3,3'-diaminobenzodyna

DACT2 – wiążący *Dishevelled* antagonist β -kateniny 2 (ang. *Dishevelled-Binding Antagonist of β -catenin 2*)

DDR2 – 2. receptor domeny dyskoidyny (ang. *Discoidin Domain Receptor 2*)

DKK – inhibitor DKK (ang. *Dickkopf*)

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

Dvl – białko Dishevelled (ang. *Dishevelled*)

EBUS– wewnątrzoskrzelowa ultrasonografia (ang. *Endobronchial Ultrasound*)

ECCU – kompleks E-kadheryna-katenina (ang. *E-Cadherin-Catenin Unit*)

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy=wersenowy (ang. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

EGF– naskórkowy czynnik wzrostu (ang. *Epidermal Growth Factor*)

EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *Epithelial Growth Factor Receptor*)

EMMPRIN – czynnik indukujący metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (ang. *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*)

EMT – transformacja nabłonkowo-mezenchymalna (ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition*)

EMX2 – (ang. *Empty Spiracles Homebox 2*)

ERCC – białko uczestniczące w naprawie przez wycinanie (ang. *Excision Repair Cross-Complementation*)

ERK5 –5. kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo(ang. *Extracellular-signal-regulated kinase 5*)

EUROCARE –Europejski Rejestr Nowotworów (ang. *European Cancer Registry*)

FAP – rodzinna polipowatość gruczolakowata (ang. *Familial Adenomatous Polyposis*)

FGF – czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *Fibroblast Growth Factor*)

FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (ang. *Fluorescence In Situ Hybridization*)

FITC – izotiocyanian fluoresceiny (ang. *Fluorescein Isothiocyanate*)

FRP – białko zależne od *Frizzled* (ang. *Frizzled-Related Protein*)

FZD– receptor *Frizzled* (ang. *Frizzled*)

GSK3 β – kinaza 3 β syntazy glikogenu (ang. *Glycogen Synthase Kinase-3 Beta*)

H+E– barwienie hematoksyliną i eozyną

HDPR1 – 1. białko zależne od deacetylazy histonów (ang. *Histone Deacetylase-Related Protein 1*)

HER2 –2. receptor dla ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*)

HGF– czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *Hepatocyte Growth Factor*)

HIER– odsłonięcie epitopu w wysokiej temperaturze (ang. *Heat-Induced Epitope Retrieval*)

HR – iloraz ryzyka (ang. *Hazard Ratio*)

HRP– peroksydaza chrzanowa (ang. *Horseradish Peroxidase*)

HSP90 – białko szoku termicznego 90 (ang. *Heat Shock Protein 90*)

IARC – Międzynarodowa Agencja do Badań nad Rakiem (ang. *International Agency for Research on Cancer*)

IASLC – Międzynarodowe Stowarzyszenie Badań Nad Rakiem Płuca (ang. *International Association for the Study of Lung Cancer*)

IGF – insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. *Insulin-like Growth Factor*)

IHC – badanie immunohistochemiczne (ang. *Immunohistchemistry*)

IMD –gęstość sieci naczyń mikrokrażenia w guzie (ang. *Intratumoral Microvessel Density*)

IMRT – radioterapia konformalna z modulacją intensywności dawki(ang. *Intensity Modulated Radiation Therapy*)

ING4 –białko ING4 (ang. *Inhibitor of Growth Family Member 4*)

JNK – kinaza domeny N-końcowej białka c-Jun (ang. *c-Jun N-terminal Kinase*)

kDa – kilodalton

KRAS – onkogen *KRAS* (ang. *Kristen Rat Sarcoma viral oncogene homolog*)

LCC – rak wielkokomórkowy (ang. *Large Cell Carcinoma*)

LDL – lipoproteina o niskiej gęstości (ang. *Low-Density Lipoprotein*)

Lef – limfoidalny czynnik wzmacniający (ang. *Lymphoid Enhancing Factor*)

LRP – białko związane z receptorem dla lipoproteiny o niskiej gęstości (ang. *Low-Density Lipoprotein-Receptor Related Protein*)

LTR – długie powtarzające się sekwencje końcowe (ang. *Long Terminal Repeat*)

MCR – region o podwyższonej częstości występowania mutacji (ang. *Mutation Cluster Region*)

MDR – wielolekowa oporność (ang. *Multidrug Resistance*)

MMP7 – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 7 (ang. *Matrix Metalloproteinase-7*)

MMTV – myszy wirus raka piersi (ang. *Mouse Mammary Tumor Virus*)

mTOR – kinaza celu rapamycyny u ssaków (ang. *Mammalian Target Of Rapamycin*)

NDRP – niedrobnokomórkowy rak płuca

NGS – sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*)

NKD1 – białko NKD1 (ang. *Naked Cuticle Homolog 1*)

NOS – nieokreślony (ang. *not otherwise specified*)

NTRK1-3 – receptor neurotropowej kinazy tyrozynowej 1-3 (ang. *Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase 1-3*)

ORR – odsetek obiektywnych odpowiedzi (ang. *Objective Response Rate*)

OS – czascałkowitego przeżycia (ang. *Overall Survival*)

p – współczynnik istotności statystycznej

PBS – roztwór buforu fosforanowego (ang. *Phosphate Buffered Saline*)

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*)

PET – pozytonowa tomografia emisyjna (ang. *Positron Emission Tomography*)

PFS – czas przeżycia wolnego od progresji (ang. *Progression-free Survival*)

PI3K – kinaza fosatydilo-3-inozytolu (ang. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*)

PIER – proteolityczne odsłonięcie epitopu (ang. *Proteolytic-Induced Epitope Retrieval*)

PL – opłucna (ang. *Pleura*)

POCHP – przewlekła obturacyjna choroba płuc

PP2A – fosfataza białkowa 2A (ang. *Protein Phosphatase 2A*)

PPARG – Gamma receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów (ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*)

r– współczynnik korelacji liniowej Pearsona

RanBP – białko wiążące Ran (ang. *Ran-Binding Protein*)

RFS – czas przeżycia wolnego od nawrotu (ang. *Recurrence Free Survival*)

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. *Ribonucleic Acid*)

RUNX3 –3. czynnik transkrypcyjny zależny od Runt (ang. *Runt-Related Transcription Factor 3*)

RYK – zależna od receptora kinaza tyrozynowa (ang. *Related To Receptor Tyrosine Kinase*)

SCC – rak płaskonabłonkowy (ang. *Squamous Cell Carcinoma*)

SD– odchylenie standardowe (ang. *Standard Deviation*)

sFRP – wydzielane białko zależne od *Frizzled* (ang. *Secreted Frizzled Related Protein*)

Shh – homolog *Sonic Hedgehog* (ang. *Sonic Hedgehog*)

shRNA – kwas rybonukleinowy o strukturze „szpilki do włosów”(ang. *Short Hairpin Ribonucleic Acid*)

SNP– polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*)

snRNA – mały, jądrowy kwas rybonukleinowy (ang. *Small Nuclear Ribonucleic Acid*)

TCF – czynnik limfocytów T (ang. *T-cell factor*)

TGF– transformujący czynnik wzrostu (ang. *Transforming Growth Factor*)

TKI – inhibitor kinazy tyrozynowej (ang. *Tyrosine Kinase Inhibitor*)

TMA– mikromacierz tkankowa (ang. *Tissue Microarray*)

TMEM88 –88. przebłonowe białko (ang. *Transmembrane Protein 88*)

TNM– klasyfikacja zaawansowania nowotworu uwzględniająca status guza pierwotnego, regionalnych węzłów chłonnych oraz przerzutów odległych (ang. *Tumor, Nodes, Metastases*)

TTF1 –1. tarczycowy czynnik transkrypcyjny (ang. *Thyroid Transcription Factor-1*)

UICC– Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem (fr. *Union Internationale Contre le Cancer*)

VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*)

WDFA – dobrze zróżnicowany gruczolakorak typu płodowego (ang. *Well Differentiated Fetal Adenocarcinoma*)

WHO– Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organisation*)

WIF-1 – 1. inhibitor Wnt (ang. *Wnt Inhibiting Factor-1*)

WISP2 –2.białko indukowane przez Wnt1 (ang. *Wnt1 Inducible Signaling Pathway Protein 2*)

Wnt– białko kodowane przez gen *Wingless*–gen miejsca integracji wirusa MMTV(ang. *Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 1*)

β-TrCP– białko zawierające powtórzenia β-transducyny

WSTĘP

1. Epidemiologia, klasyfikacja i etiologia raka płuca

Pierwsze doniesienia o zachorowaniach na raka płuca pochodzą z XV wieku. U wielu górników zatrudnionych w tym okresie w kopalniach na granicy czesko-niemieckiej zdiagnozowano śmiertelną *bergkrankheit* – „chorobę górską” [1,2,3]. W roku 1879 Harting i Hesse przeprowadzili badania autopsyjne 20 górników – u 75% chorych z *bergkrankheit* postawili rozpoznanie mięsaka płuca. Za czynnik etiologiczny choroby, którą następnie określono mianem „płaskonabłonkowy rak płuca”, uznano ekspozycję na pył kopalniany [4].

Choroby nowotworowe stanowią drugą pod względem częstości, po chorobach układu krążenia, przyczynę zgonów. Rak płuca jest najczęstszym nowotworem złośliwym (1,6 mln, tj. 13% rozpoznań spośród 12,7 mln nowotworów złośliwych diagnozowanych rocznie na świecie) oraz najczęstszą przyczyną zgonów nowotworowych (1,4 mln zgonów rocznie, 18%) [5].

Liczba zachorowań na raka płuca narastała logarytmicznie od lat 30-tych ubiegłego wieku, a od kilku dekad możemy mówić już o globalnej pandemii raka płuca. W Polsce w pierwszej połowie lat 90-tych zaobserwowano stabilizację, a następnie tendencję spadkową zachorowalności wśród mężczyzn, natomiast w populacji kobiet zapadalność nadal wzrasta, szczególnie w przedziale wiekowym 45-54 lata. Rak płuca jest najczęstszym nowotworem złośliwym u mężczyzn (19,9% wszystkich rozpoznań onkologicznych), natomiast w populacji kobiet zajmuje drugie miejsce po rakupiersi (8,7% wszystkich rozpoznań onkologicznych). Z danych Krajowego Rejestru Nowotworów wynika, że w 2012 roku w Polsce nowotwór ten rozpoznano u około 15.000 mężczyzn, a współczynnik zachorowań wyniósł 81,9/100.000. W tym okresie u około 5.500 kobiet zdiagnozowano raka płuca, a współczynnik zachorowalności wyniósł odpowiednio 22,2/100.000. Ryzyko zachorowania na raka płuca w Polsce jest ok. 3 razy wyższe u mężczyzn niż u kobiet. Większość zachorowań na nowotwory złośliwe płuca występuje po 50. roku życia (96% zachorowań u mężczyzn i 95% zachorowań u kobiet), przy czym około 50% zachorowań u obu płci przypada na populację osób po 65. roku życia. Ryzyko zachorowania na raka płuca wzrasta z wiekiem, osiągając szczyt u mężczyzn w ósmej dekadzie życia (455/100.000), a u kobiet na przełomie szóstej i siódmej dekady życia (100/100.000) [6].

W Polsce 55-60% nowotworów płuca rozpoznaje się w stadium zaawansowanym – w stopniu zaawansowania klinicznego IIIB (naciek krytycznych struktur śródpiersia, zmiany satelitarne umiejscowione w innym niż pierwotny guz płacie tego samego płuca i/lub przerzuty do węzłów chłonnych śródpiersia po stronie przeciwnej lub węzłów nadobojczykowych) i IV (zmiany przerzutowe w drugim płucu, zajęcie opłucnej lub osierdza oraz przerzuty w odległych narządach) [6].

W populacji polskiej wskaźniki przeżycia 5-letniego chorych z nowotworami płuca w ciągu pierwszej dekady XXI wieku w populacji mężczyzn wzrosły z 10,8% do 11,9%, natomiast w populacji kobiet - z 15,7 % do 16,9% [6].

W 2012 roku zarejestrowano 22.512 zgonów z powodu nowotworów płuca, w tym 16.880 u mężczyzn i 5.632 u kobiet (wskaźnik struktury, odpowiednio 30,7% i 15,3%). Standaryzowany współczynnik umieralności na 100.000 osób wyniósł w 2012 roku 53,3 u mężczyzn i 16,4 u kobiet. Większość zgonów z powodu nowotworów złośliwych płuca występuje po 50. roku życia. Najwięcej zgonów u mężczyzn notuje się w siódmej dekadzie życia, u kobiet na przełomie szóstej i siódmej dekady życia. Ryzyko zgonu z powodu tego nowotworu wzrasta wraz z wiekiem, począwszy od piątej dekady życia i najwyższe wartości osiąga po 70. roku życia, zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet. W populacji mężczyzn wzrost umieralności utrzymywał się do początku lat 90-tych XX wieku, po czym nastąpiła stabilizacja i znaczący spadek tego współczynnika. Wśród kobiet od ponad 4 dekad umieralność charakteryzuje się tendencją rosnącą. Zaznaczyć należy, iż umieralność z powodu nowotworów płuca w Polsce jest u obu płci znacząco wyższa niż średnia dla krajów Unii Europejskiej [6].

Pierwotny rak płuca jest nowotworem pochodzącym z komórek nabłonkowych. W 2011 roku Międzynarodowe Stowarzyszenie Badań Nad Rakiem Płuca (IASLC) zaproponowało zmodyfikowaną klasyfikację raków gruczołowych. W 2015 roku wydano modyfikację klasyfikacji WHO, wprowadzając istotne zmiany i precyzując znaczenie badań immunohistochemicznych dla określania typu histologicznego. Według danych dla krajów Europy Zachodniej około 95% wszystkich raków płuca stanowią 4 typy histologiczne: rak gruczołowy (około 40% – najczęstszy u osób niepalących), rak płaskonabłonkowy (około 30%), rak drobnokomórkowy (około 15%) oraz rak wielokomórkowy (około 10%). W Polsce nadal u obu płci dominuje rak płaskonabłonkowy, stanowiąc 55,2% raków płuca u mężczyzn i 32,5% u kobiet. U kobiet, w porównaniu z mężczyznami, występuje wyższy odsetek raka gruczołowego (18% vs 6,6%) i drobnokomórkowego (18,5% vs 15,5%) [7]. Gruczolakorak wykazuje histologiczną tendencję do tworzenia układów pęcherzykowych lub brodawkowatych oraz często do produkcji śluzu. W

spektrum naciekających raków gruczołowych płuca wyróżnia się gruczolakoraki głównie typu tapetującego, głównie typu zrazikowego, głównie typudrobno- lub brodawkowatego oraz głównie typu litego. Pośród histologicznych wariantów raka gruczołowego naciekającego wyróżnia się: raka gruczołowego naciekającego śluzowego, raka gruczołowego koloidowego, a także płodowego oraz jelitowego. Charakterystycznymi cechami różnicowania płaskonabłonkowego raka płuca jest obecność rogowacenia i/lub mostków międzykomórkowych, widocznych w badaniu mikroskopowym. Wśród typów płaskonabłonkowego raka płuca wyróżnia się następujące odmiany: brodawkowatą, drobnokomórkową, jasnokomórkową oraz bazaloidalną. Rak wielokomórkowy stanowi niezróżnicowany podtyp nowotworu, w którym nie wyodrębnia się jednoznacznie cytologicznych i architektonicznych wykładników drobnokomórkowego raka płuca, różnicowania płaskonabłonkowego ani gruczołowego. Na podstawie charakterystyki cytologicznej wyróżnia się podtyp jasnokomórkowy, rabdoidalny, limfoepitelioidny, bazoidalny oraz neuroendokrynnny. Architektonikę drobnokomórkowego raka płuca, zaliczanego do spektrum nowotworów neuroendokrynnnych, charakteryzuje obecność komórek niewielkich rozmiarów, o skąpej cytoplazmie i prymitywnym jądrze o drobnoziarnistej chromatynie [8]. Rozpoznanie nieokreślonego niedrobnokomórkowego raka płuca (ang. *not otherwise specified* – NOS) stosuje się w przypadku braku możliwości określenia histologicznego typu nowotworu na podstawie obrazu mikroskopowego oraz wyników weryfikacji immunohistochemicznej. Odsetek nieokreślonych nowotworów płuca nie powinien przekraczać 10% wszystkich rozpoznań niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP).

Główną przyczyną obserwowanej epidemii raka płuca jest rozpowszechnienie nałogu palenia tytoniu, co potwierdzono w opublikowanym w 1964 roku obszernym raporcie „*Surgeon's General Report on Smoking and Heath*” [1]. W badaniu populacyjnym przeprowadzonym w Polsce w 2004 roku wśród 1005 osób wykazano, że 35% Polaków powyżej 15-tego rż. pali tytoń. Palacze stanowią około 90% chorych na raka płuca [9,10]. Ryzyko zachorowania na raka płuca zależy od wieku w chwili rozpoczęcia palenia, długości i intensywności tytoniowej ekspozycji (mierzonej liczbą paczkołat) oraz rodzaju papierosów. Ryzyko jest wyższe dla osób wcześniej ulegających nałogowi, rośnie proporcjonalnie wraz z liczbą paczkołat i jest nieznacznie niższe w przypadku papierosów z filtrem, fajek i cygar. Bach i wsp. wykazali, że także osoby wtórnie ekspozowane na dym tytoniowy, tzw. bierni palacze, są w grupie podwyższonego ryzykazachorowania na raka płuca [11,12]. Międzynarodowa Agencja do Badań nad Rakiem (IARC) zaliczyła bierną ekspozycję na dym tytoniowy do karcynogenów klasy A [5]. U małżonków osób palących ryzyko zachorowania wzrasta o około 25%, zaś u osób

narażonych na przebywanie w dymie tytoniowym w pracy o około 17% [13]. Ostatnie badania wskazują ponadto na znaczenie dodatkowych czynników, takich jak sposób wdychania dymu tytoniowego, a także cechy demograficzne oraz genetyczne, zwłaszcza warunkujące metabolizm nikotyny. Wyniki prospektywnych badań obejmujących dwie jednomilionowe grupy obywateli Stanów Zjednoczonych *American Cancer Society Cancer Prospective Study I & II* (ACS CPS I i II) wykazały, że względne ryzyko zachorowania u palących w porównaniu z niepalącymi wynosi 24 dla mężczyzn i 12,5 dla kobiet [14].

Spośród około 4000 toksycznych substancji zawartych w dymie papierosowym, kilkadziesiąt ma potwierdzone kancerogenne działanie (związki z grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych – benzopiren, nitrozoaminy, aminy aromatyczne, pochodne fenolu, katechole i związki niektórych metali). Tytoniowe kancerogeny oddziałują poprzez reaktywne cząstki powstające podczas ich metabolizowania w komórkach błony śluzowej oskrzeli lub poprzez bezpośrednie wiązanie się z receptorami oraz aktywowanie białek regulujących komórkowe procesy m.in. apoptozy i angiogenezy. W mechanizm kancerogenezy wpisuje się także drażniące działanie dymu tytoniowego, sprzyjające infekcjom dróg oddechowych, oraz osłabienie miejscowych reakcji immunologicznych. Pod wpływem ekspozycji na dym tytoniowy w obrębie błony śluzowej oskrzeli dochodzi do powstania pól kancerogenezy, morfologicznie odpowiadających ogniskom metaplastji lub dysplastji nabłonka, którego komórki wykazują obecność mutacji genów istotnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki, głównie genów supresorowych i onkogenów. Na wstępnym etapie dochodzi w materiale genetycznym tych komórek do niestabilności genomu, utraty fragmentów DNA oraz rearanżacji chromosomalnych. Pośrednie metabolity benzopirenu, najdogłębniej zbadanego kancerogenu dymu tytoniowego, łączą się z DNA, zwykle w pozycji guaniny, zwiększając ryzyko powstania mutacji w tym regionie. Nitrozoaminy prowadzą do aktywacji szlaków regulujących proliferację, apoptozę i angiogenezę. Oddziaływania węglowodorów aromatycznych i nitrozoamin z nicią DNA prowadzą do formowania adduktów DNA. W procesie tym biorą udział 2 grupy enzymów: enzymy P450, odpowiedzialne za metaboliczną aktywację kancerogenów, oraz transferaza glutationowa, neutralizująca reaktywne kancerogeny. Dym tytoniowy indukuje także oksydacyjne zmiany w DNA, najczęściej związane z powstaniem 8-oksoguaniny, odpowiedzialnej za transwersję G-T [10]. Kontynuacja ekspozycji na dym tytoniowy prowadzi do dalszych etapów kancerogenezy – promocji nowotworu z kumulacją genetycznych i epigenetycznych zaburzeń. Istotnym zjawiskiem jest także wzrost aktywności telomerazy, co prowadzi do nieograniczonych podziałów nieprawidłowych komórek.

Do najczęstszych mutacji występujących pod wpływem kancerogenów zawartych w dymie tytoniowym należą: mutacje genu *p53* (obecne w 80-90% raków drobnokomórkowych i 20-60% raków niedrobnokomórkowych) i genu *K-RAS*. W badaniach doświadczalnych obserwowano także nieprawidłowe wzorce metylacji genów w komórkach raka płuca, dotyczące głównie sekwencji promotorowych [10]. Do czynników ryzyka o mniejszym znaczeniu w etiopatogenezie raka płuca (odpowiadających za 5-10% zachorowań) należą: ekspozycja zawodowa na azbest, niektóre metale (arsen, chrom, kadm, nikiel, ołów), krzemionkę i promieniowanie jonizujące (szczególnie w wyniku narażenia na radon, co stanowi drugą w kolejności przyczynę raka płuca w krajach rozwiniętych) [15,16,17]. Wydaje się, że niektóre przewlekłe choroby układu oddechowego (przewlekła obturacyjna choroba płuc, zwłóknienie płuc, pylica, gruźlica) zwiększają ryzyko raka płuca, a najlepiej udokumentowano ten związek dla przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POCHP) [18,19,20].

Bezspornie jednak najistotniejszą przyczyną pandemii raka płuca jest nałóg tytoniowy i ograniczanie ekspozycji społeczeństw na dym tytoniowy powinno być podstawowym rodzajem interwencji w ramach profilaktyki pierwotnej raka płuca.

2. Zasady postępowania w raku płuca

U większości chorych rak płuca rozpoznawany jest w zaawansowanym stadium (75% chorych w stopniu III i IV zaawansowania klinicznego), co wynika z obserwowanego często w naturalnej historii choroby długotrwałego, bezobjawowego przebiegu oraz brak skutecznej metody badań przesiewowych.

Wyniki leczenia tego nowotworu wciąż pozostają niezadowolające – dane z badania EURO CARE-5 wskazują, że 5-letni wskaźnik przeżycia jest udziałem zaledwie 10-14% ogółu chorych, a roczny – około 30% chorych [21].

Obowiązującym standardem leczenia wczesnego raka płuca (stopień klinicznego zaawansowania I-II), a także wyselekcjonowanych chorych w stopniu zaawansowania klinicznego IIIA (z wyłączeniem większości chorych z cechą N2), jest pierwotna radykalna resekcja miąższu płucnego (najczęściej lobektomia lub pneumonektomia, w wyjątkowych przypadkach chorych z ograniczoną wydolnością oddechową – resekcja klinowa) oraz usunięcie węzłów chłonnych wnęki i śródpiersia [22]. W przypadku chorych w stopniu zaawansowania IIIA z cechą N2 postępowanie chirurgiczne rozważa się wyjątkowo w sytuacji tzw.

„minimalnego” zajęcia węzłów chłonnych śródpiersia, po uzyskaniu obiektywnej odpowiedzi na indukcyjną chemioterapię [7,23]. Niestety jedynie ok.15-20% ogółu chorych z rozpoznaniem raka płuca kwalifikuje się do zabiegu operacyjnego. Początki chirurgicznego leczenia raka płuca sięgają 1933 roku, kiedy to Evarts Graham przeprowadził pierwszą udaną pneumonektomię [24]. Od tego czasu rozwój przedoperacyjnej diagnostyki oraz pooperacyjnej opieki spowodował obniżenie odsetka śmiertelności okołoperacyjnej, obecnie nie przekraczającej 5%.

Chorych z wczesnym rakiem płuca (T1-2N0M0),niekwalifikujących się do zabiegu operacyjnego z powodu ograniczonej rezerwy oddechowej lub niewydolności krążeniowo-oddechowej,leczy się z wykorzystaniem radioterapii stereotaktycznej, której wczesne wyniki są porównywalne do resekcji chirurgicznych [25].

Wyniki badań III fazy z randomizacją oraz ich metaanaliza wskazują, że pooperacyjna radioterapia po radykalnej resekcji raka płuca u chorych w stopniu zaawansowania patologicznego pI-pIII zmniejsza ryzyko miejscowych nawrotów bez wydłużenia czasu przeżycia, a w stopniach I i II może mieć niekorzystny wpływ na przeżycie. Wskazania do zastosowania uzupełniającej radioterapii obejmują: nieradykalność chirurgiczną oraz niewiarygodną ocenę patologicznej cechy N2 [26]. W planowaniu pooperacyjnej radioterapii wykorzystuje się najczęściej technikę konformalną z zastosowaniem modulacji intensywności dawki (IMRT) i stosuje się dawki w zakresie 54-66Gy [7].

Wyniki badań z losowym doбором chorych oraz ich metaanalizy wskazują, że zastosowanie pooperacyjnej chemioterapii prowadzi do poprawy wskaźnika 5-letniego przeżycia o 4-15% [27,28]. Znamienna korzyść z zastosowania uzupełniającej chemioterapii dotyczy wyłącznie chorych z rakiem płuca w stopniu zaawansowania klinicznego II i IIIA [29,30]. Pooperacyjna chemioterapia obejmuje 3-4 cyklez zastosowaniem dwóch cytostatyków, w tym pochodnych platyny, stosowanych co 3 tygodnie.

W latach 50-tych XX wieku zaczęto wykorzystywać promieniowanie jonizujące do leczenia raka płuca. Aktualnie do radykalnej radioterapii kwalifikuje się chorych, u których przeprowadzenie radykalnej resekcji nie jest możliwe ze względu na zasięg nowotworu (stopień klinicznego zaawansowania IIIA i IIIB) lub istnieją istotne medyczne przeciwwskazania do znieczulenia ogólnego i zabiegu operacyjnego [7].

Wyniki badań z randomizacją oraz ich metaanalizy wykazały, że skojarzenie teleradioterapii z chemioterapią jest skuteczniejsze w porównaniu do samodzielnej

radioterapii (poprawa odsetka przeżyć 5-letnich o ok. 5%)[31]. Jednoczesne zastosowanie obu metod wiąże się ze znamienym zyskiem terapeutycznym, kosztem wyższego ryzyka działań niepożądanych (głównie ostrego zapalenia przełyku, w mniejszym stopniu pneumo- i mielotoksyczności)[32].

W radykalnym napromienianiu (wyłącznym lub skojarzonym z chemioterapią) stosuje się techniki konformalne, najczęściej z zastosowaniem modulacji intensywności wiązki (IMRT), oraz dawki w zakresie 60-66Gy [7]. Obszar tarczowy obejmuje guz pierwotny oraz zajęte węzły chłonne wnęki i śródpiersia.

Chorzy z rakiem płuca w stadium uogólnienia najczęściej poddawani są chemioterapii z intencją paliatywną. Pierwszym cytostatykiem, który w latach 40-tych ubiegłego wieku znalazł zastosowanie w leczeniu raka płuca był gaz musztardowy. Na przełomie lat 70-tych i 80-tych zidentyfikowano kolejne związki, które wykazały aktywność w leczeniu raka płuca, a prawdziwym postępem na polu skuteczności leczenia systemowego okazało się zastosowanie związków platyny. Przez kolejne 2 dekady w licznych przeprowadzonych prospektywnych badaniach z randomizacją badano skuteczność różnych schematów chemioterapii (z udziałem cisplatyny, karboplatyny, pemetreksedu, gemcytabiny, winorelbiny, etopozytu, paklitakselu lub docetakselu) [33]. Schematy zawierające pochodną platyny okazały się najskuteczniejszą opcją terapeutyczną [34]. W wyniku stosowania chemioterapii uzyskano wydłużenie czasu całkowitego przeżycia chorych o ok. 1,5-2 miesiące (do około 9 miesięcy), a odsetek chorych żyjących rok lub dłużej wzrósł o około 10%. Jednak obiektywną odpowiedź obserwuje się jedynie u 25-30% chorych, niezależnie od zastosowanego schematu leczenia [35,36].

Metodą wykorzystywaną celem kontroli dolegliwości u ok. 50-60% chorych w stadium uogólnienia raka płuca jest brachyterapia lub hipofrakcjonowana teleradioterapia paliatywna. Najczęściej stosowane schematy frakcjonowania to 20 Gy w 5 frakcjach oraz 30 Gy w 10 frakcjach [7].

3. Ukierunkowane molekularnie leczenie raka płuca

Szacowana mediana całkowitego przeżycia chorego z zaawansowanym lub uogólnionym rakiem płuca wynosi obecnie od 10 do 12 miesięcy [7]. Zastosowanie standardowego leczenia cytostatycznego w niewyselekcjonowanej populacji prowadzi do uzyskania czasu przeżycia wolnego od progresji (PFS) wynoszącego średnio 3-5 miesięcy [37].

Niezadowalające wyniki leczenia i osiągnięcie *plateau* skuteczności terapeutycznej powyższych metod stymulowały badaczy do poszukiwania nowych rozwiązań w zakresie leczenia systemowego.

W ostatnich dekadach w badaniach przedklinicznych i klinicznych udało się zidentyfikować kluczowe mutacje onkogenne – insercje, delecje i amplifikacje genowe, a także rearanżacje – które prowadzą do aktywacji istotnych, wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału, promując niekontrolowany wzrost komórek nowotworu. Dokładne poznanie molekularnej natury nowotworu poprzez profilowanie genomu może okazać się kluczem do opracowania potencjalnie skutecznego leczenia celowanego w molekularnie zdefiniowanych typach nowotworów. Wysiłki licznych instytutów badawczych koncentrują się aktualnie na sekwencjonowaniu genomu nowotworów – odkrywaniu somatycznych zaburzeń na poziomie genów kodujących białka uczestniczące w kaskadzie przekazywania sygnału i kontroli podstawowych procesów życiowych komórek (prolifracja, dojrzewanie, cykl komórkowy, angiogeneza, apoptoza), które stanowiłyby punkt uchwytu ukierunkowanych molekularnie terapii. W badaniach przedklinicznych potwierdzono, że nieprawidłowe białka powstałe na skutek wspomnianych mutacji onkogennych mogą zostać zahamowane przez monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko określonemu receptorowi lub poprzez drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz tyrozynowych danych białek (*ang. tyrosine kinase inhibitors, TKI*).

Za początek ery medycyny spersonalizowanej w leczeniu raka płuca przyjmuje się pierwsze zastosowanie drobnocząsteczkowych inhibitorów kinazy tyrozynowej receptora naskórkowego czynnika wzrostu (*ang. epithelial growth factor receptor, EGFR*) w przypadkach nowotworów z potwierdzoną mutacją genu *EGFR*. Wprowadzenie do praktyki klinicznej genotypowo-celowanych terapii istotnie zmieniło rokowanie chorych z zaawansowanym rakiem płuca, wykazując w badaniach klinicznych poprawę wskaźników obiektywnej odpowiedzi i czasu przeżycia w porównaniu z efektami standardowej chemioterapii.

Przykłady zaburzeń molekularnych o udowodnionym znaczeniu predykcyjnym występujących w niedrobnokomórkowym raku płuca to:

- względnie częste nieprawidłowości EGFR (silna ekspresja białka – 40-80% przypadków NDRP, wysoki poziom polisomii lub amplifikacja – 30-40% oraz mutacje genu *EGFR* – 10-20%), które stanowią punkt uchwytu dla inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR – erlotynibu, gefitynibu i afatynibu, oraz przeciwciała monoklonalne przeciwko EGFR – cetuksymabu;

- rearanżacja genu *ALK* (3-5% NDRP) oraz rearanżacja genu *ROS1* (1-3% NDRP), będące predykcyjnymi markerami terapeutycznej korzyści z zastosowania inhibitora ALK – kryzotylibu;
- mutacje genów *HER2* i *BRAF*, związane z korzyścią kliniczną z zastosowania inhibitorów białek odpowiadających tym genom [38].

Aktualnie trwa ocena genomu nowotworów płuca pod kątem innych zaburzeń molekularnych z wykorzystaniem metod sekwencjonowania nowej generacji (*ang. next generation sequencing*, NGS), fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (*ang. fluorescence in situ hybridization*, FISH) oraz łańcuchowej reakcji polimerazy (*ang. polymerase chain reaction*, PCR) [39-41]. Statystyki podają, że w USA oraz krajach Europy Zachodniej u ponad połowy chorych z rozpoznaniem raka płuca wykrywa się przynajmniej jedno zaburzenie molekularne, będące potencjalnym celem ukierunkowanej interwencji [42]. Dane opublikowane przez *Lung Cancer Mutations Consortium* potwierdzają wydłużenie mediany przeżycia wyselekcjonowanych chorych z zaawansowanym rakiem płuca, poddanych leczeniu ukierunkowanemu molekularnie, do ponad 3 lat, z towarzyszącą znamieną poprawą jakości życia [43]. Korzyści kliniczne płynące z zastosowania terapii celowanych zmieniają obraz terapeutyczny raka płuca, wprowadzają nową jakość i wyznaczają nowe cele podejmowanych wysiłków naukowo-badawczych.

Atrakcyjnymi celami molekularnymi oraz potencjalnymi czynnikami predykcyjnymi wydają się zidentyfikowane w ostatnim czasie w genomie raka płuca: amplifikacja i mutacja genu *MET* (2-5% NDRP), translokacja genu *RET* (1,5% NDRP), amplifikacja genu *FGFR* (5-20% NDRP), mutacja genu *DDR2* (4% NDRP), mutacja genu *MEK* (1% NDRP) oraz rearanżacja genu *NTRK1-3* (3% NDRP) [38]. Odkrywanie kolejnych zaburzeń molekularnych w raku płuca, analiza ich prognostycznego i predykcyjnego potencjału oraz poszukiwanie leków swoiście hamujących zidentyfikowane szlaki sygnałowe są bardzo obiecującym kierunkiem dalszych badań translacyjnych i projektowania indywidualizowanych terapii. Już dziś należy uwzględniać genotypowanie nowotworu jako integralną składową diagnostyki i klasyfikacji onkologicznej, a w przyszłości jedno z podstawowych narzędzi w podejmowaniu decyzji terapeutycznych.

Niezadowalająca skuteczność leczenia onkologicznego wynika z heterogenności nowotworów, pierwotnej lub indukowanej oporności na cytostatyki i promieniowanie jonizujące, a także obecności niewrażliwych na leczenie nowotworowych komórek macierzystych. Aktualnie najistotniejszą szansą na przezwycięzenie tych terapeutycznych ograniczeń wydaje się możliwie najbardziej precyzyjne rozszyfrowanie molekularnego kodu

nowotworów, a następnie rozwój i powszechne wdrożenie adekwatnych terapii celowanych. Bardzo obiecującą metodą systemowego leczenia nowotworów jest obecnie również modulacja odpowiedzi immunologicznej.

4. Szlak transdukcji sygnału zależny od Wnt

Szlak transdukcji sygnału zależny od Wnt po raz pierwszy wzbudził zainteresowanie badaczy w latach 80-tych ubiegłego wieku. W 1982 roku Varmus i Nusse zidentyfikowali protoonkogen *int-1*, który ulegając aktywacji poprzez integrację fragmentu LTR mysiego wirusa raka piersi (*ang. mouse mammary tumor virus*, MMTV), wywołuje transformację nowotworową w gruczole piersiowym gryzoni [44-46]. W tym okresie Nusslein-Volhard i Wieschaus odkryli homologiczny, kodujący to samo białko, gen segmentalnej polarność u muszki owocowej (*fac.Drosophila melanogaster*), odpowiedzialny za prawidłowy rozwój skrzydeł owada, który niezależnie nazwali *wingless* (*wg*) [47]. Fuzja obu terminów zapoczątkowała określenie „Wnt” [48,49].

W rodzinie białek Wnt zidentyfikowano 19 glikoprotein (39-46 kDa). Strukturalnie białka te bogate są w reszty cysteinowe (średnio 23-25), które odgrywają rolę w formowaniu mostków disulfidowych istotnych dla multimeryzacji [50]. Białka Wnt charakteryzują się właściwościami hydrofobowymi i są nierozpuszczalne, co długo utrudniało wyizolowanie ich aktywnych form. Po raz pierwszy w 2003 roku Nusse i współpracownicy wyizolowali aktywne produkty mysiego genu *Wnt3a* i genu *Wnt8* muszki owocowej. W retikulum endoplazmatycznym białka Wnt poddawane są przez enzym Porc posttranslacyjnym modyfikacjom: palmitynacji, umożliwiającej prawidłową ich sekrecję i funkcję, oraz N-glikozylacji [50-52].

Ligandy należące do rodziny Wnt podzielić można w zależności od pełnionej funkcji na: glikoproteiny o właściwościach onkogennych (aktywujące ścieżkę związaną z β -kateniną), do której należą m.in. Wnt1, 2, -3A, -8 oraz -8B oraz glikoproteiny nie wykazujące właściwości transformujących (aktywujące ścieżkę niekanoniczną i działające antagonistycznie względem białek pierwszej grupy), do której należą m.in. Wnt4, -5a oraz -11.

Zidentyfikowano 5 szlaków komórkowych aktywowanych przez białka z rodziny Wnt:

- kanoniczny, zależny od β -kateniny – regulujący ekspresję genów poprzez kompleks β -katenina/TCF (*T-cell factor*);
- polarny – aktywujący AP1 poprzez JNK i regulujący asymetryczną polarność, kształt i zdolność migracji komórek;
- zależny od jonów wapnia – aktywujący proteinową kinazę C i regulujący komórkową adhezję poprzez m.in. Wnt5a i Wnt11;
- zależny od białkowej kinazy A – regulujący proces miogenezy;
- zależny od nietypowych receptorów kinazy tyrozynowej (RTK) – Ror i Ryk [53].

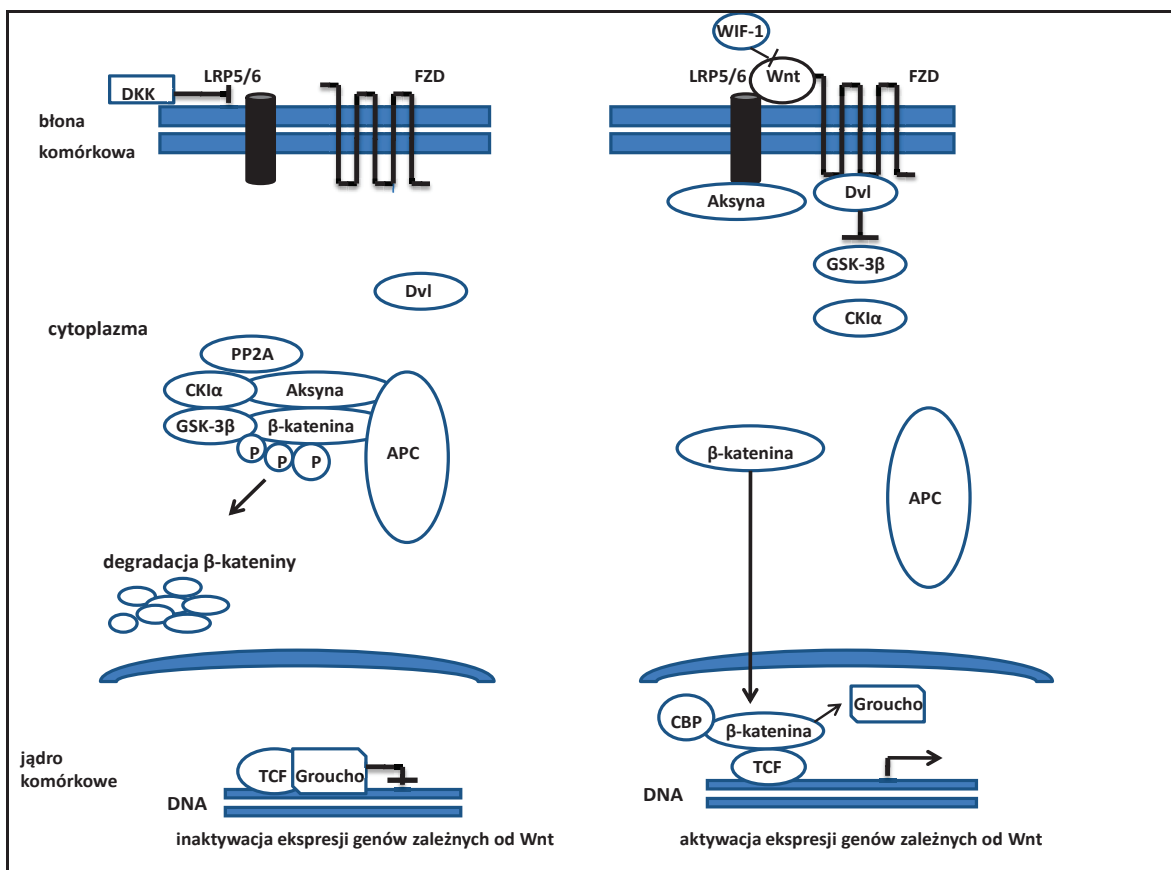
Dotychczas najlepiej zbadaną ścieżką sygnałową związaną z białkami Wnt jest ścieżka kanoniczna, której dotyczy niniejsza rozprawa. Zidentyfikowano 6 glikoprotein Wnt aktywujących wspomnianą ścieżkę: Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt8 i Wnt8b [53].

Aktywność kanonicznego szlaku sygnałowego jest determinowana przez poziom zgromadzonej w cytoplazmie β -kateniny. Cytoplazmatyczny poziom β -kateniny utrzymywany jest fizjologicznie na niskim poziomie poprzez dokonującą się w sposób ciągły proteasomalną degradację zależną od ubikwityny, która jest regulowana przez poliproteinowy kompleks składający się z aksyny, APC (*fac. Adenomatous Polyposis Coli*), białkowej fosfatazy 2A (*ang. protein phosphatase 2A, PP2A*), kinazy 3β syntazy glikogenu (*ang. glycogen synthase kinase-3 beta, GSK3 β*) oraz kinazy kazeiny 1α (*ang. casein kinase 1α , CK1 α*) [54,55]. W procesie proteasomalnej degradacji biorą udział: enzym aktywujący ubikwitynę (E1), enzym koniugujący ubikwitynę (E2) oraz ligaza ubikwityny (E3). Białka GSK3 β oraz CK1 α pośredniczą w degradacji β -kateniny poprzez fosforylowanie specyficznych reszt aminokwasowych (Ser33, Ser37 i Thr41 przez GSK-3 β i Ser45 przez CK1 α), co umożliwia rozpoznanie białka przez kompleks β -TrCP (*ang. β -transducin repeat containing protein*), będący składnikiem ligazy ubikwityny (E3), a następnie ostateczną degradację przez kompleks 26S proteasomu [56-58]. Transdukcja sygnału rozpoczyna się od połączenia ligandów Wnt z N-końcową, bogatą w reszty cysteinowe domeną receptorów z rodziny *Frizzled* (Fzd), w obrębie której zidentyfikowano 10 różnych receptorów. Zbudowane są one z 7 przezbłonowych domen, wykazujących homologię z receptorami sprzężonymi z heterotrimerycznymi białkami G [59-61]. Dla przekazania sygnału konieczne jest także współdziałanie innych receptorów: m.in. należących do rodziny LDL (*ang. Low-Density Lipoprotein-Receptor Related Proteins*) – LRP5 oraz LRP6, które odpowiadają za oddziaływania auto- i parakryne [62,63]. Związanie liganda Wnt z domeną CRD receptora Fzd powoduje fosforylację cytoplazmatycznego, zbudowanego z 3 domen (DIX, PDZ i DEP), białka

Dishevelled(Dvl), a następnie jego aktywację i transport do błony komórkowej [64]. Zaktywowane białko Dvl wiąże się z kompleksem APC-aksyna-konduktyna, hamując, poprzez fosforylację, działanie kinazy 3 β syntazy glikogenu (GSK3 β) oraz kinazy kazeiny 1 α (CK1 α). Prowadzi to do zablokowania fosforylacji β -kateniny. Fosforylacja β -kateniny na N-końcu przez GSK3 β oraz CK1 α jest niezbędna do rozpoznania tego białka przez β -TrCP, będącego składową kompleksu ligazy ubikwitynowej E3, która odpowiedzialna jest za lizosomalną degradację. Niefosforylowana β -katenina gromadzi się w cytoplazmie komórki, a następnie ulega translokacji do jądra komórkowego (poprzez białko RanBP3 lub kompleks porów jądra komórkowego), gdzie tworzy kompleksy z czynnikami transkrypcyjnymi Tcf/Lef, co indukuje ekspresję genów zależnych od Wnt, związanych z regulacją cyklu komórkowego, proliferacji, apoptozy, a także wielu onkogenów, w tym *cykliny D1*, *c-myc*, *MMP7*, *VEGF-A* oraz *surwiwiny* [53,65-67].

β -katenina jest ponadto koaktywatorem czynników transkrypcyjnych *Legless* i *Pygopus* [68-70]. Na poziomie komórkowym β -katenina oddziałuje także z E-kadheryną, formując połączenia zwierające odpowiedzialne za oddziaływania międzykomórkowe, a zaburzenie tych interakcji może mieć znaczenie dla inwazji podścieliska i tworzenia przerzutów nowotworowych. Dodatkowo E-kadheryna, wiążąc β -kateninę, uniemożliwia jej fosforylację, a także jądrową internalizację i aktywowanie transkrypcji zależnej od TCF/LEF [68-70].

W sytuacji braku sygnału pochodzącego od kompleksu Wnt/Fzd, β -katenina ulega fosforylacji przy udziale GSK-3 β oraz CK1 α , a następnie zostaje zidentyfikowana przez β -TrCP – element kompleksu ligazy ubikwitynowej E3. Połączenie fosforylowanej β -kateniny z ubikwityną prowadzi do jej degradacji w proteasomie. Wówczas nie dochodzi do akumulacji β -kateniny w cytoplazmie i jądrze, a kompleks TCF/LEF w wyniku oddziaływania z białkiem *Groucho*, a następnie poprzez interakcję z deacetylazami histonowymi, głównie CtBP (*ang.C-Terminal Binding Protein*) i jej homologiem – p300, działa jako bloker transkrypcji [71,72].



Rycina 1. Schemat kanonicznego szlaku transdukcji sygnału zależnego od Wnt.

FZD – receptor Frizzled; LRP – białko związane z receptorem lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *low density lipoprotein receptor-related protein*); Dvl – białko Dishevelled; APC – białko APC (ang. *adenomatous polyposis coli*); GSK-3β – kinaza 3β syntazy glikogenu (ang. *glycogen synthase kinase-3β*); CK1α – kinaza kazeiny 1α (ang. *casein kinase 1α*); PP2A – białkowa fosfataza 2A (ang. *protein phosphatase 2A*); TCF – czynnik transkrypcyjny TCF (ang. *T-cell factor*); CBP – białko wiążące CREB (ang. *CREB binding protein*), DKK – inhibitor DKK (ang. *dickkopf*), WIF-1 – inhibitor Wnt 1 (ang. *Wnt inhibiting factor-1*).

4.1. Inhibitory szlaku transdukcji sygnału zależnego od Wnt

Przekazywanie sygnału szlakiem Wnt jest pozakomórkowo modulowane przez 2 grupy antagonistów. Do pierwszej należą białka rodziny sFRP, WIF-1 i *Cerberus*, które bezpośrednio wiążą się z białkami Wnt, hamując przekazywanie sygnału szlakiem kanonicznym i niekanonicznym, do drugiej – białka Dkk, wiążące się z kompleksem LRP5/LRP6, blokujące selektywnie transdukcję sygnału szlakiem kanonicznym [73]. Ponadto białka Wnt-5a i -5b posiadają potencjał hamowania szlaku kanonicznego na drodze niezależnej od GSK-3β degradacji β-keniny.

W nowotworach złośliwych (rak szyjki macicy, rak piersi, rak jajnika, rak nerki) wykazano obniżenie stężenia białek rodziny sFRP [74]. W ostatnich doniesieniach potwierdzono udział wymienionych antagonistów w onkogenezie raka żołądka, raka jelita grubego, a także raka płuca [74].

4.2. Rola szlaku sygnałowego zależnego od Wnt w biologii procesu nowotworowego

W komórce nowotworowej do zaburzonej aktywacji szlaku transdukcji sygnału zależnego od Wnt dochodzi na drodze nadekspresji aktywatorów szlaku lub inaktywacji jego inhibitorów.

Przez lata brakowało jednoznacznego potwierdzenia udziału szlaku sygnałowego Wnt w procesie kancerogenezy. W doświadczeniach prowadzonych w latach 80-tych XX wieku na transgenicznym myszach wykazano, że wzrost guza nowotworowego zależy od ekspresji Wnt1 [45,46]. Badania nad ekspresją Wnt w ludzkich nowotworach piersi ugruntowały wiedzę na temat roli sygnałowania zależnego od Wnt w rozwoju raka piersi u kobiet [75]. Udowodniono, że ekspresja Wnt5a wywiera bezpośredni wpływ na zdolność poruszania oraz inwazyjność komórek czerniaka złośliwego [76]. Ekspresja Wnt5a w materiale biopsyjnym z ognisk czerniaka ma związek z histologicznym stopniem złośliwości [76]. Chen i współpracownicy udowodnili, że komórki wykazujące ekspresję Wnt1 były odporne na apoptozę wywołaną przeciwnowotworowym leczeniem. Przekazywanie sygnału za pośrednictwem Wnt1 hamowało uwalnianie cytochromu c i aktywację kaspazy 9, indukowane w zwykłych warunkach przez cytostatyki (m.in. winkrystynę, winblastynę). Dalsze badania nad zagadnieniem potwierdziły hamujący wpływ przekazywania sygnału poprzez Wnt1 na proces apoptozy na drodze aktywacji transkrypcji zależnej od kompleksu β -katenina/TCF [77].

Mutacje promujące konstytutywną aktywację szlaku Wnt prowadzą do indukcji nowotworów. Najlepiej poznaną, przykładową jednostką chorobową jest, dziedziczna autosomalnie dominująca, rodzinna polipowatość gruczołakowata (*ang. familial adenomatous polyposis, FAP*). U jej molekularnego podłoża leżą mutacje genu supresorowego APC, prowadzące do zaburzonej aktywacji szlaku przekazywania sygnału zależnego od Wnt, co stymuluje proliferację nabłonka jelitowego i tworzenie licznych polipów w jelicie grubym, które ulegają nowotworowej transformacji [78,79]. Mutacje genu APC wykrywa się ponadto w 80% sporadycznych nowotworów jelita grubego [80]. Są to najczęściej mutacje typu zmiany ramki

odczytu, promocje kodonów nonsensownych oraz hipermetylacje w regionie przyłączenia aksyny i β -kateniny [81]. W genomie wielu typów nowotworów, w tym m.in. nowotworów jelita, jajnika, endometrium, trzustki, gruczołu krokowego, żołądka oraz regionu głowy i szyi, potwierdzono obecność mutacji genu β -kateniny. Mutacje dotyczą regionów fosforylacji β -kateniny przez CK1 α i GSK3 β oraz regionu rozpoznawanego przez TrCP i prowadzą do stabilizacji tego onkogenu [82]. W raku wątrobowokomórkowym potwierdzono obecność mutacji utraty funkcji w genie aksyny [83].

Jak dotychczas zgromadzono silne dowody potwierdzające zaburzoną aktywację szlaku transdukcji sygnału zależnego od Wnt w wielu rodzajach nowotworów: m.in. raku jelita grubego, nowotworach regionu głowy i szyi, raku prostaty, raku płuca, raku piersi, białaczkach oraz międzybłoniaku opłucnej.



Rycina 2. Częstość występowania zaburzeń transdukcji sygnału szlakiem zależnym od Wnt w nowotworach złośliwych.

4.3. Wpływ przekazywania sygnału zależnego od Wnt na cykl życiowy oraz metabolizm nowotworowych komórek macierzystych

Dane z piśmiennictwa dowodzą znaczenia nowotworowych komórek macierzystych jako rezerwuaru zdolnych do niekontrolowanych podziałów komórek [91]. Wykazano, że szlak sygnałowy zależny od Wnt pobudza samoodnowę nowotworowych komórek macierzystych [92,93]. Udowodniono, że aktywacja β -kateniny w komórkach progenitorowych szeregu granulocytarnego przewlekłej białaczki szpikowej stymuluje samoodnowę, promując potencjał białaczkowy klonu komórkowego [94]. Dane z badań nad transgenicznymi myszami sugerują, że aktywacja szlaku Wnt w nabłonkowych komórkach macierzystych może prowadzić do rozwoju nowotworów złośliwych [95]. Dla potwierdzenia tej hipotezy, Clevers i wsp. wykazali istotne podobieństwo pomiędzy modelem ekspresji genów w komórkach raka jelita grubego oraz macierzystych komórkach jelita [96]. Kontrola predestynacji oraz procesu samoodnowy komórek macierzystych przez szlak zależny od Wnt stanowi kolejny argument za istotnym znaczeniem tej ścieżki przekazywania sygnału w procesie onkogenezy, uzasadniając dalsze badania i poszukiwanie potencjalnych molekularnych celów nowych terapii.

4.4. Znaczenie przekazywania sygnału zależnego od Wnt w rozwoju embrionalnym oraz etiopatogenezie chorób płuc

Odkrycie, że myszy onkogen *int-1* jest homologiem genu polarności *wingless* muszki owocowej po raz pierwszy zwróciło uwagę na rolę białek z rodziny Wnt w procesach embriogenezy i kancerogenezy. Udowodniono udział przekazywania sygnału zależnego od Wnt w morfogenezie przewodu pokarmowego, gruczołów piersiowych, układu krążenia oraz szpiku kostnego [62]. Ostatnie dane podkreślają znaczenie aktywacji szlaku Wnt w rozwoju płuc [84]. Przekazywanie sygnału wspomnianym szlakiem reguluje formowanie struktur nabłonkowych oraz mezenchymalnych na różnych etapach embriogenezy. Wykazano, że synteza danego rodzaju białka Wnt charakterystyczna jest dla określonego typu komórki układu oddechowego. Odpowiednio Wnt2 występuje głównie w komórkach mezenchymalnych [85], Wnt11 – zarówno w komórkach nabłonkowych, jak i mezenchymalnych [86], zaś Wnt7b jest białkiem specyficznym dla komórek nabłonkowych [87]. Aktywność promotora Wnt7b jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny TTF1, niezbędny dla różnicowania nabłonka płucnego, głównie pneumocytów typu II [84]. Hamowanie ekspresji TTF1 u myszy prowadzi do niedoboru

efektywnych czynnościowo pęcherzyków płucnych, co jest prawdopodobnie rezultatem zaburzonego przekazywania sygnału na poziomie Wnt7b.

Na podstawie analizy systemu promotora TCF zależnego od operonu LacZ wykazano aktywację kanonicznej ścieżki sygnałowej na wszystkich etapach rozwoju płuc u zarodków mysich [88]. Ponadto udowodniono, że przekazywanie sygnału za pośrednictwem β -kateniny odgrywa istotną rolę w rozwoju dystalnych odcinków dróg oddechowych [89]. Badania przeprowadzone na myszach wykazały istotną rolę Wnt2, Wnt5a i Wnt7b w procesie dojrzewania płuc [84]. Utrata funkcji Wnt5a u badanych myszy prowadziła do nasilenia proliferacji nabłonka oddechowego oraz pogrubienia śródbłonka [84]. Bonner i wsp. potwierdzili to w badaniach z wykorzystaniem techniki macierzy oligonukleotydowych [84]. Ostatnio udowodniono, że aktywacja zależnego od β -kateniny szlaku kanonicznego jest jednym z czynników potencjalnie indukujących procesy zapalne, w tym idiopatyczne włóknienie płuc [90]. Szlak transdukcji sygnału zależny od Wnt wydaje się pełnić złożoną rolę: jego aktywacja jest istotna dla embrionalnego rozwoju układu oddechowego, a jego deregulacja może prowadzić do rozwoju chorób zapalnych lub nowotworowej transformacji.

4.5. Znaczenie ścieżki sygnałowej Wnt w raku płuca

Większość badanych linii komórkowych NDRP wykazywała aktywność szlaku Wnt lub podwyższoną ekspresję Wnt1 [97], jednakże dane dotyczące znaczenia szlaków zależnych od Wnt w etiopatogenezie raka płuca są nadal ograniczone. Największą uwagę jak dotychczas poświęcono dziedzicznym i sporadycznym mutacjom supresorowego genu *APC* i β -kateniny. Białko APC odpowiada za degradację β -kateniny, a mutacje jego genu mogą prowadzić do akumulacji β -kateniny w jądrze komórkowym, co stymuluje aktywację genów docelowych, m.in. *cykliny D1* oraz *c-myc*. Podwyższenie poziomu białka β -kateniny zauważono w różnych podtypach histologicznych raka płuca [98], zaś występowanie mutacji genu *APC* i β -kateniny stwierdzono w tym nowotworze względnie rzadko – w ok. 4% przypadków [99,100]. Ukazały się natomiast doniesienia dowodzące onkogennego wpływu zaburzonej regulacji na poziomie białek Wnt [101,102]. Zdefiniowano 3 mechanizmy aktywacji szlaku transdukcji sygnału zależnego od Wnt: nadekspresja efektorów szlaku, np. Dvl, aktywacja niekanonicznej ścieżki sygnałowej zależnej od JNK oraz supresja funkcji naturalnych antagonistów komponentów szlaku, m.in. WIF-1 [103]. W materiale pooperacyjnym pochodzącym od chorych z rozpoznaniem raka płuca wykazano wysoką ekspresję Wnt1 (40% analizowanych

przypadków), Wnt2 (88% analizowanych przypadków), Wnt3 i Wnt5a oraz innych komponentów szlaku, m.in. *Frizzled-8*, *Dishevelled*, *Porcupine* i TCF-4, co korelowało z gorszym rokowaniem chorych [103]. W badaniach na liniach komórkowych NDRP oraz w analizach materiału pooperacyjnego opisywano obniżoną aktywność inhibitorów szlaku Wnt (najczęściej uwarunkowaną hipermetylacją promotora genu kodującego), co wiązało się z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu, wyższym stopniem złośliwości histologicznej oraz stanowiło negatywny czynnik rokowniczy [103].

Istnieją dowody na stymulację skojarzonego przekazywania sygnału szlakiem Wnt i Hedgehog w komórkach nabłonka oddechowego po ekspozycji na dym tytoniowy [104,105]. Ponadto, aktywacja szlaku Wnt jest jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za oporność na leczenie systemowe cisplatyną i docetakselem, a także na promieniowanie jonizujące [162].

4.6.1. Wnt1

Gen *Wnt1*, aktywowany poprzez integrację fragmentu RNA mysiego wirusa i indukujący wzrost guzów gruczołu sutkowego u tych gryzoni, wykazuje wysoką ekspresję także w wielu rodzajach nowotworów u człowieka, co potwierdzili w swoich badaniach Katoh i Wong [106,107]. He i wsp. wykazali wysoką ekspresję *Wnt1* w liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuca i komórkach pierwotnych guzów płuca [108]. W barwieniu immunohistochemicznym materiału pochodzącego z resekowanych raków płuca w 37-63% uzyskiwano pozytywne odczyny na obecność białka Wnt-1, co wiązało się z niskim indeksem apoptotycznym, zaburzoną immunoekspresją β -kateniny, zwiększoną immunoekspresją c-Myc, cykliny D1, VEGF-A, MMP-7, Ki-67, surwiwiny oraz zwiększoną gęstością naczyń krwionośnych w guzach, klinicznie natomiast stanowiło negatywny czynnik prognostyczny [109-111]. Chen i wsp. wykazali oporność komórek wykazujących ekspresję *Wnt1* na terapię proapoptotyczne [112]. Hamowanie *Wnt1* przez siRNA (*ang. small interfering RNA*) lub specyficzne przeciwciało monoklonalne prowadziło do indukcji apoptozy w komórkach wykazujących immunoekspresję *Wnt1* oraz zmniejszało proliferację i inwazyjność komórek linii komórkowych NDRP [101]. Dodatkowo udowodniono, że monoklonalne przeciwciało przeciwko *Wnt1* hamowało wzrost nowotworów w warunkach *in vivo* [101]. Do analogicznych wniosków doszli Rhee i wsp., którzy analizowali płaskonabłonkowe nowotwory głowy i szyi [113]. Przedstawione dowody sugerują

kluczową rolę aktywacji Wnt1 w regulacji apoptozy w nowotworach pochodzenia nabłonkowego.

4.6.II. Wnt2

Silną ekspresję ludzkiego genu *Wnt2* wykazano w płucach w życiu płodowym [106, 114-116]. Wysoką immunoekspresję Wnt2 oraz FZD-8 wykryto także w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca [102]. Analogicznie do badań nad Wnt1, w przypadku Wnt2 także wykazano, że zahamowanie jego aktywności poprzez siRNA, shRNA (*ang. small hairpin RNA*) lub specyficzne przeciwciała monoklonaalne skutkuje uruchomieniem mechanizmów zaprogramowanej śmierci komórki i obniżeniem aktywności transkrypcyjnej zależnej od TCF. You i wsp. udowodnili dodatkowo, że zastosowanie przeciwciała anty-Wnt2 hamuje wzrost kolonii komórkowych pochodzących od chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca [102].

4.6.III. Inne składowe szlaku przekazywania sygnału zależnego od Wnt

Huang i wsp. wykazali immunoekspresję Wnt5a, aktywującego niekanoniczną ścieżkę zależną od jonów wapnia, w komórkach raka płuca, znamienne wyższą w przypadku histologii płaskonabłonkowej w porównaniu do gruczołowej (co może sugerować związek z bardziej agresywnym, naturalnym przebiegiem nowotworu) oraz podkreślili jej związek z indeksem proliferacyjnym guza [117].

W przypadku wielu nowotworów, także w raku płuca, dochodzi do zjawiska zwanego transformacją nabłonkowo-mezenchymalną (*ang. epithelial-mesenchymal transition, EMT*), która indukowana jest podwyższonym poziomem β -kateniny. Jak wspomniano powyżej mutacje genu *β -kateniny* występują w komórkach raka płuca relatywnie rzadko, a mechanizmem, który najprawdopodobniej pośrednio odpowiada za regulację EMT i proces tworzenia przerzutów odległych jest aktywacja niekanonicznego szlaku zależnego od Wnt5a. Dowiedziono, że Wnt5a reguluje ekspresję czynnika wzrostu fibroblastów (*ang. fibroblast growth factor, FGF*) oraz Shh (*ang. sonic hedgehog*), których wysoki poziom wykrywa się w odległych przerzutach [118]. Białka z rodziny FGF oraz Shh pełnią funkcję modulacyjną w procesie nabłonkowo-mezenchymalnej transformacji (EMT). Warunkująca metastatyczny potencjał nowotworu zaburzona regulacja przekazywania sygnału zależnego od FGF i Shh

sugeruje pośrednią rolę białka Wnt5a i całego niekanonicznego szlaku transdukcji sygnału w tworzeniu przerzutów odległych raka płuca.

Szczególne zainteresowanie badaczy budzi gen *Wnt7a*, którego ekspresja jest obniżona w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca. Zwiększona ekspresja Wnt7a i FZD9 prowadzi do zahamowania wzrostu linii komórkowych raka płuca poprzez oddziaływanie na receptor gamma aktywowany przez proliferatory peroksysomów (*ang. peroxisome proliferator activated receptor gamma*, PPARG) w mechanizmie zależnym od pozakomórkowej kinazy ERK5 (*ang. extracellular-signal-regulated kinase 5*). Wynikiem tego oddziaływania jest prawidłowe różnicowanie komórek nabłonkowych [119]. Powyższy etap transdukcji sygnału ścieżką niekanoniczną wydaje się być konieczny dla prawidłowego różnicowania nabłonka układu oddechowego. Calvo i wsp. wykazali obniżoną ekspresję Wnt7a w liniach komórkowych raka płuca, a także w materiale pochodzącym z guza pierwotnego, co może wskazywać na jego supresorową funkcję [120]. W późniejszych badaniach Ohira i wsp. udowodnili, że Wnt7a indukuje ekspresję E-kadheryny w komórkach raka płuca [121].

Dodatkowo udowodniono, że konstytutywna aktywacja ścieżki kanonicznej w rozwoju embrionalnym prowadzi do wykształcenia niezróżnicowanego fenotypu tkanki płucnej, przypominającego nowotwór. Kolejnym dowodem potwierdzającym znaczenie szlaku Wnt w etiopatogenezie raka płuca jest zwiększona ekspresja docelowych genów szlaku kanonicznego i polarnego, w tym metaloproteinaz, niezbędnych dla nowotworowego modelowania tkanek, do którego dochodzi w inwazyjnych postaciach raka płuca [122].

4.6.IV. Dvl (*dishevelled*)

Białka Dvl stymulują przekazywanie sygnału szlakiem zależnym od Wnt, prowadząc do aktywacji białek Rac i Rho, które zaangażowane są w proces kancerogenezy [103]. Jablons i wsp. wykryli nadekspresję genu *Dvl-3* w 75% świeżych, poddanych mikrodesekcji próbek materiału pochodzącego od chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca, co miało związek z wyższym stopniem złośliwości histologicznej nowotworu [123,124]. Dodatkowo wykazali, że selektywne blokowanie Dvl-1, -2 i -3 obniżało poziom β -kateniny, hamowało transkrypcję zależną od TCF oraz wzrost w liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuca. Te dane pozwalają na przyjęcie założenia, że szlak sygnałowy zależny od Wnt może być aktywowany poprzez nadekspresję Dvl.

4.6.V. β -katenina

β -katenina jest kluczową składową ścieżki sygnałowej zależnej od Wnt i jest odpowiedzialna za przekazywanie sygnału do jądra komórkowego. Poprzez regulację onkogenów (m.in. *cykliny D1* oraz *c-myc*) odgrywa ona istotną rolę w procesie kancerogenezy. Jedynie w około 4% przypadków pierwotnych raków płuca wykrywa się mutację w eksonie 3 genu kodującego β -kateninę [100]. W licznych badaniach obserwowano podwyższony poziom β -kateniny w komórkach raka płuca. Obecność β -kateniny wykazano w 94% pierwotnych płaskonabłonkowych raków płuca i w 51% gruczolowych raków płuca [125]. Obniżenie poziomu β -kateniny w komórkowym kompartmentie błonowym oraz cytoplazmatyczna jej akumulacja miały związek z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu, większą średnicą guza i krótszym czasem całkowitego przeżycia chorych [125]. Hommura i wsp. wykazali związek pomiędzy podwyższonym poziomem β -kateniny a wyższym indeksem mitotycznym, a także, co wydaje się być nieco zaskakujące, lepszym rokowaniem, szczególnie w przypadku niepłaskonabłonkowej histologii raka płuca [126]. W niezależnym eksperymencie Retera i Kase wykazali, że obniżony poziom β -kateniny może mieć związek z gorszym rokowaniem w grupie chorych na gruczolowego raka płuca [127,128]. Nakatani i wsp., analizując dobrze zróżnicowane gruczolakoraki typu płodowego (*ang. well differentiated fetal adenocarcinoma, WDFA*), potwierdzili jądrowo-cytoplazmatyczny wzorec ekspresji β -kateniny w każdym z rozpatrywanych przypadków oraz mutacje w eksonie 3 genu kodującego β -kateninę w znamienym ich odsetku [129].

Akumulacja β -kateniny w jądrze komórkowym wykazuje związek z mutacją *EGFR*, a jej nadekspresja w analizowanych liniach komórkowych NDRP wiązała się z opornością na inhibitor EGFR gefitynib [130].

Dowiedziono, że podwyższony poziom czynnika indukującego EMMPRIN (*ang. extracellular matrix metalloproteinase inducer*) w komórkach raka płuca stymuluje przekazywanie sygnału zależne od β -kateniny [131].

Xu i wsp. wykazali nadekspresję TCF-4 w 80% analizowanych przypadków raka płuca, co okazało się mieć związek z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu [132].

Utrata ekspresji β -kateniny w analizowanych pooperacyjnych wycinkach NDRP miała związek z większą średnicą guza pierwotnego, wyższym stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu oraz wyższym stopniem złośliwości histologicznej [125]. Piśmiennictwo podaje sprzeczne dane dotyczące prognostycznego znaczenia ekspresji β -kateniny – część autorów raportuje związek ekspresji β -kateniny z lepszym rokowaniem [125-128], w innych pracach podwyższony poziom β -kateniny przedstawiany jest jako negatywny czynnik prognostyczny [132], co najprawdopodobniej należy wiązać z jej wpływem na funkcję E-kadheryny.

Znaczenie ekspresji β -kateniny w raku płuca jest nadal przedmiotem naukowych kontrowersji z uwagi na złożoną naturę współzależności β -kateniny z E-kadheryną na polu adhezji komórkowej oraz wielotorową regulację jej aktywności na drodze „molekularnego dialogu” z innymi szlakami transdukcji sygnału [133].

4.6.VI. E-kadheryna

E-kadheryna, tzw. nabłonkowa, klasyczna kadheryna typu I, należy do rodziny zależnych od jonów wapnia adhezyjnych glikoprotein. Jest odpowiedzialna za tworzenie i stabilizację połączeń międzykomórkowych na drodze interakcji z homotypowymi kadherynami sąsiadujących komórek nabłonkowych oraz wywiera wpływ na komórkową zdolność migracji [134]. Domena wewnątrzkomórkowa E-kadheryny wiąże się z kateninami komórkowymi (β -kateniną, α -kateniną i plakoglobiną), a za jej pośrednictwem z filamentami aktynowymi cytoszkieletu, a zjawisko to modulowane jest w procesie fosforylacji zależnym od kinazy tyrozynowej [135]. Wykazano, że utrata lub obniżenie ekspresji E-kadheryny, w skojarzeniu z utratą lub obniżeniem ekspresji β -kateniny, jest jednym z mechanizmów indukcyjopotencjału metastatycznego nowotworów [136], a klinicznie stanowi negatywny czynnik prognostyczny, m.in. w raku przełyku, żołądka, jelita grubego, wątroby i trzustki [137-141]. W ostatnio opublikowanych doniesieniach potwierdzono także w NDRP związek obniżonej ekspresji E-kadheryny z wysokim stopniem złośliwości histologicznej, agresywną inwazją miejscową nowotworu, występowaniem przerzutów węzłowych i odległych, a także krótszym całkowitym czasem przeżycia chorych [142-145]. W analizie immunohistochemicznej Choi i wsp. wykazali znamienne obniżenie ekspresji E-kadheryny w komórkach płaskonabłonkowego raka płuca w porównaniu z gruczolakorakiem płuca [146].

4.6.VII. Inhibitory szlaku transdukcji sygnału zależnego od Wnt

W niedrobnokomórkowym raku płuca najczęściej dochodzi do „wyciszenia” poprzez metylację wysp CpG promotora genu antagonisty ścieżki sygnałowej Wnt – WIF-1 (*ang. Wnt inhibitory factor 1*), który hamuje wzrost komórek [147].

Licchesi i wsp. wykazali hipermetylację promotorów genów kilku antagonistów szlaku Wnt w gruczolowym raku płuca [148]. Fukui i wsp. potwierdzili metylację *SFRP1* (*ang. secreted frizzled related protein 1*) w 55% przypadków analizowanych NDRP [149]. Mazieres i wsp. w podjętych badaniach wykazali obniżenie ekspresji WIF-1, co w 83% przypadków wykazywało związek z metylacją promotora, a klinicznie wiązało się z obecnością wysięku opłucnowego [150-152]. Forget i wsp. wykazali ekspresję antagonisty Wnt – DKK-1 (*ang. Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor 1*) w 48% przypadków analizowanych NDRP [153], natomiast zespół badawczy Sheng wykazał związek obniżonego stężenia DKK-1 w surowicy z agresywnym przebiegiem klinicznym raka płuca i znamienne krótszym całkowitym czasem przeżycia chorych [154]. W odniesieniu do antagonisty DKK-3 wykazano obniżenie ekspresji jego mRNA w 63% przypadków NDRP [155], natomiast metylacja jego promotora okazała się ujemnym czynnikiem rokowniczym [156]. Mutacje w regionie MCR genu *APC* wykrywa się jedynie w 4% NDRP [99], natomiast obecność metylacji promotora genu *APC*, wykryto w ok. 95% pierwotnych nowotworów płuca [157,158]. Tang i wsp. wykazali, że do metylacji promotora genu *APC* dochodzi znamienne częściej w genomie pierwotnych gruczolowych nowotworów płuca w porównaniu z ogniskami przerzutowymi, w przeciwieństwie do metylacji *SFRP1* i *WIF-1*, które występują znamienne częściej w genomie zmian przerzutowych [159]. Zespół badawczy Xu potwierdził, że ekspresja aksyny, charakterystyczna dla nowotworów dobrze zróżnicowanych, wykazuje odwrotny związek z ekspresją TCF-4 [132]. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu Pro50Ser w sekwencji kodującej genu *aksyny 2*, jak wnioskują w swojej pracy Kanzaki i wsp., stanowi czynnik ryzyka zachorowania na raka płuca w populacji japońskiej [160]. Dehan i wsp. analizując aberracje chromosomowe oraz profile ekspresji genów wykazali w NDRP obniżoną ekspresję antagonistów szlaku Wnt – WIF-1, CTNNBIP1 i WISP2, oraz towarzyszącą wysoką ekspresję agonistów tego szlaku – LEF1 i Ruvb11 [161].

4.7. Wpływ szlaku przekazywania sygnału zależnego od Wnt na rozwój oporności na leczenie

W badaniach *in vitro* przeprowadzonych przez zespół Chena udowodniono, że komórki nowotworowe wykazujące ekspresję Wnt1 były odporne na apoptozę indukowaną leczeniem cytostatykami [162]. Aktywacja szlaku transdukcji sygnału zależnego od Wnt1 hamowała uwalnianie cytochromu c oraz aktywację kaspazy 9, indukowane przez takie cytostatyki, jak winkrystyna i winblastyna, co prowadziło do znaczącego zmniejszenia ich skuteczności. Zjawisko nieśmiertelności komórek nowotworowych modulowane przez Wnt1 zależne było od aktywacji transkrypcji przez kompleks β -katenina/TCF, a jego hamowanie uwrażliwiało komórki na bodźce proapoptotyczne [162]. Aktywacja przekazywania sygnału szlakiem Wnt indukuje transkrypcję genów kodujących białka związane z rozwojem oporności na leczenie – MDR-1 (*ang. multidrug resistance protein 1*), surwiwiny oraz liwiny [163,164]. Gao i wsp. wykazali oporność na cisplatynę komórek linii A549 NDRP [165,166], natomiast zastosowanie antagonisty Wnt - EMX2 przywracało wrażliwość na cytostatyki [167]. Ekspozycja klonu komórkowego A549 na inhibitor ścieżki Wnt – GDK-100017 prowadziła do zahamowania transkrypcji genów zależnych od kompleksu β -katenina/TCF oraz proliferacji komórek, jednocześnie stymulując wrażliwość na promieniowanie jonizujące [168], natomiast na antagonistę Wnt – ING4 – nasilała zarówno wrażliwość na cytostatyki, jak i promieniowanie jonizujące [169].

4.8. Składowe szlaku przekazywania sygnału zależnego od Wnt jako cele terapii ukierunkowanych molekularnie

Potencjalne leki celowane hamujące aktywację szlaku Wnt w komórkach nowotworowych (jak np. w dziedzicznym raku jelita) z założenia powinny oddziaływać we wnętrzu komórki i na poziomie molekularnych efektorów β -kateniny. Interwencje terapeutyczne w przypadku nowotworów, w których dochodzi do zaburzenia przekazywania sygnału zależnego od Wnt w innym mechanizmie (jak w przypadku np. raka płuca) powinny oddziaływać również pozakomórkowo interferując w oddziaływanie ligand-receptor. Zahamowanie inhibitorami Wnt potencjału proliferacyjnego komórek macierzystych mogłoby

znaleźć zastosowanie praktyczne w leczeniu uzupełniającym lub po wykorzystaniu standardowych metod leczenia radykalnego.

Nadzieje na sukces terapeutyczny rodzi koncepcja syntezy leku celowanego, który hamowałby tworzenie kompleksu β -katenina-Tcf. Wyzwaniem jest spełnienie warunku wysokiej selektywności leku, który nie powinien zaburzać interakcji β -kateniny z innymi czynnikami (APC, kadheryną i aksyną), wykazującymi wspólne miejsce wiązania z kompleksem Tcf.

Jak wspomniano powyżej, hamowanie Wnt1 [97,101], Wnt2 [102], Wnt5a [117], FZD-8 [170], Dvl-1, -2 i -3 [123] oraz aktywacja inhibitorów szlaku Wnt – Wnt7a [121], aksyny [171], WIF-1 [172], DACT2 [173], ING4, EMX2 i Dkk-3 [174] jest związane z korzystnym efektem terapeutycznym w eksperymentach na liniach komórkowych NDRP oraz w modelach zwierzęcych. W I fazie badań klinicznych znajdują się następujące inhibitory omawianego szlaku:

- OMP-18R5 – przeciwciało monoklonalne przeciwko receptorom FZD [175],
- OMP-54F28 – humanizowana immunoglobulina sekwestrująca ligandy Wnt [176],
- PRI-724 – drobnocząsteczkowy inhibitor wiązania β -kateniny z białkiem CREBbp [177].

W badaniach przedklinicznych analizuje się ponadto inhibitory interakcji β -katenina/Tcf [178] i kinazy kazeinowej 1 α [179].

Atrakcyjną przestrzenią dalszych badań pozostają substancje demetylujące, które potencjalnie promować mogą nasiloną ekspresję inhibitorów szlaku Wnt, m.in. WIF-1 i DACT2. Przykładem jest decytabina, która wykazała w badaniu I/II fazy aktywność terapeutyczną w zaawansowanym raku płuca [180].

Poważnym ograniczeniem projektowania użytecznych terapii celowanych hamujących aktywność szlaku transdukcji sygnału zależnego od Wnt jest brak zdefiniowanych biomarkerów predykcyjnych.

Podsumowując, podwyższony poziom białek Wnt wraz z obniżoną ekspresją regulatorów tego szlaku prowadzą do inicjacji i promocji raka płuca w modelach przedklinicznych. Uzasadnia to podejmowanie dalszych wysiłków w celu szczegółowego poznania molekularnej natury tego szlaku i jego roli w kancerogenezie. Selektywne hamowanie wybranych białek tej kaskady sygnału wydaje się być obiecującym celem dla ukierunkowanych molekularnie strategii leczenia raka płuca, ponadto uzasadnione wydaje się zweryfikowanie ich prognostycznego i predykcyjnego znaczenia.

5. Metodologia badań immunohistochemicznych

Immunohistochemia (IHC) łączy morfologiczne, immunologiczne i biochemiczne techniki w celu detekcji poszczególnych białek w tkankach i pojedynczych komórkach, wykorzystując mechanizm reakcji antygenu ze swoistym przeciwciałem. Aktualnie znajduje ona przede wszystkim zastosowanie w diagnostyce patomorfologicznej chorób nowotworowych, a także w ocenie skuteczności nowych leków oraz w badaniach naukowych.

Historia metody rozpoczęła się w 1942 roku, kiedy Coons i współpracownicy po raz pierwszy wykorzystali reakcje immunohistochemiczne, używając przeciwciał znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (*ang. fluorescein isothiocyanate*, FITC) do wykrycia antygenów pneumokoka w zainfekowanej tkance. Od tego czasu metoda podlegała nieustannej, technicznej ewolucji, której nadrzędnym celem była poprawa jej czułości. W latach 70-tych ubiegłego stulecia Taylor, Mason i współpracownicy zastosowali enzymatyczną technikę „immunoperoksydazy”, co uczyniło z immunohistochemii metodę diagnostyczną rutynowo stosowaną w anatomii patologicznej [181]. Początkowo do wykrywania antygenów wykorzystywano przeciwciała poliklonalne, których część zmienna zbudowana jest z różnych epitopów skierowanych przeciwko jednemu antygenowi, następnie w 1975 roku Köhler i Milstein opracowali metodę syntezy tzw. *hybrydoma* (fuzja limfocytu B produkującego przeciwciała z komórką szpiczaka mnogiego) do produkcji przeciwciał monoklonalnych, skierowanych selektywnie przeciwko jednemu epitopowi danego antygeny, co znacząco poprawiło specyficzność i jakość oznaczeń [181]. Udoskonalano systemy detekcji antygenów w mechanizmach bezpośrednich, a następnie pośrednich. Wprowadzono systematyczną automatyzację metody. W 1991 roku Shi i współpracownicy wprowadzili technikę odsłaniania epitopu w wysokiej temperaturze (95-120°C) w procesie podgrzewania skrawków tkankowych w roztworach wodnych lub zbuforowanych roztworach cytrynianu lub EDTA (*ang. heat-induced epitope retrieval*, HIER) [181]. Wynik oznaczeń immunohistochemicznych definiowany jest jakościowo lub półilościowo.

Pierwszym etapem reakcji immunohistochemicznej jest utrwalenie materiału tkankowego w 10% zbuforowanej formalinie, co potencjalnie indukuje zmiany w 3- i 4-rzędowej strukturze białek, zachowuje natomiast morfologiczny charakter tkanki oraz ekspresję determinant antygenowych. Utrwalony materiał tkankowy kroi się na skrawki o

grubości 3-4µm i umieszcza na szkiełkach. W celu odśłonięcia antygenu stosuje się enzymatyczną degradację, najczęściej poprzez ekspozycję na trypsynę lub proteazę (ang. *proteolytic-induced epitope retrieval*, PIER) lub wyżej wspomnianą metodę HIER [182].

Kluczowym etapem reakcji immunohistochemicznej jest oddziaływanie antygen-przeciwciała. W metodzie bezpośredniej znakowane (zwykle biotyną) przeciwciała jest bezpośrednio umieszczane na skrawku materiału tkankowego. Następnie biotyna wiąże się z awidyną lub streptawidyną, co dodatkowo amplifikuje intensywność odczynu barwnego i poprawia czułość metody. W metodzie pośredniej przeciwciała pierwotne, wykazujące powinowactwo do antygeny, nie jest znakowane, a na początkowym etapie reakcji wiąże się ze znakowanym biotyną przeciwciałem wtórnym [181]. Wykorzystanie metody immunohistochemii pośredniej zapewnia wszechstronność i wielofunkcyjność poprzez możliwość wykorzystania szerokiego spektrum nieznakowanych przeciwciał.

Ostatnim etapem reakcji immunohistochemicznej jest enzymatyczna wizualizacja odczynu barwnego. W przeszłości do wykrycia kompleksu antygen-przeciwciała wykorzystywano znaczniki radioaktywne. Aktualnie efekt barwny uzyskuje się poprzez wiązanie przeciwciała z enzymem. W reakcjach immunoenzymatycznych stosuje się enzymy, które reagują z bezbarwnymi chromogenami, dając barwne produkty. Najpowszechniej stosowanym enzymem jest wyizolowana z korzenia chrzanu pospolitego (*Cochlearia armoracia*) peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxidase*, HRP), która katalizuje reakcję utleniania chromogenu – 3,3'-diaminobenzyny (DAB) w obecności nadtlenu wodoru, czego efektem jest powstanie brązowo zabarwionego, nierozpuszczalnego produktu [181].

Znaczącym ograniczeniem metody jest obecność endogennej biotyny w tkankach, która może wywoływać fałszywie dodatnie odczyny barwne. Celem poprawy specyficzności metody wprowadza się do praktyki laboratoryjnej systemy polimerowe (np. *EnVision* DAKO), w których enzymy i przeciwciała połączone są z dekstranowym szkieletem [183].

Istotnym aspektem efektywnego wykorzystywania metody immunohistochemii jest kontrola jakości, zapewniająca pożądaną czułość i swoistość oraz powtarzalność i standaryzację tej metody. Technika immunohistochemiczna jest obecnie podstawowym narzędziem badań diagnostycznych, prognostycznych i predykcyjnych w onkologii.

6. Technika mikromacierzy tkankowych

Zastosowanie techniki mikromacierzy tkankowych (*ang. tissue microarray, TMA*) umożliwia szybką i efektywną kosztowo analizę wielu diagnostycznych i prognostycznych markerów w licznych próbkach materiału tkankowego.

W 1986 roku Hector Battifora jako pierwszy opisał metodę opracowania „kiełbaskowego” bloku parafinowego, w którym cylindryczny fragment badanego materiału tkankowego o średnicy 1mm, otoczony warstwą jelita cienkiego, zatapiany był w parafinie [184]. Metodę zmodyfikowano w 1990 roku wprowadzając konfigurację szachownicy [185]. Umożliwiło to efektywne, jednoczesne analizowanie wielu próbek tkankowych, ale trudności w precyzyjnej identyfikacji poszczególnych cylindrów utrudniały interpretację wyników.

Niemal dekadę później, w 1998 roku Kononen i wsp. opracowali aktualnie stosowaną technikę konstrukcji mikromacierzy tkankowych (TMA) przy użyciu urządzenia dedykowanego do precyzyjnego wycinania cylindrów tkankowych [186]. Przygotowanie mikromacierzy tkankowej rozpoczyna się od wybrania reprezentatywnego bloku parafinowego z materiałem tkankowym – tzw. bloku „donora”. Zaleca się ponadto uzyskanie skrawka materiału z danego bloku celem barwienia hematoksyliną i eozyną (H+E), który patolog wykorzystuje do precyzyjnej lokalizacji obszaru tkanki nowotworowej w obrębie analizowanego materiału. Dostępne są igły do nakłuwania bloku donora o średnicy od 0,6 do 2 mm. Cylinder tkankowy wycięty mechanicznie, manualnie lub automatycznie, z bloku donora zostaje następnie umieszczony w przygotowanym obszarze pustego bloku parafinowego – tzw. bloku „biorcy” [187,188]. Na platformie pojedynczej mikromacierzy można zdeponować do 1000 cylindrów tkankowych. Bezwzględnie konieczne jest przygotowanie mapy mikromacierzy, z ustalonym rozmieszczeniem znaczników (np. umieszczone w skrajnym położeniu cylindry miększu wątroby) i podaniem współrzędnych lokalizacji poszczególnych cylindrów badanej tkanki w układzie współrzędnych X-Y, co pozwala na precyzyjne odczytanie wyników analiz dla poszczególnych cylindrów. Urządzenie zwane mikrotomem służy do skrojenia tak przygotowanego bloku biorcy na skrawki, które będą poddawane dalszej analizie. Z pojedynczej mikromacierzy, zawierającej 1000 cylindrów tkankowych, można uzyskać 200 seryjnych skrawków, otrzymując tym sposobem 200 000 próbek do analizy.

Większość tworzonych aktualnie mikromacierzy wykorzystywanych jest do przeprowadzania badań immunohistochemicznych, pozostałe w technikach hybrydyzacji *in situ*, głównie za pomocą metody FISH. Technika znajduje zastosowanie głównie w patologii

onkologicznej. Podczas przeprowadzania pojedynczego eksperymentu umożliwia jednocześnie analizowanie próbek odrębnych nowotworów, pochodzących od wielu chorych.

Zastosowanie techniki mikromacierzy tkankowych w porównaniu z klasycznymi metodami analiz tkankowych niesie wiele korzyści praktycznych. Technika TMA pozwala na jednoczasową analizę licznych próbek tkankowych, co znacząco podwyższa wydajność zbierania danych. Analiza całej kohorty przypadków umożliwia ocenę nowego markera podczas jednego eksperymentu, co eliminuje wpływ potencjalnych błędów przy powtarzaniu barwienia. Cylindry tkankowe, umieszczone na jednej mikromacierzy, poddawane są obróbce w jednakowych warunkach (m.in. czas i temperatura inkubacji), co zapewnia wysoki poziom standaryzacji. Ponadto obecność pozytywnej i negatywnej kontroli, ujednolicenie procedur samego barwienia, a także oglądania i interpretacji wyników barwień stanowi gwarancję wiarygodnej kontroli jakości techniki TMA. Omawiana metoda wymaga niskich stężeń odczynników i zdecydowanie mniejszego nakładu pracy personelu, co czyni ją wyjątkowo efektywną kosztowo. Dodatkową korzyść stanowi zredukowane do minimum ryzyko destrukcji pierwotnego materiału histopatologicznego. Liczba skrawków uzyskanych standardowymi metodami z archiwalnego bloku parafinowego wynosi 50-100. W technice TMA natomiast ten sam blok bioptujemy otrzymując 200-300 cylindrów tkankowych, z których uzyskujemy ok. 1000 skrawków, co generuje materiał do kilkudziesięciu – kilkuset tysięcy oznaczeń. Technika TMA pozwala na ocenę wielu parametrów molekularnych w tym samym materiale badanym i umożliwia analizę ich związku z cechami klinicznymi nowotworów. Ryzyko utraty cylindrów w trakcie obróbki technicznej materiału jest niskie i ocenia się je na <5%. Po dłuższym okresie przechowywania TMA nie obserwowano utraty immunoreaktywności próbek, co potencjalnie mogłoby prowadzić do uzyskania fałszywie ujemnych wyników barwień. Poddawanie analizie statystycznej setek lub tysięcy próbek eliminuje ryzyko zaburzenia wyniku przez błędną interpretację pojedynczej próbki i ułatwia wnioskowanie. Zarówno wycinki tkankowe, jak i linie komórkowe mogą zostać wykorzystane do konstrukcji mikromacierzy, co umożliwia półilościową analizę ekspresji badanych genów lub białek.

Istotne ograniczenie techniki stanowi mała średnica cylindra tkankowego, który może nie być reprezentatywny dla całego, potencjalnie heterogennego guza nowotworowego. W przeprowadzonych nad tym zagadnieniem badaniach wykazano, że pobranie 3-4 cylindrów tkankowych z bloku donora kompensuje ryzyko związane z heterogennością nowotworów i obrazuje profil całej tkanki.

Liczne dane z piśmiennictwa podkreślają wiarygodność metody TMA oraz zgodność jej wyników ze standardowymi technikami histopatologicznymi w ocenie ryzyka progresji choroby i oceny rokowania chorych [187]. Technika mikromacierzy tkankowych ugruntowała swoją pozycję na polu nauk podstawowych, patologii i genetyki nowotworów. Dalsza ewolucja tej metody (postępująca automatyzacja, technologia cyfrowej analizy obrazu – wirtualne slajdy skanowanych mikromacierzy) oraz jej upowszechnienie przyspieszą implementację osiągnięć nauk podstawowych w praktyce klinicznej.

CELE PRACY

1. Analiza immunohistochemiczna ekspresji białek Wnt1, Wnt2, β -kateniny oraz E-kadheryny w niedrobnokomórkowym raku płuca w populacji kaukaskiej.
2. Analiza związku pomiędzy poziomem białek Wnt1, Wnt2, β -kateniny oraz E-kadheryny w niedrobnokomórkowym raku płuca a wybranymi cechami klinicznymi i patologicznymi badanej grupy chorych.
3. Ocena rokowniczego znaczenia białek Wnt1, Wnt2, β -kateniny oraz E-kadheryny w niedrobnokomórkowym raku płuca.

MATERIAŁ I METODY

1. Opis badanej grupy

Po uzyskaniu pozytywnej opinii Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed), badanie przeprowadzono wykorzystując archiwalny materiał tkankowy Katedry i Zakładu Patomorfologii pochodzący od 208 chorych poddanych radykalnej resekcji mięszu płucnego z powodu niedrobnokomórkowego raka płuca w latach 2005-2008 w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku.

Średnia wieku chorych włączonych do analizy wyniosła 62 lata (zakres: 40,6-80,5). W grupie badanej większość (140 chorych, 67,3%) stanowili mężczyźni.

Najczęstszym zabiegiem operacyjnym była lobektomia (148 chorych, 71,2%). U 35 chorych (16,8%) przeprowadzono pneumonektomię. Bilobektomię wykonano u 13 chorych (6,3%), segmentektomię – u 8 (3,8%), resekcję klinową – u 2 (1%) oraz lobektomię mankietową – również u 2 osób (1%). U wszystkich chorych przeprowadzono wycięcie węzłów chłonnych śródpiersia. Czterech chorych (1,9%) poddano indukcyjnej chemioterapii. 10 chorych (4,8%) otrzymało uzupełniającą chemioterapię, natomiast tylko 1 chory (0,5%) poddany był pooperacyjnej radioterapii.

Mediana czasu obserwacji, definiowanego jako czas od daty zabiegu operacyjnego do daty ostatniej wizyty kontrolnej lub daty zgonu, wyniosła 68 miesięcy (zakres: 0,2-117,5 miesiąca). U większości analizowanych chorych nie doszło do nawrotu choroby (115 chorych, 55,3%). Wznowę miejscową obserwowano u 30 chorych (14,4%), wznowę regionalną w węzłach chłonnych śródpiersia – u 26 (12,5%), natomiast wznowę regionalną w węzłach chłonnych nadobojczykowych jedynie u 4 chorych (1,9%). U 34 chorych (16,3%) stwierdzono przerzuty odległe. U 14 (6,7%) doszło do uogólnienia choroby z towarzyszącym nawrotem miejscowo-regionalnym. Przerzuty odległe najczęściej zlokalizowane były w mózgowiu (30 chorych, 14,4%), kośćcu (16 chorych, 7,7%) oraz wątrobie (6 chorych, 2,9%). W analizowanej grupie odnotowano 82 zgony (39,4%). U 23 obserwowanych chorych (11,1%) nie udało się ustalić stanu choroby.

Najczęstszą lokalizacją nowotworu były: płąt górny prawy (63 chorych, 30,3%) i płąt górny lewy (57 chorych, 27,4%). W analizowanej grupie nieznacznie przeważali chorzy

z rozpoznaniem histopatologicznym płaskonabłonkowego raka płuca (108, 52,4%), rozpoznanie raka gruczołowego stwierdzono u 97 chorych (46,6%). Najczęstszymi podtypami gruczolaka były: podtyp zrazikowy (53 chorych, 25,5%) i lity (21 chorych, 10,1%). Do grupy badanej włączono ponadto 3 chorych (1,4%) z rozpoznaniem wielkomórkowego raka płuca. Większość rozpoznawanych nowotworów stanowiły raki o pośrednim (G2) stopniu złośliwości histologicznej (140 chorych, 67,3%). W analizowanej grupie przeważali chorzy z nowotworem we wczesnym stopniu zaawansowania klinicznego, ocenianym wg 7 edycji klasyfikacji TNM Międzynarodowej Unii do Walki z Rakiem (UICC) i Amerykańskiego Wspólnego Komitetu Raka (AJCC): stopień IA – 38 chorych (18,3%), stopień IB – 58 chorych (27,9%) oraz stopień IIA – 45 chorych (21,6%); z cechą T2 (121 chorych, 58%), bez przerzutów w węzłach chłonnych śródpiersia (127 chorych, 61,1%). Stopień zaawansowania klinicznego nowotworów ustalono na podstawie bronchoskopii, badań obrazowych – badania tomograficznego klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz procedur inwazyjnych oceniających stan regionalnych węzłów chłonnych – ultrasonografii wewnątrzoskrzelowej (EBUS) i/lub mediastinoskopii. W analizowanym okresie do oceny stopnia zaawansowania klinicznego raka płuca badanie pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) nie było powszechnie dostępne.

W tabeli nr 1 przedstawiono charakterystykę kliniczną analizowanych chorych, w tabeli nr 2 przedstawiono natomiast charakterystykę histopatologiczną analizowanych niedrobnokomórkowych raków płuca.

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna analizowanych chorych.

Cecha	Liczba chorych (n)	Odsetek chorych (%)
Wiek		
<60r.ż.	81	38,9
>60r.ż.	127	61,1
Płeć		
kobiety	68	32,7
mężczyźni	140	67,3
Status palenia tytoniu		
palący	129	62,0
niepalący	79	38,0
Nawrót		
bez nawrotu	115	55,3
nawrót obecny	70	33,6
brak danych	23	11,1
Lokalizacja nawrotu		
miejscowy	30	14,4
węzły chłonne śródpiersia	26	12,5
węzły chłonne nadobojczykowe	4	1,9
mózgowie	30	14,4
układ kostny	16	7,7
wątroba	6	2,9
skóra	3	1,4
nadnercza	2	0,1
Przeżycie		
żyjący	115	55,3
zgon	82	39,4
brak danych	11	5,3

Tabela 2. Charakterystyka histopatologiczna analizowanych niedrobnokomórkowych raków płuca.

Cecha histopatologiczna	Liczbachorych (n)	Odsetekchorych (n)
Typ histologiczny oraz stopień zróżnicowania histologicznego wg WHO (2004)		
Rak płaskonabłonkowy	108	51,9
1. stopień zróżnicowania histologicznego (G1)	0	0,0
2. stopień zróżnicowania histologicznego (G2)	77	37,0
3. stopień zróżnicowania histologicznego (G3)	31	14,9
Rak gruczołowy	97	46,6
1. stopień zróżnicowania histologicznego (G1)	11	5,3
2. stopień zróżnicowania histologicznego (G2)	61	29,3
3. stopień zróżnicowania histologicznego (G3)	25	46,6
Rak wielkokomórkowy	3	1,4
1. stopień zróżnicowania histologicznego (G1)	0	0,0
2. stopień zróżnicowania histologicznego (G2)	2	1,0
3. stopień zróżnicowania histologicznego (G3)	1	0,5
TNM (7 wydanie)		
T1a	20	9,6
T1b	32	15,4
T2a	83	39,9
T2b	38	18,3
T3	34	16,3
T4	1	0,5
N0	127	61,1
N1	48	23,1
N2	31	14,9
N3	0	0,0
Nx	2	1,0
Stopień zaawansowania patologicznego		
IA	38	18,3
IB	58	27,9
IIA	45	21,6
IIB	28	13,5
IIIA	39	18,8
IIIB	0	0,0
IV	0	0,0

Radykalność resekcji		
R0	197	94,7
R1	9	4,3
R2	2	1,0

2. Opracowanie materiału tkankowego

Do analizy wykorzystano wycinki z guza pierwotnego pochodzące z materiału pooperacyjnego, które zostały standardowo utrwalone w 10% zbuforowanej formalinie (przez ok. 24 godziny), a następnie poddane dehydratacji w odpowiednio wzrastających stężeniach alkoholu etylowego i ksylenu. Ostatecznie wycinki zatopiono w niskotopliwej parafinie w temperaturze 54-56°C, którą uformowano w kształt przestrzennych bloków. 416 bloków parafinowych (po 2 reprezentatywne od każdego z chorych) wykorzystano do konstrukcji mikromacierzy tkankowych przy użyciu aparatu Manual Tissue Arrayer MTA firmy Beecher. Z pierwotnych bloków (tzw. „donorów”) pobrano po 4 cylindry tkankowe o średnicy 0,6mm, zawierające reprezentatywne, bogatokomórkowe fragmenty guza pochodzące z różnych jego obszarów (wyznaczone po uprzedniej identyfikacji i weryfikacji przez doświadczonego patologa). Cylindry z analizowanego materiału tkankowego umieszczono we wtórnym bloku parafinowym (tzw. „biorcy”), średnio po ok. 240 cylindrów/blok. Dodatkowo na każdym bloku macierzy tkankowych, w ustalonej pozycji, umieszczono cylindry tkanki kontrolnej (mięśń wątroby), co miało posłużyć prawidłowej orientacji TMA. Przygotowano 12 bloków macierzy tkankowych (6 „bliźniaczych” zawierało podwojony materiał wszystkich analizowanych przypadków, a 6 kolejnych – podwójny zestaw cylindrów dla wszystkich przypadków, z wyłączeniem 17 przypadków, dla których dostępny był wyłącznie pojedynczy pierwotny blok parafinowy). Następnie TMA utrwalono zgrzewając w łaźni wodnej w temperaturze 40°C. Tak przygotowane bloki macierzy tkankowych skrojono przy użyciu mikrotomu na skrawki o grubości 4 µm, które umieszczono na szkiełkach podstawowych *FLEX IHC Microscope Slides* (DAKO), a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez noc. Do analizy wykorzystano szkiełka skrojone z 6 mikromacierzy tkankowych, zawierających materiał tkankowy 208 guzów nowotworowych. Sporządzono mapę TMA celem precyzyjnego odczytu wyników barwień.

3. Ocena immunoekspresji białka Wnt1, Wnt2, β -kateniny i E-kadheryny

3.1. Zastosowane przeciwciała pierwotne

Celem detekcji obecności białka Wnt1 w badanym materiale tkankowym zastosowano królicze przeciwciało poliklonalne anti-Wnt1 firmy Thermo Scientific Pierce (nr kat. #PA5-32641) w zalecanej rozcieńczeniu 1:100. Kontrolę pozytywną stanowiła tkanka raka piersi. Obserwowano cytoplazmatyczny wzorec odczynu barwnego.

Do oceny obecności białka Wnt2 w badanym materiale tkankowym zastosowano królicze przeciwciało monoklonalne anti-Wnt2 RabMab firmy Epitomics (nr kat. #3169-1, klon EPR3101[2]) w zalecanej rozcieńczeniu 1:350. Kontrolę pozytywną stanowił materiał zawierający komórki płuc ludzkiego płodu (SKBR-3). Obserwowano cytoplazmatyczny wzorec reakcji barwnej.

Celem określenia obecności β -kateniny w badanym materiale tkankowym zastosowano mysie przeciwciało monoklonalne przeciwko β -kateninie firmy Dako (nr kat. #M3539, klon β -katenina-1) w zalecanej rozcieńczeniu 1:200. Kontrolę pozytywną stanowiły wycinki raka gruczołowego jelita grubego. Odczyn komórkowy miał charakter głównie błonowy, silniej wyrażony przy brzegach sąsiadujących komórek. Oceniono ponadto odczyn jądrowy i rozlany odczyn cytoplazmatyczny.

Ocenę obecności E-kadheryny w badanym materiale tkankowym przeprowadzono wykorzystując mysie przeciwciało monoklonalne anti-E-kadheryna firmy Dako (nr kat. #IR059, klon NCH-38) w zalecanej rozcieńczeniu 1:100. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki nabłonkamigdałka podniebiennego. Odczyn komórkowy miał charakter błonowy i/lub cytoplazmatyczny.

3.2. Procedura barwień immunohistochemicznych

Procedurę pośredniego barwienia immunohistochemicznego z zastosowaniem powyższych przeciwciał przeprowadzono zgodnie ze standardowym protokołem dla zestawu detekcyjnego EnVision FLEX+ firmy Dako (nr kat. K8002) w następujących etapach:

1. Inkubacja szkiełek w suszarce w temperaturze 55-56°C przez 1 godzinę;
2. Deparafinizacja preparatów w szeregu ksilenów z naprzemiennym płukaniem w wodzie destylowanej przez 3 minuty w aparacie Dako PT Link;
3. Stopniowa rehydratacja preparatów w szeregu alkoholi o malejącym stężeniu (100%, 96%, 80%, 70%, 50%) z naprzemiennym płukaniem w wodzie destylowanej przez 3 minuty;
4. Odkrywanie epitopów antygenów metodą HIER w procesie podgrzewania w aparacie Dako PT Link (nr kat. PT100/PT101) w roztworze *EnVision FLEX Target Retrieval Solution* o pH=9 (nr kat. K8000/K8004) w temperaturze 97°C przez 20 minut; następnie chłodzenie do 65°C;
5. Umieszczanie preparatów w kominku Coplina i przepłukanie wodą destylowaną (2x), a następnie roztworem buforu fosforanowego (*ang. phosphate buffered solution, PBS*) przez ok. 60 minut w temperaturze pokojowej;
6. Umieszczenie preparatów w wilgotnej komorze i neutralizacja endogennej peroksydazy poprzez 5-10 minutową inkubację z roztworem 0,3% nadtlenku wodoru (200 µl);
7. Ekspozycja z przeciwciałem pierwotnym w temperaturze pokojowej przez 20 minut;
8. Ekspozycja z przeciwciałem wtórnym (Envision Rabbit/Mouse) w temperaturze pokojowej przez 20 minut;
9. Ekspozycja z chromogenem: 3,3'-diaminobenzydyną (DAB) w temperaturze pokojowej przez 3 minuty;
10. Zabarwienie preparatów hematoksyliną Mayera przez 5-10 minut w temperaturze pokojowej;
11. Stopniowa dehydratacja preparatów w szeregu alkoholi o rosnącym stężeniu (50%, 70%, 80%, 96%, 99%) oraz w szeregu ksilenów;
12. Zamknięcie preparatów pod szkiełkiem nakrywkowym bezwodnym roztworem Vecta Mount.

Przy użyciu mikroskopu optycznego OLYMPUS BX43 każdy z 4 cylindrów tkankowych, reprezentujących dany przypadek kliniczny, poddano indywidualnej ocenie reakcji barwnej na obecność białek: Wnt1, Wnt2, β -kateniny oraz E-kadheryny.

Interpretacja odczynów immunohistochemicznych:

- Wnt1: odczyn cytoplazmatyczny,
- Wnt2: odczyn cytoplazmatyczny,
- β -katenina: odczyn błonowy, jądrowy, rozlany cytoplazmatyczny,
- E-kadheryna: odczyn cytoplazmatyczny, błonowy.

Do oceny odczynów stosowano metodę półilościową, z wykorzystaniem wskaźnika H(*H-score*), uwzględniającą odsetek komórek z produktem reakcji barwnej, intensywność barwienia w skali 0-3 oraz jego dystrybucję w obrębie danego przypadku. Intensywność reakcji barwnej klasyfikowano w czterech kategoriach:

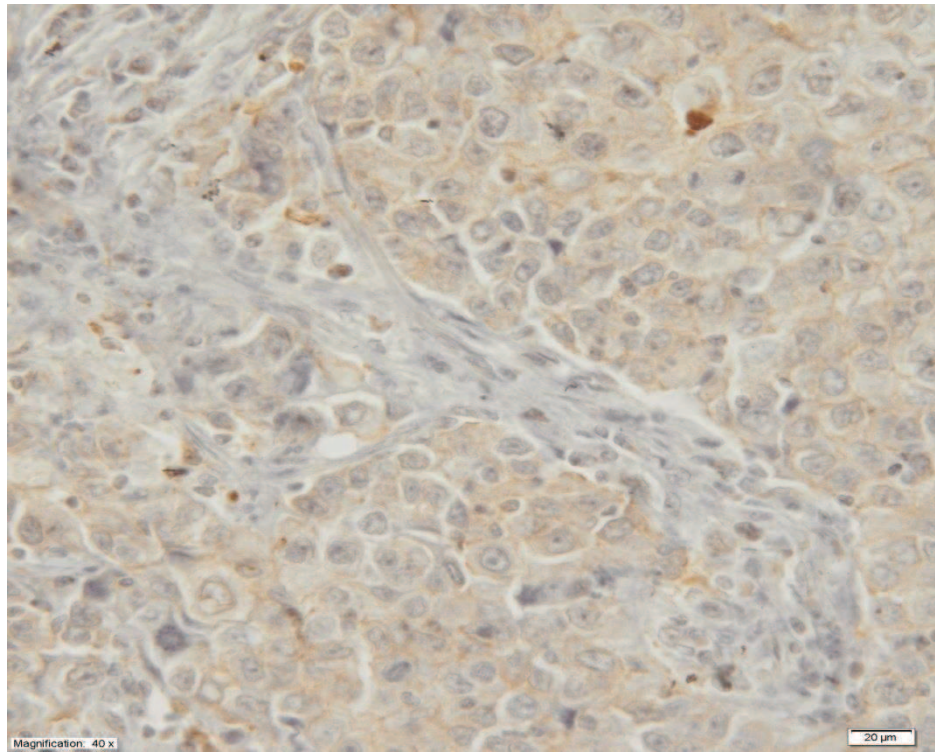
- 0 – brak odczynu,
- 1+ – słaby odczyn (jasnobrązowe wybarwienie obserwowane przy powiększeniu 20-40-krotnym),
- 2+ – średni odczyn (intensywność pomiędzy 1+ a 3+),
- 3+ – silny odczyn (ciemnobrązowe wybarwienie widziane już przy powiększeniu 5-krotnym).

Wartość wskaźnika H wyliczano mnożąc skategoryzowaną intensywność barwienia oraz określaną w procentach rozległość obszarów komórek z poszczególną reakcją barwną w odniesieniu do całej powierzchni analizowanego cylindra tkankowego wg wzoru:

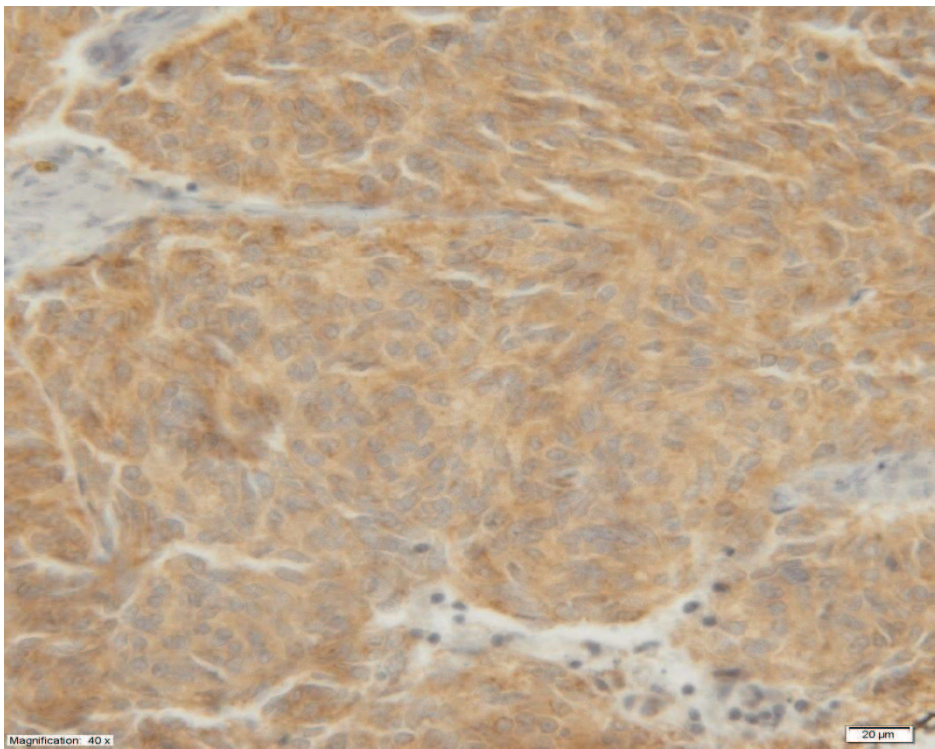
$$\text{Wskaźnik H} = [1 \times (\% \text{ komórek } 1+) + 2 \times (\% \text{ komórek } 2+) + 3 \times (\% \text{ komórek } 3+)]$$

Wynik *H-score* przyjmował wartość od 0 (przypadki bez potwierdzonego odczynu) do 300 (przypadki, w których 100% komórek wykazywało silny odczyn). Przypadek uznawano za pozytywny, jeśli wartość wskaźnika H była wyższa od mediany. W analizie statystycznej uwzględniono wartość maksymalną wskaźnika H z obliczonych wyników dla poszczególnych 4 cylindrów reprezentujących określony przypadek w mikromacierzy tkankowej.

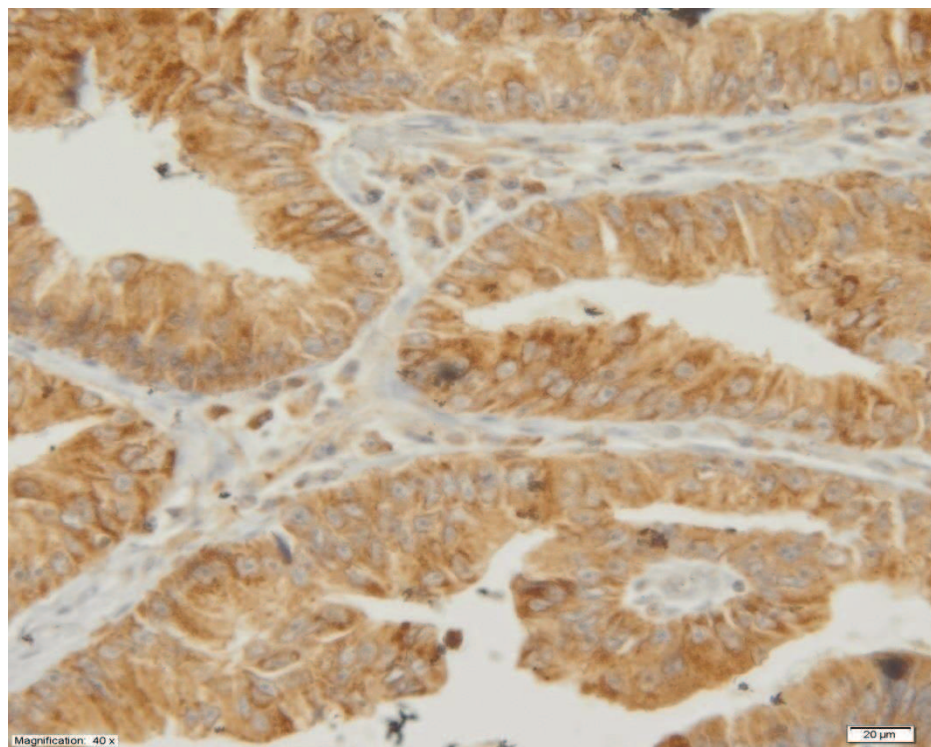
Ryciny nr 3-6 przedstawiają reprezentatywne zdjęcia przypadków wraz z wynikiem oceny reakcji barwnej wg powyższych kryteriów.



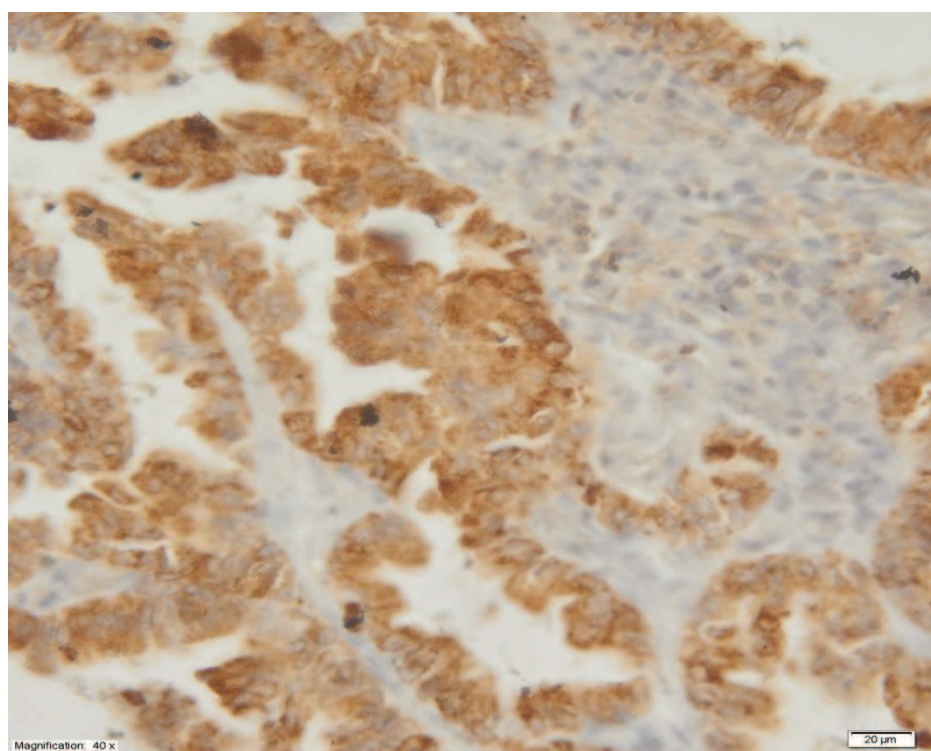
A



B



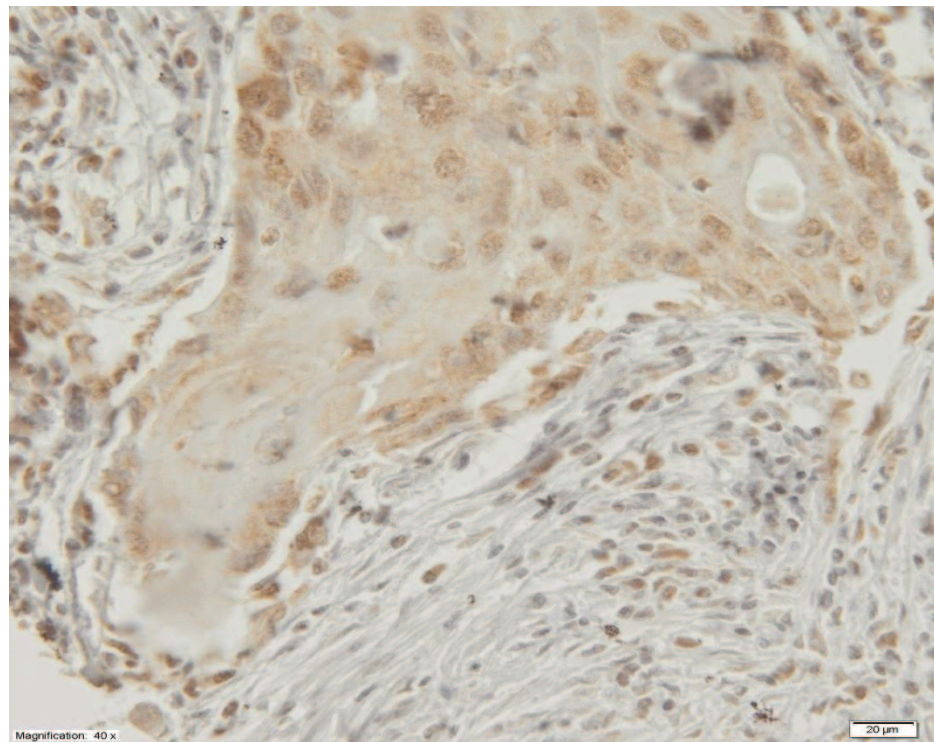
C



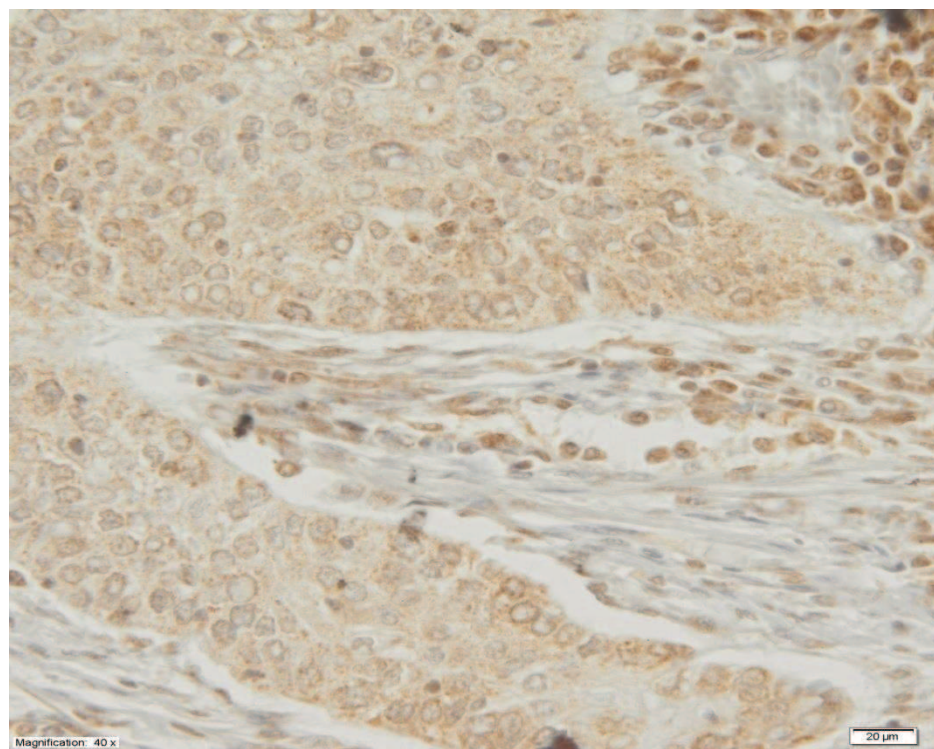
D

Rycina 3. Przykłady odczynów barwnych z przeciwciałem poliklonalnym anti-Wnt1 (x40).

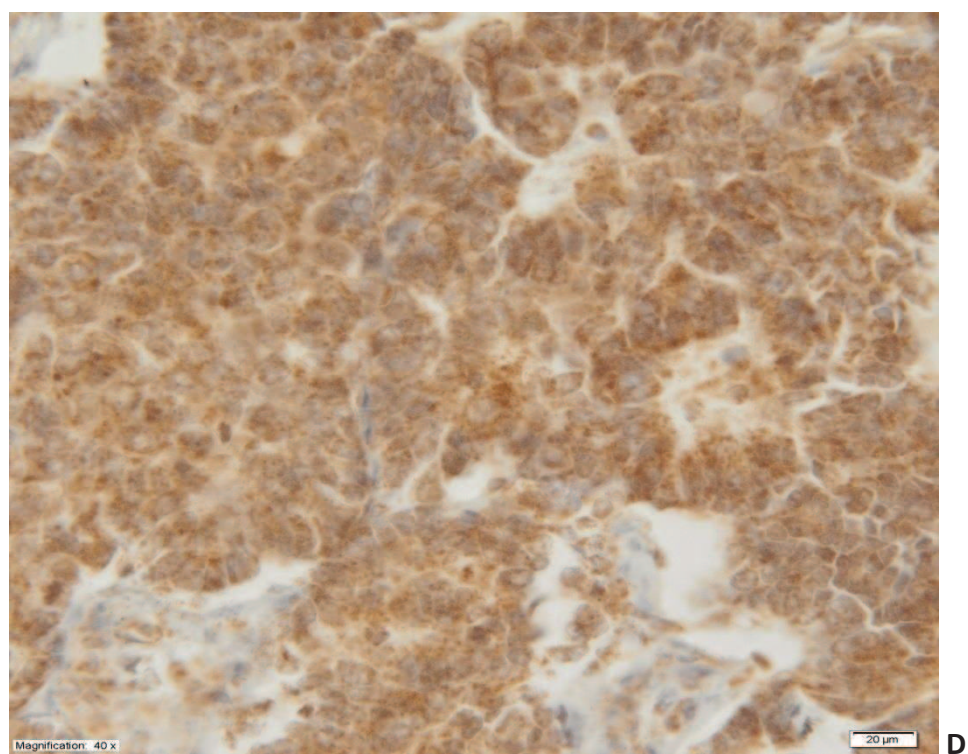
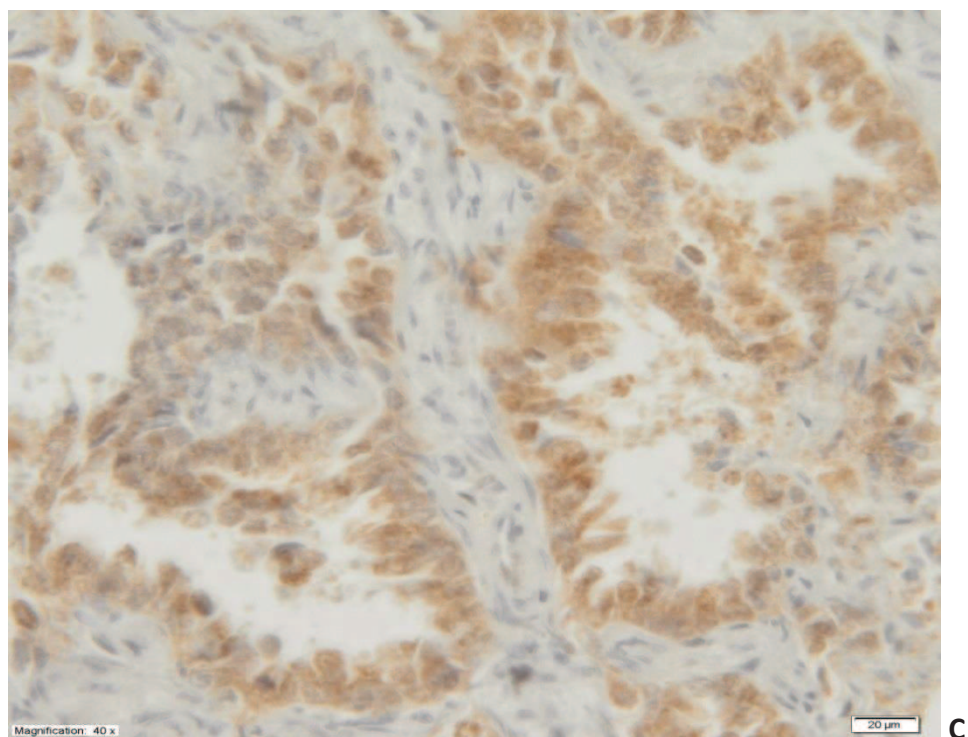
A – wskaźnik H=10; B – wskaźnik H=100; C – wskaźnik H=200; D – wskaźnik H=300



A

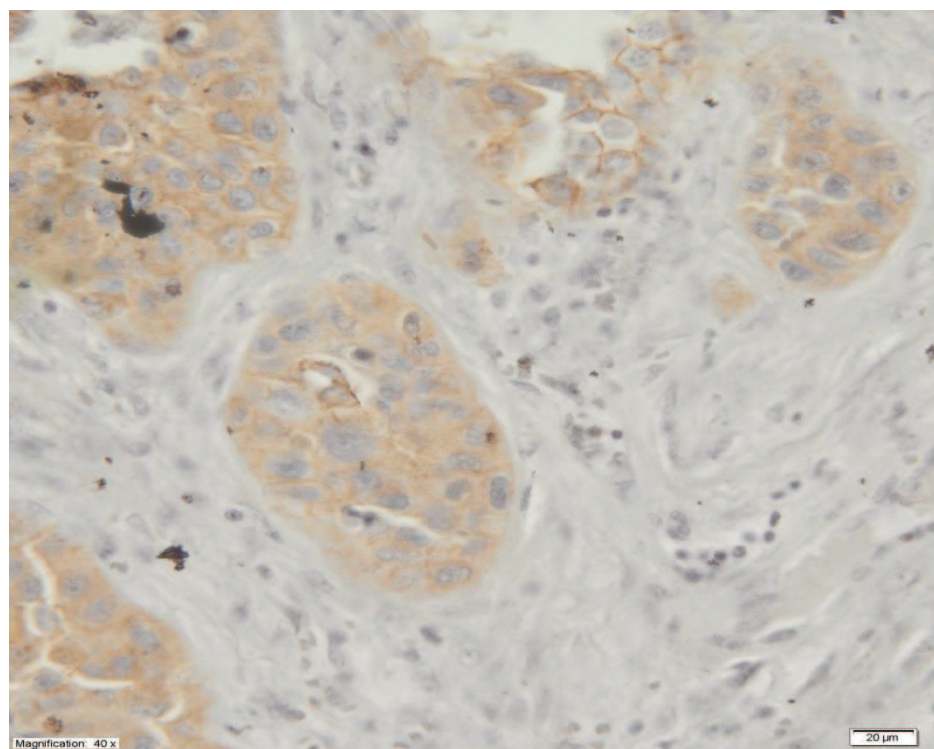


B

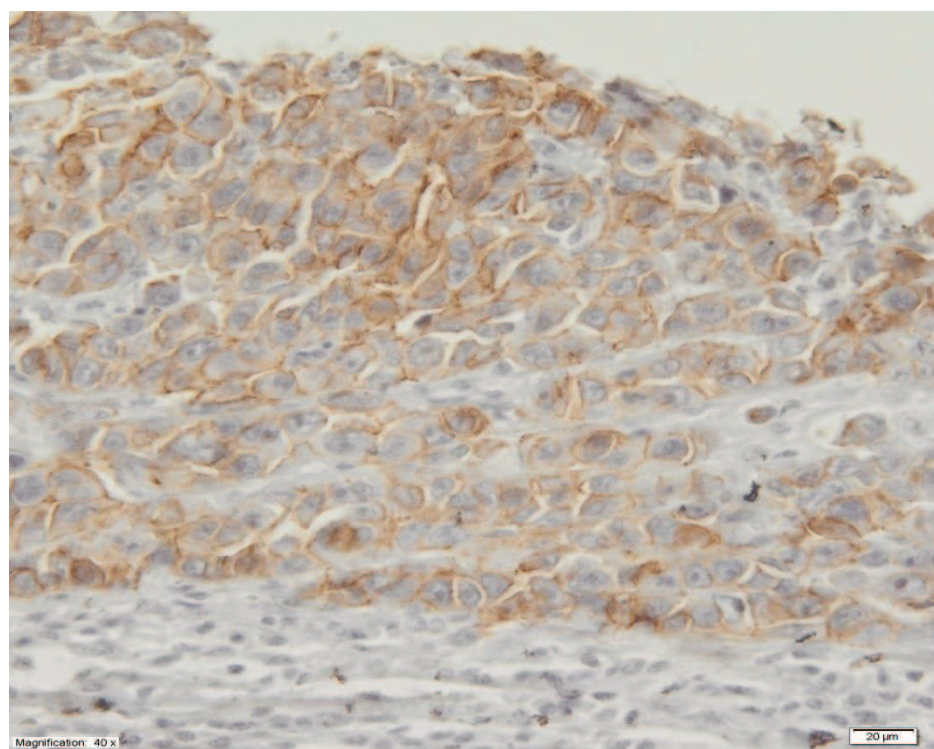


Rycina 4. Przykłady odczynów barwnych z przeciwciałem monoklonalnym anti-Wnt2 (x40).

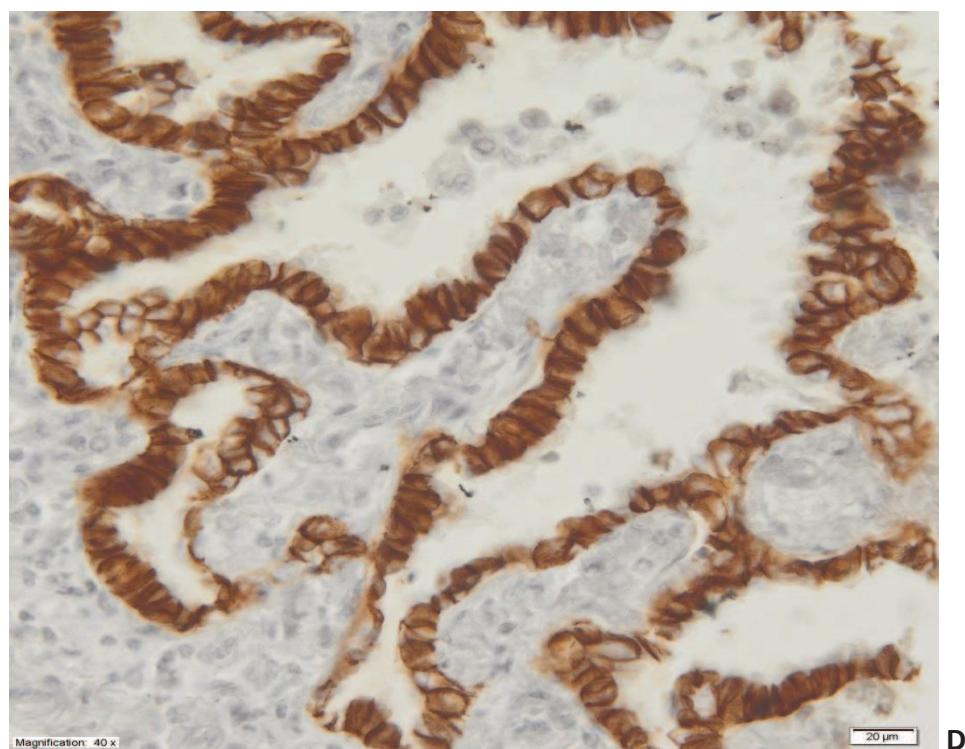
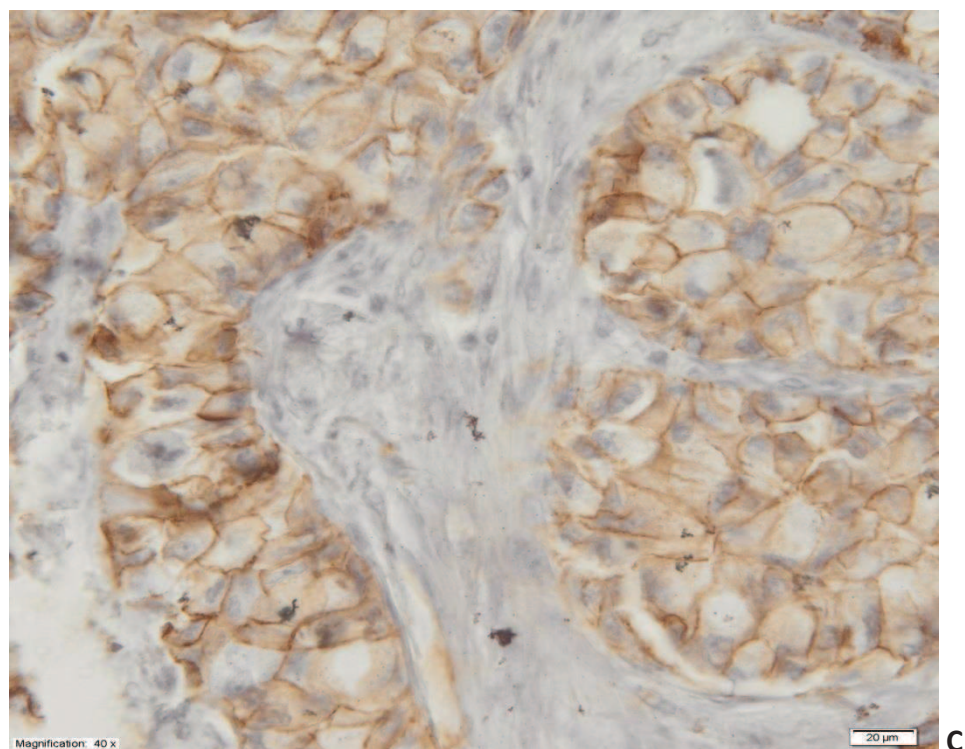
A – wskaźnik H=10; B – wskaźnik H=100; C – wskaźnik H=200; D – wskaźnik H=300



A

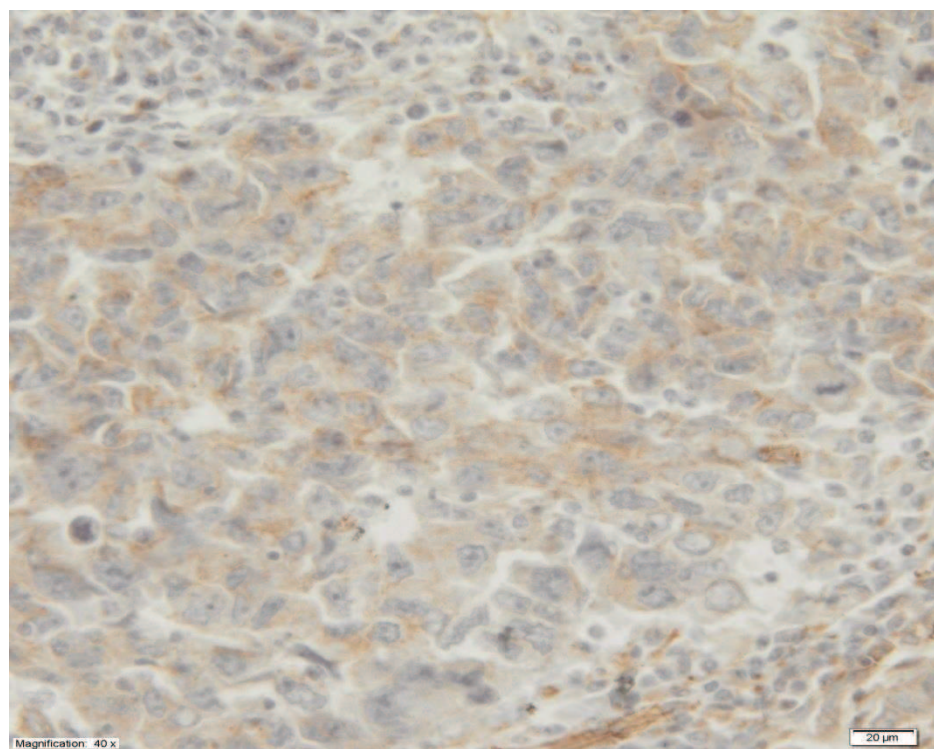


B

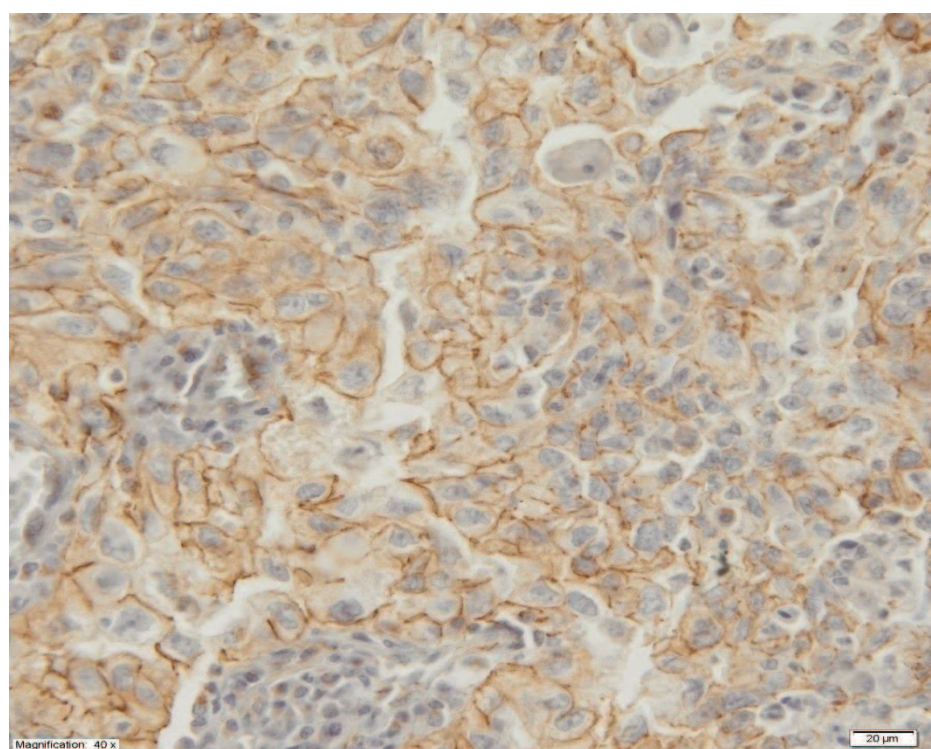


Rycina 5. Przykłady odczynów barwnych z przeciwciałem monoklonalnym anti-E-kadheryna (x40).

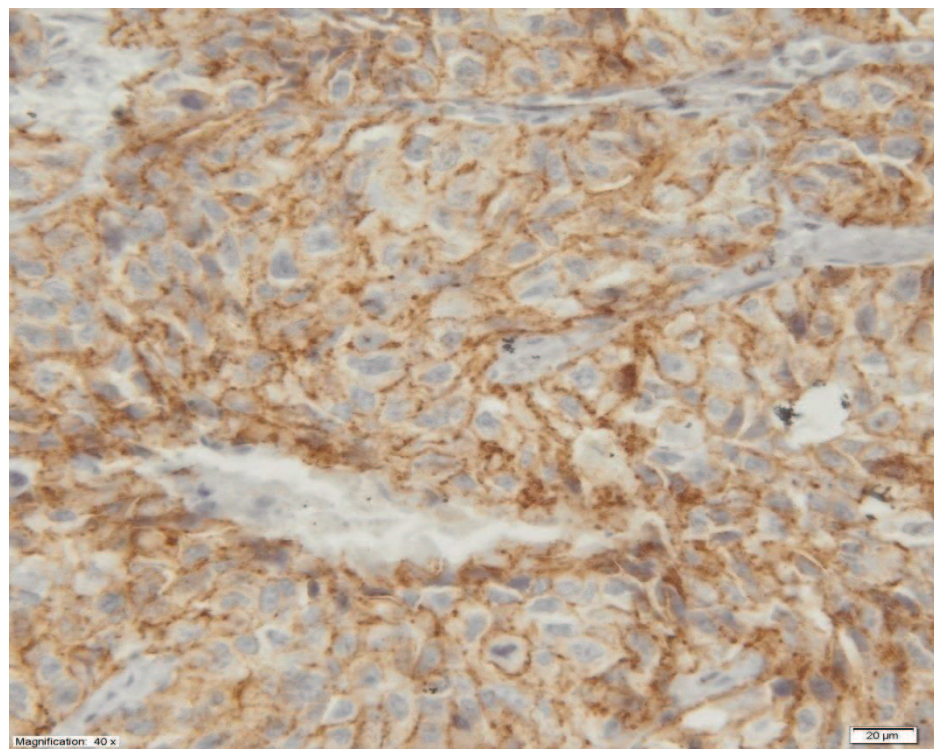
A – wskaźnik H=10; B– wskaźnik H=100;C – wskaźnik H=200; D – wskaźnik H=300



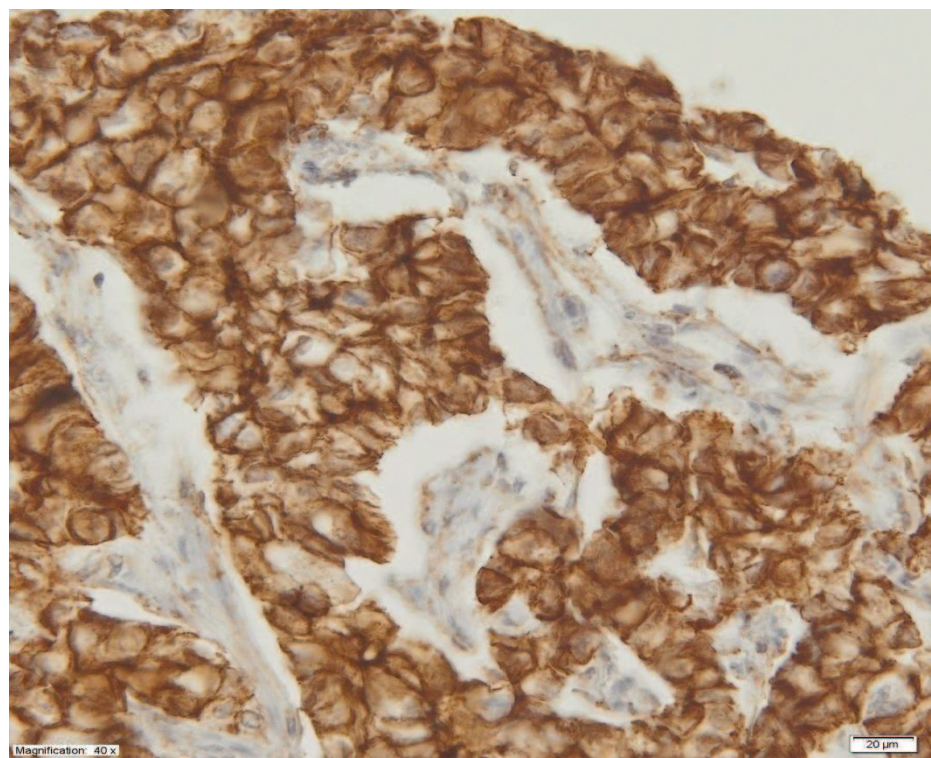
A



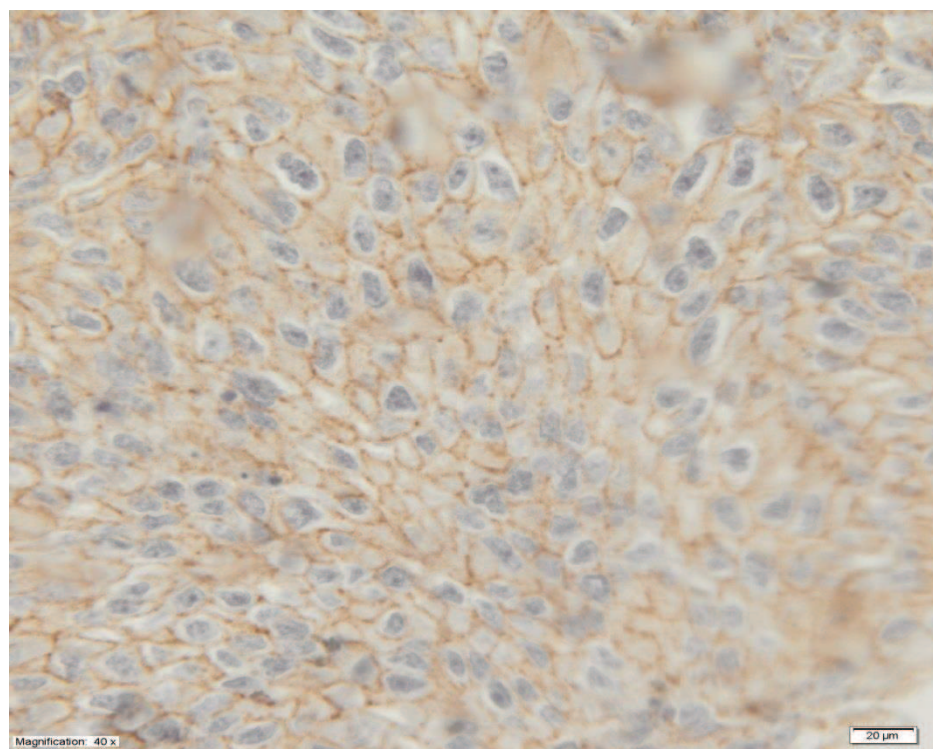
B



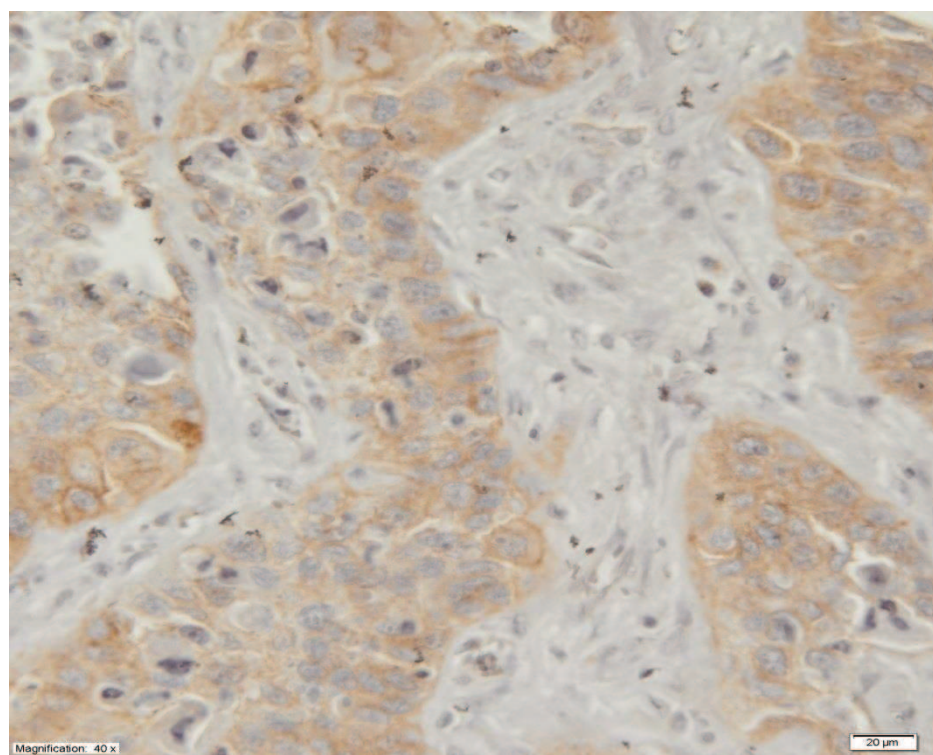
C



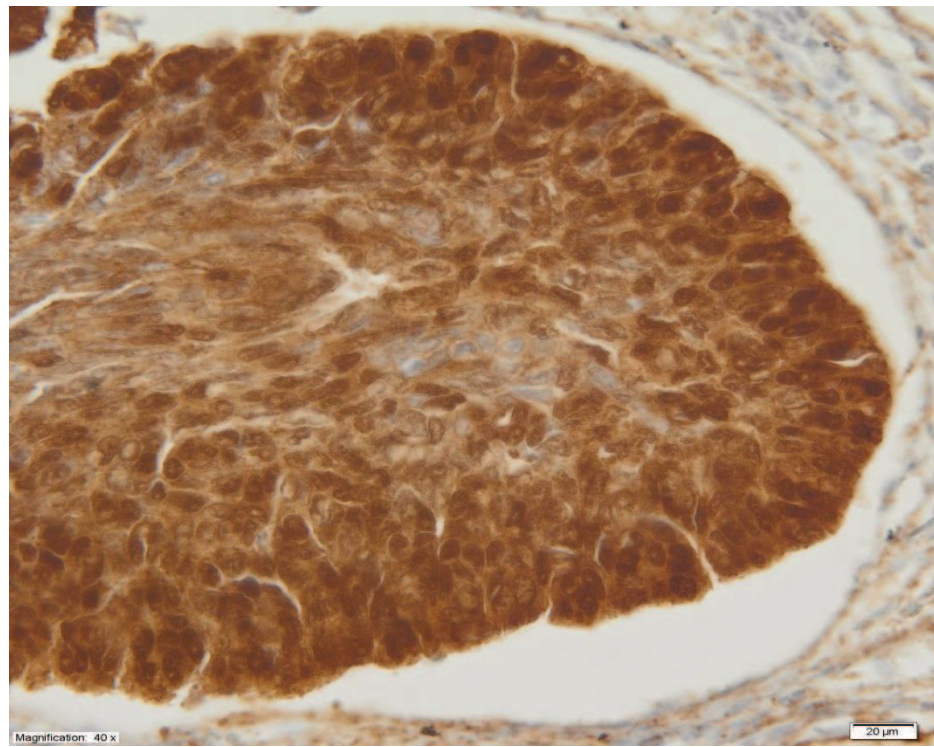
D



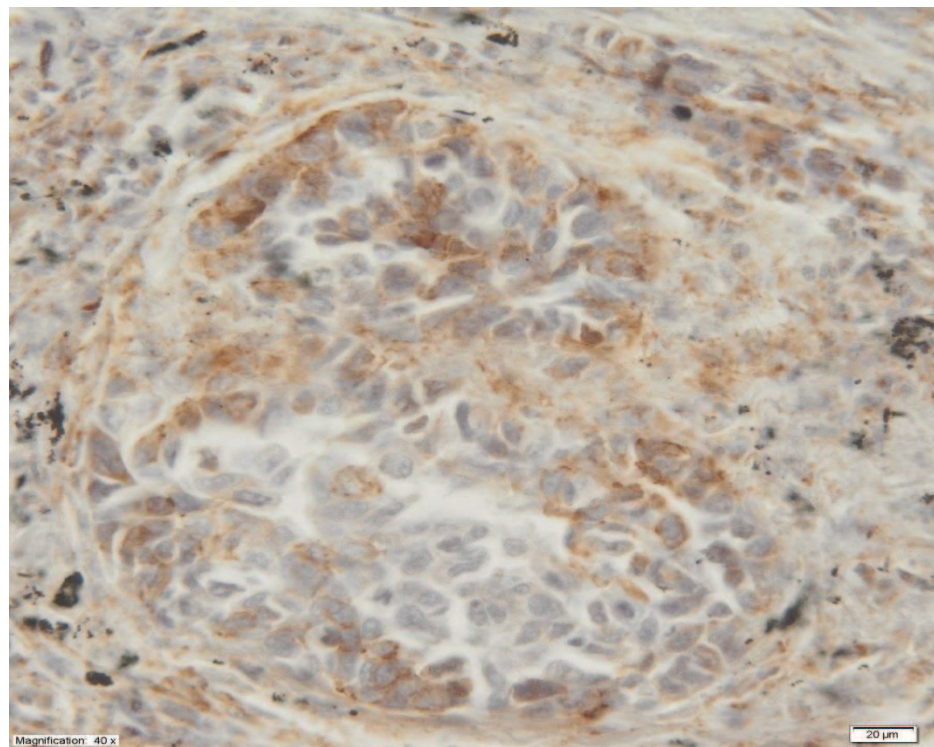
E



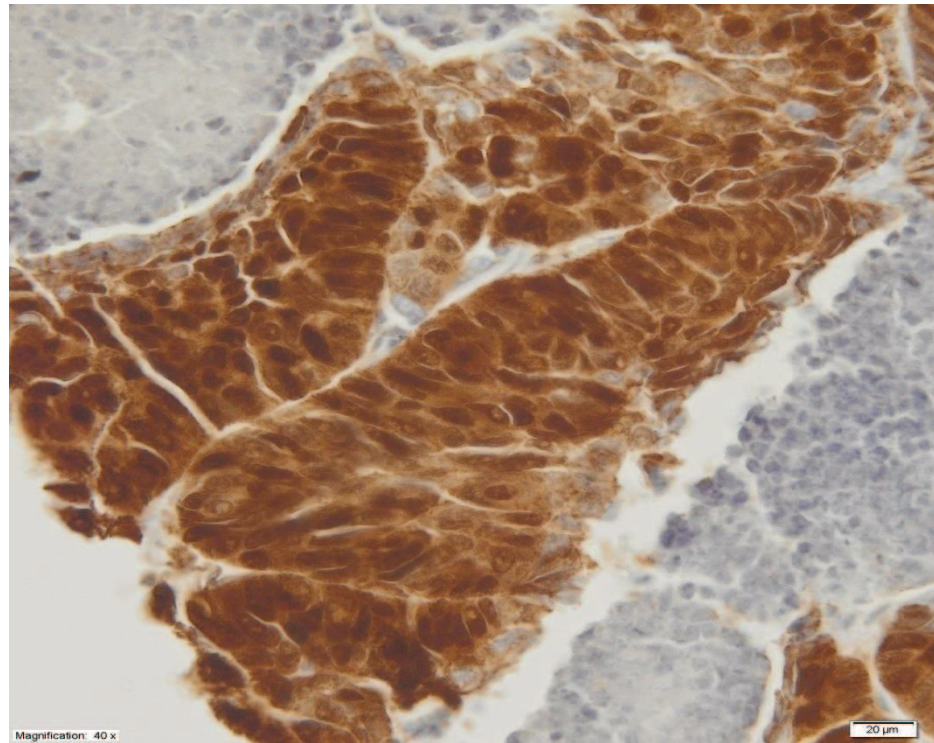
F



G



H



Rycina 6. Przykłady odczynów barwnych z przeciwciałem monoklonalnym anti- β -katenina (x40).

Odczyn błonowy: A – wskaźnik H=10; B – wskaźnik H=100; C – wskaźnik H=200; D – wskaźnik H=300

Odczyn cytoplazmatyczny: E – wskaźnik H=10; F – wskaźnik H=100; G – wskaźnik H=300

Odczyn jądrowy: H – wskaźnik H=0; I – wskaźnik H=300

4. Analiza statystyczna

Analizę opisową przedstawiono podając medianę i zakres. Medianę czasu przeżycia obliczono stosując metodę odwróconego cenzurowania.

Zależności pomiędzy poszczególnymi analizowanymi zmiennymi ciągłymi weryfikowano w testach nieparametrycznych dla prób niezależnych U Manna-Whitney'a lub Kruskala-Wallisa, natomiast zmienne kategoryzowane porównano w teście chi-kwadrat. Korelacje pomiędzy dwiema zmiennymi ciągłymi analizowano metodą Pearsona.

Analizę przeżycia przeprowadzono wykorzystując metodę Kaplana-Meiera. Czas całkowitego przeżycia (*ang. overall survival, OS*) mierzono od daty zabiegu operacyjnego do daty zgonu lub daty ostatniej obserwacji. Czas przeżycia wolny od nawrotu (*RFS, ang. recurrence free survival*) definiowano jako czas od zabiegu operacyjnego do daty potwierdzonej wznowy miejscowej, regionalnej lub odległej, zgonu z powodu nowotworu albo innej, niezależnej przyczyny lub daty ostatniej obserwacji. Jednoczynnikową i wieloczynnikową analizę przeżycia przeprowadzono wykorzystując test log-rank i model proporcjonalnego ryzyka Coxa z wsteczną eliminacją zmiennych na podstawie wyników testu ilorazu wiarygodności.

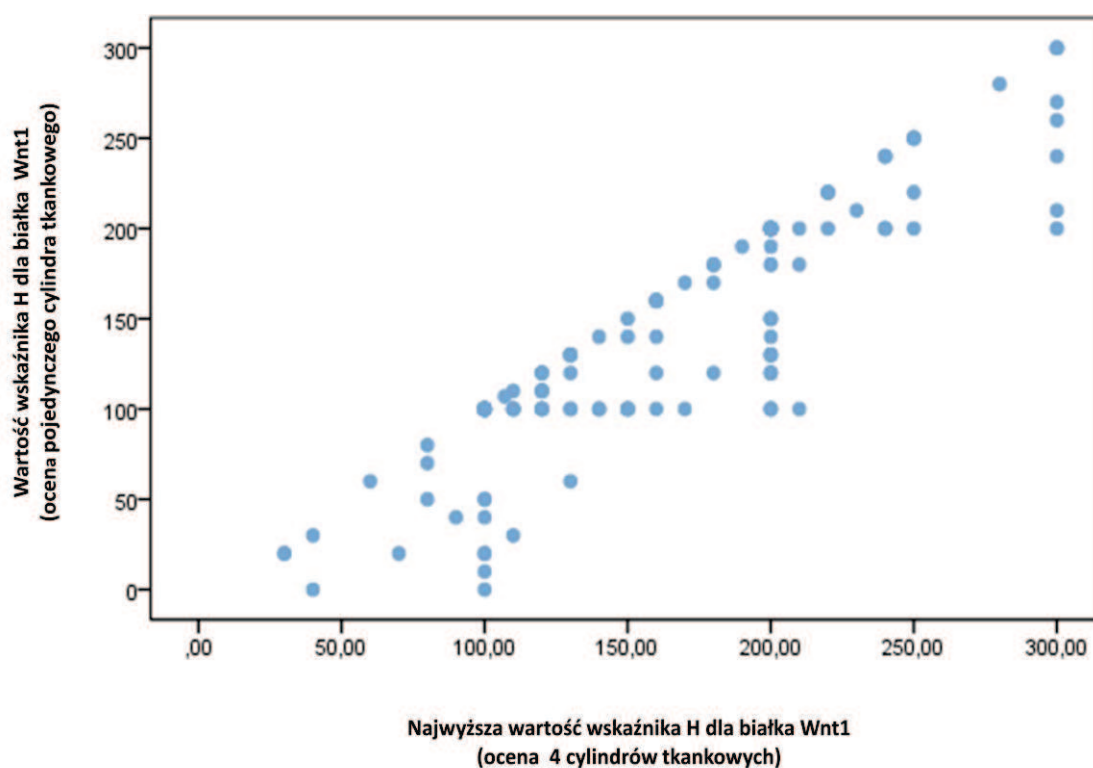
We wszystkich przeprowadzonych analizach za poziom istotności statystycznej przyjęto $\alpha=0,05$ (nie uwzględniono poprawek dla wielokrotnego testowania). Wszystkie przedstawione wartości współczynników istotności statystycznej P są dwustronne.

Obliczenia statystyczne oraz wykresy wykonano w programie SPSS, wersja 22,0 (IBM Corporation, NY, USA).

WYNIKI

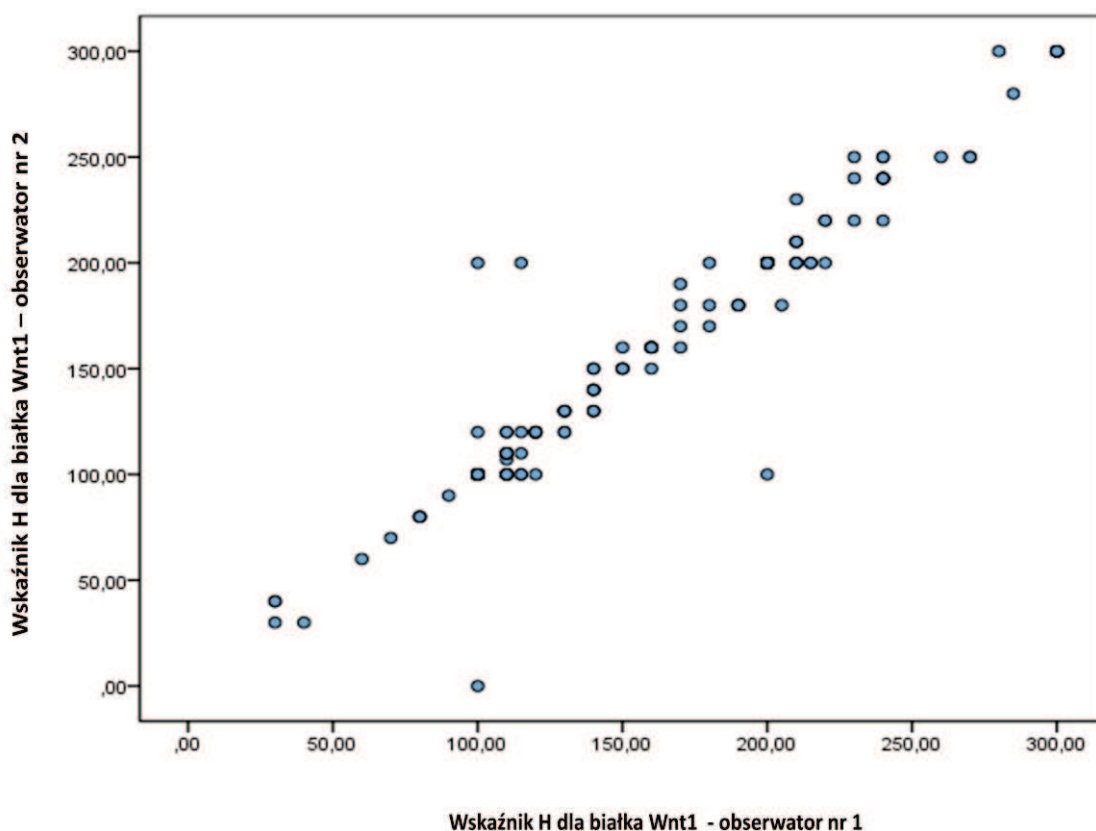
1. Immunohistochemiczna ocena poziomu analizowanych białek

Wyniki immunohistochemicznej oceny poziomu białek Wnt1, Wnt2 oraz E-kadheryny uzyskano dla 206 (99%) analizowanych guzów pierwotnych. Wyniki barwień dla trzech lokalizacji komórkowych β -kateniny uzyskano dla 207 (99,5%) przypadków. W 8 cylindrach tkankowych reprezentujących 2 przypadki na mikromacierzy tkankowej, w których oceniano ekspresję białka Wnt1, Wnt2 oraz E-kadheryny nie potwierdzono obecności komórek nowotworowych. W 4 cylindrach tkankowych reprezentujących 1 przypadek na mikromacierzy tkankowej, w których oceniano ekspresję trzech frakcji β -kateniny nie potwierdzono obecności nowotworu. W analizach statystycznych uwzględniono najwyższą wartość wskaźnika H – uzyskaną dla 4 ocenianych cylindrów tkankowych reprezentujących każdy guz pierwotny. Dla każdego z badanych białek potwierdzono silną korelację między najwyższą wartością wskaźnika H uwzględnianą w analizie a wartością wskaźnika H odczytaną w wyniku barwienia pojedynczego cylindra tkankowego. (Rycina nr 7 – na przykładzie oceny poziomu białka Wnt1).



Rycina 7. Wykres przedstawiający korelację najwyższej wartości wskaźnika H dla białka Wnt1, uzyskanej z oceny 4 cylindrów tkankowych, z wynikiem wskaźnika H dla białka Wnt1 pojedynczego cylindra tkankowego.

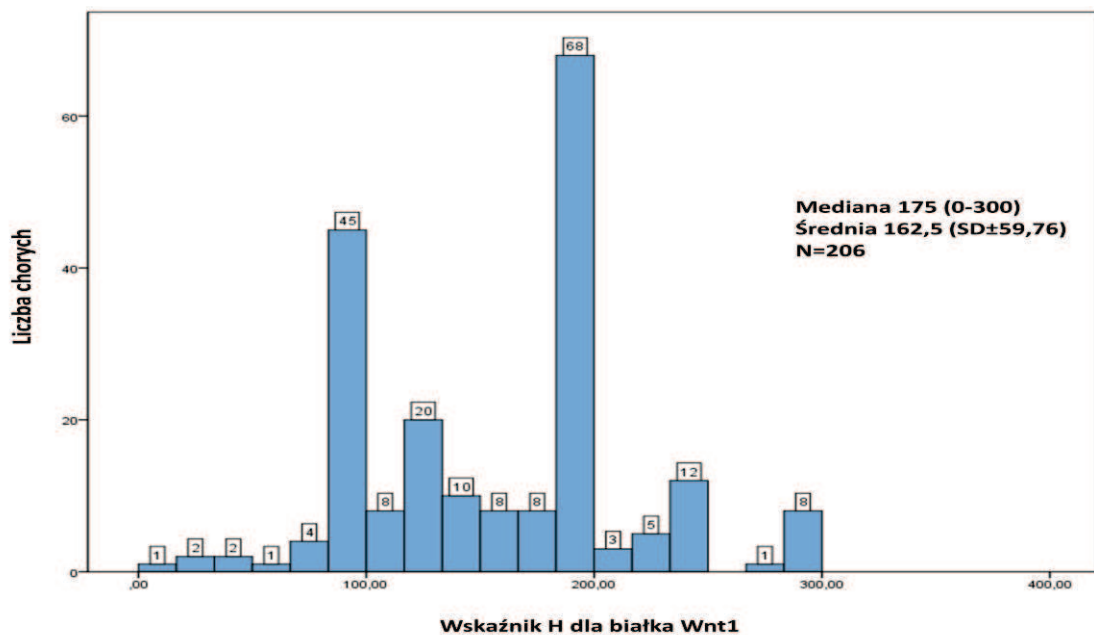
Wykazano wysoką zgodność oceny wyników barwień immunohistochemicznych analizowanych białek przez 2 niezależnych obserwatorów uczestniczących w badaniu. (Rycina nr 8– przykładowa korelacja wskaźników H dla białka Wnt1).



Rycina 8. Wykres przedstawiający korelację wskaźników H poziomu białka Wnt1 ocenianych przez 2 niezależnych obserwatorów.

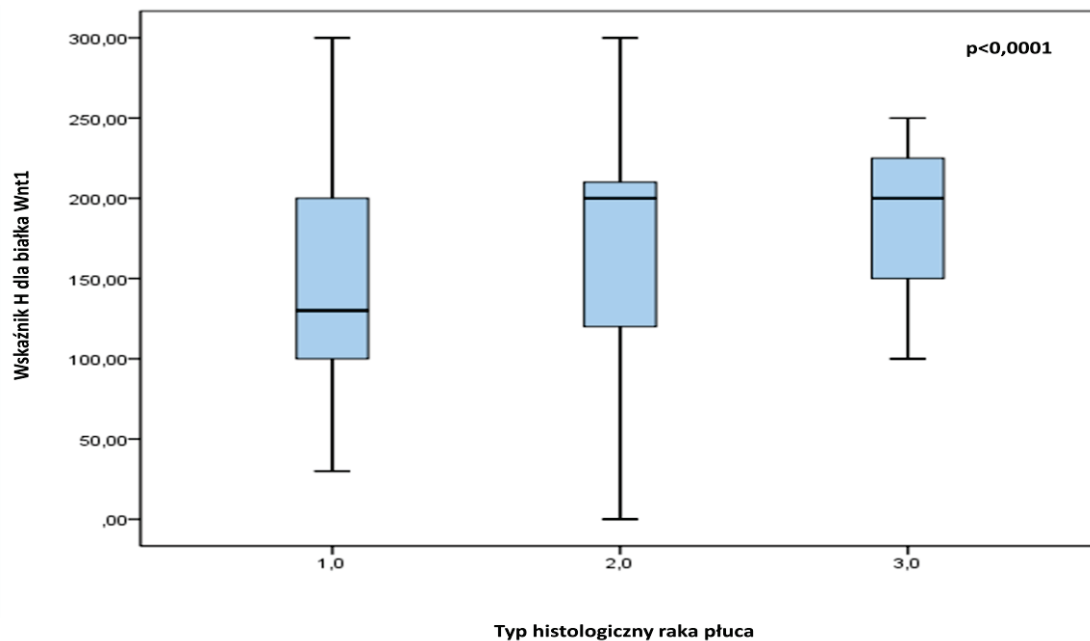
1.1. Ocena poziomu białka Wnt1

Mediana wartości wskaźnika H dla białka Wnt1 wyniosła 175 (zakres: 0-300), natomiast średnia – 162,5 ($\pm 59,8$). W 55 (26,7%) przypadkach wartość wskaźnika H wyniosła ≤ 100 . We wszystkich analizowanych próbkach, poza 1 (0,5%) wartość wskaźnika H dla białka Wnt1 była wyższa od 10. Odczyn immunohistochemiczny interpretowano jako dodatni, gdy wartość wskaźnika H wyniosła >175 (punkt odcięcia na poziomie mediany: 103 przypadki [49,5%]). Średnia wartość wskaźnika H dla płaskonabłonkowych raków płuca wyniosła 148 (± 53), dla raków gruczołowych – 178 (± 63), natomiast dla wielkomórkowych – 183 (± 76). Rozkład wyników wskaźnika H dla białka Wnt1 w analizowanej grupie przedstawia rycina nr 9.



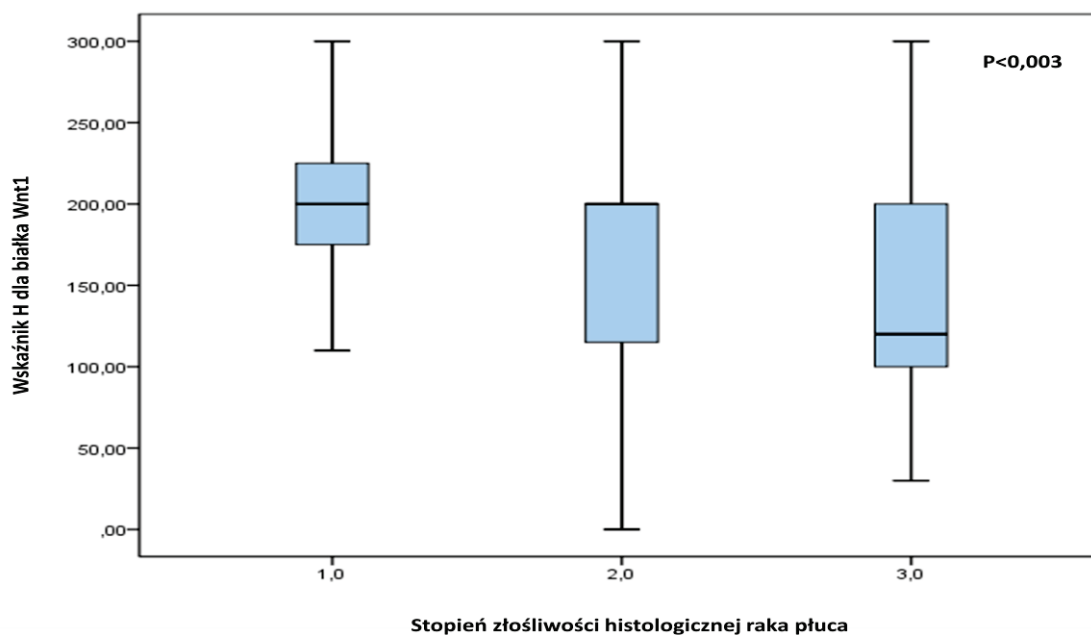
Rycina 9. Histogram przedstawiający rozkład wskaźnika H dla białka Wnt1.

Analizując poziom białka Wnt1 jako zmienną ciągłą wykazano istotną statystycznie zależność od typu histologicznego raka płuca ($p < 0,0001$) –poziom białka był znacząco wyższy w guzach pierwotnych o histologii gruczołowej i wielkomórkowej w porównaniu z płaskonabłonkową (Ryc. 10).



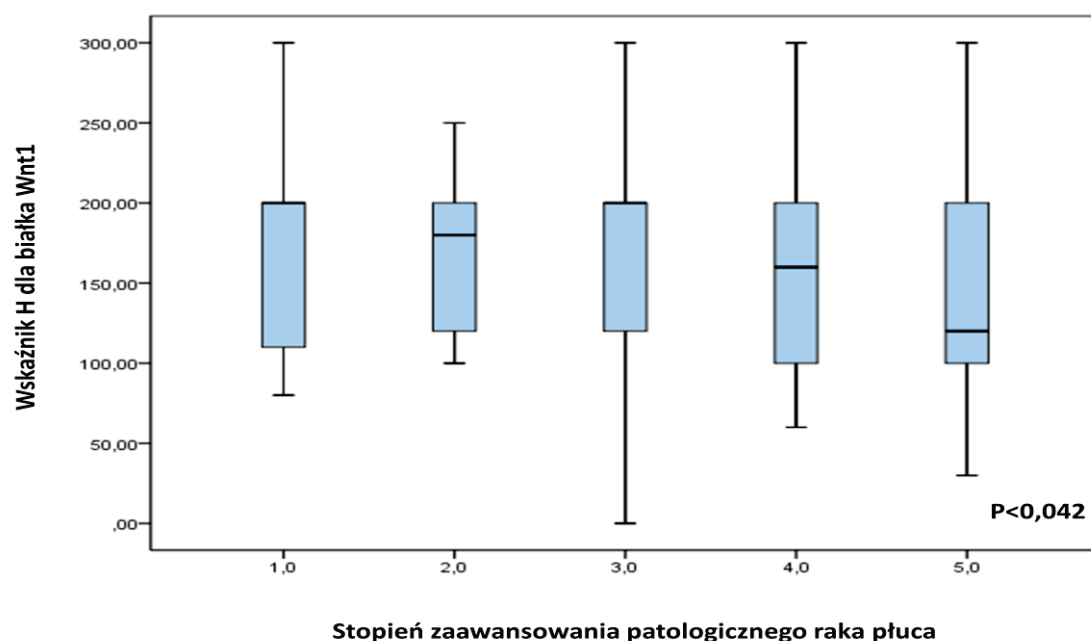
Rycina 10. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla białka Wnt1 od typu histologicznego raka płuca (1 – rak płaskonabłonkowy, 2 – rak gruczołowy, 3 – rak wielkomórkowy).

Ponadto potwierdzono znamienne niższe poziomy białka Wnt1 w nowotworach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej [(G3); $p=0,003$] (Ryc. 11)



Rycina 11. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla białka Wnt1 od stopnia złośliwości histologicznej raka płuca (1 – G1, 2 – G2, 3 – G3).

Stwierdzono znamienne niższy poziom białka Wnt1 w nowotworach w wyższym stopniu zaawansowania patologicznego (st. IIB i IIIA, $p=0,042$ Ryc.12).



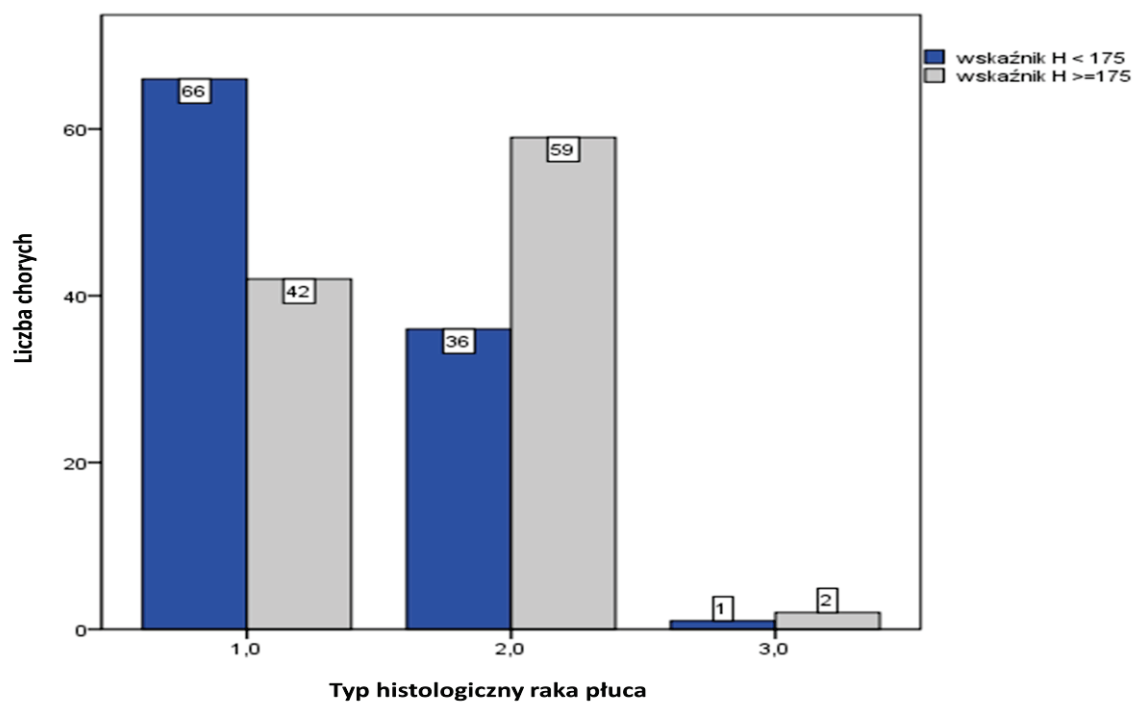
Rycina 12. Wykres przedstawiający zależność poziomu białka Wnt1 od stopnia zaawansowania patologicznego raka płuca (1 – IA, 2 – IB, 3 – IIA, 4 – IIB, 5 – IIIA).

W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem białka Wnt1 (wskaźnikiem H) analizowanym jako zmienna ciągła a wiekiem, płcią chorych, statusem palenia papierosów, cechą T, cechą N oraz stopniem naciekania opłucnej ($p>0,05$). Szczegółowe dane przedstawiono w tabeli nr 3.

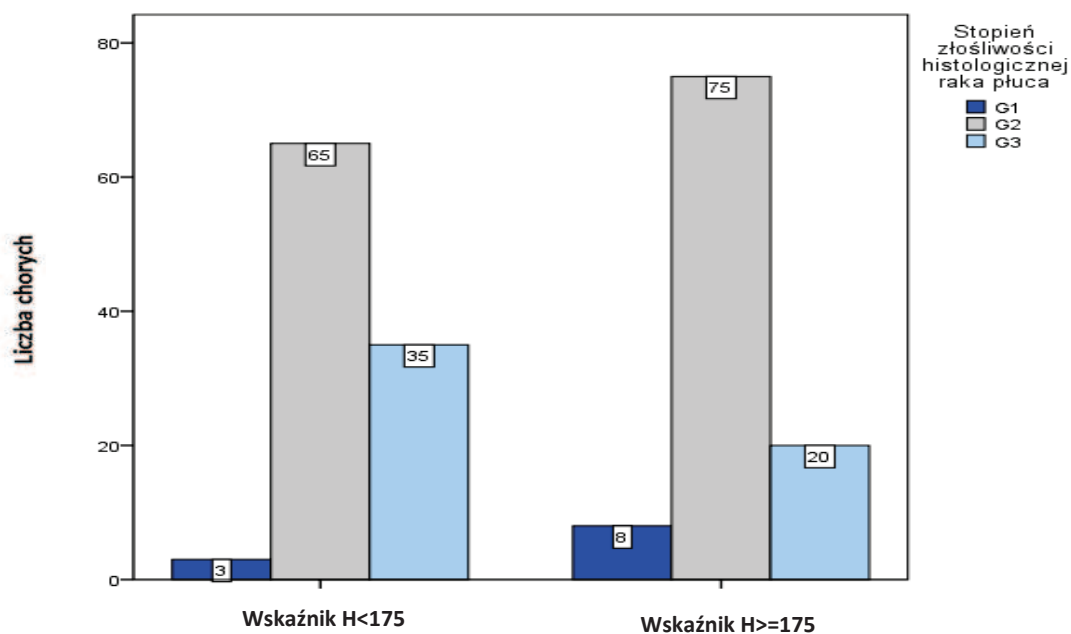
Tabela 3. Zależność poziomu białka Wnt1 od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.

Cecha kliniczna lub patologiczna	p	r
Wiek	0,216	-0,087
Płeć	0,577	
Status palenia papierosów	0,625	
Typ histologiczny raka płuca (WHO, 2004)	$\leq 0,0001$	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego (WHO, 2004)	0,029	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego (WHO, 2015)	0,012	
Cecha T	0,363	
Cecha N	0,056	
Stopień zaawansowania patologicznego nowotworu	0,042	
Stopień zróżnicowania histologicznego (WHO, 2004)	0,003	
Stopień zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego (WHO, 2015)	0,002	
Średnica guza pierwotnego	0,027	-0,154
Odsetek martwicy w utkaniu guza pierwotnego	0,002	-0,212
Stopień naciekania opłucnej	0,312	

Przyjmując za punkt odcięcia wartość mediany wskaźnika H dla białka Wnt1 potwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy poziomem immunohistochemicznej ekspresji białka Wnt1 a histologicznym typem nowotworu, z tendencją do wyższego poziomu analizowanego białka w rakach gruczołowych ($p=0,004$, Ryc. 13) oraz stopniem histologicznego zróżnicowania, z tendencją do wyższego poziomu białka Wnt1 w rakach o niższym stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,029$, Ryc. 14).



Rycina 13. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla białka Wnt1 od typu histologicznego raka płuca (1 – rak płaskonabłonkowy, 2 – rak gruczołowy, 3 – rak wielkomórkowy).



Rycina 14. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla białka Wnt1 od stopnia złośliwości histologicznej raka płuca.

Przyjmując wartość mediany wskaźnika H jako punkt odcięcia nie wykazano zależności pomiędzy poziomem białka Wnt1 wiekiem lub płcią analizowanych chorych, statusem palenia papierosów, cechą T, cechą N, stopniem zaawansowania patologicznego nowotworu oraz stopniem naciekania opłucnej (wszystkie uzyskane wartości $p>0,05$).

Szczegółowe wyniki przedstawia tabela nr 4.

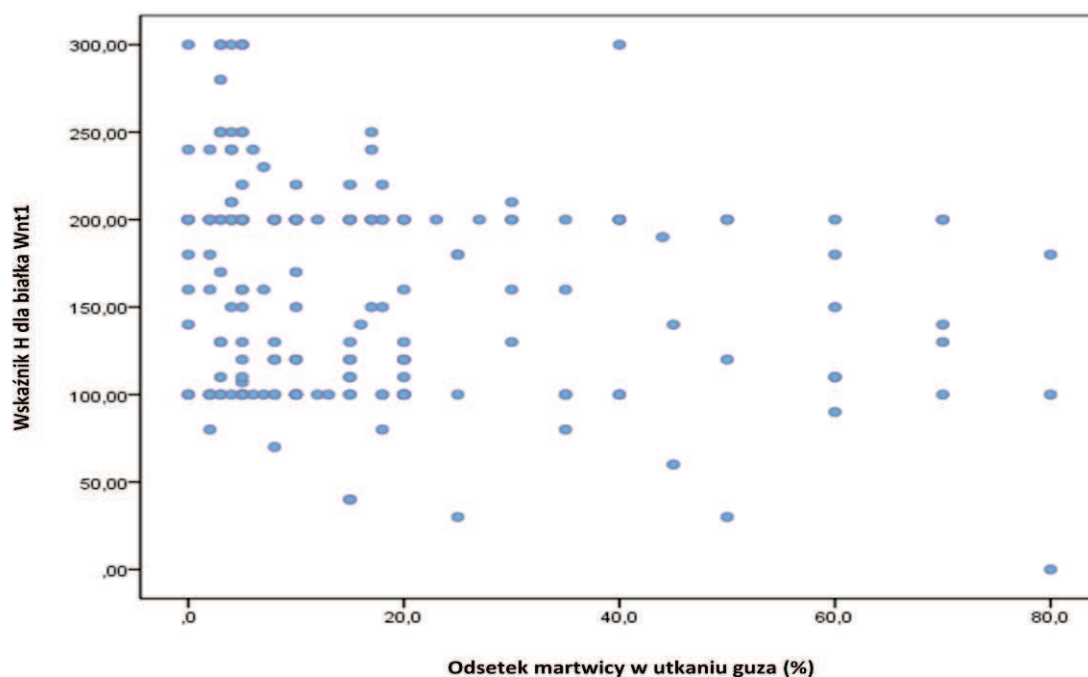
Tabela 4. Zależność wskaźnika H dla białka Wnt1 od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.

Charakterystyka		Poziom białka Wnt1 (wskaźnik H)		
		≤175	>175	p
Liczba chorych z wynikiem barwienia IHC (%) / liczba chorych	206/208 (99%)	103	103	
Wiek				0,527
Mediana	62	64,7	62	
Zakres	40,6-80,5	45,1-79,8	40,6-80,5	
Płeć, n (%)				0,374
Kobiety	68 (32,7%)	37 (17,9%)	31 (15%)	
Mężczyźni	140 (67,3%)	66 (32%)	72 (35%)	
Stopień zaawansowania patologicznego nowotworu, n (%)				0,273
IA	38 (18,3%)	15 (7,3%)	22 (10,7%)	
IB	58 (27,9%)	28 (13,6%)	29 (14%)	
IIA	45 (21,6%)	20 (9,7%)	25 (12,1%)	
IIB	28 (13,5%)	15 (7,3%)	13 (6,3%)	
IIIA	39 (18,8%)	25 (12,1%)	14 (6,8%)	
IIIB	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Typ histologiczny raka płuca, n (%)				0,004
Płaskonabłonkowy	108 (52%)	66(32%)	42 (20%)	
Gruczołowy	97 (46,6%)	36 (17,5%)	59 (28,6%)	
Wielkokomórkowy	3 (1,4%)	1 (0,5%)	2 (0,97%)	

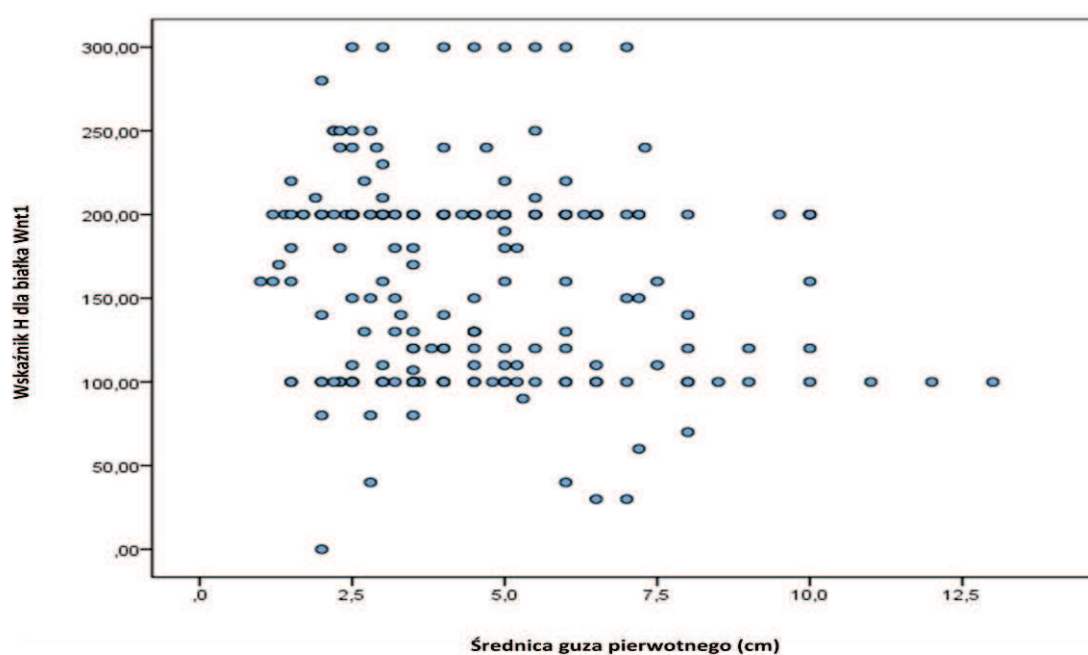
Stopień złośliwości histologicznej				0,029
G1	11 (5,3%)	3 (1,5%)	8 (3,9%)	
G2	140 (67,3%)	65 (31,5%)	75 (36,4%)	
G3	57(27,4%)	35(17%)	20(9,7%)	
Cecha T, n (%)				0,252
T1a	20 (9,6%)	10 (4,8%)	10 (4,8%)	
T1b	32 (15,4%)	11 (5,3%)	20 (9,7%)	
T2a	83 (39,9%)	40 (19,4%)	42 (20,3%)	
T2b	38 (18,3%)	19 (9,2%)	19 (9,2%)	
T3	34 (16,3%)	22 (10,7%)	12 (5,8%)	
T4	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0 (0%)	
Cecha N, n (%)				0,292
N0	127 (61%)	61 (29,6%)	65 (31,5%)	
N1	48 (23,1%)	23 (11,2%)	24 (11,6%)	
N2	31 (14,9%)	19 (9,2%)	12 (5,8%)	
N3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Nx	2 (1%)	0 (0%)	2 (1%)	
Średnica guza(cm)				0,725
Średnia	4,42	4,42	3,7	
Zakres	1-13	1-13	1,2-10	
Odsetek martwicy w utkaniu guza pierwotnego (%)	0-80	0-80	0-80	0,314
Stopień naciekania opłucnej				0,179
PL0	119 (57,2%)	58 (28,1%)	59 (28,6%)	
PL1	74 (35,6%)	34 (16,5%)	40 (19,4%)	
PL2	3 (1,4%)	2 (1%)	1 (0,5%)	
PL3	11 (5,3%)	9 (4,3%)	2 (1%)	
PLx	1 (0,5%)	0 (0%)	1 (0,5%)	

Przy ustaleniu punktu odcięcia wskaźnika H dla Wnt1 równego 100 wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy poziomem białka Wnt1 a stopniem patologicznego zaawansowania ($p=0,027$) oraz stopniem histologicznego zróżnicowania nowotworu ($p=0,03$). Wskaźnik $H > 100$ obserwowano częściej w nowotworach o niższym stopniu patologicznego zaawansowania oraz niższym stopniu złośliwości histologicznej.

Ponadto wykazano słabe odwrotne korelacje pomiędzy: odsetkiem martwicy w utkaniu nowotworu a poziomem białka Wnt1 ($r=-0,212$, $p=0,002$, Ryc. 15) oraz pomiędzy średnicą guza pierwotnego a poziomem analizowanego białka ($r=-0,154$, $p=0,027$, Ryc. 16).

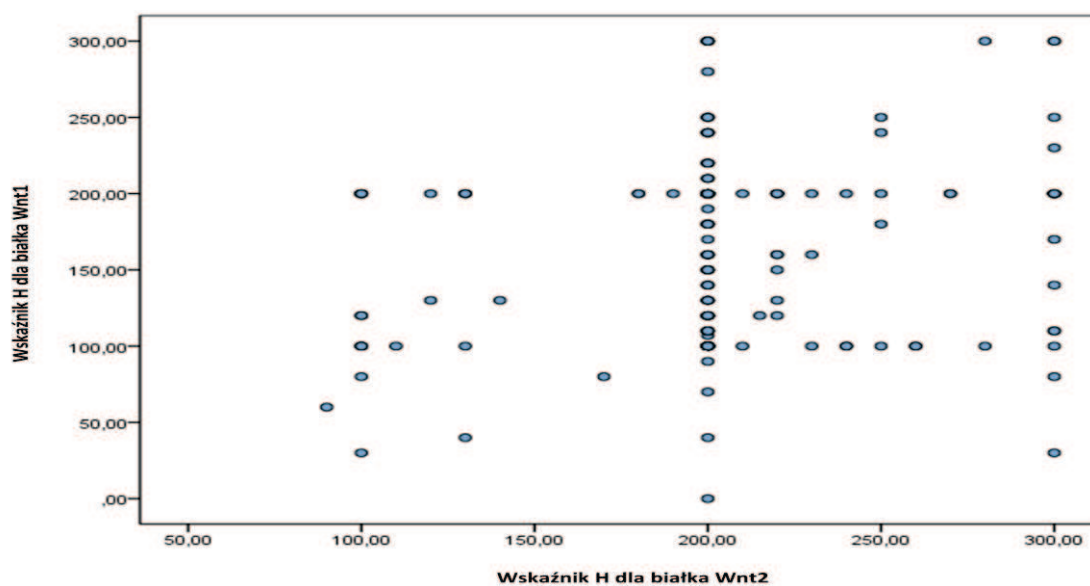


Rycina 15. Wykres przedstawiający zależność poziomu białka Wnt1 od odsetka martwicy w utkaniu guza pierwotnego.



Rycina 16. Wykres przedstawiający zależność poziomu białka Wnt1 od średnicy guza pierwotnego.

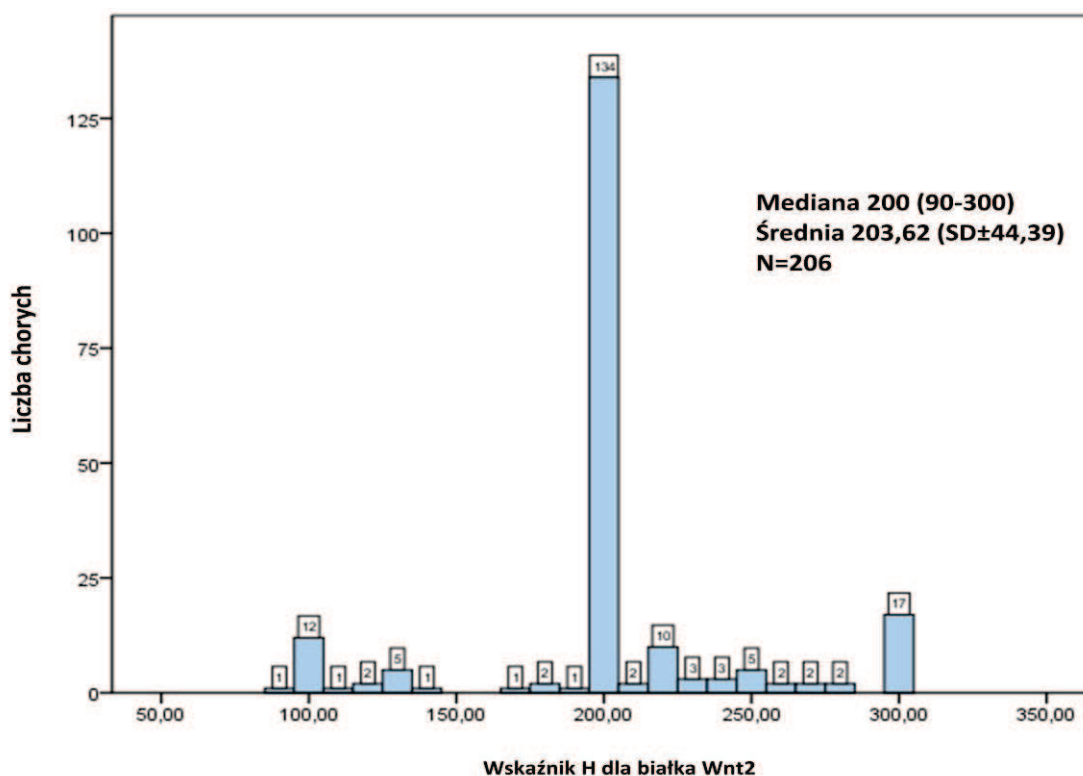
Poziom białka Wnt1 był znacząco związany z poziomem białka Wnt2 ($r=0,161$, $p=0,021$, Ryc. 17).



Rycina 17. Wykres przedstawiający korelację między poziomami białek Wnt1 i Wnt2.

1.2. Ocena poziomu białka Wnt2

Mediana wartości wskaźnika H dla białka Wnt2 wyniosła 200 (zakres: 90-300), natomiast średnia – 203,62 ($\pm 44,39$). W materiale tkankowym pochodzących ze 134 (65%) raków płuca wartość wskaźnika H była równa 200, w 26 (12,6%) przypadkach osiągnęła wartość niższą od mediany, natomiast w 46 (22,3%) – wartość wyższą od mediany. Odczyn immunohistochemiczny interpretowano jako dodatni, gdy wartość wskaźnika H wyniosła >200 . Pozytywny wynik reakcji barwnych uzyskano dla 46 przypadków (22,3%). W 13 (6,3%) przypadkach wartość wskaźnika H wyniosła ≤ 100 , natomiast w 193 (93,7%) mieściła się w zakresie 101-300. We wszystkich analizowanych próbkach wartość wskaźnika H dla białka Wnt2 była wyższa od 10. Średnia wartość wskaźnika H dla płaskonabłonkowych raków płuca wyniosła 195 (± 46), dla raków gruczołowych – 212 (± 40), natomiast dla wielkokomórkowych – 233 (± 57). Szczegółową dystrybucję wyników wskaźnika H dla białka Wnt2 w analizowanych przypadkach przedstawia rycina nr 18.



Rycina 18. Histogram przedstawiający rozkład wskaźnika H dla białka Wnt2.

Analizując poziom białka Wnt2 jako zmienną ciągłą wykazano istotną statystycznie zależność od stopnia zróżnicowania histologicznego ($p=0,002$) – nowotwory o wyższym stopniu złośliwości histologicznej wykazywały znamienne niższy poziom białka.

W przeprowadzonym badaniu nie wykazano zależności pomiędzy poziomem białka Wnt2 analizowanym jako zmienna ciągła a wiekiem, płcią chorych, statusem palenia papierosów, typem histologicznym raka płuca, cechą T, cechą N, stopniem zaawansowania patologicznego nowotworu, średnicą guza pierwotnego, odsetkiem martwicy w utkaniu nowotworu oraz stopniem naciekania opłucnej ($p>0,05$).

Szczegółowe podsumowanie wyników zawiera tabela nr 5.

Tabela 5. Zależność poziomu białka Wnt2 od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.

Cecha kliniczna lub patologiczna	p	r
Wiek	0,565	-0,04
Płeć	0,971	
Status palenia papierosów	0,719	
Typ histologiczny raka płuca (WHO, 2004)	0,124	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego (WHO, 2004)	0,337	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego (WHO, 2015)	0,585	
Cecha T	0,767	
Cecha N	0,305	
Stopień zaawansowania patologicznego nowotworu	0,739	
Stopień zróżnicowania histologicznego (WHO, 2004)	0,002	
Stopień zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego (WHO, 2015)	0,259	
Średnica guza pierwotnego	0,569	0,04
Odsetek martwicy w utkaniu guza pierwotnego	0,772	-0,02
Stopień naciekania opłucnej	0,284	

Przyjmując jako punkt odcięcia wartość mediany wskaźnika H dla białka Wnt2, potwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy poziomem białka Wnt2 a stopniem histologicznego zróżnicowania ($p=0,001$).

Przyjmując wartość mediany wskaźnika H jako punkt odcięcia nie wykazano zależności pomiędzy poziomem białka Wnt2a wiekiem i płcią analizowanych chorych, typem histologicznym raka płuca, stopniem histologicznego zróżnicowania, cechą T, cechą N, stopniem zaawansowania patologicznego nowotworu, średnicą guza pierwotnego, odsetkiem martwicy w utkaniu nowotworu oraz stopniem naciekania opłucnej (wszystkie uzyskane wartości $p>0,05$). Szczegółowe wyniki przedstawia tabela nr 6.

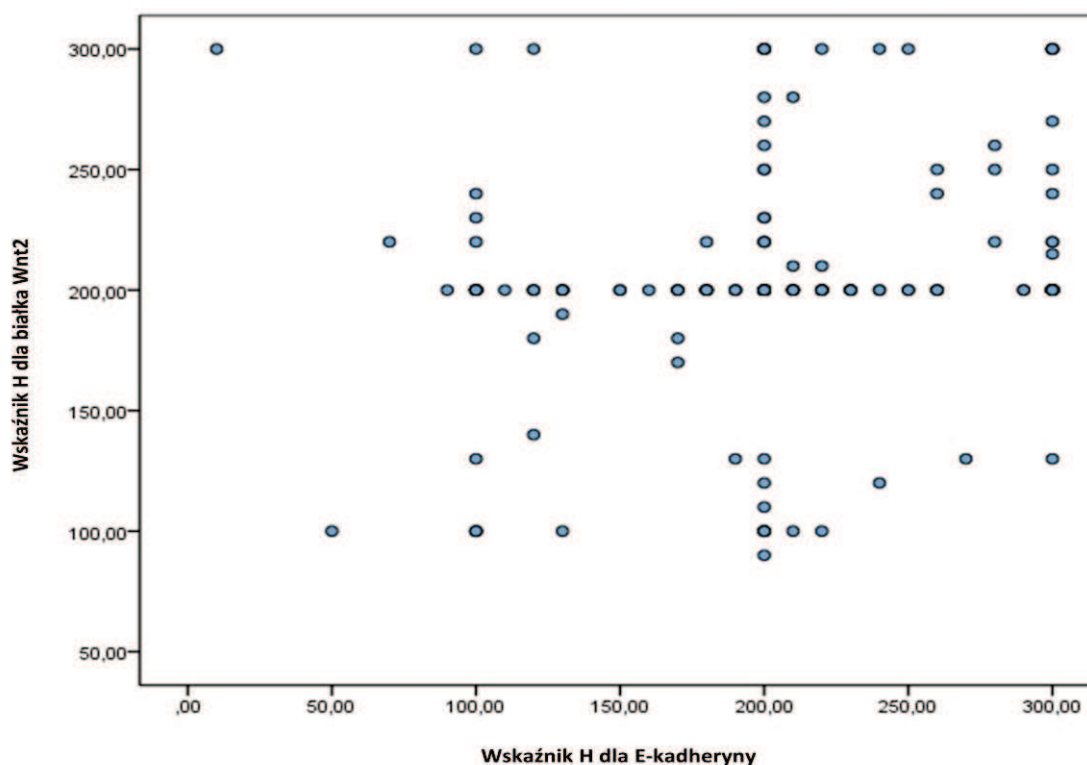
Tabela 6. Zależność wskaźnika H dla białka Wnt2 od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.

Poziom białka Wnt2 (wskaźnik H)				
Charakterystyka		≤200	>200	p
Liczba chorych z wynikiem barwienia IHC /liczba chorych (%)	206/208 (99%)	160 (76,9%)	46 (22,1%)	
Wiek				0,465
Mediana	62	62	63	
Zakres	40,6-80,5	40,6-80,5	48-78,4	
Płeć, n (%)				0,948
Kobiety	68 (32,7%)	53 (25,7%)	15 (7,3%)	
Mężczyźni	140 (67,3%)	107 (52%)	31 (15%)	
Typ histologiczny raka płuca, n (%)				0,899
Płaskonabłonkowy	108 (52%)	84 (40,8%)	24 (11,5%)	
Gruzołowy	97 (46,6%)	74 (36%)	21 (10,2%)	
Wielkokomórkowy	3 (1,4%)	2 (1%)	1 (0,5%)	
Stopień zaawansowania patologicznego nowotworu, n (%)				0,662
IA	38 (18,3%)	30 (14,6%)	7 (3,4%)	
IB	58 (27,9%)	45 (21,8%)	12 (5,8%)	
IIA	45 (21,6%)	34 (16,5%)	11 (5,3%)	
IIB	28 (13,5%)	19 (9,2%)	9 (4,5%)	
IIIA	39 (18,8%)	32 (15,5%)	7 (3,4%)	
IIIB	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Stopień złośliwości histologicznej, n (%)				0,001
G1	11 (5,3%)	6 (2,9%)	5 (2,4%)	
G2	140 (67,3%)	119 (57,8%)	21 (10,2%)	
G3	57 (27,4%)	35 (17%)	20 (9,7%)	

Cecha T, n (%)				0,778
T1a	20 (9,6%)	16 (7,8%)	4 (1,9%)	
T1b	32 (15,4%)	26 (12,6%)	5 (2,4%)	
T2a	83 (39,9%)	65 (31,5%)	17 (8,3%)	
T2b	38 (18,3%)	28 (13,6%)	10 (4,9%)	
T3	34 (16,3%)	24 (11,6%)	10 (4,9%)	
T4	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0 (0%)	
Cecha N, n (%)				0,243
N0	127 (61%)	96 (46,6%)	30 (14,6%)	
N1	48 (23,1%)	35 (17%)	12 (5,8%)	
N2	31 (14,9%)	28 (13,6%)	3 (1,4%)	
N3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Nx	2 (1%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	
Średnica guza (cm)				0,81
Średnia	4,42	4,42	4,1	
Zakres	1-13	1-13	1,4-11	
Odsetek martwicy w utkaniu guza pierwotnego (%)	0-80	0-80	0-80	0,8
Stopień naciekania opłucnej				0,179
PL0	119 (57,2%)	90 (43,7%)	27 (13,1%)	
PL1	74 (35,6%)	58 (28,1%)	16 (7,7%)	
PL2	3 (1,4%)	2 (1%)	1 (0,5%)	
PL3	11 (5,3)	9 (4,5%)	2 (1%)	
PLx	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0 (0%)	

Przy ustaleniu punktu odcięcia wskaźnika H dla Wnt2 równego 100 wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy poziomem białka Wnt2a stopniem naciekania opłucnej - znamiennej niższą ekspresję analizowanego białka obserwowano w nowotworach naciekających opłucną ($p=0,001$).

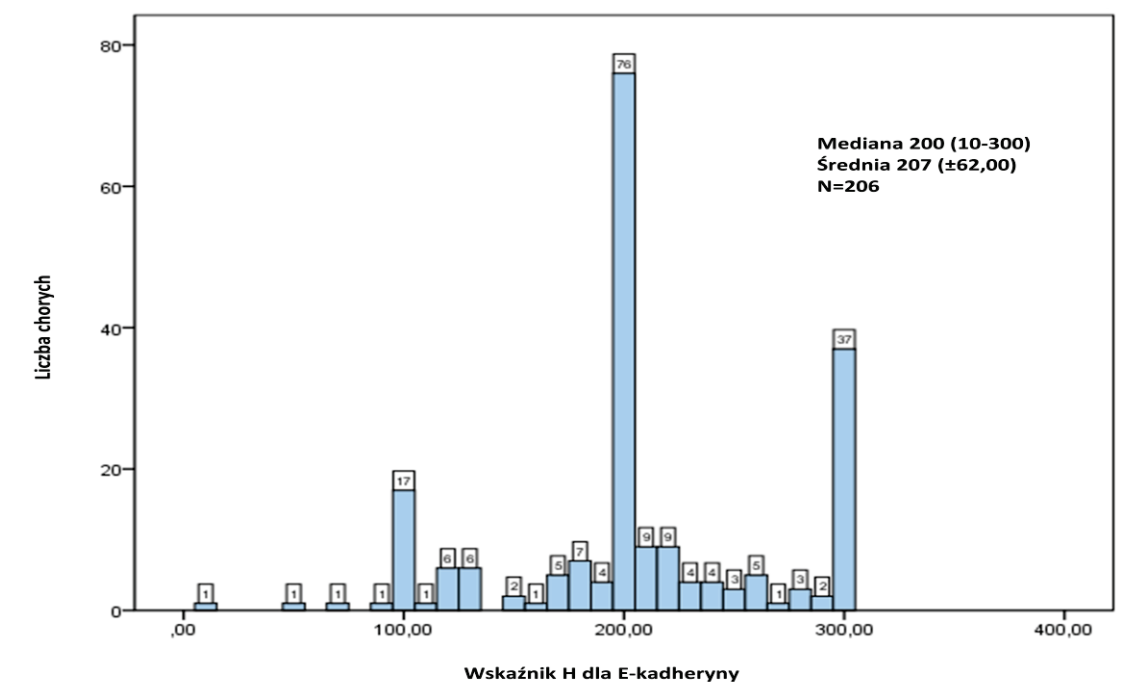
Wykazano słabą dodatnią korelację pomiędzy poziomem białka Wnt2 a ekspresją E-kadheryny ($r=0,151$, $p=0,03$, Ryc. 19).



Rycina 19. Wykres przedstawiający korelację między poziomem białka Wnt2 i E-kadheryny.

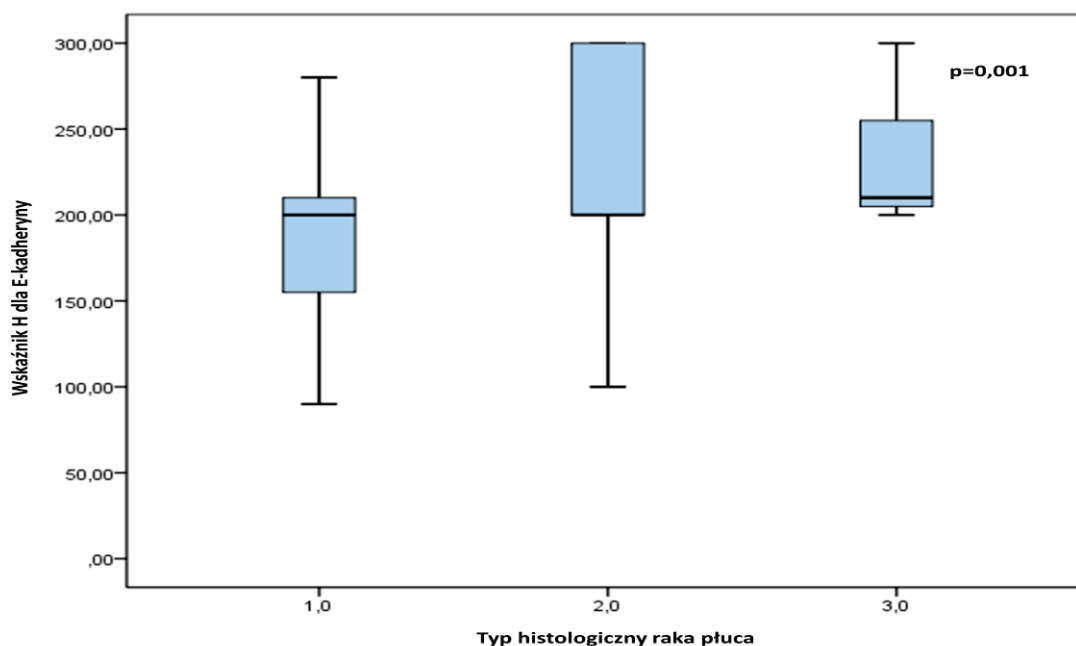
1.3. Ocena poziomu E-kadheryny

Mediana wartości wskaźnika H dla E-kadheryny wyniosła 200 (zakres: 10-300), natomiast średnia – 207 (± 62). W materiale tkankowym pochodzącym z 76 (36,9%) raków płuca wartość H wyniosła równo 200, w 53 przypadkach (25,7%) osiągnęła wartość niższą od mediany, natomiast w 77 (37,4%) – wyższą od mediany. Odczyn immunohistochemiczny interpretowano jako dodatni, gdy wartość wskaźnika H wyniosła >200 (77 przypadków [37,4%]). W 21 (10,2%) przypadkach wartość wskaźnika H wyniosła ≤ 100 , natomiast w 185 (89,8%) mieściła się w zakresie 101-300. We wszystkich analizowanych przypadkach, poza 1 (0,5%), wartość wskaźnika H dla E-kadheryny była wyższa od 10. Średnia wartość wskaźnika H dla płaskonabłonkowych raków płuca wyniosła 190 (± 58), dla raków gruczołowych – 224 (± 61), natomiast dla wielkomórkowych – 236 (± 55). Szczegółową dystrybucję wskaźnika H dla E-kadheryny w analizowanej grupie przedstawia rycina nr 20.



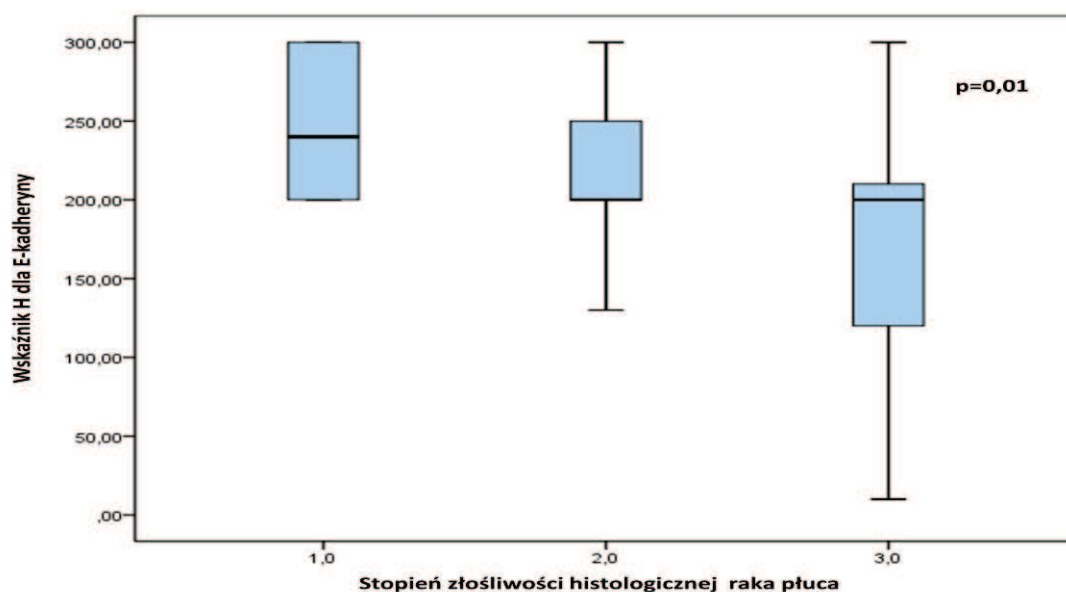
Rycina 20. Histogram przedstawiający rozkład wskaźnika H dla E-kadheryny.

Analizując poziom E-kadheryny jako zmienną ciągłą wykazano znamienne istotną zależność od typu histologicznego raka płuca ($p=0,001$) – immunoekspresja białka była znamienne wyższa w guzach pierwotnych o histologii gruczołowej i wielkokomórkowej w porównaniu z płaskonabłonkową (Ryc. 21).



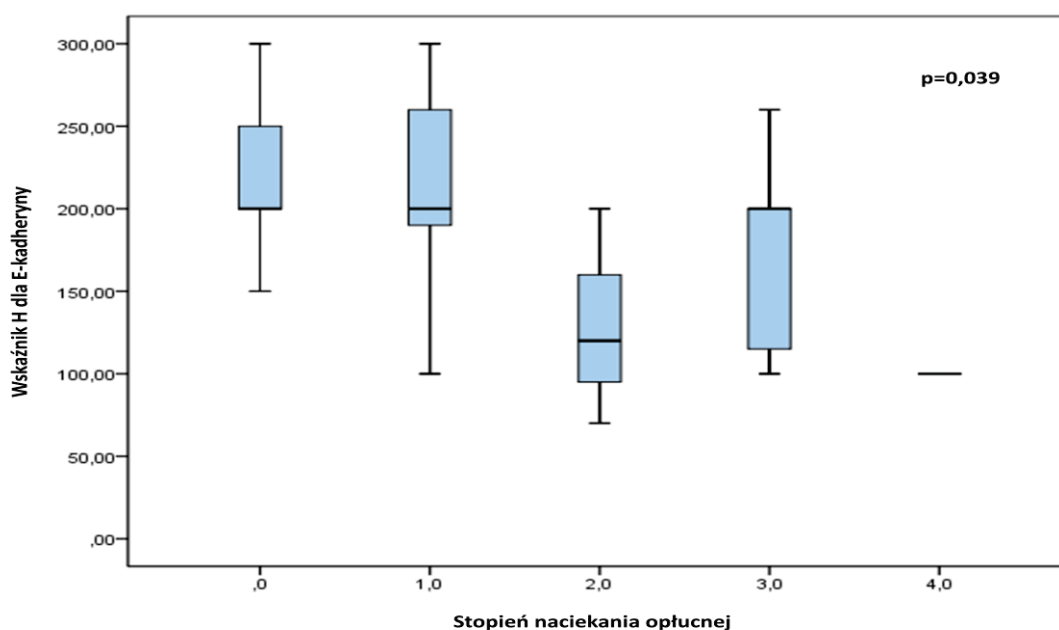
Rycina 21. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla E-kadheryny od typu histologicznego raka płuca (1 – rak płaskonabłonkowy, 2 – rak gruczołowy, 3 – rak wielkokomórkowy).

Ponadto potwierdzono znamienne niższy poziom E-kadheryny w nowotworach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej [(G3); $p=0,01$, Ryc. 22].



Rycina 22. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla E-kadheryny od stopnia złośliwości histologicznej raka płuca (1 – G1, 2 – G2, 3 – G3).

Wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy poziomem immunohistochemicznej ekspresji E-kadheryny analizowanej jako zmienna ciągła a stopniem naciekania opłucnej ($p=0,039$), wykazując znamienne niższy poziom białka w przypadkach rozległego zajęcia opłucnej (Ryc. 23).



Rycina 23. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla E-kadheryny od stopnia naciekania opłucnej (0 – PL0, 1 – PL1, 2 – PL2, 3 – PL3, 4 – brak danych).

W przeprowadzonym badaniu nie wykazano zależności pomiędzy poziomem E-kadheryny analizowanej jako zmienna ciągła a pozostałymi cechami klinicznymi i patologicznymi (wiekiem i płcią chorych, cechą T, cechą N, stopniem zaawansowania patologicznego nowotworu, średnicą guza pierwotnego oraz odsetkiem martwicy w utkaniu nowotworu ($p>0,05$, tabela nr 7).

Tabela 7. Zależność poziomu E-kadheryny od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.

Cecha kliniczna lub patologiczna	p	r
Wiek	0,452	-0,053
Płeć	0,099	
Status palenia papierosów	0,103	
Typ histologiczny raka płuca (WHO, 2004)	0,001	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego (WHO, 2004)	0,264	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego (WHO, 2015)	0,831	
Cecha T	0,778	
Cecha N	0,165	
Stopień zaawansowania patologicznego nowotworu	0,470	
Stopień zróżnicowania histologicznego (WHO, 2004)	0,010	
Stopień zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego (WHO, 2015)	0,745	
Średnica guza pierwotnego	0,339	-0,067
Odsetek martwicy w utkaniu guza pierwotnego	0,099	-0,115
Stopień naciekania opłucnej	0,039	

Przyjmując za punkt odcięcia wartość mediany wskaźnika H dla E-kadheryny nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy poziomem białka a klinicznymi i patologicznymi cechami analizowanej grupy chorych (wszystkie uzyskane wartości $p>0,05$, tab.8).

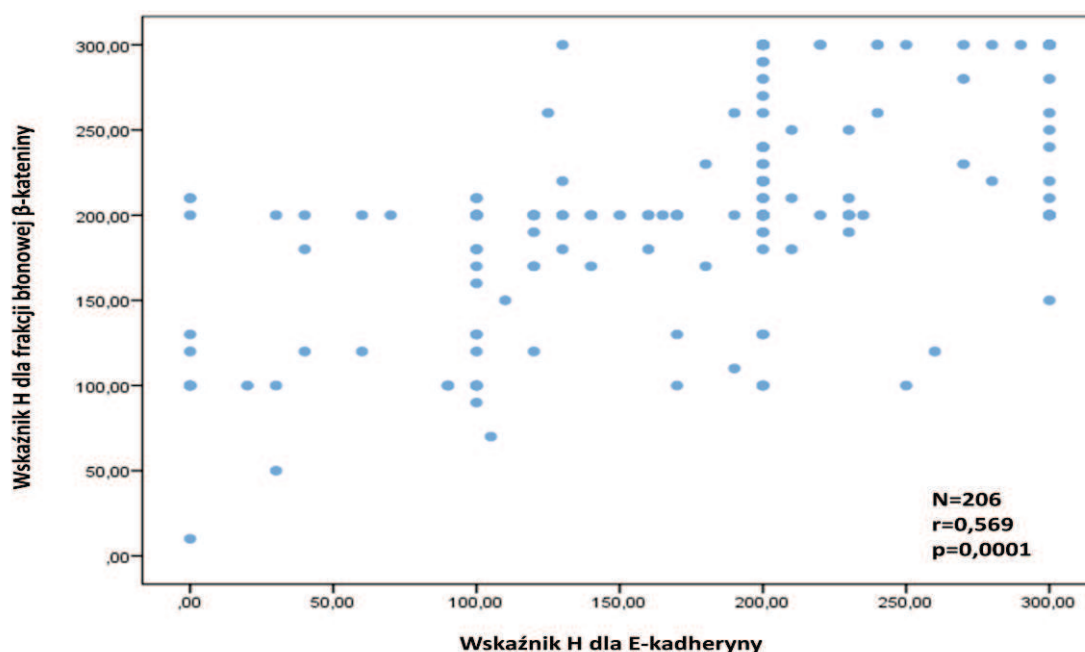
Tabela 8. Zależność wskaźnika H dla E-kadheryny od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.

Poziom E-kadheryny (wskaźnik H)				
Charakterystyka		≤200	>200	p
Liczba chorych z wynikiem barwienia IHC /liczba chorych (%)	206/208 (99%)	129 (62%)	77 (37%)	
Wiek				0,492
Mediana	62	62	62	
Zakres	40,6-80,5	40,6-79,9	45,1-80,5	
Płeć, n (%)				0,273
Kobiety	68 (32,7%)	39 (19%)	29 (14%)	
Mężczyźni	140 (67,3%)	90 (43,7%)	48 (23,3%)	
Typ histologiczny raka płuca, n (%)				0,076
Płaskonabłonkowy	108 (52%)	75 (36,5%)	33 (16%)	
Gruzołowy	97 (46,6%)	53 (25,7%)	42 (20,3%)	
Wielkokomórkowy	3 (1,4%)	1 (0,5%)	2 (1%)	
Stopień zaawansowania patologicznego nowotworu, n (%)				0,147
IA	38 (18,3%)	24 (11,6%)	13 (6,3%)	
IB	58 (27,9%)	36 (17,5%)	21 (10,2%)	
IIA	45 (21,6%)	22 (10,7%)	23 (11,2%)	
IIB	28 (13,5%)	22 (10,7%)	6 (2,9%)	
IIIA	39 (18,8%)	25 (12,1%)	14 (6,8%)	
IIIB	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Stopień złośliwości histologicznej, n (%)				0,2
G1	11 (5,3%)	5 (2,4%)	6 (2,9%)	
G2	140 (67,3%)	85 (41,3%)	55 (26,7%)	
G3	57 (27,4%)	39 (18,9%)	16 (7,8%)	
Cecha T, n (%)				0,7
T1a	20 (9,6%)	13 (6,3%)	7 (3,4%)	
T1b	32 (15,4%)	18 (8,7%)	13 (6,3%)	
T2a	83 (39,9%)	51 (24,7%)	31 (15%)	
T2b	38 (18,3%)	23 (11,2%)	15 (7,3%)	
T3	34 (16,3%)	24 (11,7%)	10 (4,9%)	

T4	1 (0,5%)	0(0%)	1 (0,5%)	
Cecha N, n (%)				0,364
N0	127 (61%)	79 (38,3%)	47 (22,8%)	
N1	48 (23,1%)	26 (12,6%)	21 (10,2%)	
N2	31 (14,9%)	22 (10,7%)	9 (4,4%)	
N3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Nx	2 (1%)	2 (1%)	0 (0%)	
Średnica guza (cm)				0,215
Średnia	4,42	4,42	4,1	
Zakres	1-13	1-13	1,4-11	
Odsetek martwicy w utkaniu guza pierwotnego (%)	0-80	0-80	0-80	0,517
Stopień naciekania opłucnej				0,146
PL0	119 (57,2%)	66 (31,8%)	51 (24,8%)	
PL1	74 (35,6%)	50 (24,4%)	24 (11,7%)	
PL2	3 (1,4%)	3 (1,5%)	0 (0%)	
PL3	11 (5,3)	9 (4,5%)	2 (1%)	
PLx	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0(0%)	

Przy ustaleniu punktu odcięcia wskaźnika H dla E-kadheryny równego 100 wykazano znamiennej statystycznie zależność pomiędzy poziomem białka a stopniem histologicznego różnicowania nowotworu ($p=0,015$) oraz stopniem naciekania opłucnej ($p=0,04$).

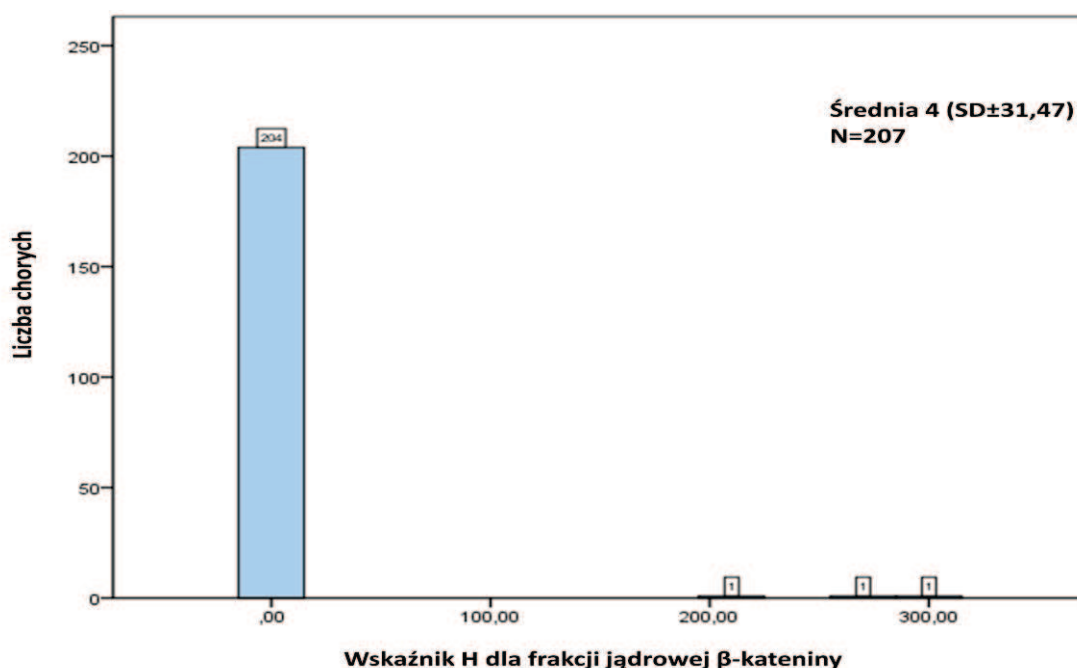
Wykazano słabą dodatnią korelację pomiędzy poziomem E-kadheryny białka Wnt2 ($r=0,151$, $p=0,03$) oraz względnie silną dodatnią korelację pomiędzy poziomem analizowanego białka a poziomem frakcji błonowej β -kateniny ($r=0,569$, $p=0,0001$, Ryc. 24).



Rycina 24. Wykres przedstawiający korelację między wskaźnikiem H dla E-kadheryny i wskaźnikiem H dla frakcji błonowej β -kateniny.

1.4. Ocena poziomu frakcji jądrowej β -kateniny

Mediana wartości wskaźnika H dla frakcji jądrowej β -kateniny nie została osiągnięta, natomiast średnia wyniosła 4. W materiale tkankowym pochodzącym z 204 (98,5%) analizowanych raków płuca wartość wskaźnika H wyniosła ≤ 200 , natomiast w przypadku 3 (1,4%) osiągnęła wartość > 200 . Przyjmując wynik wskaźnika H równy 100 lub 10 jako punkt odcięcia otrzymano analogiczny (jak powyżej) podział procentowy analizowanej populacji. 3 przypadki z wskaźnikiem H > 200 dla frakcji jądrowej zakwalifikowano jako wykazujące obecność jądrowej frakcji β -kateniny. Średnia wartość wskaźnika H dla płaskonabłonkowych raków płuca wyniosła 3, dla raków gruczołowych – 5, natomiast w rakach wielkokomórkowych nie wykazano barwienia na obecność frakcji jądrowej β -kateniny. Szczegółową dystrybucję wyników wskaźnika H dla frakcji jądrowej β -kateniny w analizowanych przypadkach przedstawia rycina nr 25.



Rycina 25. Histogram przedstawiający rozkład wskaźnika H dla frakcji jądrowej β-kateniny.

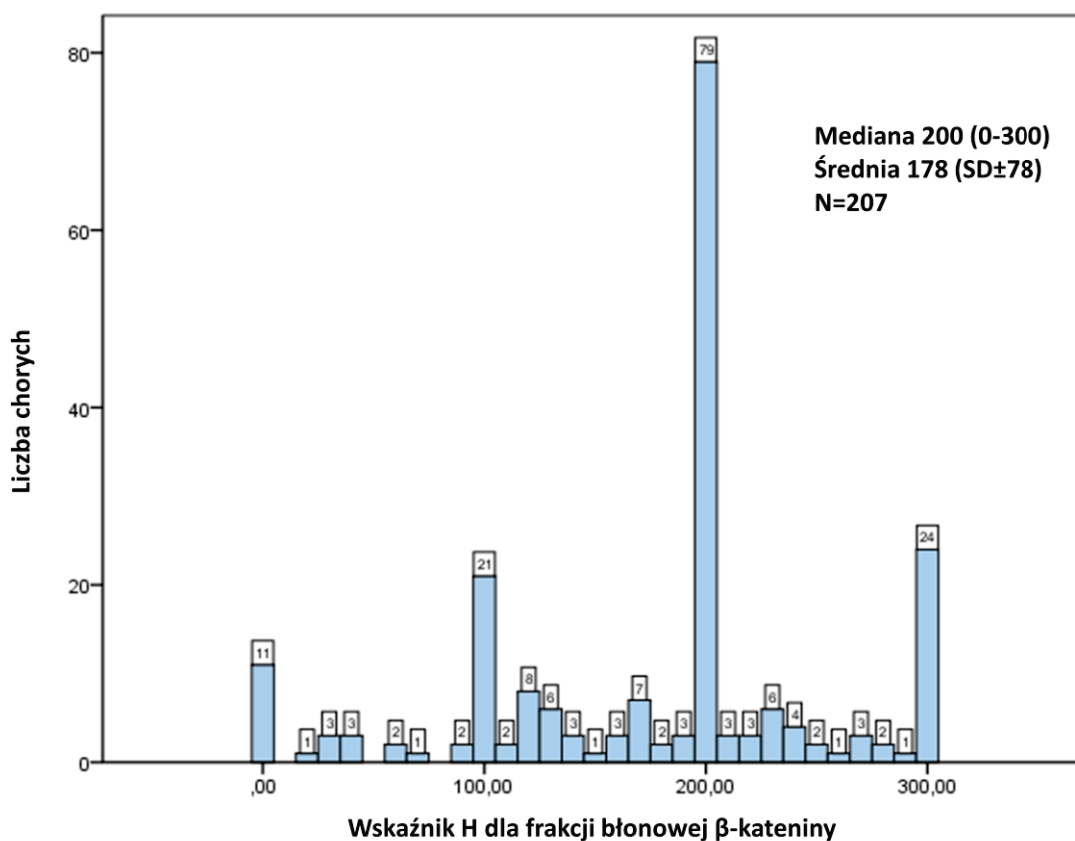
Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy poziomem analizowanego białka a klinicznymi i patologicznymi cechami w analizowanej grupie chorych (wszystkie uzyskane wartości $p > 0,05$, tab.9).

Tabela 9. Zależność poziomu frakcji jądrowej β-kateniny od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.

Cecha kliniczna lub patologiczna	p	r
Wiek	0,123	0,108
Płeć	0,215	
Status palenia papierosów	0,293	
Typ histologiczny raka płuca (WHO, 2004)	0,777	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego (WHO, 2004)	0,896	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego (WHO, 2015)	0,897	
Cecha T	0,795	
Cecha N	0,737	
Stopień zaawansowania patologicznego nowotworu	0,824	
Stopień zróżnicowania histologicznego (WHO, 2004)	0,084	
Stopień zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego (WHO, 2015)	0,282	
Średnica guza pierwotnego	0,437	-0,054
Odsetek martwicy w utkaniu guza pierwotnego	0,411	-0,057
Stopień naciekania opłucnej	0,305	

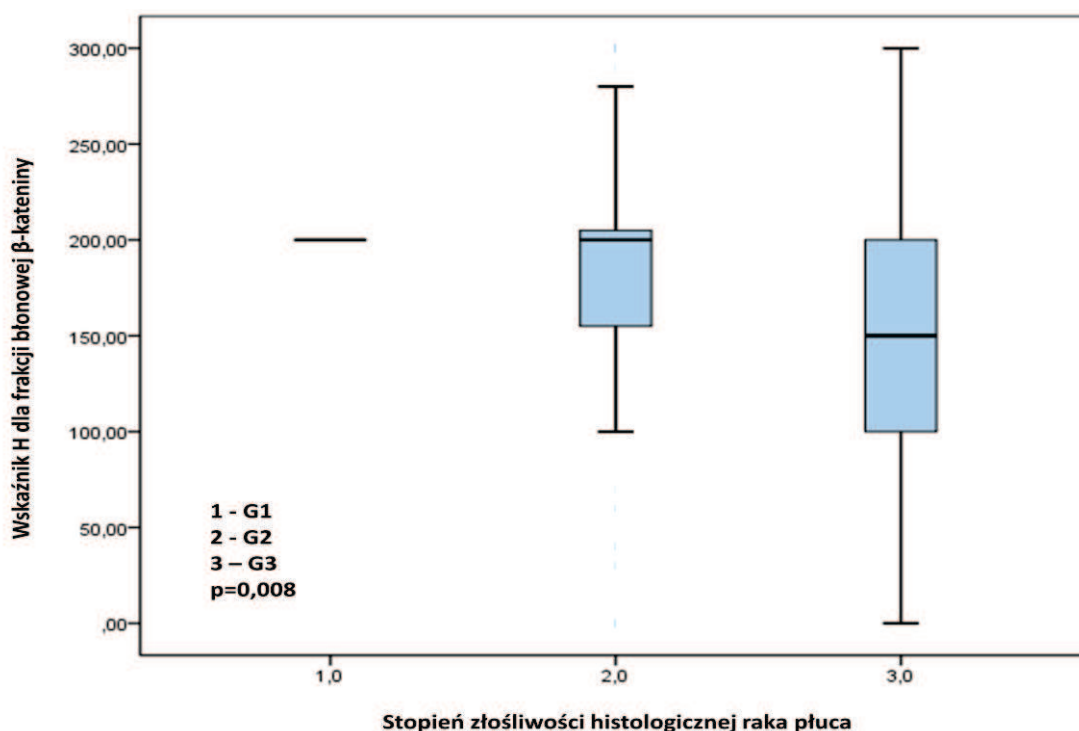
1.5. Ocena poziomu frakcji błonowej β -kateniny

Mediana wartości wskaźnika H dla frakcji błonowej β -kateniny wyniosła 200 (zakres: 0-300), natomiast średnia wyniosła 178 (± 78). W materiale tkankowym pochodzącym z 79 (38,2%) analizowanych raków płuca wartość wskaźnika H wyniosła dokładnie 200, w 79 (38,2%) przypadkach osiągnęła wartość niższą od mediany, natomiast w 49 (23,7%) – wartość wyższą od mediany. Odczyn immunohistochemiczny interpretowano jako dodatni, gdy wartość wskaźnika H wyniosła >200 [49 przypadków (23,7%)]. W 43 (20,8%) przypadkach wartość wskaźnika H wyniosła ≤ 100 , natomiast w 164 (79,2%) mieściła się w zakresie 101-300. W materiale tkankowym ze 197 (95,2%) guzów oceniona wartość wskaźnika H wyniosła powyżej 10, w pozostałych 10 (4,8%) przypadkach ≤ 10 . Średnia wartość wskaźnika H dla płaskonabłonkowych raków płuca wyniosła 174 (± 80), dla raków gruczołowych – 185 (± 74), natomiast dla raków wielkomórkowych – 123 (± 157). Szczegółową dystrybucję wyników wskaźnika H dla frakcji błonowej β -kateniny przedstawia rycina nr 26.



Rycina 26. Histogram przedstawiający rozkład wskaźnika H dla frakcji błonowej β -kateniny.

Analizując poziom ekspresji frakcji błonowej β -kateniny jako zmienną ciągłą wykazano znamiennej statystycznie zależność od stopnia zróżnicowania histologicznego ($p=0,008$) – nowotwory o wyższym stopniu złośliwości histologicznej wykazywały niższą ekspresję analizowanego białka (Ryc. 27).



Rycina 27. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla frakcji błonowej β -kateniny od stopnia złośliwości histologicznej raka płuca (1 – G1, 2 – G2, 3 – G3).

Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy poziomem immunohistochemicznej ekspresji analizowanego białka a innymi klinicznymi i patologicznymi cechami badanej grupy chorych (wszystkie uzyskane wartości $p>0,05$; tab. 10).

Tabela 10. Zależność poziomu frakcji błonowej β -kateniny od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.

Cecha kliniczna lub patologiczna	p	r
Wiek	0,59	-0,038
Płeć	0,661	
Status palenia papierosów	0,514	
Typ histologiczny raka płuca (WHO, 2004)	0,435	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego (WHO, 2004)	0,423	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego (WHO, 2015)	0,773	
Cecha T	0,670	
Cecha N	0,778	
Stopień zaawansowania patologicznego nowotworu	0,272	
Stopień zróżnicowania histologicznego (WHO, 2004)	0,008	
Stopień zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego (WHO, 2015)	0,368	
Średnica guza pierwotnego	0,145	-0,102
Odsetek martwicy w utkaniu guza pierwotnego	0,055	0,134
Stopień naciekania opłucnej	0,618	

Przyjmując jako punkt odcięcia wartość mediany wskaźnika H dla frakcji błonowej β -kateniny nie wykazano, poza zależnością od odsetka martwicy w utkaniu guza ($p=0,018$), istotnych statystycznie zależności (tab. 11).

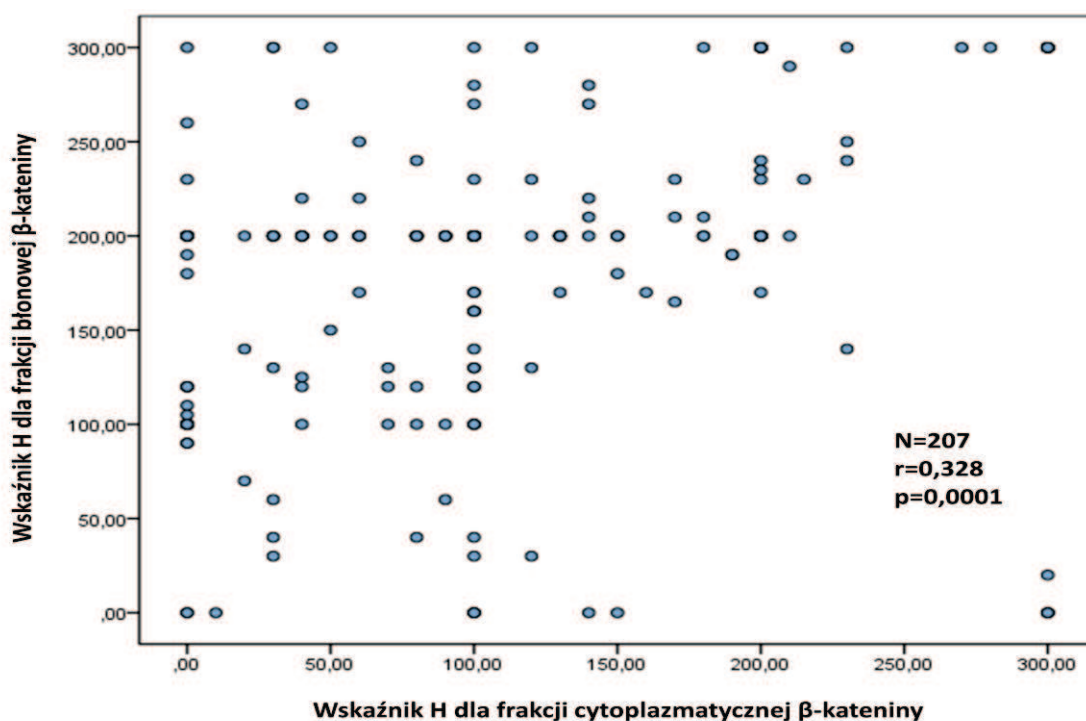
Tabela 11. Zależność wskaźnika H dla frakcji błonowej β -kateniny od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.

Poziom frakcji błonowej β -kateniny (wskaźnik H)				
Charakterystyka		≤ 200	> 200	p
Liczba chorych z wynikiem barwienia IHC/liczba chorych (%)	207/208 (99,5%)	158 (76%)	49 (23,5%)	
Wiek				0,572
Mediana	62	62	62	
Zakres	40,6-0,5	40,6-80,5	50,1-78,4	
Płeć, n (%)				0,973
Kobiety	68 (32,7%)	52 (25,1%)	16 (7,7%)	
Mężczyźni	140 (67,3%)	106 (51,2%)	33 (16%)	

Typ histologiczny raka płuca, n (%)				0,829
Płaskonabłonkowy	108 (52%)	84 (40,5%)	24 (11,6%)	
Gruzołowy	97 (46,6%)	72 (34,8%)	24 (11,6%)	
Wielkokomórkowy	3 (1,4%)	2 (1%)	1 (0,5%)	
Stopień zaawansowania patologicznego nowotworu, n (%)				0,566
IA	38 (18,3%)	26 (12,6%)	11 (5,3%)	
IB	58 (27,9%)	42 (20,3%)	16 (7,7%)	
IIA	45 (21,6%)	36 (17,4%)	9 (4,3%)	
IIB	28 (13,5%)	24 (11,6%)	4 (1,9%)	
IIIA	39 (18,8%)	30 (14,5%)	9 (4,3%)	
IIIB	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Stopień złośliwości histologicznej, n (%)				0,788
G1	11 (5,3%)	9 (4,3%)	2 (1%)	
G2	140 (67,3%)	105 (50,7%)	35 (17%)	
G3	57 (27,4%)	44 (21,2%)	12 (5,8%)	
Cecha T, n (%)				0,94
T1a	20 (9,6%)	15 (7,2%)	5 (2,4%)	
T1b	32 (15,4%)	23 (11,1%)	8 (3,9%)	
T2a	83 (39,9%)	63 (30,4%)	20 (9,7%)	
T2b	38 (18,3%)	28 (13,5%)	10 (4,8%)	
T3	34 (16,3%)	28 (13,5%)	6 (3%)	
T4	1 (0,5%)	1(0,5%)	0 (0%)	
Cecha N, n (%)				0,542
N0	127 (61%)	93 (45%)	34 (16,4%)	
N1	48 (23,1%)	38 (18,3%)	9 (4,3%)	
N2	31 (14,9%)	25 (12%)	6 (2,9%)	
N3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Nx	2 (1%)	2 (1%)	0 (0%)	
Średnica guza(cm)				
Średnia	4,42	4,42	3,8	0,978
Zakres	1-13	1-13	1,5-10	
Odsetek martwicy w utkaniu guza pierwotnego (%)	0-80	0-80	0-80	0,018

Stopień naciekania opłucnej				0,378
PL0	119 (57,2%)	85 (41%)	33 (16%)	
PL1	74 (35,6%)	59 (28,5%)	15 (7,2%)	
PL2	3 (1,4%)	3 (1,4%)	0 (0%)	
PL3	11 (5,3)	10 (4,8%)	1 (0,5%)	
PLx	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0(0%)	

Wykazano słabą dodatnią korelację pomiędzy wskaźnikiem H dla błonowej i cytoplazmatycznej frakcji β -kateniny ($r=0,328$, $p=0,0001$, Ryc.28).

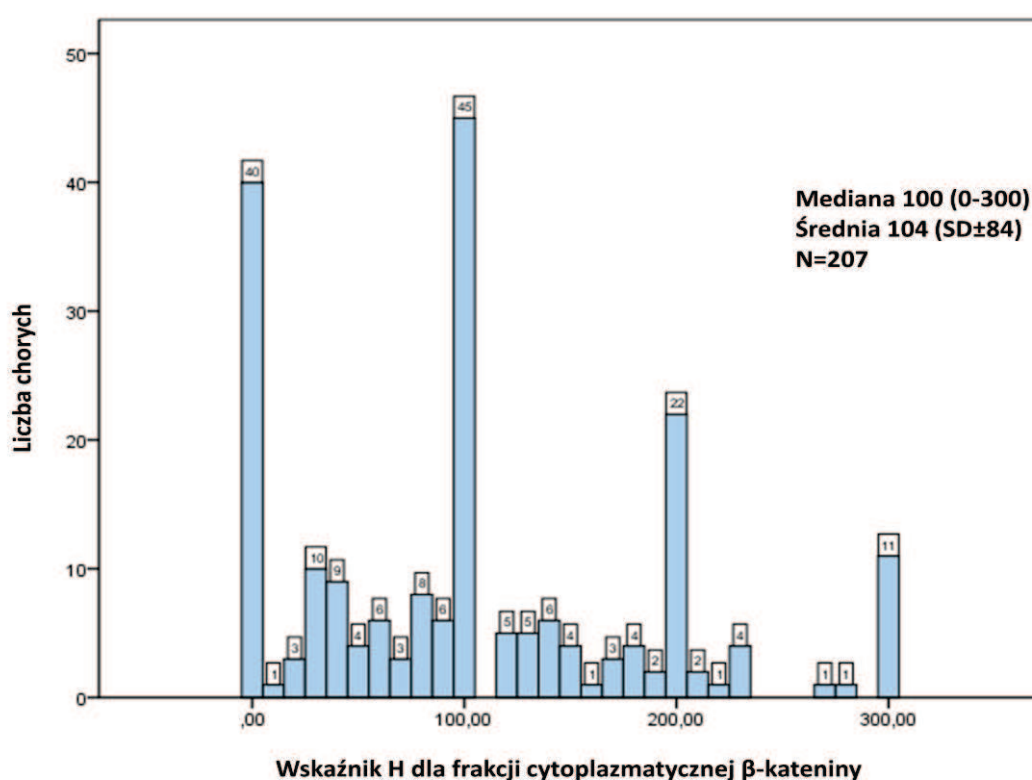


Rycina 28. Wykres przedstawiający korelację pomiędzy wskaźnikami H dla frakcji błonowej i frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny.

1.6. Ocena poziomu frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny

Mediana wartości wskaźnika H dla frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny wyniosła 100 (zakres: 0-300), natomiast średnia wyniosła 104 (± 84). W materiale tkankowym pochodzącym ze 45 (21,7%) analizowanych raków płuca wartość wskaźnika H wyniosła równo 100,

w przypadku 90 (43,5%) osiągnęła wartość niższą od mediany, natomiast w 72 (34,8%) – wyższą od mediany. Odczyn immunohistochemiczny interpretowano jako dodatni, gdy wartość wskaźnika H wyniosła >100 (punkt odcięcia na poziomie mediany). Pozytywny wynik reakcji barwnych uzyskano w 72 przypadkach (34,8%). W materiale tkankowym ze 166 (80,2%) guzów oceniona wartość wskaźnika H wyniosła powyżej 10. Średnia wartość wskaźnika H dla płaskonabłonkowych raków płuca wyniosła $174(\pm 80)$, dla raków gruczołowych – $185 (\pm 74)$, natomiast dla raków wielkomórkowych – $123 (\pm 157)$. Szczegółową dystrybucję wyników wskaźnika H dla frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny przedstawia rycina nr 25.



Rycina 29. Histogram przedstawiający rozkład wskaźnika H dla frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny.

Analizując poziom frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny (wskaźnik H) jako zmienną ciągłą nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy poziomem ekspresji białka a cechami analizowanej populacji (wszystkie uzyskane wartości $p > 0,05$, tab. 12).

Tabela 12. Zależność poziomu frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.

Cecha kliniczna lub patologiczna	p	r
Wiek	0,726	-0,024
Płeć	0,371	
Status palenia papierosów	0,855	
Typ histologiczny raka płuca (WHO, 2004)	0,264	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego (WHO, 2004)	0,810	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego (WHO, 2015)	0,282	
Cecha T	0,379	
Cecha N	0,939	
Stopień zaawansowania patologicznego nowotworu	0,407	
Stopień zróżnicowania histologicznego (WHO, 2004)	0,922	
Stopień zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego (WHO, 2015)	0,071	
Średnica guza pierwotnego	0,118	-0,109
Odsetek martwicy w utkaniu guza pierwotnego	0,073	0,125
Stopień naciekania opłucnej	0,141	

Przyjmując wartość mediany wskaźnika H jako punkt odcięcia dla frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny nie wykazano znamienych statystycznie zależności pomiędzy poziomem białka a klinicznymi i patologicznymi cechami w analizowanej grupie (wszystkie uzyskane wartości $p > 0,05$, tab. 13).

Tabela 13. Zależność wskaźnika H dla frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.

Poziom frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny (wskaźnik H)				
Charakterystyka		≤ 100	> 100	p
Liczba chorych z wynikiem barwienia IHC/liczba chorych (%)	207/208 (99,5%)	135(65%)	72(35%)	
Wiek				0,495
Mediana	62	62	62	
Zakres	40,6-80,5	41-79,4	40,6-80,5	
Płeć, n (%)				0,466
Kobiety	69 (43,2%)	42(20,2%)	26 (12,7%)	
Mężczyźni	139 (66,8%)	93 (44,9%)	46 (22,2%)	

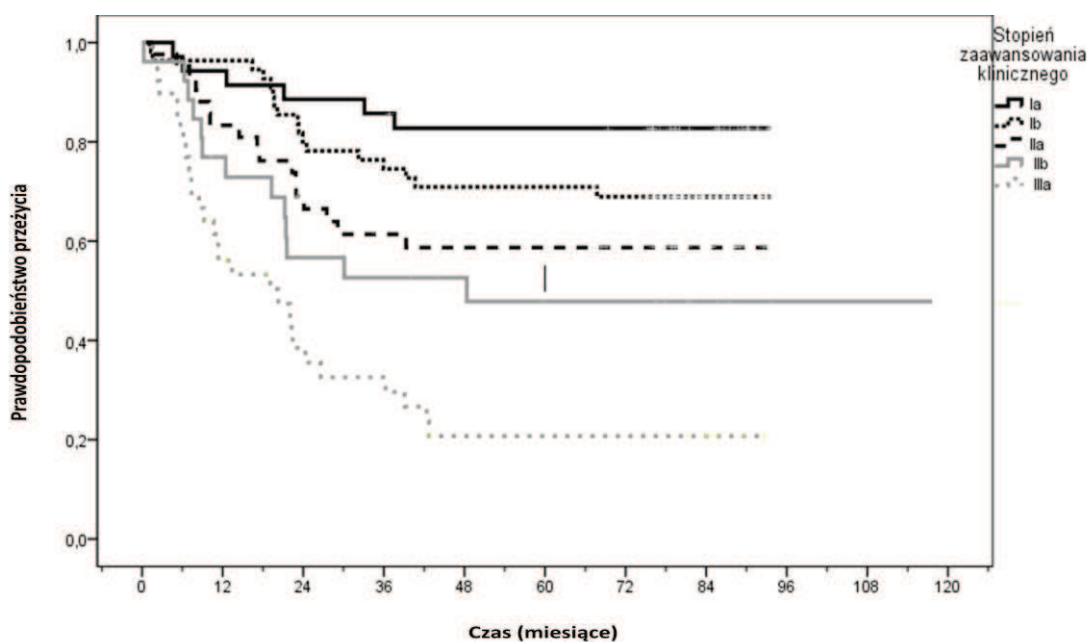
Typ histologiczny raka płuca, n (%)				0,063
Płaskonabłonkowy	108 (52%)	64 (31%)	44 (21%)	
Gruzołowy	97 (46,6%)	70 (34%)	26 (12,5%)	
Wielkokomórkowy	3 (1,4%)	1 (0,5%)	2 (1%)	
Stopień zaawansowania patologicznego nowotworu, n (%)				0,42
IA	38 (18,3%)	22 (10,6%)	15 (7,3%)	
IB	58 (27,9%)	34 (16,4%)	24 (11,6%)	
IIA	45 (21,6%)	34 (16,4%)	11 (5,3%)	
IIB	28 (13,5%)	19 (9,2%)	9 (4,3%)	
IIIA	39 (18,8%)	26 (12,6%)	13 (6,3%)	
IIIB	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Stopień złośliwości histologicznej, n (%)				0,976
G1	11 (5,3%)	7 (3,4%)	4 (2%)	
G2	140 (67,3%)	92 (44,4%)	48 (23,2%)	
G3	57 (27,4%)	36 (17,4%)	20 (9,6%)	
Cecha T, n (%)				0,725
T1a	20 (9,6%)	14 (6,8%)	6 (3%)	
T1b	32 (15,4%)	21 (10,1%)	10 (4,8%)	
T2a	83 (39,9%)	50 (24,1%)	33 (15,9%)	
T2b	38 (18,3%)	24 (11,6%)	14 (6,8%)	
T3	34 (16,3%)	25 (12,1%)	9 (4,3%)	
T4	1 (0,5%)	1(0,5%)	0 (0%)	
Cecha N, n (%)				0,673
N0	127 (61%)	80 (38,6%)	47 (22,7%)	
N1	48 (23,1%)	34 (16,4%)	13 (6,3%)	
N2	31 (14,9%)	20 (9,7%)	11 (5,3%)	
N3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Nx	2 (1%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	
Średnica guza(cm)				0,978
Średnia	4,42	4,42	3,7	
Zakres	1-13	1-13	1,2-10	
Odsetek martwicy w utkaniu guza pierwotnego (%)	0-80	0-80	0-80	0,018

Stopień naciekania opłucnej				0,717
PL0	119 (57,2%)	76 (36,7%)	42 (20,3%)	
PL1	74 (35,6%)	50 (24,1%)	24 (11,6%)	
PL2	3 (1,4%)	2 (1%)	1 (0,5%)	
PL3	11 (5,3)	7 (3,4%)	4 (1,9%)	
PLx	1 (0,5%)	0(0%)	1(0,5%)	

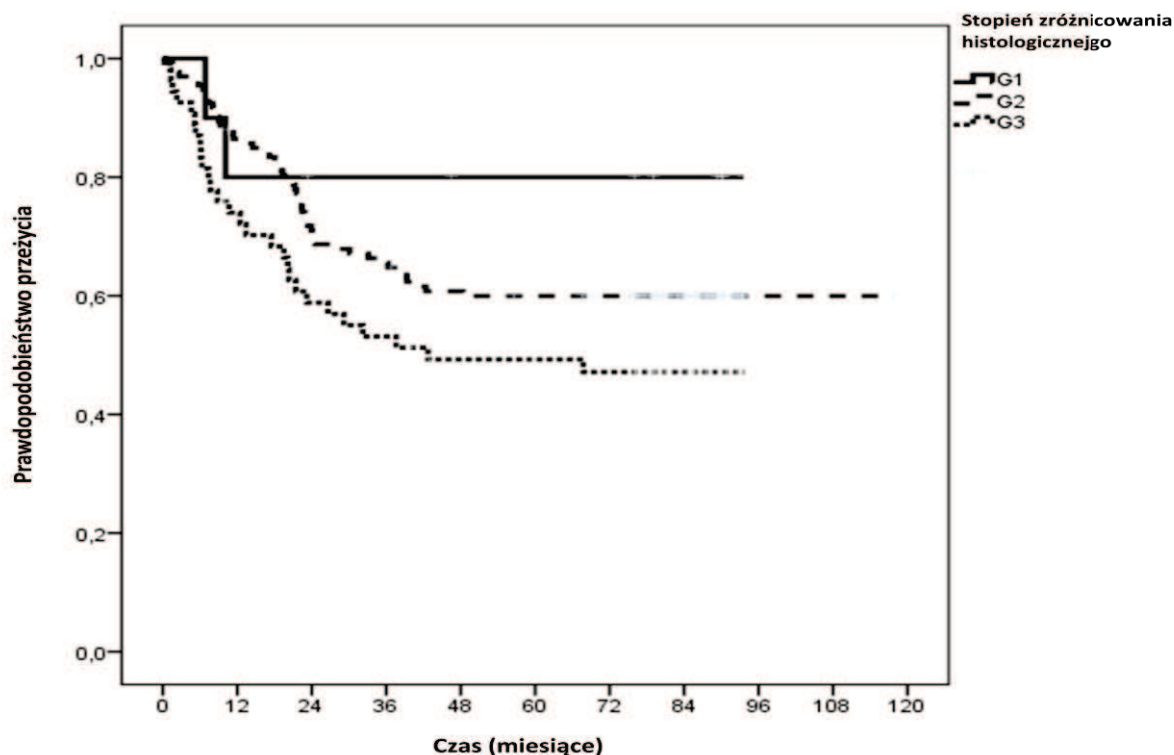
2. Analiza przeżycia

Mediana czasu obserwacji wyniosła 68 miesięcy (zakres: 0,2-118 miesięcy). U większości analizowanych chorych nie doszło do nawrotu choroby (N=115, 55,3%). U 34 chorych (16,3%) doszło do ujawnienia przerzutów odległych. Wznowę miejscową stwierdzono u 30 chorych (14,4%), wznowę regionalną w węzłach chłonnych śródpiersia – u 26 (12,5%), natomiast wznowę regionalną w węzłach chłonnych nadobojczykowych jedynie u 4 chorych (1,9%). W analizowanej grupie odnotowano 82 zgony (39,4%).

W analizie przeżycia z wykorzystaniem jednoczynnikowego modelu regresji Coxa wykazano znamioną statystycznie zależność całkowitego czasu przeżycia od cechy T ($p<0,0001$), średnicy guza pierwotnego ($p<0,0001$), stopnia naciekania opłucnej ($p=0,001$), cechy N ($p<0,0001$), stopnia zaawansowania patologicznego nowotworu ($p<0,0001$, Ryc. 30) oraz stopnia zróżnicowania histologicznego nowotworu ($p=0,023$, tab. 14, Ryc. 31).



Rycina 30. Prawdopodobieństwo przeżycia (OS, ang. *overall survival*) w zależności od stopnia zaawansowania patologicznego NDRP.



Rycina 31. Prawdopodobieństwo przeżycia (OS, ang. *overall survival*) w zależności od stopnia zróżnicowania histologicznego NDRP (1 – G1, 2 – G2, 3 – G3).

Tabela 14. Analiza jednoczynnikowa zależności czasu przeżycia całkowitego od cech klinicznych i patologicznych w badanej grupie chorych.

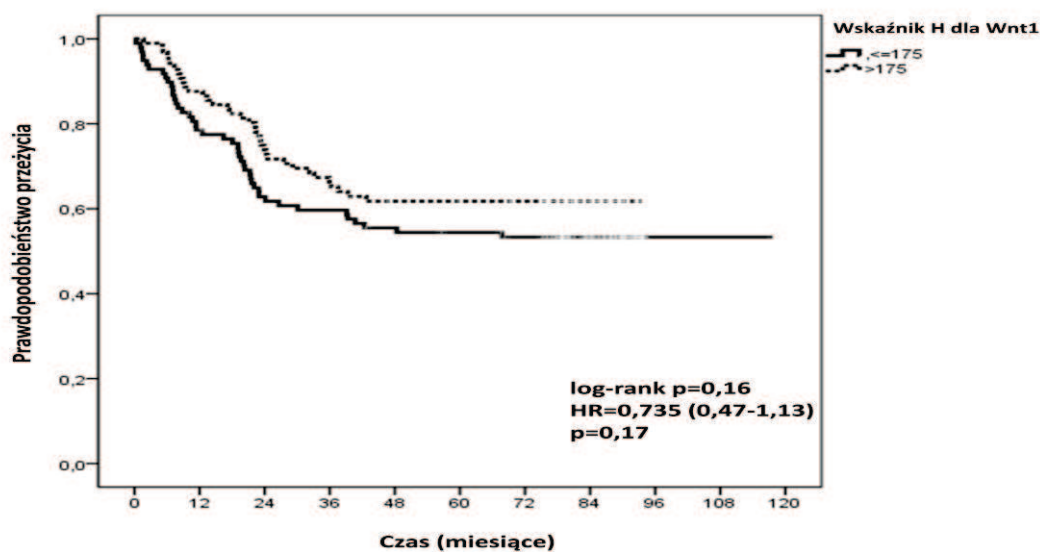
Cecha kliniczna lub patologiczna	HR	95% CI	p (model Coxa)
Wiek	0,997	0,97-1,02	0,79
Płeć	1,095	0,68-1,75	0,7
Typ histologiczny raka płuca (WHO, 2004)	0,88	0,58-1,33	0,54
Cecha T	1,479	1,21-1,79	<0,0001
Cecha N	2,233	1,71-2,91	<0,0001
Stopień zaawansowania patologicznego nowotworu	1,65	1,4-1,94	<0,0001
Stopień zróżnicowania histologicznego (WHO, 2004)	1,61	1,06-2,42	0,02
Średnica guza pierwotnego	1,183	1,08-1,28	<0,0001
Odsetek martwicy w utkaniu guza pierwotnego	0,999	0,98-1,01	0,91
Stopień naciekania opłucnej	1,523	1,18-1,96	<0,001

W analizie z wykorzystaniem jednoczynnikowego modelu regresji Coxa wykazano znamiennej statystycznie zależność czasu przeżycia wolnego od nawrotu od cechy T ($p<0,0001$), średnicy guza pierwotnego ($p<0,0001$), stopnia naciekania opłucnej ($p<0,0001$), cechy N ($p<0,0001$) oraz stopnia zaawansowania patologicznego nowotworu ($p<0,0001$, tab. 15).

Tabela 15. Analiza jednoczynnikowa zależności czasu przeżycia wolnego od nawrotu od cech klinicznych i patologicznych w badanej grupie chorych.

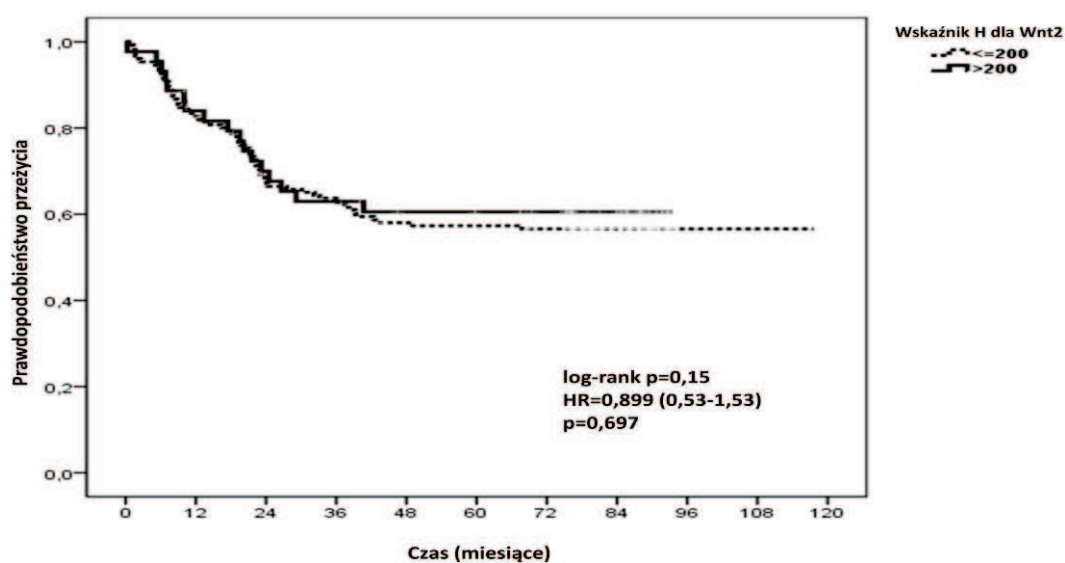
Cecha kliniczna lub patologiczna	HR	95%CI	p (model Coxa)
Wiek	0,986	0,96-1,01	0,25
Płeć	1,092	0,69-1,7	0,69
Typ histologiczny raka płuca (WHO, 2004)	0,883	0,59-1,3	0,53
Cecha T	1,46	1,21-1,74	<0,0001
Cecha N	2,357	1,82-3,03	<0,0001
Stopień zaawansowania patologicznego nowotworu	1,744	1,48-2,04	<0,0001
Stopień zróżnicowania histologicznego (WHO, 2004)	1,387	0,93-2,05	0,1
Średnica guza pierwotnego	1,187	1,09-1,28	<0,0001
Odsetek martwicy w utkaniu guza pierwotnego	1,001	0,99-1,01	0,85
Stopień naciekania opłucnej	1,622	1,27-2,05	<0,0001

W jednoczynnikowym modelu regresji Coxa nie stwierdzono zależności czasu przeżycia wolnego od nawrotu (RFS) oraz czasu całkowitego przeżycia (OS) od poziomu białka Wnt1 w guzie (punkt odcięcia na poziomie mediany – wskaźnik $H \leq 175$ vs. >175 ; odpowiednio $p=0,183$; $HR=0,754$ i $p=0,168$; $HR=0,735$, Ryc. 32). Nie wykazano także znamiennych statystycznie różnic w RFS i OS dla punktów odcięcia wskaźnika $H=100$ (odpowiednio $p=0,157$; $HR=0,722$ i $p=0,106$; $HR=0,68$) oraz wskaźnika $H=200$ ($p=0,281$; $HR=0,684$ i $p=0,249$; $HR=0,651$). Poziom białka Wnt1 analizowany jako zmienna ciągła również nie miał związku z czasem przeżycia wolnym od nawrotu oraz czasem całkowitego przeżycia (odpowiednio $p=0,265$; $HR=0,998$ oraz $p=0,164$; $HR=0,997$).



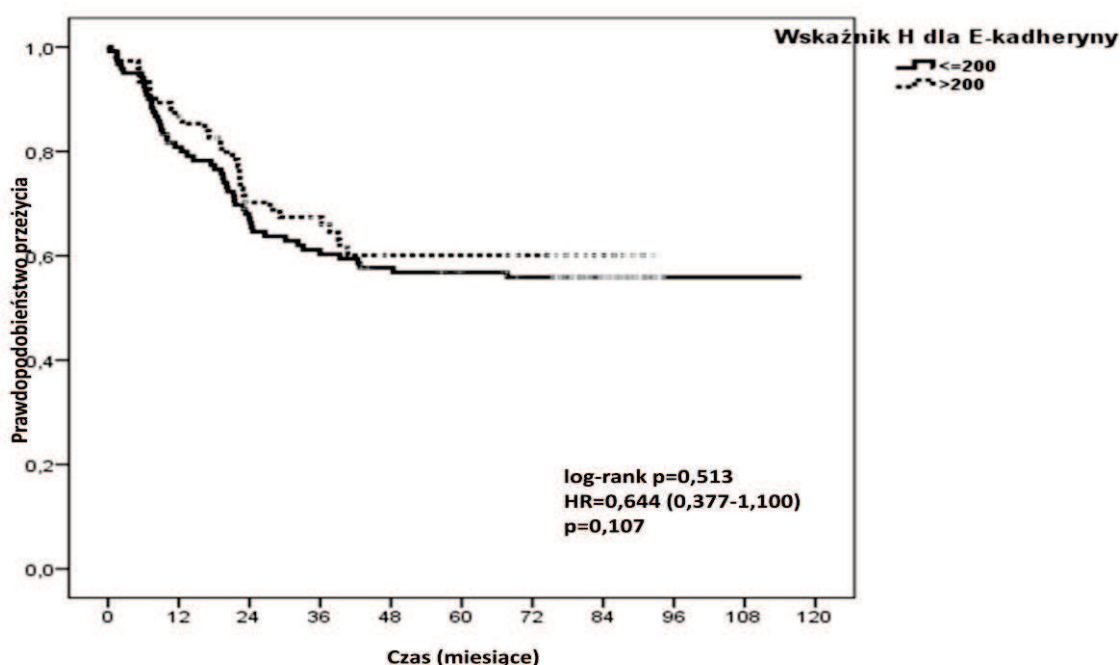
Rycina 32. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od poziomu białka Wnt1.

W jednoczynnikowym modelu regresji Coxa nie wykazano zależności czasu przeżycia wolnego od nawrotu (RFS) oraz całkowitego czasu przeżycia (OS) od poziomu białka Wnt2 w guzie (punkt odcięcia na poziomie mediany – wskaźnik $H \leq 175$ vs. >175 ; odpowiednio $p=0,624$; $HR=0,881$ i $p=0,697$; $HR=0,899$, Ryc. 33). Nie wykazano także znamienych statystycznie różnic w RFS i OS dla punktów odcięcia wskaźnika $H=100$ (odpowiednio $p=0,562$; $HR=1,306$ i $p=0,435$; $HR=1,492$). Poziom białka Wnt2 analizowany jako zmienna ciągła również nie miał związku z czasem przeżycia wolnego od nawrotu i czasem całkowitego przeżycia (odpowiednio $p=0,503$; $HR=0,998$ oraz $p=0,695$; $HR=0,999$).



Rycina 33. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od poziomu białka Wnt2.

W jednoczynnikowym modelu regresji Coxa nie stwierdzono zależności czasu przeżycia wolnego od nawrotu (RFS) oraz całkowitego czasu przeżycia (OS) od poziomu E-kadheryny w guzie (punkt odcięcia na poziomie mediany – wskaźnik $H \leq 200$ vs. >200 ; odpowiednio $p=0,604$; $HR=0,893$ oraz $p=0,107$; $HR=0,644$, Ryc. 34). Różnica czasu przeżycia chorych dla punktu odcięcia wskaźnika $H=100$ była bliska znamienności statystycznej ($p=0,064$; $HR=0,548$). Wykazano znamiennej statystycznie związek pomiędzy poziomem E-kadheryny analizowanym jako zmienna ciągła i czasem całkowitego przeżycia ($p=0,039$; $HR=0,996$), natomiast nie stwierdzono znamiennej związku z czasem przeżycia wolnego od nawrotu ($p=0,102$; $HR=0,997$).

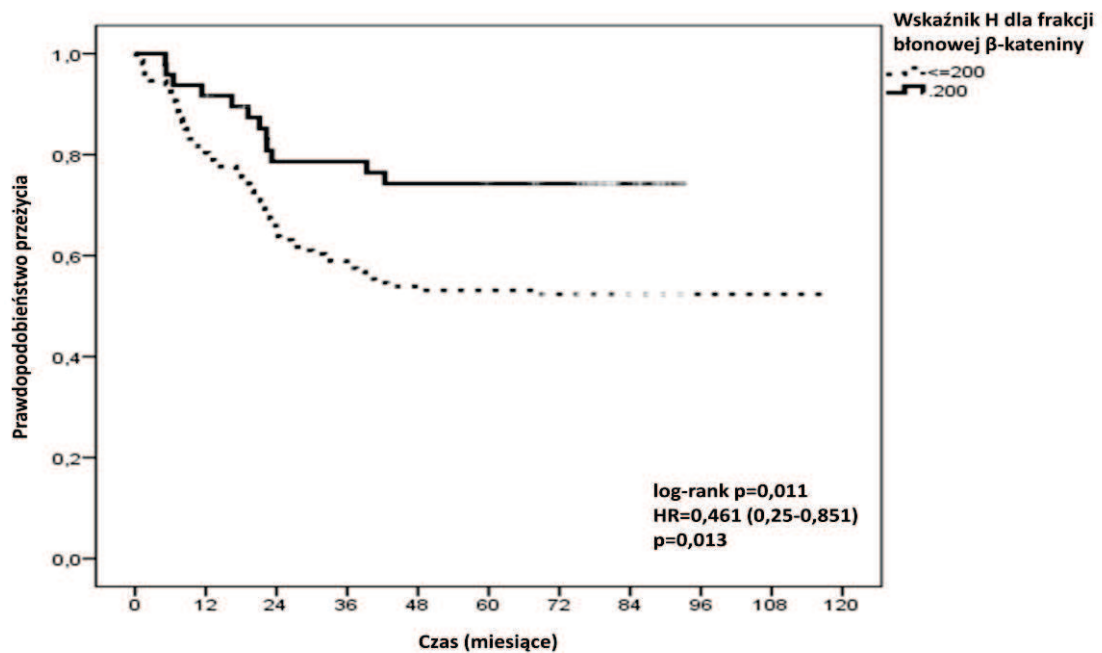


Rycina 34. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od poziomu E-kadheryny.

Dodatni odczyn na obecność frakcji jądrowej β -kateniny w guzie dotyczył jedynie 3 chorych, co uniemożliwiło analizę czasu przeżycia wolnego od nawrotu i czasu całkowitego przeżycia. Spośród trzech powyższych chorych, do nawrotu doszło u 2 osób.

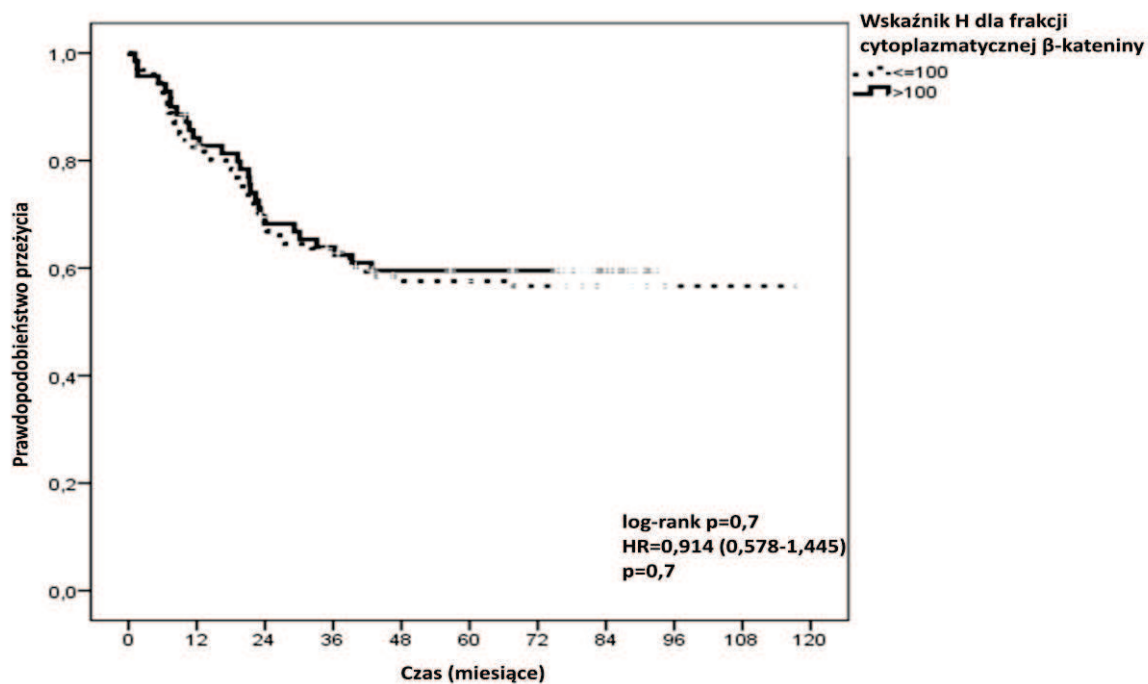
W jednoczynnikowym modelu regresji Coxa wykazano znamiennej zależność czasu przeżycia wolnego od nawrotu (RFS) oraz całkowitego czasu przeżycia (OS) od poziomu frakcji błonowej β -kateniny w guzie (punkt odcięcia na poziomie mediany – wskaźnik $H \leq 200$ vs. >200 ; odpowiednio $p=0,004$; $HR=0,419$ i $p=0,013$; $HR=0,461$, Ryc. 35). Nie wykazano znamiennych

statystycznie różnic w RFS i OS przy ustaleniu punktu odcięcia na poziomie wskaźnika H=100 (odpowiednio $p=0,236$; $HR=0,744$ i $p=0,432$; $HR=0,775$). Poziomfrakcji błonowej β -kateniny analizowany jako zmienna ciągła był znacząco związany z czasem przeżycia wolnym od nawrotu i czasem całkowitego przeżycia (odpowiednio $p=0,006$; $HR=0,997$ oraz $p=0,007$; $HR=0,996$).



Rycina 35. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od poziomu frakcji błonowej β -kateniny.

W jednoczynnikowym modelu regresji Coxa nie stwierdzono zależności czasu przeżycia wolnego od nawrotu (RFS) oraz całkowitego czasu przeżycia (OS) od poziomu frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny w guzie (punkt odcięcia na poziomie mediany – wskaźnik $H \leq 100$ vs. > 100 ; odpowiednio $p=0,609$; $HR=0,893$ i $p=0,7$; $HR=0,914$, Ryc. 36). Poziom frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny analizowany jako zmienna ciągła również nie miał związku z czasem przeżycia wolnym od nawrotu i czasem całkowitego przeżycia (odpowiednio $p=0,481$; $HR=0,999$ oraz $p=0,451$; $HR=0,999$).



Rycina 36. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od poziomu frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny.

W analizie wieloczynnikowej, po uwzględnieniu wpływu wieku, płci, typu histologicznego nowotworu płuca, stopnia zaawansowania patologicznego choroby, nie wykazano istotnego statystycznie związku pomiędzy poziomem białka Wnt1, Wnt2, E-kadheryny oraz 3 frakcji β -kateniny a czasem całkowitego przeżycia (OS) oraz czasem przeżycia wolnego od nawrotu (RFS). Wyniki modelu wstępnego analizy regresji Coxa przedstawiono w tabelach nr 16 i 17.

Tabela 16. Wyniki wieloczynnikowej analizy czasu przeżycia całkowitego (model wstępny).

Zmienna	HR	95%CI	p
Wiek (lata) (zmienna ciągła)	1,002	0,976-1,029	0,876
Płeć (kobieta vs mężczyzna)	1,084	0,643-1,827	0,761
Status palenia (palący vs niepalący)	0,942	0,586-1,513	0,805
Typ histologiczny nowotworu (SCC vs AC vs LCC)	1,069	0,657-1,740	0,788
Stopień zaawansowania klinicznego (I vs II vs III)	1,642	1,379-1,953	<0,0001
Wnt1 (zmienna ciągła)	0,999	0,995-1,003	0,676
Wnt2 (zmienna ciągła)	1,001	0,996-1,006	0,757
E-kadheryna (zmienna ciągła)	0,998	0,994-1,003	0,476
Frakcja jądrowa β-kateniny (zmienna ciągła)	1,002	0,997-1,008	0,419
Frakcja błonowa β-kateniny (zmienna ciągła)	0,998	0,995-1,001	0,225
Frakcja cytoplazmatyczna β-kateniny (zmienna ciągła)	1,001	0,998-1,004	0,632

HR – iloraz ryzyka; CI – przedział ufności; SCC – rak płaskonabłonkowy; AC – rak gruczołowy; LCC – rak wielkokomórkowy

Tabela 17. Wyniki wieloczynnikowej analizy czasu przeżycia wolnego od nawrotu (model wstępny).

Zmienna	HR	95%CI	p
Wiek (lata) (zmienna ciągła)	0,994	0,969-1,019	0,629
Płeć (kobieta vs mężczyzna)	1,094	0,671-1,784	0,719
Status palenia (palący vs niepalący)	1,141	0,719-1,811	0,576
Typ histologiczny nowotworu (SCC vs AC vs LCC)	1031	0,654-1,625	0,896
Stopień zaawansowania klinicznego (I vs II vs III)	1,750	1,478-2,073	<0,0001
Wnt1 (zmienna ciągła)	1,000	0,996-1,004	0,997
Wnt2 (zmienna ciągła)	0,999	0,994-1,004	0,722
E-kadheryna (zmienna ciągła)	0,999	0,995-1,003	0,750
Frakcja jądrowa β-kateniny (zmienna ciągła)	1,002	0,997-1,008	0,412
Frakcja błonowa β-kateniny (zmienna ciągła)	0,998	0,995-1,001	0,159
Frakcja cytoplazmatyczna β-kateniny (zmienna ciągła)	1,001	0,998-1,004	0,543

HR – iloraz ryzyka; CI – przedział ufności; SCC – rak płaskonabłonkowy; AC – rak gruczołowy; LCC – rak wielkokomórkowy

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Rak płuca pozostaje znaczącym wyzwaniem współczesnej onkologii. Mediana całkowitego przeżycia chorych z zaawansowanym lub uogólnionym rakiem płuca wynosi obecnie od 10 do 12 miesięcy [7]. Zastosowanie standardowego leczenia cytostatycznego w pierwszej linii w niewyselekcjonowanej populacji chorych jest związane z obiektywnym odsetkiem odpowiedzi (ORR) na niezadowalającym poziomie około 20-30% oraz czasem przeżycia wolnym od progresji (PFS) wynoszącym około 3,5-5 miesięcy [37]. Poprawa skuteczności terapeutycznej w zaawansowanym raku płuca rozpoczęła się wraz z wprowadzeniem do praktyki klinicznej leczenia ukierunkowanego molekularnie, mającego zastosowanie w wyselekcjonowanej grupie chorych z określonym podtypem nowotworu, charakteryzującym się występowaniem unikalnego zaburzenia molekularnego o potencjale onkogennym. Z danych *Lung Cancer Mutation Consortium* wynika, że zastosowanie adekwatnej terapii celowanej w molekularnie wyselekcjonowanych populacjach chorych wydłuża czas przeżycia do ok. 3 lat, z towarzyszącą znamieną poprawą jakości życia [43]. W leczeniu raka płuca dysponujemy aktualnie możliwością terapeutycznej ingerencji w zaburzoną transdukcję sygnału zależną od mutacji genu *EGFR* oraz rearanżacji *ALK* i *ROS1*. Kolejnymi atrakcyjnymi celami molekularnymi oraz potencjalnymi czynnikami predykcyjnymi wydają się zidentyfikowane w ostatnim czasie w genomie raka płuca: amplifikacja i mutacja genu *MET*, translokacja genu *RET*, amplifikacja genu *FGFR*, mutacja genu *DDR2*, mutacja genu *MEK* oraz rearanżacja genów *NTRK1-3* [38]. Zidentyfikowane dotychczas zaburzenia molekularne stanowią jedynie niewielki odsetek pełnego spektrum onkogennych zdarzeń w genomie raka płuca. Podejmowanie dalszych wysiłków zmierzających do odkrywania kolejnych celów molekularnie ukierunkowanych terapii oraz analizy ich znaczenia prognostycznego i predykcyjnego jest ważnym etapem w rozwoju badań przedklinicznych w onkologii.

W molekularnej etiopatogenezie wielu nowotworów (m.in. w raku jelita grubego, raku piersi, nowotworach regionu głowy i szyi, białaczkach, międzybłoniaku opłucnej) wykazano zaburzoną aktywację szlaku transdukcji sygnału zależnego od białek z rodziny Wnt. Dane z piśmiennictwa dowodzą także udziału tego szlaku molekularnego w onkogenezie raka płuca. Dane te są nadal ograniczone i w większości dotyczą populacji azjatyckiej.

Prezentowana praca jest pierwszym opracowaniem oceniającym ekspresję białek z rodziny Wnt, E-kadheryny i β -kateniny, ich wzajemne zależności, związek z cechami kliniczno-

patologicznymi oraz ich znaczenie rokownicze w niedrobnokomórkowym raku płuca w populacji kaukaskiej.

1. Charakterystyka kliniczna i patologiczna badanej grupy chorych

Do analizy włączono 208 chorych poddanych radykalnej resekcji mięszu płucnego z powodu niedrobnokomórkowego raka płuca. Średnia wieku chorych wyniosła 62 lata. W badanej grupie większość (67,3%) stanowili mężczyźni. Stosunek liczby kobiet do mężczyzn w grupie chorych z rozpoznaniem raka gruczołowego płuca wyniósł 1,4:1, natomiast w przypadku raka płaskonabłonkowego – 1:3,3, co odpowiada danym z piśmiennictwa. Polskie raporty statystyczne podają, że gruczołowego raka płuca rozpoznaje się zwykle u chorych w młodszych grupach wiekowych. W omawianej analizie nie wykazano znamiennej różnicy w wieku chorych w zależności od typu histologicznego nowotworu ($p=0,088$), co może wynikać z ograniczonej liczebności grupy badanej.

W analizowanej grupie odnotowano nieznaczną przewagę chorych z rozpoznaniem histopatologicznym płaskonabłonkowego raka płuca (51,9%; 108 chorych). Średnica analizowanych raków płaskonabłonkowych była znamienne większa od średnicy raków gruczołowych i wielkokomórkowych ($p=0,011$), co miało związek z wyższym odsetkiem martwicy w guzach o utkaniu płaskonabłonkowym ($r=0,184$, $p=0,0008$). Wyniki są zgodne z danymi z piśmiennictwa [192]. Biologiczną konsekwencją wzrostu nowotworu jest postępująca niewydolność sieci naczyń krwionośnych prowadząca do powstania w utkaniu guza ognisk martwicy, lokalizujących się głównie centralnie. Większość rozpoznawanych nowotworów stanowiły raki o pośrednim (G2) stopniu złośliwości histologicznej (67,3%; 140 chorych). W ocenianej grupie przeważali chorzy z nowotworem we wczesnym stopniu zaawansowania klinicznego wg 7 edycji klasyfikacji TNM, bez przerzutów w węzłach chłonnych śródpiersia. W ogólnej ocenie uwzględniona w omawianej analizie grupa chorych, z jej liczebnością i profilem cech kliniczno-patologicznych, po uwzględnieniu omówionych powyżej ograniczeń, dobrze odzwierciedla polską populację chorych z rozpoznaniem niedrobnokomórkowego raka płuca, kwalifikowanych do zabiegu operacyjnego.

2. Ocena poziomu białka Wnt1

Wyniki reakcji barwnych na obecność białka Wnt1 uzyskano dla 206 (99%) analizowanych przypadków. Obserwowano cytoplazmatyczny wzorec odczynu komórkowego. Pozytywny wynik reakcji barwnych uzyskano dla 103 przypadków (49,5%). Otrzymane wyniki są zgodne z danymi z piśmiennictwa. W doniesieniach Nakashimy, Huanga i Xianhua opisano charakterystyczną dla białka Wnt1 cytoplazmatyczną reakcję barwną [109,193,194]. Odsetek przypadków raka płuca o dodatnim barwieniu na obecność białka Wnt1 był w opracowaniach przytaczanych powyżej autorów zbliżony do uzyskanego w omawianej rozprawie – odpowiednio 42% w pracy Nakashimy, 49,1% w pracy Huanga, 36,6% w pracy Xianhua, 36,6% w pracy Xu [109,193,194,111]. Zaznaczyć należy, że w analizie Xianhua i wsp., jak w omawianej rozprawie, do oceny odczynów barwnych stosowano metodę półilościową z wykorzystaniem wskaźnika H, przyjęto natomiast inny – równy 100 – punkt odcięcia dla interpretacji odczynu jako dodatni [194]. Pozostałych trzech autorów nie podało szczegółowej metodologii oceny i zasad interpretacji odczynu immunohistochemicznego.

Analizując poziom białka Wnt1 jako zmienną ciągłą wykazano istotną statystycznie zależność od typu histologicznego nowotworu płuca ($p \leq 0,0001$) – poziom białka był znamienne wyższy w guzach pierwotnych o histologii gruczołowej i wielkokomórkowej w porównaniu z płaskonabłonkową. Taką zależność statystyczną potwierdzono także przyjmując jako punkt odcięcia wartość mediany wskaźnika H dla białka Wnt1 – wyższy poziom analizowanego białka obserwowano w rakach gruczołowych ($p=0,004$). Powyższe wyniki są zbieżne z obserwacjami Xianhua i wsp. – w analizowanej populacji wykazali znamienne wyższy poziom białka Wnt1 w gruczolakorakach płuca, co sugerować może większe znaczenie aktywacji tego szlaku w onkogenezie w tym typie histologicznym NDRP [194]. W pracy Huanga, Nakashimy i Xu nie obserwowano wyżej wspomnianej zależności [193,109,111]. Grupy chorych w badaniach azjatyckich miały porównywalną liczebność i były zrównoważone pod względem charakterystyki kliniczno-patologicznej, więc potencjalna dysproporcja w doborze cech populacji badanych nie może stanowić wytłumaczenia powyższych rozbieżności. Przyczynę odmiennych wniosków w tym zakresie mogą stanowić różnice w metodologii i interpretacji odczynu immunohistochemicznego.

Ponadto w przedstawianej pracy potwierdzono znamienne niższy poziom białka Wnt1, analizowaną jako zmienną ciągłą, w nowotworach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej [(G3); $p=0,003$]. Taką zależność statystyczną potwierdzono także przyjmując jako punkt

odcienia wartość mediany wskaźnika H dla białka Wnt1– niższy poziom białka Wnt1 obserwowano w rakach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,029$). Po potwierdzeniu zrównoważonego udziału nowotworów w poszczególnych stopniach różnicowania histologicznego w porównywanych analizach, należy uwzględnić kilka hipotez tłumaczących wyżej wspomnianą zależność. Z progresją złośliwości histologicznej nowotworu może wiązać się odmienny sposób potranslacyjnej modyfikacji białka, modulacja aktywności inhibitorów szlaku Wnt (np. WIF-1 i DKK-3), wynikająca z uruchomienia mechanizmów epigenetycznych (w tym metylacji DNA i modyfikacji histonów), a także aktywacja niezależnych od Wnt1, kompetycyjnych ligandów omawianego szlaku sygnałowego oraz związek szlaku zależnego od białek Wnt z innymi, aktywnymi w onkogenezie raka płuca szlakami transdukcji sygnału (m.in. zależnymi od MET, IGF), które mogą hamować aktywację zależną od Wnt. Wspomniana zależność nie była analizowana w pracy Xianhua i wsp. [194]. Obserwacji tych nie potwierdzają opublikowane dane pozostałych badań przeprowadzonych w populacji azjatyckiej, co może wynikać przede wszystkim z różnic w interpretacji odczynu immunohistochemicznego [109,111,193].

W omawianej analizie dowiedziono istotnej statystycznie zależności pomiędzy poziomem białka Wnt1 a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu ($p=0,042$), wykazując znamienne niższy poziom analizowanego białka w stopniu IIB i IIIA klinicznego zaawansowania. Nie obserwowano takiej zależności w badaniach przeprowadzonych w populacji azjatyckiej [109,111,193,194]. Zarówno w omawianej rozprawie, jak i w większości przytaczanych badań przeprowadzonych w populacji azjatyckiej, odsetki chorych diagnozowanych w poszczególnych stopniach zaawansowania klinicznego raka płuca były zbliżone, co wyklucza potencjalną dysproporcję w doborze chorych i mogące wynikać z niej różnice w wynikach. Obniżony poziom białka Wnt1 w nowotworach o wyższym stopniu zaawansowania klinicznego może sugerować jego aktywność na wczesnych etapach inicjacji i promocji raka płuca oraz brak oddziaływania w zaawansowanych fazach progresji tego nowotworu.

Ponadto w omawianej pracy wykazano słabe ujemne korelacje pomiędzy: odsetkiem martwicy w utkaniu nowotworu a poziomem białka Wnt1 ($r=-0,212$, $p=0,002$) oraz średnicą guza pierwotnego a poziomem ekspresji analizowanego białka ($r=-0,154$, $p=0,027$). W pracy Xianhua i wsp. wykazano znamienne wyższy poziom białka Wnt1 w nowotworach płuca, w których odsetek martwicy w utkaniu guza wynosił $<10\%$ [194], co wykazuje zbieżność z wynikami omawianej rozprawy. Rozleglejsze pola martwicy charakteryzują zwykle architekturę nowotworów o wyższym stopniu złośliwości histologicznej, większej średnicy i

wyższym stopniu zaawansowania klinicznego. Poziom białka Wnt1 w nowotworach agresywniejszych histologicznie i bardziej zaawansowanych klinicznie jest obniżony, co koresponduje z niższym poziomem w guzach z wyższym odsetkiem utkania martwiczego (potencjalnie o niższym stopniu zróżnicowania histologicznego, o większej średnicy i w wyższym stopniu zaawansowania klinicznego). Argumentacja przedstawiona powyżej tłumaczy także tę obserwację. Z dozą ostrożności należy interpretować ujemną korelację pomiędzy średnicą guza pierwotnego a poziomem białka Wnt1. W omawianej analizie zastosowano technikę mikromacierzy tkankowych (TMA) i poddawano ocenie wyłącznie wybrane fragmenty guzów pierwotnych płuca, które mogą okazać się nie w pełni reprezentatywne dla całego, potencjalnie heterogennego guza nowotworowego. Dane z piśmiennictwa dowodzą jednak, że pobranie 3-4 cylindrów tkankowych z guza pierwotnego kompensuje ryzyko związane z heterogennością nowotworów i w sposób adekwatny obrazuje profil całej tkanki. W omawianym badaniu autorka konstruując TMA pobierała po 4 cylindry tkankowe z guza pierwotnego, celem ograniczenia wpływu heterogenności guza na wyniki oznaczeń. Interpretując zatem wynik ujemnej korelacji pomiędzy średnicą guza pierwotnego a poziomem białka Wnt1 na podłożu biologicznym należałoby uwzględnić potencjalną dynamikę immunoekspresji Wnt1 – wyższą na wczesnych etapach inicjacji i promocji nowotworu, ulegającą obniżeniu wraz ze wzrostem masy nowotworu. Dane z piśmiennictwa dostarczają dowodów na występowanie dynamicznych zmian w zakresie transkryptomu, a w konsekwencji i proteomu w odpowiedzi na wzrost średnicy guza nowotworowego [195].

W przeprowadzonym badaniu nie wykazano zależności pomiędzy poziomem białka Wnt1 analizowanej jako zmienna ciągła a wiekiem i płcią chorych, cechą T, cechą N oraz stopniem naciekania opłucnej ($p > 0,05$). Analogiczne wnioski płyną z analiz Huanga, Nakshimy i Xu [193,109,111].

W omawianej pracy wykazano ponadto korelację poziomu białka Wnt1 z poziomem białka Wnt2 ($r = 0,161$, $p = 0,021$), co może sugerować zbliżoną funkcję tych białek oraz ich zaangażowanie na tych samych etapach kaskady przekazywania sygnału szlakiem kanonicznym. W dostępnych w piśmiennictwie opracowaniach do tej pory nie analizowano wzajemnych zależności między poziomem białek Wnt1 i Wnt2.

3. Ocena poziomu białka Wnt2

Wyniki reakcji barwnych na obecność białka Wnt2 uzyskano dla 206 (99%) analizowanych przypadków. Obserwowano cytoplazmatyczny wzorec odczynu komórkowego. Pozytywny wynik reakcji barwnych uzyskano dla 46 przypadków (22,3%). W badaniu Huanga i wsp. przeprowadzonym w populacji azjatyckiej wykazano obecność białka Wnt2 w 62,9% przypadków analizowanych niedrobnokomórkowych raków płuca [195]. Różnice w wynikach obu prac mogą wynikać przede wszystkim z odmiennej interpretacji odczynów barwnych. W pracy Huanga nie stosowano wskaźnika H i punktu odcięcia na poziomie mediany. Nawet najniższy uzyskany odczyn barwny (1+ w 1,1% komórek) klasyfikowano jako dodatni [195]. Nie można pominąć również potencjalnych genotypowych różnic pomiędzy populacją azjatycką i kaukaską.

W omawianej rozprawie analizując poziom białka Wnt2 jako zmienną ciągłą wykazano istotną statystycznie zależność od stopnia zróżnicowania histologicznego ($p=0,002$) – nowotwory o wyższym stopniu złośliwości histologicznej wykazywały znamienne niższy poziom analizowanego białka. Analogiczną zależność uzyskano przyjmując jako punkt odcięcia wartość mediany wskaźnika H dla białka Wnt2 – wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy poziomem białka Wnt2 a stopniem histologicznego zróżnicowania ($p=0,001$). Uwzględniając podobną funkcjonalną naturę białek Wnt1 i Wnt2 wydaje się zasadne przyjęcie przytoczonej powyżej argumentacji o wpływie stopnia złośliwości histologicznej nowotworu płuca na dynamikę immunoekspresji nie tylko białka Wnt1, ale również białka Wnt2.

W przeprowadzonym badaniu nie wykazano zależności pomiędzy poziomem białka Wnt2 analizowanej jako zmienna ciągła a wiekiem i płcią chorych, typem histologicznym raka płuca, cechą T, cechą N, stopniem zaawansowania patologicznego nowotworu, średnicą guza pierwotnego, odsetkiem martwicy w utkaniu nowotworu oraz stopniem naciekania opłucnej ($p>0,05$). Rozpatrywanych zależności z cechami kliniczno-patologicznymi nie wykazano także przyjmując wartość mediany wskaźnika H jako punkt odcięcia dla interpretacji poziomu białka Wnt2. W badaniu Huanga i wsp. wykazano znamienne statystycznie zależność pomiędzy poziomem białka Wnt2 a typem histologicznym raka płuca i stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu, obserwując znamienne wyższy poziom analizowanego białka w gruczołowych rakach płuca, o wyższym stopniu zaawansowania klinicznego. Po uwzględnieniu wyższego odsetka raków gruczołowych oraz wyższej liczebności chorych w III stopniu zaawansowania klinicznego NDRP w pracy Huanga, kolejnym wytłumaczeniem

rozbieżności w wynikach wydaje się być odmienna interpretacja odczynu immunohistochemicznego, a także potencjalne genotypowe, transkryptomyczne, proteomiczne i metabolomiczne różnice pomiędzy rasą azjatycką i kaukaską.

Przy ustaleniu punktu odcięcia na wartości wskaźnika H dla Wnt2 równego 100 wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy poziomem białka Wnt2 a stopniem naciekania opłucnej – znamienne niższą immunoekspresję analizowanego białka w nowotworach naciekających opłucną ($p=0,001$). Wy tłumaczenie tego zjawiska może stanowić omawiana powyżej tendencja do obniżonego poziomu zarówno białka Wnt1, jak i Wnt2 w nowotworach płuca o bardziej agresywnym przebiegu (obserwowane zahamowanie immunoekspresji białka Wnt1 i Wnt2 na dalszych etapach progresji złośliwości histologicznej oraz klinicznej nowotworu), co wiąże się także z nasiloną inwazyjnością miejscową nowotworu.

4. Ocena poziomu E-kadheryny

Wyniki reakcji barwnych na obecność E-kadheryny uzyskano dla 206 (99%) analizowanych przypadków. Obserwowano błonowy wzorec odczynu komórkowego. Odczyn immunohistochemiczny interpretowano jako dodatni, gdy wartość wskaźnika H wyniosła >200 (punkt odcięcia na poziomie mediany). Pozytywny wynik reakcji barwnych uzyskano dla 77 przypadków (37,4%), co sugeruje znamienne obniżenie lub brak immunoekspresji E-kadheryny w większości przypadków NDRP. Analogicznie w badaniu Choi i wsp. obserwowano także głównie odczyn błonowy E-kadheryny w komórkach NDRP, z niewielkim udziałem frakcji cytoplazmatycznej, a pozytywny wynik reakcji dotyczył 40% analizowanych przypadków niedrobnokomórkowego raka płuca [146]. Miao i wsp. wykazali błonową ekspresję E-kadheryny w 33,3% przypadków NDRP [196].

W omawianej pracy analizując poziom E-kadheryny jako zmienną ciągłą wykazano istotną statystycznie zależność od typu histologicznego nowotworu płuca ($p=0,001$) – poziom białka był znamienne wyższy w guzach pierwotnych o histologii gruczołowej i wielkokomórkowej w porównaniu z płaskonabłonkową. Dane te potwierdzają doniesienia Choi, Yana i Lee [146,197,198]. Obserwacja ta sugeruje bardziej nasilone zaburzenia adhezji komórkowej w architektonice nowotworów płaskonabłonkowych płuca, ich silniejszą

tendencję do inwazji miejscowej oraz większe znaczenie biologiczne utraty E-kadheryny w onkogenezie płaskonabłonkowych nowotworów płuca.

W przedstawianej analizie potwierdzono ponadto znamienne niższy poziom E-kadheryny, interpretowanej jako zmienna ciągła, w nowotworach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej [(G3); $p=0,01$]. Obserwacja ta sugeruje wpływ obniżonego poziomu E-kadheryny na utratę potencjału różnicowania komórek, a w konsekwencji silniej wyrażone zaburzenia adhezji komórkowej w niskozróżnicowanych nowotworach płuca. Obniżona ekspresja E-kadheryny stymuluje także proces przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej, podczas której komórki nowotworowe tracą zdolność tworzenia struktur nabłonkowych, a wykształcają fenotyp mezenchymalny, który umożliwia dysocjację komórek i inwazję otoczenia. Potwierdzeniem tych danych są wyniki prezentowane przez Choi i wsp. [146], Yana [197], Zhanga [199] oraz Kase [200], a także wyniki metaanalizy Yanga [201], w których wykazano tendencję do niższego poziomu E-kadheryny w niskozróżnicowanych nowotworach płuca.

W prezentowanej rozprawie dowiedziono także istotnej statystycznie zależności pomiędzy poziomem E-kadheryny, definiowanym jako zmienna ciągła, a stopniem naciekania opłucnej ($p=0,039$), wykazując znamienne niższy poziom tego białka w przypadku bardziej rozległego zajęcia opłucnej. Przedstawione dane są zbieżne z doniesieniami Lina i Kima [202,203], ale nie potwierdziły ich wyniki metaanalizy Yanga [201].

W metaanalizie Qiu, do której włączono 2412 chorych z NDRP oraz metaanalizie Yanga, w której uwzględniono 3575 chorych, potwierdzono znamienne statystycznie zależności pomiędzy immunоекспресją E-kadheryny a cechą N, a w drugiej z przytaczanych metaanaliz także pomiędzy poziomem E-kadheryny a stopniem zaawansowania klinicznego raka płuca [204,201]. Podobnie jak w doniesieniu Myonga i wsp. [205], w omawianej pracy nie wykazano tego związku, co może wynikać z ograniczonej liczebności grupy badanej i niewystarczającej mocy statystycznej analizy. Zwrócić należy jednak uwagę na ograniczenia wspomnianych metaanaliz. W uwzględnionych w nich badaniach wykorzystywano różne metody immunohistochemiczne oceny odczynów (odmienne przeciwciała, różne punkty odcięcia w interpretacji wyników reakcji barwnych). Brak standaryzacji metody IHC może być źródłem znaczącej różnorodności wyników i zaburzać wnioskowanie. W większości włączonych do analiz badań nie podano wartości współczynników ryzyka względnego, co wymagało ekstrapolowania ilorazu ryzyka (HR) oraz przedziałów ufności (CI) z krzywych przeżycia Kaplana-Meiera, co mogło wiązać się z pewnym błędem szacunkowym. Nie bez znaczenia

dla oceny wartości wyników metaanaliz jest zjawisko selekcji na etapie publikacji. Negatywne badania analizujące to zagadnienie być może nie zostały opublikowane i w konsekwencji nie zostały włączone do analizy. W metaanalizie nie uwzględniono także badań, które zostały opublikowane w języku innym niż angielski. Metaanaliza nie grupowała także chorych względem rodzaju zastosowanego leczenia i nie oceniła wpływu leczenia uzupełniającego na oceniane zmienne. Wymienione ograniczenia sprawiają, że należy zachować interpretacyjną ostrożność i krytycyzm przy ocenie wyników obu metaanaliz.

W omawianej pracy nie wykazano zależności pomiędzy poziomem E-kadheryny analizowanym jako zmienna ciągła a wiekiem i płcią chorych, cechą T, średnicą guza pierwotnego oraz odsetkiem martwicy w utkaniu nowotworu ($p > 0,05$), co jest zgodne z doniesieniami Kasego i Myonga oraz wynikami wspomnianych powyżej metaanaliz [200,205,201,204].

W omawianej pracy wykazano słabą dodatnią korelację pomiędzy poziomem E-kadheryny a poziomem białka Wnt2 ($r = 0,151$, $p = 0,03$), co tłumaczyć należy związkiem pomiędzy bifunkcyjną β -kateniną, kompleksem E-kadheryna-katenina (ang. *E-cadherin-catenin unit*, ECCU) a szlakiem kanonicznym zależnym od białek Wnt. Dowiedziono także umiarkowanej dodatniej korelacji pomiędzy immunоекспресją analizowanego białka a immunоекспресją frakcji błonowej β -kateniny ($r = 0,569$, $p = 0,0001$). Dla nowotworów o bardziej agresywnym przebiegu klinicznym, niskozróżnicowanych z wyższym potencjałem metastatycznym charakterystyczne są zaburzenia funkcji kompleksu adhezyjnego E-kadheryna- β -katenina, wyrażające się skojarzonym obniżeniem poziomu obu białek. Mechanizm tego oddziaływania nie jest jednoznacznie wyjaśniony. Regulacja tego procesu może odbywać się na poziomie genu, transkryptu bądź białka. Analogiczną korelację wykazali w swoim opracowaniu Choi i Kase [146, 200].

5. Ocena poziomu β -kateniny

Wyniki barwień dla β -kateniny uzyskano dla 207 (99,5%) przypadków NDRP. Reakcje barwne oceniano oddzielenie w 3 kompartmentach komórkowych: jądrze, błonie komórkowej oraz cytoplazmie. Trzy przypadki z wskaźnikiem H > 200 dla frakcji jądrowej zakwalifikowano jako wykazujące obecność jądrowej frakcji β -kateniny. Analizując udział frakcji błonowej β -kateniny, odczyn immunohistochemiczny interpretowano jako pozytywny, gdy wartość

wskaźnika H wyniosła >200 (punkt odcięcia na poziomie mediany). Pozytywny wynik reakcji barwnych uzyskano w 49 przypadkach (23,7%). W przypadku frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny odczyn immunohistochemiczny interpretowano jako dodatni, gdy wartość wskaźnika H wyniosła >100 (punkt odcięcia na poziomie mediany). Pozytywny wynik reakcji barwnych uzyskano w 72 przypadkach (34,8%).

W prawidłowym nabłonku β -katenina lokalizuje się w błonie komórkowej. Obniżona immunoekspresja błonowa, a także obecność β -kateniny w kompartmentie cytoplazmatycznym oraz translokacja do jądra komórkowego interpretowane są jako wskaźniki zaburzonej immunoekspresji tego białka. W omawianej pracy obniżenie poziomu frakcji błonowej β -kateniny wykazano w 158 przypadkach NDRP (76,3%), w 72 przypadkach potwierdzono obecność β -kateniny w cytoplazmie (34,8%), natomiast tylko w 3 przypadkach obserwowano odczyn jądrowy (1,4%). W pracy Xu zaburzoną immunoekspresję β -kateniny wykazano w 76% analizowanych przypadków [111], w pracy Miao – w 83% [196], w pracy Kren – w 71% [125], natomiast w pracy Lin – w 80%, przy znacząco wyższym odsetku immunoekspresji jądrowej – 36,7% [206].

Zwrócić należy szczególną uwagę na opisywaną w literaturze różnorodność interpretacji odczynów barwnych β -kateniny. W pracy Xu i Kim, co istotne, oprócz reakcji barwnych w 3 wspomnianych kompartmentach komórkowych oceniano także odczyny mieszane: błonowo-cytoplazmatyczne i cytoplazmatyczno-jądrowe [111,203]. Większość autorów oceniających to zagadnienie analizowała ogólną komórkową immunoekspresję β -kateniny, bez uwzględniania poszczególnych kompartmentów komórkowych [128, 186]. W badaniach Kim, Hommury oraz Retera obserwowany odczyn błonowy omawianego białka interpretowany był jako ujemny [203,207,208]. Brak standaryzacji w interpretacji odczynów reakcji barwnych utrudnia porównanie wyników cytowanych prac.

Analizując poziom frakcji błonowej β -kateniny jako zmienną ciągłą wykazano znamioną statystycznie zależność od stopnia zróżnicowania histologicznego ($p=0,008$) – nowotwory o wyższym stopniu złośliwości histologicznej wykazywały niższy poziom analizowanego białka. Obniżony poziom składowej kompleksu adhezyjnego β -katenina-E-kadheryna zaburza różnicowanie komórek, promuje bardziej inwazyjny ich fenotyp – naciekanie podścieliska i tworzenie przerzutów odległych. Potwierdzenie tej zależności znajdujemy w pracach Choi [146], Lina [202], Prininena [209], nie wykazała jej natomiast metaanaliza Yanga [210].

W przeprowadzonym badaniu nie wykazano zależności pomiędzy poziomem frakcji błonowej β -kateniny, zarówno analizowanej jako zmienna ciągła, ale też kategoryzowanej według mediany, a wiekiem i płcią chorych, typem histologicznym raka płuca, cechą T, cechą N, stopniem zaawansowania patologicznego nowotworu, średnicą guza pierwotnego, odsetkiem martwicy w utkaniu nowotworu oraz stopniem naciekania opłucnej ($p>0,05$). Doniesienia te pozostają w zgodności z wynikami metaanalizy Yanga [210].

W omawianej pracy nie wykazano zależności między frakcją jądrową β -kateniny a cechami kliniczno-patologicznymi analizowanej populacji. W niniejszej analizie stwierdzono obecność jedynie 3 przypadków NDRP na 207 ocenionych, w których potwierdzono wzorzec jądrowy odczynu, co uniemożliwia statystyczne wnioskowanie w tym zakresie. We wspomnianej powyżej metaanalizie Yanga nie wykazano związku immunoekspresji frakcji jądrowej β -kateniny z parametrami kliniczno-patologicznymi badanej populacji [210].

Nie potwierdzono także zależności między poziomem frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny a cechami kliniczno-patologicznymi analizowanej populacji, co jest zgodne z wynikami metaanalizy Yanga [210].

W przedstawianej pracy wykazano słabą dodatnią korelację pomiędzy poziomem frakcji jądrowej β -kateniny a jej frakcji cytoplazmatycznej ($r=0,232$, $p=0,001$). Zależność ta wyjaśnia charakterystyczne dla komórek nowotworowych zjawisko zaburzonej immunoekspresji β -kateniny, związane z jej migracją z błony komórkowej do cytoplazmy, a także translokacją do jądra komórkowego. Wspomniana zależność nie była przedmiotem wcześniejszych analiz.

6. Analiza przeżycia

Najistotniejszym czynnikiem rokowniczym w niedrobnokomórkowym raku płuca jest stopień zaawansowania klinicznego choroby. Niestety nawet w subpopulacji chorych z wczesnym rakiem płuca, w I stopniu zaawansowania klinicznego, u 18-24% chorych dochodzi do nawrotu choroby w ciągu 5 lat obserwacji [211,212]. Świadczy to o znacznej różnorodności nawet w obrębie jednego, określonego stopnia zaawansowania i niewystarczającej ocenie ryzyka nawrotu wyłącznie na podstawie klasyfikacji TNM. Uzasadnione wydaje się poszukiwanie molekularnych i genetycznych czynników prognostycznych, które pozwoliłyby na

bardziej precyzyjną stratyfikację ryzyka nawrotu, a ich obecność stanowiłaby wskazanie do wdrożenia leczenia uzupełniającego w tak wyodrębnionej grupie chorych „wysokiego ryzyka”.

W omawianej analizie potwierdzono znaczenie rokownicze poznanych wcześniej czynników ryzyka: cechy T ($p < 0,0001$), średnicy guza pierwotnego ($p < 0,0001$), stopnia naciekania opłucnej ($p = 0,001$), cechy N ($p < 0,0001$) oraz stopnia zaawansowania patologicznego nowotworu ($p < 0,0001$), które osiągnęły znamienność statystyczną zarówno dla całkowitego czasu przeżycia (OS), jak i czasu przeżycia wolnego od nawrotu (RFS). Ponadto wykazano istotną statystycznie zależność czasu przeżycia od stopnia zróżnicowania histologicznego nowotworu ($p = 0,023$).

W prezentowanej pracy, w jednoczynnikowym modelu regresji Coxa nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w czasie przeżycia wolnym od nawrotu (RFS) oraz czasie całkowitego przeżycia (OS) w zależności od poziomu białka Wnt1. Przeprowadzono dodatkowe analizy specyfikując punkt odcięcia dla odczynu pozytywnego na wskaźniku H = 100 lub 200, a także oceniając poziom białka Wnt1 jako zmienną ciągłą, ale w żadnej z prób nie wykazano istotnej statystycznie zależności między statusem białka Wnt1 a wskaźnikami przeżycia ($p > 0,05$). W analizie wieloczynnikowej poziom białka Wnt1 nie miał związku z czasem przeżycia wolnego od nawrotu i czasem całkowitego przeżycia. Uzyskane wyniki pozostają w opozycji z jedynymi dostępnymi doniesieniami w tym temacie, opublikowanymi przez azjatyckich autorów: Huanga, Xu i Nakashimę [193,194,109]. Huang i wsp. wykazali dodatnią korelację pomiędzy poziomem białka Wnt1 i β -kateniną, indeksem proliferacyjnym (Ki67) oraz gęstością sieci mikrokrażenia (ang. *intratumoral microvessel density*, IMD). Potwierdzili także znaczenie rokownicze białka Wnt1 – chorzy, których nowotwory wykazywały wyższą ekspresję ocenianego białka charakteryzowali się krótszym czasem przeżycia [193]. Xu potwierdził rolę Wnt1 jako negatywnego czynnika rokowniczego [194]. Nakashima dowiódł dodatniej korelacji pomiędzy poziomem Wnt1 a surwiwiny, białka hamującego apoptozę komórek nowotworowych, oraz wykazał znamienne krótszy czas przeżycia chorych z NDRP, z wysoką immunoekspresją analizowanego białka w guzie [109]. Podstawowymi przyczynami rozbieżności wydają się być różnice populacyjne między rasą azjatycką a kaukaską, różnice w przeciwciałach zastosowanych do barwienia na obecność białka Wnt1 i różnice w interpretacji odczynów barwnych. Piśmiennictwo dostarcza danych o populacyjnych polimorfizmach genów kodujących enzymy uczestniczące w metabolizmie nikotyny i leków (m.in. *CYP1A1*, *CYP2E1*, *CYP3A4*, *CYP3A50*), w naprawie DNA (m.in. *ERCC1*, *ERCC2*), a także indukcji stanu zapalnego (m.in. *COX2*) [213,214]. Ponadto o genetycznej odmienności nowotworów płuca rozpoznawanych w obu tych rasach świadczą różne odsetki wykrywanych zaburzeń

molekularnych, w tym najlepiej poznanych mutacji somatycznych, m.in. mutacji aktywującej genu *EGFR* (30% chorych w populacji azjatyckiej w porównaniu do 7% chorych w populacji kaukaskiej), a także mutacji genu *KRAS* (<10% chorych w populacji azjatyckiej w porównaniu do 18% chorych w populacji kaukaskiej). Molekularne odmienności rasowe potencjalnie mogą dotyczyć także szlaku przekazywania sygnału zależnego od białek Wnt, nie tyle występowania mutacji, które, stwierdzane są rzadko w genomie NDRP, ale raczej aktywacji kompetycyjnych ligandów szlaku lub antagonistów, a także modyfikacji epigenetycznych genów kodujących kluczowe białka tego szlaku. Wiedza na ten temat jest nadal niewystarczająca, a wnioskowanie na podstawie uproszczonego, uwzględniającego udział wyłącznie jednego liganda omawianego szlaku, modelu oraz porównywanie obu populacji wydaje się niezwykle trudne i ma ograniczoną wartość.

Na podstawie wyników omawianej pracy wnioskować można wstępnie o ograniczonej roli białka Wnt1 w aktywacji szlaku kanonicznego (nie potwierdzono korelacji między poziomem Wnt1 a poziomem β -kateniny) w populacji kaukaskiej. Wykrycie obecności białka Wnt1 nie jest surogatem jego aktywnej funkcji, która może być hamowana w różnych mechanizmach (m.in. antagoniści Wnt: WIF-1, DKK1, FRP). U chorych rasy kaukaskiej może dochodzić preferencyjnie do aktywacji innych ligandów szlaku zależnego od Wnt. Niewielka liczebność grupy nakazuje interpretacyjną ostrożność i ostateczną weryfikację tej hipotezy w badaniu z udziałem większej liczby chorych.

W niniejszej pracy analogiczne wnioski dotyczą wpływu poziomu białka Wnt2 na wskaźniki przeżycia. W jednoczynnikowym modelu regresji Coxa nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w czasie przeżycia wolnym od nawrotu oraz czasie całkowitego przeżycia między chorymi z nowotworami płuca wykazującymi wysoki poziom białka Wnt2 (zdefiniowany punkt odcięcia na poziomie mediany – wskaźnika H ≤ 200 vs. >200) a chorymi z nowotworami płuca z niskim poziomem tego białka. Nie wykazano także różnic znamiennych statystycznie w OS i RFS przy ustaleniu punktu odcięcia na poziomie wskaźnika H=100 czy w analizie zmiennej ciągłej. W analizie wieloczynnikowej poziom białka Wnt2 nie miał związku z czasem przeżycia wolnego od nawrotu i czasem całkowitego przeżycia. Dane te pozostają w sprzeczności z doniesieniami Huanga i wsp., którzy wykazali prognostyczne znaczenie immunoekspresji białka Wnt2 w NDRP [195]. Wy tłumaczenie rozbieżności stanowią omówione szeroko powyżej różnice w interpretacji wyników odczynów immunohistochemicznych oraz potencjalne odmienności genotypowe, transkryptomiczne, proteomiczne i metabolomiczne pomiędzy rasą azjatycką i kaukaską, skutkujące 3-krotnie wyższym odsetkiem nowotworów płuca wykazujących wysoki poziom białka Wnt2, diagnozowanych w populacji azjatyckiej [213,214].

W przedstawianej pracy, w jednoczynnikowym modelu regresji Coxa nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w czasie przeżycia wolnym od nawrotu (RFS) oraz czasie całkowitego przeżycia (OS) między chorymi z nowotworami płuca w zależności od poziomu E-kadheryny. Różnica w OS i RFS przy ustaleniu punktu odcięcia na poziomie wskaźnika $H=100$ była bliska znamienności statystycznej (log-rank $p=0,06$ i Cox $p=0,064$; $HR=0,548$). Być może liczebność analizowanej grupy okazała się niewystarczająca dla wykazania omawianej zależności. Udowodniono natomiast znamienny statystycznie związek między poziomem E-kadheryny analizowanym jako zmienna ciągła a czasem całkowitego przeżycia. Obniżony poziom E-kadheryny stanowił negatywny czynnik prognostyczny. Przedstawione dane są zgodne z wynikami prac You [197], Lee [198], Kasego [200] oraz wynikami metaanaliz Yanga [201] i Qiu [204]. Choi i Kim wykazali znaczenie rokownicze immunoekspresji E-kadheryny wyłącznie w gruczołowym raku płuca [146,203]. W analizie wieloczynnikowej natomiast poziom E-kadheryny nie wykazał związku z czasem przeżycia wolnego od nawrotu i czasem całkowitego przeżycia, co koresponduje z wynikami prac Lee [198], Kasego [200] i Choi [146], a pozostaje w sprzeczności z doniesieniami Kima [203] i Yanga [201]. Wy tłumaczenie uzyskanych w omawianej pracy wyników może stanowić niewystarczająca dla wykazania wszystkich zależności liczebność analizowanej grupy chorych, a w konsekwencji niewystarczająca moc statystycznej analizy. E-kadheryna, jako składowa adhezyjnego kompleksu E-kadheryna-katenina, spełnia funkcję „supresora inwazji”. Obniżenie jej poziomu prowadzi do osłabienia międzykomórkowych oddziaływań adhezyjnych, zaburza integralność i architekturę tkankową oraz promuje agresywne cechy komórek nowotworowych – naciekanie podścieliska, inwazję naczyń krwionośnych i tworzenie przerzutów [215]. Ponadto E-kadheryna wpływa na przekazywanie sygnału szlakami regulującymi wzrost oraz migrację komórek nowotworowych, m.in. szlaku kanonicznego zależnego od białek Wnt oraz szlaku zależnego od białek z rodziny Rho, modulując odpowiedź transkrypcyjną [216,217]. E-kadheryna spełnia także funkcję supresora wzrostu komórek – hamuje cykl komórkowy w mechanizmie aktywacji białka p27, zależnego od cyklin inhibitora kinaz [218]. Obniżony poziom E-kadheryny stymuluje aktywność proliferacyjną komórek, mierzoną wskaźnikiem Ki67 [219], a także proces przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej, podczas której komórki nowotworowe tracą zdolność tworzenia struktur nabłonkowych, a wykształcają fenotyp mezenchymalny, który umożliwia dysocjację komórek, inwazję otoczenia oraz tworzenie przerzutów [220]. Obniżenie poziomu nabłonkowej frakcji – E-kadheryny ma związek ze wzrostem poziomu mezenchymalnych N-kadheryn, które stymulują migrację i naciekanie podścieliska [221]. W historii naturalnej nowotworu obniżenie poziomu E-kadheryny wiąże się z promocją jego

agresywnego fenotypu i dynamiczną progresją choroby, co przekłada się na rokowanie chorych.

W przedstawianej pracy, przyjmując różne punkty odcięcia (wskaźnik H= 10 lub 200), nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w czasie przeżycia wolnym od nawrotu oraz czasie całkowitego przeżycia chorych z nowotworami płuca wykazującymi różny poziom frakcji jądrowej β -kateniny. Poziom frakcji jądrowej β -kateniny analizowany jako zmienna ciągła również nie wpływał istotnie statystycznie na czas przeżycia. W omawianej analizie tylko w 3 przypadkach (1,4%) wykazano obecność frakcji jądrowej β -kateniny, co uniemożliwia statystyczne wnioskowanie.

W niniejszej pracy, w jednoczynnikowym modelu regresji Coxa wykazano istotną statystycznie różnicę w czasie przeżycia wolnym od nawrotu oraz czasie całkowitego przeżycia w zależności od poziomu frakcji błonowej β -kateniny (zdefiniowany punkt odcięcia na poziomie mediany wskaźnika H $\leq$ 200 vs. >200). Poziom frakcji błonowej β -kateniny analizowany jako zmienna ciągła wykazał znamieny statystycznie związek z czasem całkowitego przeżycia (Cox p=0,007; HR=0,996 95%CI 0,994-0,999). Obniżony poziom frakcji błonowej β -kateniny stanowił negatywny czynnik prognostyczny.

W przedstawianej pracy nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w czasie przeżycia wolnym od nawrotu oraz czasie całkowitego przeżycia w zależności od frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny. Powyższe wyniki są zgodne z wnioskami z analizy Kasego – poziom frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny w NDRP, w przeciwieństwie do raka jelita grubego, nie ma znaczenia rokowniczego.

W przeprowadzonej w omawianej pracy analizie wieloczynnikowej poziomy poszczególnych komórkowych frakcji β -kateniny nie wykazały związku z czasem przeżycia wolnym od nawrotu i czasem całkowitego przeżycia, co jest zgodne z wynikami Prinina [209] i Yanga [210], a pozostaje w sprzeczności z doniesieniami Choi [146], Hommury [207] i Retera [208].

Uzyskane w niniejszej rozprawie wyniki trudno bezpośrednio porównać z doniesieniami innych autorów. Głównym ograniczeniem pozostaje odmienna metodologia i brak wystandaryzowanych kryteriów interpretacji odczynów immunohistochemicznych dla β -kateniny. Obniżony poziom frakcji błonowej, wynikający z hipermetylacji promotora genu kodującego *β -kateninę* [222], a także jej obecność w kompartmentie cytoplazmatycznym oraz translokacja do jądra komórkowego interpretowane są jako wskaźniki zaburzonej ekspresji

tego białka. W pracy Xu i Kim, co istotne, oprócz reakcji barwnych w 3 wspomnianych kompartmentach komórkowych oceniano także odczyny mieszane: błonowo-cytoplazmatyczne i cytoplazmatyczno-jądrowe [111,203]. Większość autorów oceniających to zagadnienie analizowała ogólnie immunoekspresję β -kateniny, bez uwzględniania lokalizacji komórkowej tego białka [128, 186]. W pracy Kase i wsp. uwzględniano natomiast wyłącznie poziom błonowej β -kateniny [200]. W badaniach Kim, Hommury oraz Retera obserwowany odczyn błonowy omawianego białka interpretowany był jako ujemny [203,207,208]. Uogólniając i uwzględniając wszystkie wspomniane interpretacje zaburzonej immunoekspresji β -kateniny, w pracach wymienionych powyżej autorów wykazano, że to molekularne zjawisko jest negatywnym czynnikiem rokowniczym w NDRP. Zaznaczyć należy, że w doniesieniach Kasego, Hommura i Choi zaburzona immunoekspresja β -kateniny była negatywnym czynnikiem prognostycznym wyłącznie w gruczolowym raku płuca [126,128,146]. Potwierdzenie statusu prognostycznego poziomu β -kateniny stanowią wyniki metaanalizy Mei, w której wykazano, że obniżony poziom frakcji błonowej β -kateniny wiąże się z krótszym przeżyciem chorych [223]. Autorzy tłumaczą mechanizm tej zależności zaburzeniem funkcjonowania kompleksu E-kadheryna-katenina, zahamowaniem międzykomórkowych oddziaływań adhezyjnych, co prowadzi do inwazji podścieliska i stymuluje potencjał metastatyczny guza pierwotnego. Istotnymi ograniczeniami wspomnianej metaanalizy pozostają m.in.: brak standaryzacji metody przeprowadzania i oceny odczynów immunohistochemicznych we włączonych do analizy badaniach (użycie różnych przeciwciał przeciwko β -kateninie, odmienne punkty odcięcia w interpretacji odczynów barwnych), istotne różnice pomiędzy analizowanymi grupami chorych w zakresie niektórych cech kliniczno-patologicznych (wiek, płeć) oraz zastosowanego leczenia uzupełniającego, a także włączenie do metaanalizy wyłącznie badań opublikowanych w języku angielskim. Autorzy metaanalizy postulują zaprojektowanie prospektywnego badania, z wystandaryzowanymi metodami immunohistochemicznymi, z zaplanowanym punktem odcięcia oraz użyciem jednakowych metod statystycznych do oceny wyników, które ostatecznie oceniłoby zależność przeżycia całkowitego od statusu β -kateniny w NDRP.

W raku płuca mutacje w genie kodującym β -kateninę opisywane są rzadko (ok. 4%) i nie stanowią głównego mechanizmu zaburzonej wewnątrzkomórkowej immunoekspresji tego białka. Xu i wsp. postulują, że zaburzona immunoekspresja β -kateniny może mieć różne podłoże molekularne w poszczególnych typach histologicznych raka płuca. Autorzy podkreślają, że obniżenie poziomu błonowej frakcji β -kateniny koreluje z obniżonym poziomem E-kadheryny w gruczolowych nowotworach płuca, co obserwowano w materiale z guzów pierwotnych, ale ta wzajemna zależność była szczególnie silnie wyrażona w materiale

pochodzącym z ognisk przerzutowych [224]. Xu i wsp. wnioskuje, że w gruczolowych rakach płuca zaburzona funkcja adhezyjnego kompleksu E-kadheryna-katenina jest głównym mechanizmem progresji nowotworu oraz rozwoju jego potencjału metastatycznego. W nowotworach o histologii płaskonabłonkowej natomiast podwyższony poziom frakcyjcytoplazmatycznej i jądrowej β -kateniny wykazywał silny związek z podwyższonym poziomem białka Wnt1, sugerując aktywację szlaku transdukcji sygnału zależnego od Wnt w tym podtypie histologicznym [194,224]. W transdukcji sygnału szlakiem Wnt każde zaburzenie funkcji białek kompleksu degradującego β -kateninę (aksyny, APC, GSK-3 β) oraz obniżenie ich poziomu prowadzi do nieprawidłowej immunoekspresji β -kateniny w komórce, której konsekwencją jest aktywacja docelowych białek szlaku Wnt i stymulacja proliferacji komórek [225].

W przedstawianej pracy analizowano ekspresję powyższych markerów wyłącznie w materiale pochodzącym z guzów pierwotnych. Nasze wyniki nie potwierdzają wniosków Xu i wsp. W omawianej pracy wykazaliśmy znamienne obniżenie poziomu E-kadheryny w płaskonabłonkowych rakach płuca w porównaniu do gruczolakoraków. Nie potwierdziliśmy wzajemnej korelacji między poziomem β -kateniny a białka Wnt1 dla żadnego z typów histologicznych raka płuca. Podstawowym ograniczeniem analizy Xu jest relatywnie niewielka liczebność grupy badanej – analizie poddano materiał pochodzący zaledwie od 41 chorych, co nie upoważnia do ostatecznego wnioskowania w tym zakresie. Dla zweryfikowania tych wniosków wymagane byłoby przeprowadzenie badań w grupie chorych o większej liczebności.

Cytowane dane z piśmiennictwa oraz wyniki omawianej pracy sugerują aktywację kanonicznego szlaku zależnego od białek Wnt w niedrobnokomórkowym raku płuca oraz jego udział w różnych etapach indukcji i promocji tego nowotworu: stymulacji proliferacji i hamowania apoptozy komórek nowotworowych, angiogenezy, indukcji transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej, naciekania podścieliska i tworzenia przerzutów, utrzymania puli nowotworowych komórek macierzystych oraz rozwoju mechanizmów oporności na chemioterapię i promieniowanie jonizujące. Jednoznaczna interpretacja znaczenia transdukcji sygnału szlakiem zależnym od Wnt w onkogenezie raka płuca jest trudna. Świadomość złożoności wzajemnych zależności pomiędzy różnymi białkami Wnt, regulacyjny wpływ aktywacji szlaków niekanonicznych, szerokie spektrum inhibitorów szlaku kanonicznego i mechanizmy epigenetyczne prowadzące do ich inaktywacji (głównie hipermetylacja promotorów genów kodujących inhibitory: WIF-1, aksynę, SFRP-1, Dkk-5, DACT2), a także współzależność z innymi szlakami (m.in. szlakami zależnymi od czynników wzrostu – HGF, EGF,

TGF β , VEGF, FGF i IGF; szlakami aktywnymi w embriogenezie i procesach różnicowania tkanek – Notch i Hedgehog; a także szlakami zależnymi od PG/Cox-2, PI3K/AKT, mTOR, Jak-STAT i Ras) nakazuje ostrożność interpretacyjną i unikanie nadmiernych uproszczeń we wnioskowaniu o indywidualnym znaczeniu poszczególnych komponentów analizowanego szlaku [226]. Aktywność szlaku zależnego od Wnt należy analizować w szerszym kontekście molekularnym, uwzględniającym w modelach symulacyjnych wymienione powyżej wzajemne oddziaływania. Ponadto, wiedzy na temat mechanizmu aktywacji szlaku Wnt w raku jelita grubego (jak dotąd najlepiej poznany model tej ścieżki sygnałowej) nie należy ekstrapolować na molekularną genezę innych nowotworów złośliwych, w tym raka płuca, ponieważ ostateczny efekt aktywacji tej ścieżki sygnałowej zależy także od rodzaju komórek efektorowych, na które oddziałują składowe szlaku. Wynikiomawianej pracy potwierdzają tę prawidłowość i odmienny wzorzec aktywacji szlaku Wnt w tych dwóch nowotworach. W procesie onkogenezy istotna wydaje się ponadto właściwa interpretacja zdarzeń zachodzących na poziomie białek oraz świadomość konieczności analizy funkcjonalnej aktywacji białek, a nie wyłączone wnioskowanie na podstawie ekspresji immunohistochemicznej. Wykrycie obecności białka nie powinno być traktowane jako surogat jego aktywnej funkcji. Wydaje się to nadmiernym uproszczeniem w kontekście współzależności molekularnych i może prowadzić do błędnych wniosków. Wspomnieć należy, że atrakcyjnym narzędziem badawczym na tym polu mogą się w przyszłości okazać strategie eliminacji białka –tzw. „knock-outu” białkowego, dające możliwość oceny funkcji poszczególnych białek onkogennych [228].

Obiecującą koncepcją onkologii molekularnej wydaje się kojarzenie kilku markerów białkowych o udowodnionym znaczeniu rokowniczym w sygnatury, co znamienne podwyższałoby moc prognostyczną molekularnego testu, zwiększało jego czułość i specyficzność. Liu i wsp. opracowali sygnaturę białkową o znaczeniu rokowniczym, która uwzględnia poziom białek CDK4, HSP90, p-CREB i CREB do stratyfikacji ryzyka chorych z NDRP [227]. Prognostyczna sygnatura proteomiczna mogłaby stanowić narzędzie wykorzystywane do oceny ryzyka nawrotu u chorych z NDRP i podejmowania decyzji terapeutycznych dotyczących zastosowania uzupełniającego leczenia onkologicznego u chorych z grupy wysokiego ryzyka. Ze względu na brak niezależnej wartości rokowniczej β -kateniny oraz E-kadheryny w niniejszej analizie, włączenie tych białek do sygnatur prognostycznych ma ograniczoną wartość. Analizowane białka nie są czynnikami prognostycznymi we wczesnym niedrobnokomórkowym raku płuca w populacji kaukaskiej i nie mogą stanowić narzędzia wykorzystywanego do selekcji chorych o wyższym ryzyku nawrotu, potencjalnie wymagających zastosowania uzupełniającego leczenia systemowego.

Podstawowym ograniczeniem skuteczności leczenia onkologicznego jest pierwotna lub nabyta oporność komórek nowotworowych, szczególnie rekrutujących się z puli nowotworowych komórek macierzystych, na leczenie systemowe i radioterapię. Dane z piśmiennictwa donoszą, że przekazywanie sygnału szlakiem Wnt/ β -katenina aktywuje transkrypcję genów kodujących białka: MDR-1, surwiwinę oraz liwinę, biorących udział w indukcji oporności na cytostatyki i promieniowanie jonizujące [162]. Dotychczas wykazano, że inaktywacja Wnt1 prowadzi do zahamowania transkrypcji indukowanej przez kompleks β -katenina/Tcf, uwolnienia cytochromu c, aktywacji kaspazy 9 i obniżenia poziomu surwiwiny, czego skutkiem jest promocja apoptozy komórek nowotworowych [162]. Aktywacja szlaku Wnt może wskazywać chorych z NDRP potencjalnie opornym na chemio- i radioterapię. W przyszłości atrakcyjną przestrzenią w badaniach nad szlakiem Wnt w NDRP byłoby poszukiwanie jego aktywnych inhibitorów, których stosowanie w skojarzeniu z chemioterapią lub radioterapią poprawiałoby skuteczność leczenia (poprzez przełamanie i/lub opóźnianie mechanizmów oporności oraz poprawę indeksu terapeutycznego), a także, co niezbędne dla praktycznego zastosowania takich terapii celowanych, zdefiniowanie czynników predykcyjnych.

Częstość występowania zaburzeń dotyczących szlaku transdukcji sygnału zależnego od białek Wnt i β -kateniny w niedrobnokomórkowym raku płuca, ich aktywna rola w onkogenezie oraz potencjalne implikacje kliniczne hamowania tego przekazywania uzasadniają prowadzenie dalszych badań na tym polu.

WNIOSKI

1. Poziom białka Wnt1 jest znamienne wyższy w nowotworach płuca o histologii gruczołowej i wielkokomórkowej w porównaniu z płaskonabłonkową, w nowotworach płuca o niższym stopniu złośliwości histologicznej i niższym stopniu zaawansowania patologicznego (st. I-IIA).
2. Poziom białka Wnt2 jest znamienne wyższy w nowotworach płuca o niższym stopniu złośliwości histologicznej.
3. Poziom E-kadheryny jest znamienne wyższy w nowotworach płuca o histologii gruczołowej i wielkokomórkowej w porównaniu z płaskonabłonkową oraz w nowotworach płuca o niższym stopniu złośliwości histologicznej.
4. Poziom frakcji błonowej β -kateniny jest znamienne wyższy w nowotworach płuca o niższym stopniu złośliwości histologicznej.
5. W analizie jednoczynnikowej nie wykazano związku pomiędzy czasem przeżycia wolnego od nawrotu oraz całkowitym czasem przeżycia a poziomem białek Wnt1 i Wnt2 w nowotworach płuca.
6. W analizie jednoczynnikowej nie wykazano związku pomiędzy czasem przeżycia wolnego od nawrotu oraz całkowitym czasem przeżycia a poziomem E-kadheryny w nowotworach płuca (punkt odcięcia na poziomie mediany – wskaźnik $H \leq 200$ vs. >200). Wykazano związek pomiędzy całkowitym czasem przeżycia a poziomem E-kadheryny analizowanym jako zmienna ciągła.
7. W analizie jednoczynnikowej wykazano znamienny związek pomiędzy czasem przeżycia wolnego od nawrotu oraz całkowitym czasem przeżycia a poziomem frakcji błonowej β -kateniny w nowotworach płuca.
8. W analizie jednoczynnikowej nie wykazano związku pomiędzy czasem przeżycia wolnego od nawrotu oraz całkowitym czasem przeżycia a poziomem frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny w nowotworach płuca.
9. W analizie wieloczynnikowej, po uwzględnieniu wpływu wieku, płci, typu histologicznego nowotworu płuca, stopnia zaawansowania patologicznego choroby, nie wykazano istotnego statystycznie związku pomiędzy poziomem białka Wnt1, Wnt2, E-kadheryny oraz trzech frakcji β -kateniny a czasem przeżycia wolnego od nawrotu oraz całkowitym czasem przeżycia.

STRESZCZENIE

Rak płuca jest najczęstszym nowotworem złośliwym [1,6 mln przypadków rocznie na świecie]. Wyniki leczenia tego nowotworu wciąż pozostają niezadowalające – wskaźnik 5-letniego przeżycia całkowitego wynosi jedynie 10-14%. U większości chorych nowotwór diagnozowany jest w zaawansowanym stadium (75%) i wymagają oni wdrożenia leczenia systemowego. Zastosowanie standardowej chemioterapii w niewyselekcjonowanej grupie chorych wiąże się z niskimi odsetkami odpowiedzi (30%) i uzyskaniem czasu przeżycia wolnego od progresji (PFS) w zakresie 3-5 miesięcy.

Aktualnie najistotniejszą szansą na poprawę wyników leczenia wydaje się poszukiwanie wiodących zaburzeń molekularnych w genomie raka płuca, analiza ich znaczenia prognostycznego i predykcyjnego, a następnie rozwój i wdrożenie adekwatnych terapii celowanych.

Najistotniejszym czynnikiem rokowniczym w niedrobnokomórkowym raku płuca jest stopień zaawansowania klinicznego choroby. Niestety nawet w grupie chorych z wczesnym rakiem płuca, w I stopniu zaawansowania klinicznego, u 18-24% chorych dochodzi do nawrotu. Świadczy to o znacznej różnorodności w zakresie poszczególnych stopni zaawansowania klinicznego i niewystarczającej ocenie ryzyka nawrotu wyłącznie na tej podstawie. Uzasadnione wydaje się poszukiwanie molekularnych czynników prognostycznych, które pozwoliłyby na bardziej precyzyjną stratyfikację ryzyka nawrotu oraz stanowiłaby wskazanie do wdrożenia leczenia uzupełniającego w tak wyodrębnionej grupie chorych „wysokiego ryzyka”.

Kanoniczny szlak transdukcji sygnału zależny od onkogennych glikoprotein Wnt i β -kateniny odkryto w latach 80-tych ubiegłego wieku. Jego aktywność jest determinowana przez poziom zgromadzonej w cytoplazmie β -kateniny. Cytoplazmatyczny poziom β -kateniny utrzymywany jest fizjologicznie na niskim poziomie poprzez dokonującą się w sposób ciągły proteasomalną degradację białka. Transdukcja sygnału szlakiem kanonicznym rozpoczyna się od połączenia ligandów Wnt 1 i Wnt2 z receptorami Fzd i LRP, co prowadzi do zahamowania fosforylacji β -kateniny. Niefosforylowana β -katenina gromadzi się w cytoplazmie komórki, a następnie ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie tworzy kompleksy z czynnikami transkrypcyjnymi Tcf/Lef, co indukuje ekspresję genów (*cyklinaD1*, *c-myc*, *MMP7*, *VEGF-A*, *surwiwina*). Na poziomie komórkowym β -katenina oddziałuje także z E-kadheryną, formując połączenia zwierające odpowiedzialne za oddziaływania międzykomórkowe, a zaburzenie tych interakcji może promować inwazję podścieliska i potencjał metastatyczny. Aktywacja szlaku

Wnt w nabłonkowych komórkach macierzystych może prowadzić do rozwoju nowotworów złośliwych, hamować apoptozę komórek nowotworowych, warunkować bardziej agresywny fenotyp nowotworu oraz jego oporność na chemioterapię i radioterapię.

Niniejsza rozprawa jest pierwszym opracowaniem oceniającym metodą immunohistochemiczną poziom białek z rodziny Wnt, E-kadheryny i β -kateniny, ich wzajemne zależności, związek z cechami klinicznymi i patologicznymi oraz ich znaczenie rokownicze w niedrobnokomórkowym raku płuca, w populacji kaukaskiej.

Do badania włączono 208 chorych poddanych radykalnej resekcji mięszu płucnego z powodu niedrobnokomórkowego raka płuca w latach 2005-2008 w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Mediana czasu obserwacji wyniosła 68 miesięcy. Wznowę miejscowo-regionalną obserwowano u 60 chorych (28,8%).

U 34 chorych (16,3%) stwierdzono przerzuty odległe. W analizowanej grupie odnotowano 82 zgony (39,4%).

Z 416 bloków parafinowych (po 2 reprezentatywne od każdego z chorych) skonstruowano mikromacierze tkankowe. Poziom analizowanych białek oceniono immunohistochemicznie z udziałem swoistych przeciwciał, wykorzystując wskaźnik H.

Obecność białka Wnt1 wykazano w 103 przypadkach (49,5%). Przyjmując wartość mediany jako punkt odcięcia wykazano, że poziom białka był znamienne niższy w guzach pierwotnych o histologii płaskonabłonkowej w porównaniu z gruczołową i wielkomórkową ($p \leq 0,0001$), w nowotworach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej ($p = 0,003$) oraz w nowotworach o wyższym stopniu zaawansowania patologicznego (IIB-III A; $p = 0,042$). Wykazano znamienne korelację poziomu białka Wnt1 z poziomem białka Wnt2 ($r = 0,161$, $p = 0,021$).

Obecność białka Wnt2 wykazano w 46 przypadkach (22,3%). Przyjmując wartość mediany jako punkt odcięcia, dowiedziono istotnego statystycznie związku pomiędzy poziomem białka Wnt2 a stopniem zróżnicowania histologicznego ($p = 0,002$) – nowotwory o wyższym stopniu złośliwości histologicznej wykazywały znamienne niższy poziom analizowanego białka.

Pozytywny wynik reakcji barwnych dla E-kadheryny uzyskano w 77 przypadkach (37,4%). Przyjmując wartość mediany jako punkt odcięcia wykazano, że poziom E-kadheryny był znamienne niższy w guzach pierwotnych o histologii płaskonabłonkowej w porównaniu z

gruczołową i wielkokomórkową ($p=0,001$), w nowotworach o wyższym stopniu złośliwości histologicznej ($p=0,01$), a także w guzach rozlegle naciekających opłucną ($p=0,039$).

Reakcje barwne dla β -kateniny oceniano oddzielenie w 3 kompartmentach komórkowych: jądrze, błonie komórkowej oraz cytoplazmie, ze względu na różne znaczenie biologiczne tego białka w powyższych lokalizacjach. Obniżenie poziomu frakcji błonowej β -kateniny wykazano w 158 przypadkach NDRP (76,3%), w 72 przypadkach potwierdzono obecność β -kateniny w cytoplazmie (34,8%), natomiast tylko w 3 przypadkach obserwowano odczyn jądrowy (1,4%). Przyjmując wartość mediany jako punkt odcięcia, wykazano znamiennej statystycznie zależność poziomu frakcji błonowej β -kateniny od stopnia zróżnicowania histologicznego ($p=0,008$) – nowotwory o wyższym stopniu złośliwości histologicznej wykazywały niższy poziom analizowanego białka.

W omawianej analizie potwierdzono znaczenie rokownicze poznanych wcześniej czynników ryzyka: cechy T ($p<0,0001$), średnicy guza pierwotnego ($p<0,0001$), stopnia naciekania opłucnej ($p=0,001$), cechy N ($p<0,0001$) oraz stopnia zaawansowania patologicznego nowotworu ($p<0,0001$), które osiągnęły znamienność statystyczną zarówno dla całkowitego czasu przeżycia (OS), jak i czasu przeżycia wolnego od nawrotu (RFS). Ponadto wykazano istotną statystycznie zależność czasu przeżycia od stopnia zróżnicowania histologicznego nowotworu ($p<0,023$).

W przedstawianej pracy, w jednoczynnikowym modelu regresji Coxa, przyjmując wartość mediany jako punkt odcięcia, nie wykazano istotnego statystycznie związku czasu przeżycia wolnego od nawrotu oraz całkowitego czasu przeżycia od poziomu białka Wnt1 (odpowiednio $p=0,183$; HR=0,754 i $p=0,168$; HR=0,735), Wnt2 (odpowiednio $p=0,624$; HR=0,881 i $p=0,697$; HR=0,899), E-kadheryny (odpowiednio $p=0,604$; HR=0,893 i $p=0,107$; HR=0,644), a także frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny (odpowiednio $p=0,609$; HR=0,893 i $p=0,7$; HR=0,914). Udowodniono natomiast znamienny statystycznie związek między poziomem E-kadheryny analizowanym jako zmienna ciągła a czasem całkowitego przeżycia (Cox $p=0,039$; HR=0,996 95%CI 0,993-1,000). Wykazano istotną statystycznie zależność czasu przeżycia wolnego od nawrotu oraz całkowitego czasu przeżycia od poziomu frakcji błonowej β -kateniny (punkt odcięcia na poziomie mediany – wskaźnik $H \leq 200$ vs. >200 ; odpowiednio $p=0,004$; HR=0,419 i $p=0,013$; HR=0,461).

W analizie wieloczynnikowej, po uwzględnieniu cech klinicznych i patologicznych, nie wykazano wpływu analizowanych białek na czas przeżycia wolnego od nawrotu i czas całkowitego przeżycia ($p>0,05$). W świetle wyników omawianej pracy analizowane białka nie są

zatem czynnikami prognostycznymi we wczesnym niedrobnokomórkowym raku płuca w populacji kaukaskiej i nie mogą stanowić narzędzia wykorzystywanego do selekcji chorych o wyższym ryzyku nawrotu, potencjalnie wymagających zastosowania uzupełniającego leczenia systemowego.

Aktywacja szlaku sygnałowego zależnego od Wnt stymuluje proces samoodnowy nowotworowych komórek macierzystych oraz indukuje oporność na cytostatyki i promieniowanie jonizujące. Kojarzenie inhibitorów szlaku Wnt z chemioterapią i radioterapią potencjalnie mogłoby poprawić wyniki leczenia poprzez opóźnianie lub przełamanie mechanizmów oporności. Ponadto w praktyce klinicznej konieczne byłoby zdefiniowanie czynnika predykcyjnego takiej terapii celowanej. Przedstawiona w niniejszej rozprawie immunohistochemiczna analiza białek szlaku Wnt stanowi podstawę do dalszych badań w tym zakresie.

ABSTRACT

Lung cancer is the most common malignancy (1,6 mln new cases diagnosed yearly worldwide). Treatment results remain unsatisfactory, with overall 5-year survival probability of 10-14% in European Union. Most patients are diagnosed in advanced stage (75%) and require systemic therapy. The use of the standard cytotoxic treatment in unselected population of patients leads to poor response rates of approximately 30% and progression free survival in the range of 3 to 5 months.

Substantial chance for improvement in treatment outcomes is foreseen through search for driving molecular aberrations in the genome of lung cancer, analysis of its prognostic and predictive relevance, and subsequent the development of adequate targeted therapies.

The stage of disease is the most important prognostic factor in non small cell lung cancer. Unfortunately, even in the group of patients with stage I, the 5 year recurrence rate is approximately 18-24% suggesting significant heterogeneity among particular lung cancer stages and the insufficient evaluation of the risk of recurrence based solely on the TNM classification. It thus seems justified to identify molecular prognostic factors for the precise assessment of the recurrence risk and qualification for the adjuvant therapy in the high risk group.

The canonical signaling pathway, dependent on Wnt glycoproteins and β -catenin, was discovered in the 1980s. Its activity is determined by the level of β -catenin accumulated in the cytoplasm. Physiologically the cytoplasmic level of β -catenin is maintained low by the continuous proteosomal degradation. Signal transduction through canonical pathway starts with the binding of Wnt1 and Wnt2 ligands with Fzd and LRP receptors, leading to inhibition of β -catenin phosphorylation. Unphosphorylated β -catenin accumulates in the cytoplasm and is subsequently translocated to the nucleus, where it creates complexes with transcriptional factors Tcf/Lef and promotes genes expression (*cyclin D1*, *c-myc*, *MMP7*, *VEGF-A*, *survivin*). On the cellular level β -catenin interacts also with E-cadherin and forms the adherens junctions responsible for the intercellular adhesion. The dysfunction of this interaction promotes stromal invasion and metastatic potential. The Wnt signaling pathway activation in epithelial stem cells may lead to the induction of neoplasms, inhibition of cancer cell apoptosis, development of more aggressive cancer phenotype and its resistance to chemotherapy and radiation.

The presented study is the first comprehensive immunohistochemical assessment of several Wnt family proteins, E-cadherin and β -catenin, their reciprocal interaction, association with clinical and pathological characteristics and prognostic significance in non small cell lung cancer in Caucasian population.

The study group consists of 208 non small-cell lung cancer patients who underwent radical pulmonary resection at Thoracic Surgery Department of Medical University of Gdańsk from 2005-2008. The median follow up was 68 months. The locoregional recurrence was noted in 60 patients (28,8%), 34 patients (16,3%) developed distant metastases, 82 deaths (39,4%) were noted in the study group.

Two representative core tissue sections were taken from each of 416 paraffin blocks and arranged into tissue microarrays (TMA). The expression of selected proteins was evaluated by IHC and scored according to *H-score*.

The Wnt1 expression was detected in 103 cases (49,5%). According to median value, the expression of this protein was significantly lower in the tumors with squamous histology as compared to adenocarcinomas and large cell carcinomas ($p \leq 0,0001$), tumors with higher grade ($p=0,003$) and higher stage (IIB-III A; $p=0,042$). Significant correlation between Wnt1 and Wnt2 expression was noted ($r=0,161$, $p=0,021$).

The Wnt2 expression was detected in 46 cases (22,3%). According to median value, significant association between Wnt2 expression and tumor grade was observed ($p=0,002$) - the expression of this protein was significantly lower in tumors with higher grade.

The E-cadherin expression was detected in 77 cases (37,4%). According to median value, the expression of this protein was significantly lower in tumors with squamous histology compared to adenocarcinomas and large cell carcinomas ($p=0,001$), tumors with higher grade ($p=0,01$) and massive pleural invasion ($p=0,039$).

The expression of β -catenin was analyzed in membranous, cytoplasmic and nuclear compartment. The reduced membranous expression of β -catenin was observed in 158 cases (76,3%). The cytoplasmic expression was found in 72 cases (34,8%). Only in 3 cases (1,4%) β -catenin was expressed in the nucleus. According to median value, the membranous expression of β -catenin was significantly associated with tumor grade ($p=0,008$) – the expression was lower in tumors with higher grade.

This study confirmed prognostic significance of well known factors on recurrence free survival and overall survival: T status ($p<0,0001$), tumor diameter ($p<0,0001$), pleural invasion ($p=0,001$), N status ($p<0,0001$) and stage ($p<0,0001$). The significant association between overall survival and tumor grade ($p<0,023$) was also observed.

In the univariate Cox analysis there were no significant associations between survival (neither RFS nor OS) and Wnt1 ($p=0,183$; HR=0,754 and $p=0,168$; HR=0,735, respectively), Wnt2 ($p=0,624$; HR=0,881 and $p=0,697$; HR=0,899), E-cadherin ($p=0,604$; HR=0,893 and $p=0,107$; HR=0,644), cytoplasmic β -catenin expression ($p=0,609$; HR=0,893 and $p=0,7$; HR=0,914), according to median values. E-cadherin expression, analyzed as a continuous variable, was significantly associated with overall survival (Cox $p=0,039$; HR=0,996 95%CI 0,993-1,000). Significant association between recurrence free survival, overall survival and membranous β -catenin expression was observed ($p=0,004$; HR=0,419 and $p=0,013$; HR=0,461, respectively).

In the multivariate Cox analysis adjusted for clinical and pathological features, no significant association between recurrence free survival or overall survival and the expression of analyzed proteins was observed ($p>0,05$ for all comparisons). The analyzed proteins are not considered prognostic factors in early lung cancer in Caucasian population and should not be used as a tool to select the patients with higher risk of recurrence, who may potentially be candidates for adjuvant therapy.

The activation of the Wnt pathway leads to the stimulation of cancer stem cells renewal and the induction of chemo- and radioresistance. The development of Wnt inhibitors to be combined with chemotherapy and radiotherapy could potentially improve the treatment efficacy through delay or overcoming of resistance mechanisms. For clinical practice it would be essential to define the predictive factor for this targeted therapy. Present study provides basic immunohistochemical data on several key proteins of Wnt pathway, serving as background information for further molecular and functional studies of this pathway in lung cancer.

PIŚMIENNICTWO

1. Ridge CA, McErlean AM, et al. Epidemiology of lung cancer. *Semin Intervent Radiol* 2013; 30: 93-98
2. Harting FH, Hesse W, et al. Der Lungenkrebs, die Bergenkrankheit in den Schneeberger gruben. *Vierteljahresschr Gerichtl Med* 1879; 30: 296-309
3. Rubin SA. Lung cancer: past, present, and future. *J Thorac Imaging* 1991; 7: 1-8
4. Arnstein A. Über den sogenannten "Schneeberger Lungenkrebs." *Wien Klin Wchnshcr.* 1913; 26:748-752
5. Alberg AJ, Brock MV, et al. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013; 143: 1-29
6. Wojciechowska U, Didkowska J i wsp. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2012 roku. wyd. Krajowy Rejestr Nowotworów 2014
7. Krzakowski M, Warzocha K i wsp. Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych, wyd. ViaMedica 2013
8. Travis WD, Brambilla E, et al. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials in 2013. *J Clin Oncol.* 2013; 31: 992-1001
9. Shopland DR. Tobacco use and its contribution to early cancer mortality with a special emphasis on cigarette smoking. *Environ Health Perspect* 1995; 103: 131-142
10. Pfeifer GP, Denissenko MF, et al. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 2002; 21: 7435-7451
11. National Research Council. Environmental Tobacco Smoke: Measuring Exposures and Assessing Health Effects. Washington, DC: wyd. National Academy Press; 1986
12. US Department of Health and Human Services (DHHS). The Health Consequences of Involuntary Smoking. A Report of the Surgeon General [Publication No. (PHS) 87-8398]. Washington, DC: wyd. DHHS; 1986

13. Hackshaw AK, Law MR, et al. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ* 1997; 315: 980-988
14. Vineis P, Alavanja M, et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 99-106
15. Neuberger JS, Field RW, et al. Occupation and lung cancer in nonsmokers. *Rev Environ Health* 2003; 18: 251-267
16. Pawel DJ, Puskin JS, et al. The U.S. Environmental Protection Agency's assessment of risks from indoor radon. *Health Phys* 2004; 87: 68-74
17. Pershagen G, Akerblom G, et al. Residential radon exposure and lung cancer in Sweden. *N Engl J Med* 1994; 330: 159-164
18. Yang P. Lung cancer in never smokers. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011; 32: 10-21
19. Brenner DR, Hung RJ, et al. Lung cancer risk in never-smokers: a population-based case-control study of epidemiologic risk factors. *BMC Cancer* 2010; 10: 285
20. Dela Cruz CS, Tanoue L, et al. Lung cancer: Epidemiology, etiology and prevention. *Clin Chest Med* 2011; 32: 605-644
21. De Angelis R, Sant M, et al. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EURO-CARE-5—a population-based study. *Lancet Oncology* 2014; 15: 23-34
22. Howington JA, Blum MG, et al. Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer. *Chest* 2013; 143 (supl.): 278-313
23. Martins RG, D'Amico TA, et al. The management of patients with stage IIIA non-small cell lung cancer with N2 mediastinal lymph node involvement. *J Natl Cancer Inst* 2012; 10: 599-613
24. Horn L, Johnson DH, et al. Evans A. Graham and the first pneumonectomy for lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3268-3275
25. Ricardi U, Badellino S, et al. Stereotactic radiotherapy for early stage non-small cell lung cancer. *Radiat Oncol J* 2015; 33: 57-65
26. PORT Meta-analysis Trialists Group. Postoperative radiotherapy in non-small cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomized controlled trials. *Lancet* 1998; 352: 257-263

27. Arriagada R, Dunant A, et al. Long-term results of the international adjuvant lung cancer trial evaluating cisplatin-based chemotherapy in resected lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 25-42
28. Butts CA, Ding K, et al. Randomized phase III trial of vinorelbine plus cisplatin compared with observation in completely resected stage IB and II non-small lung cancer: updated survival analysis of JBR-10. *J Clin Oncol* 2010; 28: 29-34
29. Douillard JY, Rosell R, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIA non-small cell lung cancer [Adjuvant Navelbine International Trialist Association (ANITA)]: a randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 2006; 7: 719-729
30. Pignon JP, Tribodet H, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3552-3559
31. Auperin A, Le Pechoux C, et al. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2181-2190
32. Baas P, Belderbos JS, et al. Chemoradiation therapy in non-small cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* 2011; 23: 140-149
33. Schiller JH, Harrington D, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002; 346: 92-98
34. Pujol JL, Barlesi F, et al. Should chemotherapy combinations for advanced non-small cell lung cancer be platinum-based? A meta-analysis of phase III randomized trials. *Lung Cancer* 2006; 51: 335-345
35. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. *Br Med J* 1995; 311: 899-909
36. Schiller JH, Harrington D, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002; 346: 92-98
37. Scagliotti GV, Parikh P, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3543-3551

38. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 2002; 297: 63-64
39. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012; 489, 519-525
40. Ding L, Getz G, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008; 455, 1069-1075
41. Kim SC, Jung Y, et al. A high-dimensional, deep-sequencing study of lung adenocarcinoma in female never-smokers. *PLoS ONE* 2013; 8, e55596
42. The Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP) and Network Genomic Medicine (NGM). A genomics-based classification of human lung tumors. *Sci Transl Med* 2013; 5, 209
43. Kris MG, Johnson BE, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA* 2014; 311: 1998-2006
44. Behrens J, Lustig B, et al. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 477-87
45. Nusse R, van Ooyen A, et al. Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (INT-1) on mouse chromosome 15. *Nature* 1984; 307: 131-136
46. Nusse R, Varmus HE, et al. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982; 31: 99-109
47. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E, et al. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980; 287: 795-801
48. Rijsewicz F, Schuermann M, et al. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene INT-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 1987; 50: 649-657
49. Nusse R, Brown A, et al. A new nomenclature for INT-1 and related genes: the WNT gene family. *Cell* 1991; 64: 231
50. Miki A, Nusse R, et al. WNTs ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 2006; 25: 7461-7468
51. Smolnik BD, MacMahon JA, et al. Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 1267-1275

52. Willert K, Brown JD, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003; 423: 448-452
53. Widelitz R. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. *Growth factors* 2005; 23: 111-116
54. Hart MJ, de los Santos R, et al. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 1998; 8: 573-581
55. Kishida S, Yamamoto H, et al. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem* 1998; 273: 10823-10826
56. Aberle H, Bauer A, et al. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* 1997; 16:3797-3804
57. Latres E, Chiaur DS, et al. The human F box protein beta-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene* 1999; 18:849-854
58. Liu C, Kato Y, et al. Beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:6273-6278
59. Gordon MD, Nusse R, et al. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 2006; 281: 224229-224233
60. Schulte G, Bryja V, et al. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 518-525
61. Quaiser T, Anton R, et al. Kinases and G proteins join the Wnt receptor complex. *Bioessays* 2006; 28: 339-343
62. Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 273-282
63. He X, Semenov M, et al. LDL-receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 2004; 131: 1663-1677
64. Wallingford JB, Habas R, et al. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 2005; 132: 4421-4436

65. Eastman Q, Grosschedl R, et al. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 233-240
66. Hendriksen J, Fagotto F, et al. RanBP3 enhances nuclear export of active (beta-)catenin independently of CRM1. *J Cell Biol* 2005; 171: 785-797
67. Pongracz JE, Stockley RA, et al. Wnt signaling in lung development and diseases. *Respir Res* 2006; 7: 15
68. Kramps T, Peter O, et al. Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 2002; 109: 47-60
69. Parker DS, Cadigan KM, et al. Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wingless signaling in *Drosophila*. *Development* 2002; 129: 2565-2573
70. Townsley FM, Cliffe A, et al. Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 626-633
71. Cavallo RA, Cox RT, et al. *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 1998; 395: 604-608
72. Chen G, Fernandez J, et al. A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev* 1999; 13: 2218-2230
73. Mazières J, He B, et al. Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett* 2005; 222: 1-10
74. Kawano Y, Kypta R, et al. Secreted antagonists of the Wnt pathway. *J Cell Sci* 2003; 116: 2627-2634
75. Turashvili G, Bouchal J, et al. Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. *Pathobiology*. 2006; 73: 213-223
76. Weeraratna AT, Jiang Y, et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 2002; 1: 279-288
77. Chen S, Guttridge Z, et al. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin /T-cell factor-mediated transcription. *J Cell Biol* 2001; 152: 87-96
78. Kinzler KW, Nilbert MC, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; 253: 661-665

79. Nishisho I, Nakamura Y, et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; 253:665-669
80. Sparks AB, Morin PJ, et al. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 1130-1134
81. Mimori-Kiyosue Y, Tsukita S, et al. Where is APC going? *J Cell Biol* 2001; 154: 1105-1109
82. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; 14: 1837-1851
83. Satoh S, Daigo Y, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 2000; 24:245-250
84. Minoo P, Hamdan H, et al. TTF-1 regulates lung epithelial morphogenesis. *Dev Biol* 1995; 172: 694-698
85. Monkley SJ, Delaney SJ, et al. Targeted disruption of WNT2 gene results in placentation effects. *Dev* 1996; 122: 3343-3353
86. Lako M, Strachan T, et al. Isolation, characterisation and embryonic expression of WNT11, a gene which maps to 11q13.5 and has possible roles in the development of skeleton, kidney and lung. *Gene* 1998; 219: 101-110
87. Weidenfeld J, Shu W, et al. The Wnt7b promoter is regulated by TTF-1, GATA-6 and Foxa2 in the lung epithelium. *J Biol Chem* 2002; 277: 21061-21070
88. Okubo T, Hogan BL, et al. Hyperactive Wnt signaling changes the developmental potential of embryonic lung endoderm. *J Biol* 2004; 3: 11
89. Mucenski ML, Nation JM, et al. Beta-catenin regulates differentiation of respiratory epithelial cells in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289: 971-979
90. Yan Z, Kui Z, et al. Reviews and prospectives of signaling pathway analysis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Autoimm Rev* 2014; 13: 1020-1025
91. Keith WN. From stem cells to cancer: balancing immortality and neoplasia. *Oncogene* 2004; 23: 5092-5094
92. Reya T, Duncan AW, et al. A role for Wnt signaling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003; 423: 409-414

93. Sato N, Meijer L, et al. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 2004; 10: 55-63
94. Jamieson CH, Ailles LE, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Eng J Med* 2004; 315: 657-667
95. Gat U, DasGupta R, et al. De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 1998; 95: 605-614
96. van de Wetering M, Sancho E, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002; 111: 241-250
97. Akiri G, Cherian MM, et al. Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2009; 28: 2163-2172
98. Kotsinas A, Evangelou K, et al. Proliferation, but not apoptosis, is associated with distinct beta-catenin expression patterns in non-small cell lung carcinomas: relationship with adenomatous polyposis coli. *Am J Pathol* 2002; 161: 1619-1634
99. Ohgaki H, Kros JM, et al. APC mutations are infrequent but present in human lung cancer. *Cancer Lett* 2004; 207: 197-203
100. Sunaga N, Kohno T, et al. Constitutive activation of the Wnt signaling pathway by CTNNB1 (beta-catenin) mutations in a subset of human lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 30: 316-321
101. He B, You K, et al. A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells. *Neoplasia* 2004; 6: 7-14
102. You L, He B, et al. Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene* 2004; 23: 6170-6174
103. Maziars J, He B, et al. Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett* 2005; 222: 1-10
104. Lemjabbar-Alaoui H, Dasari V, et al. Wnt and Hedgehog are critical mediators of cigarette smoke-induced lung cancer. *Plos One* 2006; 1: 93
105. Liu F, Killian JK, et al. Epigenomic alterations and gene expression profiles in respiratory epithelia exposed to cigarette smoke condensate. *Oncogene* 2010; 29: 3650-3664

106. Katoh M. Expression and regulation of WNT1 in human cancer: up-regulation of WNT1 by beta-estradiol in MCF-7 cells. *Int J Oncol* 2003; 22: 209-212
107. Wong SC, Lo SF, et al. Expression of frizzled-related protein and Wnt-signaling molecules in invasive human breast tumors. *J Pathol* 2002; 196: 145-153
108. Daniel VC, Peacock CD, et al. Developmental signaling pathways in lung cancer. *Respirology*. 2006; 11: 234-240
109. Nakashima T, Liu D, et al. Wnt1 overexpression associated with tumor proliferation and a poor prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Oncol Rep* 2008; 19: 203-209
110. Wang Q, Zhan P, et al. The correlation between the expression of Wnt1 and prognosis in resected non-small cell lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2010; 13: 586-590
111. Xu X, Sun PL, et al. Aberrant Wnt1/beta-catenin expression is an independent poor prognostic marker of non-small cell lung cancer after surgery. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 716-724
112. Chen S, Guttridge Z, et al. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin /T-cell factor-mediated transcription. *J Cell Biol* 2001; 152: 87-96
113. Rhee CS, Sen M, et al. Wnt and frizzled receptors as potential targets for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* 2002; 21: 6598-6605
114. Nessling M, Solinas-Toldo S, et al. Mapping of chromosomal imbalances in gastric adenocarcinoma revealed amplified protooncogenes MYCN, MET, WNT2 and ERBB2. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 23: 307-316
115. Vider BZ, Zimmer A, et al. Evidence for the involvement of the Wnt2 gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 1996; 12: 153-158
116. Pham K, Milovanovic T, et al. Wnt ligand expression in malignant melanoma: pilot study indicating correlation with histopathological features. *Mol Pathol* 2003; 56: 280-285
117. Huang Y, Liu G, et al. Wnt-5a regulates proliferation in lung cancer cells. *Oncol Rep* 2010; 23: 177-181
118. Huang CL, Liu D, et al. Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor - an expression in non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8765-8773

119. Winn RA, van Scoyk M, et al. Antitumorigenic effect of Wnt 7a and Fzd 9 in non-small cell lung cancer cells is mediated through ERK-5-dependent activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 2006; 281: 26943-26950
120. Calvo R, West J, et al. Altered HOX and Wnt7a expression in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12776-12781
121. Ohira T, Gemmil RM, et al. Wnt7a induces E-cadherin in lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10429-10434
122. Giles RH, van Es JH, et al. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653:1-24
123. Uematsu K, He B, et al. Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression. *Oncogene* 2003; 22: 7218-7221
124. Wei Q, Zhao Y, et al. Dishevelled family proteins are expressed in non-small cell lung cancer and function differentially on tumor progression. *Lung Cancer* 2008; 62: 181-192
125. Kren I, Hermanova M, et al. Downregulation of plasma membrane expression/cytoplasmic accumulation of beta-catenin predicts shortened survival in non-small cell lung cancer. A clinicopathological study of 100 cases. *Cesk Patol* 2003; 39: 17-20
126. Hommura F, Furuuchi K, et al. Increased expression of beta-catenin predicts better prognosis in non-small cell lung carcinomas. *Cancer* 2002; 94: 752-758
127. Retera JM, Leers MP, et al. The expression of beta-catenin in non-small-cell lung cancer: a clinicopathological study. *J Clin Path* 1998; 51: 891-894
128. Kase S, Sugio K, et al. Expression of E-cadherin and beta-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4789-4796
129. Nakatani Y, Masudo K, et al. Abberant nuclear localization and gene mutation of beta-catenin in low-grade adenocarcinoma of fetal lung type: up-regulation of the Wnt pathway may be a common denominator of the development of tumors that form morules. *Mod Pathol* 2002; 15: 617-624
130. Suzuki M, Shigematsu H, et al. Synchronous alterations of Wnt and EGFR signaling pathways through aberrant methylation and mutation in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6087-6092

131. Sidhu M, Nawroth R, et al. EMMPRIN regulates the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway, a potential role in accelerating lung tumorigenesis. *Oncogene* 2010; 29: 887-898
132. Xu HT, Wei Q, et al. Overexpression of axin downregulates TCF-4 and inhibits the development of lung cancer. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 3251-3259
133. Barker N, Morin PJ, et al. The Yin-Yang of TCF/beta-catenin signaling. *Adv Cancer Res* 2000; 77: 1-24
134. Aberle H, Schwartz H, et al. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 1996; 61: 514-523
135. Wijnhoven BPL, Dinjens WNM, et al. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* 2000; 87: 992-1005
136. Shiozaki H, Tahara H, et al. Expression of immuno-reactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* 1991; 139: 17-23
137. Kadowaki T, Shiozaki H, et al. E-cadherin and alpha-catenin expression in human esophageal cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 291-296
138. Matsuura K, Kawanishi J, et al. Altered expression of E-cadherin in gastric cancer tissues and carcinomatous fluid. *Br J Cancer* 1992; 66: 1122-1130
139. Hiscox S, Jiang WG, et al. Expression of E-cadherin, alpha, beta, and gamma-catenin in human colorectal cancer. *Anticancer Res* 1997; 17: 1349-1354
140. Ihara A, Koizumi H, et al. Expression of epithelial cadherin and alpha- and beta-catenins in nontumoral livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1996; 23: 1441-1447
141. Cheng L, Nagabhushan M, et al. Expression of E-cadherin in primary and metastatic prostate cancer. *Am J Pathol* 1996; 48: 1375-1380
142. Liu D, Huang C, et al. E-cadherin expression associated with differentiation and prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 949-955
143. Kase S, Sugio K, et al. Expression of E-cadherin and b-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4789-4796

144. Hidaka N, Nagao T, et al. Expression of E-cadherin, a-catenin, b-catenin, g-catenin in bronchioloalveolar carcinoma and conventional pulmonary adenocarcinoma: an immunohistochemical study. *Mod Pathol* 1998; 11: 1039-1045
145. Qiu X, Yang X, et al. A study of E-cadherin and beta-catenin expression and their correlation with prognosis of non-small cell lung carcinoma. *Chin J Pathol* 2002; 31: 318-321
146. Choi YS, Shim YM, et al. Prognostic significance of E-cadherin and beta-catenin in resected stage I non small cell lung cancer. *Eur J Cardiothoracic Surg* 2003; 24: 441-449
147. Kim J, You L, et al. Wnt inhibitory factor inhibits lung cancer cell growth. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133: 733-737
148. Licchesi JD, Westra WH, et al. Epigenetic alteration of Wnt pathway antagonists in progressive glandular neoplasia of the lung. *Carcinogenesis* 2008; 29: 895-904
149. Fukui T, Kondo M, et al. Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2005; 24: 6323-6327
150. Wissmann C, Wild PJ, et al. WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung and bladder cancer. *J Pathol* 2003; 201: 204-212
151. Mazieres J, He B, et al. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 4717-4720
152. Yang TM, Leu SW, et al. WIF-1 promoter region hypermethylation as an adjuvant diagnostic marker for non-small cell lung cancer-related malignant pleural effusions. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 919-924
153. Forget MA, Turcotte S, et al. The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumors and in some common cancer types. *Br J Cancer* 2007; 96: 646-653
154. Sheng SL, Huang G, et al. Clinical significance and prognostic value of serum Dickkopf-1 concentrations in patients with lung cancer. *Clin Chem* 2009; 55: 1656-1664
155. Nozaki I, Tsuji T, et al. Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2001; 19: 117-121

156. Suzuki M, Shigematsu H, et al. Synchronous alterations of Wnt and EGF receptor signaling pathways through aberrant methylation and mutation in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6087-6092
157. Brabender J, Usadel H, et al. Adenomatous polyposis coli gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer associated with survival. *Oncogene* 2001; 20: 3528-3532
158. Usadel H, Brabender J, et al. Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum and plasma DNA of patients with lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 371-375
159. Tang M, Torres-Lanzas J, et al. Wnt signaling promoter hypermethylation distinguishes lung primary adenocarcinomas from colorectal metastasis to the lung. *Int J Cancer* 2006; 119: 2603-2606
160. Kanzaki H, Ouchida M, et al. Single nucleotide polymorphism of the AXIN2 gene is preferentially associated with human lung cancer risk in a Japanese population. *Int J Mol Med* 2006; 18: 279-284.
161. Dehan E, Ben-Dor A, et al. Chromosomal aberrations and gene expression profiles in non-small cell lung cancer. *Lung cancer* 2007; 56: 175-184
162. Chen S, Guttridge DC, et al. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription. *J Cell Biol* 2001; 152: 87-96
163. Takahashi-Yanaga F, Kahn M, et al. Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3153-3162
164. Yuan D, Liu L, et al. Transcriptional regulation of livin by beta-catenin/TCF signaling in human lung cancer cell lines. *Mol Cell Biochem* 2007; 306: 171-178
165. Gao Y, Liu Z, et al. Inhibition of cytoplasmatic GSK-3 β increases cisplatin resistance through activation of Wnt/beta-catenin signaling in A549/DDP cells. *Cancer Lett* 2013; 336: 231-239
166. Yang Y, Li H, et al. The noncoding RNA expression profile and the effect of lncRNA AK126698 on cisplatin resistance in non-small cell lung cancer. *PloS One* 2013; 8: 65309

167. Okamoto J, Hirata T, et al. EMX2 is epigenetically silenced and suppress growth in human lung cancer. *Oncogene* 2010; 29: 5969-5975
168. Lee SB, Gong YD, et al. 2,3,6-Trisubstituted quinoxaline derivative, a small molecule inhibitor of the Wnt/beta-catenin signaling pathway, suppresses cell proliferation and enhances radiosensitivity in A549/Wnt2 cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2013; 43: 746-752
169. Li X, Cai L, et al. ING4 induces cell growth inhibition in human lung adenocarcinoma A549 cells by means of Wnt-1/beta-catenin signaling pathway. *Anat Rec* 2008; 291: 593-600
170. Wang HQ, Xu ML, et al. Frizzled-8 as a putative therapeutic target in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Comm* 2012; 417: 62-66
171. Tennis MA, Vanscoyk MM, et al. Methylation of Wnt7a is modulated by DNMT1 and cigarette smoke condensate in non-small cell lung cancer. *PloS One* 2012; 7: 32921
172. Kim J, You L, et al. Wnt inhibitory factor inhibits lung cancer cell growth. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133: 733-737
173. Jia Y, Yang Y, et al. Epigenetic regulation of DACT2, a key component of the Wnt signaling pathway in human lung cancer. *J Pathol* 2013; 230: 194-204
174. Tsuji T, Nozaki I, et al. Antiproliferative activity of REIC/Dkk-3 and its significant downregulation in non-small cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Comm* 2001; 289: 257-263
175. Gurney A, Axelord F, et al. Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 11717-11722
176. Hitt E. Wnt signaling inhibition: will decades of effort be fruitful at last? *OncLive* 2013;
177. El-Khoueiry AB, Ning Y, et al. A phase I first-in-human study of PRI-724 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2013; 31: abstract 2501
178. Watanabe K, Dai X, et al. A WNTer revisit: new faces of beta-catenin and TCFs in pluripotency. *Sci Signal* 2011; 4: 41
179. Watanabe K, Dai X, et al. Winning WNT: race to Wnt signaling inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 5929-5930

180. Momparler RL, Bouffard DY, et al. Pilot phase I-II study on 5-aza-2-deoxycytidine (decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anti Cancer Drugs* 1997; 8: 358-368
181. Kumar GL, Rudbeck L, et al. Education Guide. Immunohistochemical Staining Methods.
182. Pileri SA, Roncador G, et al. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol* 1997; 183: 116-123
183. Vosse BA, Seelentag W, et al. Background staining of visualization systems in immunohistochemistry - comparison of the Avidin-Biotin complex system and the EnVision(+) system. *Appl Immunohistochem & Mol Morph* 2007; 15: 103-107
184. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. Laboratory investigation. *J Tech Meth Path* 1986; 55: 244-248
185. Vogel UF, Bode J, et al. Increasing the efficiency of paraffin tissue microarrays by packing the paraffin tissue core biopsies in a honeycomb pattern. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15: 343-345
186. Kononen J, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Med* 1998; 4: 844-847
187. Vogel UF, Bueltmann BD, et al. Simple, inexpensive and precise paraffin tissue microarrays constructed with a conventional microcompound table and drill grinder. *Am J Clin Path* 2006; 126: 342-348
188. Remotti H. Tissue microarrays: construction and use. *Methods Mol Biol* 2013; 980: 13-28
189. Schweizer MS, Schumacher I, et al. Constructing tissue microarrays for research use. *Curr Protoc Hum Genet* 2004; 10: 39
190. American Joint Committee on Cancer. Cancer Staging Handbook 2009
191. Pierceall W, Wolfe M, et al. Strategies for H-score normalization of preanalytical technical variables with potential utility to immunohistochemical-based biomarker quantitation in therapeutic response diagnostics. *Analyt Cell Path* 2011; 159-168
192. Robbins and Cottrane Pathologic Basis of Disease, 9th edition, wyd. Elsevier Saunders 2015

193. Huang Ch, Liu D, et al. Wnt1 overexpression promotes tumor progression in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2008; 2680-2688
194. Xu X, Sun P, et al. Aberrant Wnt1/ β -Catenin Expression is an Independent Poor Prognostic Marker of Non-small Cell Lung Cancer After Surgery. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 716-724
195. Huang C, Ma R, et al. Wnt2 promotes non-small cell lung cancer progression by activating WNT/ β -catenin pathway. *Am J Cancer Res* 2015; 5: 1032-1046
196. Miao Y, Li A, et al. Expression of p130cas, E-cadherin and b-catenin and their correlation with clinicopathological parameters in non-small cell lung cancer: p130cas over-expression predicts poor prognosis. *Folia Histochem Cytobiol* 2012; 50: 392-397
197. Yan H, Jiang Y, et al. Expression of E-cadherin and β -catenin and their significance in non-small cell lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2005; 8: 202-206
198. Lee Y, Wu C, et al. E-cadherin expression in surgically-resected non-small cell lung cancers- A clinicopathological study. *Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 48: 294-299
199. Zhang H, Liu J, et al. Clinical significance of E-cadherin, β -catenin, vimentin and S100A4 expression in completely resected squamous cell lung carcinoma. *J Clin Pathol* 2013; 66: 937-945
200. Kase S, Sugio K, et al. Expression of E-cadherin and b-Catenin in Human Non-Small Cell Lung Cancer and the Clinical Significance. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4789-4796
201. Yang Y, Chen M, et al. Prognostic and Clinicopathological Significance of Downregulated E-Cadherin Expression in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Meta-Analysis. *PLOS One* 2014; 9: 99763
202. Lin Q, Maoquan L, et al. Prognostic Impact of Vascular Endothelial Growth Factor-A and E-Cadherin Expression in Completely Resected Pathologic Stage I Non-Small Cell Lung Cancer. *J J Clin Oncol* 2010; 40: 670-676
203. Kim H, Yoo S, et al. Alteration of the E-cadherin/ β -Catenin Complex Is an Independent poor Prognostic Factor in Lung Adenocarcinoma. *Korean J Pathol* 2013; 47: 44-51
204. Qiu Z, Zhao S, et al. Prognostic value and clinicopathological significance of epithelial cadherin expression in non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer* 2015; 6: 589-596

205. Myong N. Reduced Expression of E-cadherin in Human Non-small Cell Lung Carcinoma. *Cancer Res Treat* 2004; 36: 56-61
206. Lin D, Xu X, et al. Expression and mutation of β -catenin in non-small cell lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2004; 7: 409-413
207. Hommura F, Furuuchi K, et al. Increased Expression of β -Catenin Predicts Better Prognosis in Non-small Cell Lung Carcinomas. *Cancer* 2002; 94: 752-758
208. Retera J, Leers M, et al. The expression of β -catenin in non-small-cell lung cancer: a clinicopathological study. *J Clin Pathol* 1998; 51: 891-894
209. Prininen R, Hirvikoski P, et al. Reduced expression of α -catenin, β -catenin, and γ -catenin is associated with high cell proliferative activity and poor differentiation in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2001; 54: 391-395
210. Yang Y, Shen J, et al. A meta-analysis of abnormal β -catenin immunohistochemical expression as a prognostic factor in lung cancer: location is more important. *Clin Trans Oncol* 2015 [*epub ahead of print*]
211. Martini N, Bains MS, et al. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995; 109:120-129
212. Goodgame B, Viswanathan A, et al. Risk of recurrence of resected stage I non-small cell lung cancer in elderly patients as compared with younger patients. *J Thorac Oncol.* 2009; 4:1370-1374
213. Zhou W, Christiani D, et al. East meets West: ethnic differences in epidemiology and clinical behaviors of lung cancer between East Asians and Caucasians. *Chin J Cancer* 2011; 30: 287-292
214. Haiman C, Stram D, et al. Ethnic and Racial Differences in the Smoking-Related Risk of Lung Cancer. *N Eng J Med* 2006; 354: 333-342
215. Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature* 2006; 441: 444-450
216. Sahai E, Marshall CJ, et al. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 133-142
217. Vincan E, Barker N, et al. The upstream components of the Wnt signalling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 657-663

218. St Croix B, Sheehan C, et al. E-cadherin dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 (KIP1). *J Cell Biol* 1998; 142: 557-571
219. Janowski JA, Newham PM, et al. Differential expression of E-cadherin in normal, metaplastic and dysplastic oesophageal mucosa: a putative biomarker. *Int J Oncol* 1993; 4: 441-448
220. Iwatsuki M, Mimori K, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci* 2010; 101: 293-299
221. Cavallaro U, Christofori G, et al. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 118-132
222. Miao Y, Wang L, et al. Promoter Methylation-Mediated Silencing of β -Catenin Enhances Invasiveness of Non-Small Cell Lung Cancer and Predicts Adverse Prognosis. *Plos One* 2014; 9: 112258
223. Mei X, Su H, et al. Prognostic significance of β -catenin expression in patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Bioscience Trends* 2013; 7: 42-49
224. Xu X, Kim J, et al. Immunohistochemical demonstration of alteration of β -catenin during tumor metastasis by different mechanisms according to histology in lung cancer. *Exp Therap Med* 2015; 9: 311-318
225. Xu H, Wang L, et al. Abnormal β -catenin and Reduced Axin Expression Are Associated With Poor Differentiation and Progression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 534-541
226. Goss K, Kahn M, et al. Targeting the Wnt Pathway in Cancer, wyd. Springer 2013
227. Liu W, Wu Y, et al. Protein signature for non-small cell lung cancer prognosis. *Am J Cancer Res* 2014; 4: 256-269
228. Cong F, Zhang J, et al. A protein knockdown strategy to study the function of β -catenin in tumorigenesis. *BMC Molec Biol* 2003; 4: 1471-2199

SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat kanonicznego szlaku transdukcji sygnału zależnego od Wnt.	22
Rycina 2. Częstość występowania zaburzeń transdukcji sygnału szlakiem zależnym od Wnt w nowotworach złośliwych.....	24
Rycina 3. Przykłady odczynów barwnych z przeciwciałem poliklonalnym anty-Wnt1 (x40).	50
Rycina 4. Przykłady odczynów barwnych z przeciwciałem monoklonalnym anty-Wnt2 (x40)...	52
Rycina 5. Przykłady odczynów barwnych z przeciwciałem monoklonalnym anty-E-kadheryna (x40).	54
Rycina 6. Przykłady odczynów barwnych z przeciwciałem monoklonalnym anty- β -katenina (x40).	59
Rycina 7. Wykres przedstawiający korelację najwyższej wartości wskaźnika H dla białka Wnt1, uzyskanej z oceny 4 cylindrów tkankowych, z wynikiem wskaźnika H dla białka Wnt1 pojedynczego cylindra tkankowego.....	61
Rycina 8. Wykres przedstawiający korelację wskaźników H poziomu białka Wnt1 ocenianych przez 2 niezależnych obserwatorów.	62
Rycina 9. Histogram przedstawiający rozkład wskaźnika H dla białka Wnt1.	63
Rycina 10. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla białka Wnt1 od typu histologicznego raka płuca (1 – rak płaskonabłonkowy, 2 – rak gruczołowy, 3 – rak wielkokomórkowy).....	63
Rycina 11. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla białka Wnt1 od stopnia złośliwości histologicznej raka płuca (1 – G1, 2 – G2, 3 – G3).....	64
Rycina 12. Wykres przedstawiający zależność poziomu białka Wnt1 od stopnia zaawansowania patologicznego raka płuca (1 – IA, 2 – IB, 3 – IIA, 4 – IIB, 5 – IIIA).	64
Rycina 13. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla białka Wnt1 od typu histologicznego raka płuca (1 – rak płaskonabłonkowy, 2 – rak gruczołowy, 3 – rak wielkokomórkowy).....	66
Rycina 14. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla białka Wnt1 od stopnia złośliwości histologicznej raka płuca.....	66
Rycina 15. Wykres przedstawiający zależność poziomu białka Wnt1 od odsetka martwicy w utkaniu guza pierwotnego.	69
Rycina 16. Wykres przedstawiający zależność poziomu białka Wnt1 od średnicy guza pierwotnego.....	69
Rycina 17. Wykres przedstawiający korelację między poziomami białek Wnt1 i Wnt2.	70
Rycina 18. Histogram przedstawiający rozkład wskaźnika H dla białka Wnt2.....	71
Rycina 19. Wykres przedstawiający korelację między poziomem białka Wnt2 i E-kadheryny...	75
Rycina 20. Histogram przedstawiający rozkład wskaźnika H dla E-kadheryny.	76
Rycina 21. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla E-kadheryny od typu histologicznego raka płuca (1 – rak płaskonabłonkowy, 2 – rak gruczołowy, 3 – rak wielkokomórkowy).....	76
Rycina 22. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla E-kadheryny od stopnia złośliwości histologicznej raka płuca (1 – G1, 2 – G2, 3 – G3).....	77
Rycina 23. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla E-kadheryny od stopnia naciekania opłucnej (0 – PL0, 1 – PL1, 2 – PL2, 3 – PL3, 4 – brak danych).....	77

Rycina 24. Wykres przedstawiający korelację między wskaźnikiem H dla E-kadheryny i wskaźnikiem H dla frakcji błonowej β -kateniny.....	81
Rycina 25. Histogram przedstawiający rozkład wskaźnika H dla frakcji jądrowej β -kateniny. ...	82
Rycina 26. Histogram przedstawiający rozkład wskaźnika H dla frakcji błonowej β -kateniny. ...	83
Rycina 27. Wykres przedstawiający zależność wskaźnika H dla frakcji błonowej β -kateniny od stopnia złośliwości histologicznej raka płuca (1 – G1, 2 – G2, 3 – G3).....	84
Rycina 28. Wykres przedstawiający korelację pomiędzy wskaźnikami H dla frakcji błonowej i frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny.....	87
Rycina 29. Histogram przedstawiający rozkład wskaźnika H dla frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny.....	88
Rycina 30. Prawdopodobieństwo przeżycia (OS, ang. <i>overall survival</i>) w zależności od stopnia zaawansowania patologicznego NDRP.	91
Rycina 31. Prawdopodobieństwo przeżycia (OS, ang. <i>overall survival</i>) w zależności od stopnia zróżnicowania histologicznego NDRP (1 – G1, 2 – G2, 3 – G3).	92
Rycina 32. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od poziomu białka Wnt1. ...	94
Rycina 33. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od poziomu białka Wnt2. ...	94
Rycina 34. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od poziomu E-kadheryny....	95
Rycina 35. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od poziomu frakcji błonowej β -kateniny.	96
Rycina 36. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od poziomu frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny.	97

SPIS TABEL

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna analizowanych chorych.	43
Tabela 2. Charakterystyka histopatologiczna analizowanych niedrobnokomórkowych raków płuca.	44
Tabela 3. Zależność poziomu białka Wnt1 od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.	65
Tabela 4. Zależność wskaźnika H dla białka Wnt1 od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.	67
Tabela 5. Zależność poziomu białka Wnt2 od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.	72
Tabela 6. Zależność wskaźnika H dla białka Wnt2 od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.	73
Tabela 7. Zależność poziomu E-kadheryny od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.	78
Tabela 8. Zależność wskaźnika H dla E-kadheryny od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.	79
Tabela 9. Zależność poziomu frakcji jądrowej β -kateniny od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.	82
Tabela 10. Zależność poziomu frakcji błonowej β -kateniny od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.	85
Tabela 11. Zależność wskaźnika H dla frakcji błonowej β -kateniny od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.	85
Tabela 12. Zależność poziomu frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.	89
Tabela 13. Zależność wskaźnika H dla frakcji cytoplazmatycznej β -kateniny od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych.	89
Tabela 14. Analiza jednoczynnikowa zależności czasu przeżycia całkowitego od cech klinicznych i patologicznych w badanej grupie chorych.	92
Tabela 15. Analiza jednoczynnikowa zależności czasu przeżycia wolnego od nawrotu od cech klinicznych i patologicznych w badanej grupie chorych.	93
Tabela 16. Wyniki wieloczynnikowej analizy czasu przeżycia całkowitego (model wstępny). ...	98
Tabela 17. Wyniki wieloczynnikowej analizy czasu przeżycia wolnego od nawrotu (model wstępny).	99