

**Ekspresja E-kadheryny i β -kateniny w ogniskach pierwotnych
i przerzutach raka jelita grubego.
Korelacja z wybranymi parametrami klinicznymi
i morfologicznymi oraz ocena wartości rokowniczej.**

lek. Rafał Pęksa

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych
Promotor: prof. dr hab. med. Wojciech Biernat

Katedra i Zakład Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Gdańsk 2011

Spis treści

I. Wstęp	1
II. Cele pracy	13
III. Materiał i metody	14
III.1. Materiał i opis badanej grupy	14
III.2. Ocena morfologiczna	19
III.3. Badania immunohistochemiczne	20
III.4. Ocena statystyczna	22
IV. Wyniki	23
IV.1. Ocena morfologiczna	23
IV.2. Ocena odczynów immunohistochemicznych	24
IV.3. Cechy morfologiczne badanej grupy raków jelita grubego	25
IV.4. Cechy immunohistochemiczne badanej grupy raków jelita grubego	29
IV.5. Analiza czasu przeżycia	32
V. Dyskusja	35
V.1. Analiza cech morfologicznych	36
V.1.1. Rodzaj podścieliska	36
V.1.2. Zawartość ilościowa podścieliska	37
V.1.3. Korelacja cech morfologicznych	38
V.2. Analiza cech immunohistochemicznych	40
V.3. Korelacja cech morfologicznych z molekularnym fenotypem nowotworu	43
V.4. Ocena wpływu cech morfologicznych i immunohistochemicznych na przeżycie chorych	44
VI. Wnioski	47
VII. Streszczenie	48
VIII. Summary	50
IX. Piśmiennictwo	52
X. Dokumentacja fotograficzna	68

I. Wstęp

Rak jelita grubego jest nowotworem o największej dynamice wzrostu zachorowań wśród chorób nowotworowych w Polsce. Zajmuje on drugie miejsce pod względem zachorowalności na nowotwory złośliwe, a wśród przyczyn zgonów jest na trzecim miejscu u kobiet i na drugim u mężczyzn [203]. Najczęstszą postacią jest gruczolakorak, który stanowi 98% wszystkich typów raka jelita grubego [92].

CZYNNIKI ETIOLOGICZNE ROZWOJU RAKA JELITA GRUBEGO

Rak jelita grubego występuje najczęściej sporadycznie (w około 75-80% przypadków), przypadki uwarunkowane dziedziczeniem skłonności do jego wystąpienia stanowią około 20-25% przypadków [33]. Spośród środowiskowych czynników etiologicznych wymienia się przede wszystkim dietę; usposabiać do jego rozwoju mogą także czynniki osobnicze, np. przewlekłe schorzenia przewodu pokarmowego (swoiste przewlekłe zapalenia jelit).

Czynniki wrodzone

Dokładnie poznano i opisano dwie ścieżki patogenezy raka jelita grubego: pierwszą – klasyczną, drugą - związaną z zaburzeniami genów mutatorowych. W obu z nich dochodzi do nagromadzenia nieletalnych mutacji w komórkach ulegających mutagenezie [76]. Różnią się one nie tylko pod względem typu mutacji, ale również sposobu ich kumulacji [76]. Sekwencja zmian morfologicznych gruczolak – rak, która występuje często w ścieżce klasycznej nie jest typowa dla drugiego typu patogenetycznego. Zaobserwowano jednak, że niektóre polipy rozrostowe zlokalizowane w prawej połowie okrężnicy mogą wykazywać niestabilność mikrosatelitarną, a to zjawisko może stanowić punkt wyjścia dla rozwoju raka [133;204] (patrz niżej).

Pierwszą ścieżkę rozwoju raka jelita grubego - klasyczną – określa się także jako zależną od mutacji genów APC/CTNGB1. Występuje ona w większości (około 80%) przypadków raków sporadycznych [147]. Molekularne podłoże tej ścieżki rozwojowej stanowią gromadzone mutacje genów supresorowych - *APC*, *TP53*, *DCC*, *SMAD2*, *SMAD4* (delecja 18q21), onkogenu *K-RAS* [87;125]. Występuje w nich również zjawisko niestabilności chromosomalnej i utraty heterozygotyczności [12]. Nowotwory rozwijające się

na tej drodze wykazują także zwiększoną aktywność telomerazy [76;83]. Cechą znaną jest akumulacja nowych zaburzeń molekularnych czemu towarzyszy progresja zmian morfologicznych nabłonka jelita grubego. Histopatologicznie stwierdza się rozrost nabłonka jelitowego, który początkowo wykazuje atypię niskiego stopnia i cechuje się brodawkowym (polipowatym) typem wzrostu. Stopień atypii narasta, zaś proliferujący nabłonek nowotworowy może ostatecznie uzyskać zdolność naciekania podścieliska, co wypełnia definicję inwazyjnego raka gruczołowego [23;87]. Korelacje te ujawniono początkowo w analizach materiału uzyskanego od chorych z zespołem polipowatości rodzinnej (ang. *familial adenomatous polyposis*, FAP), który warunkują konstytutywne mutacje genu *APC* zlokalizowanego na chromosomie 5q21 [171]. Później sekwencję tych zmian morfologicznych potwierdzono także w nowotworach rozwijających się sporadycznie. Zespół FAP charakteryzuje się obecnością ok. 500-2500 gruczolaków w jelicie grubym. Dodatkowo gruczolaki mogą także występować w innych częściach przewodu pokarmowego – najczęściej w dwunastnicy. Większość polipów wykazuje utkanie gruczolaków cewkowych, nieliczne z nich to gruczolaki kosmkowe. Ryzyko rozwoju raka w tym zespole wynosi praktycznie 100%, dlatego jedynym leczeniem jest profilaktyczna resekcja całego jelita grubego (*pancolectomia*). Odmianami klinicznymi FAP są zespół Gardnera i typ 2 zespołu Turcot. W pierwszym z nich gruczolakom jelita grubego towarzyszy występowanie torbieli naskórkowych, kostniaków, zaburzeń rozwojowych zębów oraz nowotworu tkanek miękkich o typie desmoidu. Typ 2 zespołu Turcot warunkują dziedziczne mutacje genu *APC*, zaś do jego obrazu klinicznego należy polipowatość jelita oraz rdzeniak zarodkowy [144]. Typ 1 zespołu Turcota charakteryzuje się brakiem wykładników FAP, natomiast często występuje w jego obrazie niepolipowaty rak jelita grubego oraz glejak wielopostaciowy [144]. W tym przypadku za swoisty obraz kliniczny odpowiadają dziedziczne mutacje genów mutatorowych (*PMS2*, *MLH1* i *MSH2*), których produkty białkowe uczestniczą w mechanizmie naprawy DNA.

Mutacje genów mutatorowych charakteryzują drugą ścieżkę patogenetyczną raka jelita grubego. Zmiany tego typu występują w 10-15% sporadycznych raków jelita grubego. Zaburzenie procesu naprawy DNA prowadzi do powstania spontanicznych mutacji w licznych obszarach prostych powtórzeń sekwencji DNA określanymi mianem mikrosatelitów. Obszary tych powtórzeń mogą zawierać liczne nukleotydy adeninowe (A_n) lub np. sekwencje dwunukleotydowe (CA_n), które w przypadku utraty zdolności naprawy błędów replikacyjnych (ang. *replicative error*) są tracone w różnych regionach chromosomalnych. Bardzo często mogą one zajmować *loci* genów hamujących wzrost

komórek nabłonka (TGF- β) lub odpowiedzialnych za apoptozę (BAX) [92]. Przykładem dziedzicznego zespołu rozwoju raka jelita grubego determinowanego mutacjami genów mutatorowych [hMSH2, hMSH3, hMSH6, hMLH1, hMLH3, hPMS1 (scMLH2) i hPMS2 (scPMS1)] jest zespół Lyncha (ang. *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer* – HNPCC).

Czynniki środowiskowe

Dieta uboga w substancje włókniste, owoce i warzywa (ubogoresztkowa) oraz bogata w tłuszcze i kalorie jest określana mianem „diety typu zachodniego” (western diet). Prowadzi ona najczęściej do rozwoju cukrzycy, hiperlipidemii oraz nadciśnienia tętniczego. Istotnie otyłość związana jest ze zwiększonym ryzykiem rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego i cukrzycy. W szczególności otyłość trzewna stała się problemem społecznym. Podkreśla się znaczenie tego sposobu odżywiania dla zwiększenia ryzyka rozwoju raka jelita grubego [14;196]. Modyfikacja spożywanego pokarmu może odgrywać rolę w zapobieganiu rozwojowi raka jelita grubego. Dodatkowo częstsze badania przesiewowe u osób ze zwiększonym ryzykiem umożliwiają wykrywanie wczesnych postaci raka lub jego zmian prekursorowych.

W ostatnim czasie dość szeroko ocenia się rolę chemoprewencji w rozwoju raka jelita grubego. Stosowanie suplementacji błonnika, soli wapnia lub kwasu acetylosalicylowego, niesterydowych leków przeciwzapalnych czy selektywnych inhibitorów COX-2 zmniejsza ryzyko rozwoju raka jak i gruczolaków jelita grubego [35;74;95;197]. Jednak stosowanie większych dawek selektywnych inhibitorów COX-2 przez dłuższy czas powoduje wzrost ryzyka wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych oraz uszkodzeń przewodu pokarmowego [59]. Ze względu na możliwość tych powikłań, chemoprewencja może znajdować zastosowanie wśród osób z grupy wysokiego ryzyka rozwoju raka jelita grubego.

Wśród czynników osobniczych dość istotną rolę w rozwoju raka jelita grubego odgrywają zaburzenia i choroby metaboliczne, m.in. cukrzyca, otyłość, hyperinsulinemia i insulinooporność [19;67;165]. Cukrzyca należy do umiarkowanych czynników ryzyka raka jelita grubego, co potwierdzono w przeprowadzonych badaniach kohortowych. Nadwaga i otyłość korelują ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia raka jelita grubego u mężczyzn oraz u kobiet w okresie przedmenopauzalnym [103;169].

Spośród czynników klinicznych ciekawym markerem rozpoczynającego się procesu kancerogenezy jelita grubego może być nieprawidłowa struktura ujść gruczołów jelita grubego, co jest określane mianem *aberrant crypt foci* (ACF). Opisano je po raz pierwszy u myszy leczonych azoksymetanem [8]. Są to miejscowo nagromadzone ujścia zachyłków

gruczołów jelitowych wykazujących zaburzoną strukturę (poszerzony, zębaty, niekiedy powrębiany kształt obrysu ujść gruczołów). Ogniska te stwierdza się podczas kolonoskopii z powiększonym obrazem, przed którą podano dojelitowo błękit metylenowy. Metoda ta uwidacznia ciemniej barwiące się skupienia krypt [71;205]. Histologicznie, w części zmian o typie ACF wyróżnia się dysplazję [180]. ACF bez zmian dysplastycznych praktycznie nie różni się od normalnego nabłonka gruczołowego, może występować poszerzenie średnicy krypt, oraz obszary rozrostu nabłonka z „ząbkowaniem” (serration), dodatkowo wzrasta aktywność mitotyczna ograniczona do dolnych dwóch trzecich odcinka wpuklenia gruczołu [154]. ACF z dysplazją charakteryzuje się obecnością powiększonych, stłoczonych i nawarstwionych jąder w komórkach nabłonka, które mogą tracić swoją biegunowość. Stopień nasilenia atypii jądrowej określa stopień dysplazji. W przypadkach ciężkiej dysplazji proliferację komórek nabłonka stwierdza się na całej głębokości dysplastycznego gruczołu [155;166;167].

ACF uważa się za najwcześniejsze morfologiczne wykładniki rozrostu tkanki gruczołowej prowadzące do powstania raka jelita grubego (tzw. zmiany przedpolipowe). U myszy i szczurów leczonych azoksymetanem stały się one biomarkerem rozwoju raka jelita grubego. W badaniach na szczurach rasy Fischer 344 udowodniono, że stosowanie chemoprewencji zmniejsza ryzyko wystąpienia ACF [10].

U ludzi związek pomiędzy ACF a rakiem jest mniej jednoznaczny. Pomimo wątpliwości dotyczących roli biologicznej ACF uważa się je za zmianę prekursorową gruczolaków i raków [180]. Badania przeprowadzone u chorych z rakiem jelita grubego wykazały częstszą obecność mutacji genu K-RAS w ogniskach ACF niż u ludzi bez raka tego narządu. Świadczy to o molekularnej specyfice ACF. Wykazano także zależność pomiędzy wzrostem częstości występowania ACF wraz z narastającym wiekiem chorych, co może pośrednio sugerować stopniowe nagromadzenie się zaburzeń genetycznych w tych ogniskach.

Wskaźnik masy ciała (BMI – body mass index), obwód bioder i obszar tkanki tłuszczowej trzewnej (VFA – visceral fat area) korelują z liczbą ACF, co w szczególności dotyczy VFA. Tkanka tłuszczowa trzewna jest gruczołem dokrewnym produkującym adipocytokiny takie jak TNF- α , leptynę i adiponektynę. Te adipocytokiny mogą odgrywać ważną rolę w karcynogenezie raka jelita grubego [178].

Receptor aktywowany proliferatorem peroksysomów typu gamma (PPAR γ – peroxisome proliferator-activated receptor) wykazuje ekspresję głównie w tkance tłuszczowej i odgrywa w niej istotną rolę w procesie różnicowania adipocytów i uwrażliwianiu ich na insulinę. Aktywacja syntetycznych ligandów PPAR γ , takich jak pioglitazon, jest powszechnie

stosowane w leczeniu cukrzycy. Ekspresję PPAR γ wykazano również w guzach nowotworowych [51;114;202]. To sugeruje, że modulacja PPAR γ może mieć wpływ na biologię komórek nowotworowych. Takahashi i wsp. wykazali w badaniu pilotażowym, że po stosowaniu pioglitazonu zmniejszyła się liczba ACF w jelicie grubym. Wyniki te sugerują, że ligandy PPAR γ stanowią potencjalną grupę czynników chemoprotekcyjnych w karcynogenezie raka jelita grubego [177].

Przewlekłe choroby zapalne jelit (IBD – inflammatory bowel disease) wpływają na zwiększenie ryzyka wystąpienia raka jelita grubego [37;80]. Pierwszy raz tę zależność wykazano dla wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Oprócz oceny histologicznej w czasie monitorowania IBD, dodatkowo sprawdza się aneuploidię DNA. Jest ona szczególnie ważnym markerem nowotworzenia w chorobie Leśniowskiego-Crohna. [170;174].

MOLEKULARNE PODŁOŻE ROZWOJU RAKA JELITA GRUBEGO: CZĄSTECZKI ADHEZYJNE – E-KADHERYNA I BETA-KATENINA

Karcynogeneza jest procesem wieloetapowym, manifestującym się zmianami informacji genetycznej komórki, czego odbiciem są zmiany morfologiczne tworzonego nowotworu. Nabywanie przez komórkę nowotworową nowych „cech” takich jak szybki wzrost, naciekanie i zdolność do przerzutowania umożliwia ekspansywny wzrost guza. Wyróżnia się sześć podstawowych procesów molekularnych, które są odpowiedzialne za transformację nowotworową:

1. Samowystarczalność w zakresie sygnałów wzrostu
2. Niewrażliwość na sygnały hamujące
3. Unikanie apoptozy
4. Niepohamowana zdolność replikacji
5. Indukowanie angiogenezy
6. Zdolność do inwazji i przerzutowania.

Zdolność do inwazyjnego wzrostu i przerzutowania są efektem oddziaływania komórki nowotworu z podścieliskiem i z innymi komórkami, w czym pośredniczą m.in. białka adhezyjne. Szczególną rolę w tych procesach odgrywiają kompleksy białkowe utworzone z katenin oraz kadheryn [73].

Wyróżnia się cztery rodzaje katenin: α , β , γ i δ [47;200]. Kateniny α , β oraz γ uczestniczą w procesie przylegania komórkowego, natomiast katenina δ występuje głównie w neuronach i należy do rodziny białek p120 [109;151;164].

β -katenina jest białkiem, którego ekspresja wzrasta w procesach molekularnych leżących u podłoża nowotworzenia (patrz wyżej). W warunkach prawidłowych β -katenina pełni podwójną rolę: bierze udział w łączeniu białek przylegania komórkowego (tzw. CAMs, ang. *cellular adhesion molecules*) ze szkieletem komórki oraz reguluje transkrypcję genów. Dzięki tym funkcjom wpływa na wiele procesów biologicznych, takich jak: różnicowanie, dojrzewanie, jak również umożliwia ruch komórki. Odgrywa także rolę w embriogenezie [57;117], różnicowaniu komórek macierzystych w dojrzałym organizmie [147] oraz regeneracji komórek wątroby po częściowej resekcji mięszu tego narządu [184].

W komórkach, w których β -katenina odpowiada za przyleganie komórkowe łączy się ona z białkami z rodziny kadheryn z filamentami aktynowymi za pośrednictwem α -kateniny [1;115;140].

β -katenina reguluje również ekspresję innych genów kontrolujących m.in. proliferację komórkową. Czynność ta wynika z roli jaką odgrywa to białko w szlaku przekazywania wewnątrzkomórkowego WNT/Wingless. Jego głównym regulatorem jest białko APC tworzące kompleks m.in. z aksyną i kinazą syntazy glikogenu 3β (GSK- 3β , patrz niżej). Kompleks ten wiąże β -kateninę i w ten sposób reguluje wielkość jej wolnej frakcji komórkowej oraz jej dystrybucję komórkową. W przypadku utraty aktywności APC, niezwiązana β -katenina gromadzi się w jądrze komórkowym działając jako koaktywator czynników transkrypcyjnych LEF/TCF (lymphoid enhancer factor /T-cell factor). Wynikiem tego jest inicjacja transkrypcji określonych onkogenów (c-myc czy cykliny D1) [7;68;118;195]. Oprócz onkogenów aktywacji ulegają także geny, których produkty warunkują inwazyjny wzrost: matrylizyna [16;31], fibronektyna [46], CD44 [201], i uPAR [108]. Ze względu na pełnienie tak istotnych funkcji stężenie β -kateniny w komórce podlega ścisłej kontroli. Z jednej strony jej ekspresja zależy od stopnia transkrypcji kodującego ją genu (*CTNNB1*). Z drugiej strony poziom białka reguluje aktywność cytoplazmatycznego kompleksu destrukcyjnego tworzonego przez białko APC, aksynę, kinazę kazeiny (CK1) i kinazę syntazy glikogenu 3 beta (GSK- 3β). Kompleks ten wiąże β -kateninę obecną w cytoplazmie i powoduje fosforylację reszt serynowej i treoninowej jej N-końcowego fragmentu. Warunkuje to przyłączanie do nich cząstek ubikwityny. Ubikwitynacja stanowi istotny proces degradacji białek przy użyciu proteasomów [147]. Aktywacja ścieżki WNT hamuje aktywność kompleksu APC, a przez to także fosforylację β -kateniny, czego efektem jest zwiększenie jej stężenia w cytoplazmie. W wyniku tego β -katenina przechodzi do jądra komórkowego, gdzie łączy się z czynnikami transkrypcyjnymi, aktywując określone geny.

W raku jelita grubego dochodzi najczęściej do zaburzeń strukturalnych białka APC [18;87], bądź N-końcowego fragmentu β -kateniny [18]. Obie te zmiany uniemożliwiają degradację β -kateniny, czego efektem jest nagromadzenie jej w cytoplazmie i jądrze komórkowym.

Ścisła regulacja funkcjonowania ścieżki WNT/ β -katenina umożliwia utrzymanie równowagi pomiędzy komórkami macierzystymi a komórkami zdeterminowanymi nabłonka jelita [15;147;194]. Zaburzenia tej równowagi korelują z rozwojem raka jelita grubego, czego dowodem jest wzrost stężenia kompleksu β -katenina- LEF/TCF w obrębie komórek nowotworu [119]. Zaburzenia funkcji szlaku WNT/ β -katenina odgrywają zasadniczą rolę w rozwoju zespołu polipowatości rodzinnej (patrz wyżej) i są najczęstszą przyczyną rodzinnych postaci raka jelita grubego [87;125].

Drugim składnikiem kompleksu odpowiedzialnego za przyleganie komórkowe jest E-kadheryna. Należy ona do nadrodziny białek adhezyjnych zależnych od jonów wapnia (ang. *Calcium-dependent adhesion molecules*). Kadheryny zaliczamy do białek przezbłonowych, które mają możliwość wiązania się z kadherynami tego samego rodzaju. Proces ten warunkuje obecność jonów wapnia. Do nadrodziny białek adhezyjnych zależnych od jonów wapnia poza kadherynami należą protokadheryny, desmogleiny, desmokoliny i wiele innych [3;70].

Do tej pory wyodrębniono ponad 30 rodzajów kadheryn, które podzielono na sześć rodzin. Do klasycznych kadheryn typu I należą kadheryna nabłonkowa (E-kadheryna), łożyskowa (P-kadheryna), siatkówkowa (R-kadheryna) i neuronalna (N-kadheryna). W procesach rozrostu nowotworowego największą rolę odgrywa zaburzenie czynności E-kadheryny. Utrata jej aktywności wydaje się być kluczową w procesie przerzutowania nowotworów [146]. Zależność tę stwierdzono bowiem w przebiegu raka gruczołu krokowego, płuca, jelita grubego, żołądka i gruczołu piersiowego [27;45;81;120;135].

Utrata ekspresji E-kadheryny może być konsekwencją zarówno zaburzeń genetycznych jak i epigenetycznych [175]. Należą do nich: delecje i mutacje kodującego ją genu (*CDH1*) oraz hypermetylacja jego promotora. *Locus* genu E-kadheryny w ramieniu długim chromosomu 16 (16q22.1) zlokalizowano w 1989 roku [126]. Początkowo zidentyfikowano utratę heterozygotyczności (LOH, loss of heterozygosity) tego regionu w raku wątrobowokomórkowym i raku gruczołu piersiowego [160;186]. Utrata ekspresji E-kadheryny korelowała z klinicznym stopniem złośliwości nowotworu, czego manifestacją jest wyższy stopień zaawansowania miejscowego oraz obecność przerzutów odległych.

W niektórych nowotworach (rak prostaty, rak pęcherza moczowego) skutkuje to skróceniem całkowitego czasu przeżycia chorych [61;136;182].

Ciekawym zjawiskiem jest korelacja czynnościowa ekspresji kadheryn z odmiennych podgrup. Najlepiej poznana jest współzależność pomiędzy utratą ekspresji E-kadheryny i wzrostem ekspresji N-kadheryny. Ta ostatnia określana jest mianem kadheryny mezenchymalnej [25] i jej ekspresja zwiększa migrację komórek nowotworowych. Spadek ekspresji E-kadheryny korelujący ze wzrostem ekspresji N-kadheryny określa się terminem przełączenia typów kadheryn (ang. *cadherin switch*) i zmienia on fenotyp komórki z pro-adhezyjnego na pro-migracyjny [25;56]. Zjawisko to opisali Nieman i wsp. [130] w raku sutka, a analogiczny proces stwierdzono także w raku jelita grubego [157]. Proces ten określa się przemianą nabłonkowo-mezenchymalną (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT). W badaniach *in vivo* oraz w badaniach na modelach komórkowych [55;161] potwierdzono uzyskiwanie fenotypu mezenchymalnego przez komórki zmieniające profil ekspresji wspomnianych kadheryn, co manifestowało się utratą połączeń międzykomórkowych, zmniejszeniem ekspresji cytokeratyn oraz nabyciem możliwości przemieszczania się przez komórki wykazujące EMT. Dodatkowo, komórki te uzyskiwały ekspresję markerów mezenchymalnych – fibrynonektyny lub wimentyny. Proces ten przebiega analogicznie jak w trakcie embriogenezy, kiedy komórki nabłonkowe tworzące zwarte struktury tkankowe ulegają przemianie w mniejsze komórki mezenchymalne. Umożliwia to ich migrację np. podczas gastrulacji czy w przypadku komórek grzebieni nerwowych przemieszczających się z neuroektodermy [183].

Niewątpliwie zmiany związane z odróżnicowaniem komórek raka jelita grubego i występowanie „przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej” są wynikiem dynamicznych procesów oddziaływania pomiędzy tkanką nowotworu i tkankami „gospodarza” [4]. Głównym miejscem interakcji pomiędzy tkanką nowotworową, a tkankami otaczającymi jest rejon „czoła inwazji” raka. W początkowej fazie dochodzi do zmniejszenia przylegania między komórkami nabłonkowymi oraz rozluźnienia połączeń komórek z cząsteczkami tworzącymi podścielisko pozakomórkowe. Następnie dochodzi do reorganizacji cytoszkieletu komórek, w wyniku czego błona komórkowa ulega pofałdowaniu – powstają wypustki blaszkowe (lamellipodia) lub wypustki cytoplazmatyczne (filopodia) [148], które umożliwiają przemieszczanie się komórki w nowo formującej się macierzy pozakomórkowej. Ważną rolę w tym procesie odgrywają integryny ($\alpha3\beta1$) oraz metaloproteinazy typu błonowego, które wraz z systemem receptorowym aktywatora urokinazy plazminogenu

obecnego na pseudopodiach biorą udział w degradacji (proteolizie) podłoża międzykomórkowego [149].

Zjawisko EMT przejawia się morfologicznie w preparatach histologicznych jako tzw. pączkowanie guza (*tumor budding*) i jest charakterystyczne dla nowotworów o naciekającym typie wzrostu [43;206]. Guz pączkujący definiuje się jako nowotwór szerzący się pojedynczymi komórkami lub grupami utworzonymi przez co najwyżej 5 komórek. W niektórych publikacjach pojęcie grupy komórek pączkujących ograniczono do skupień co najwyżej 4 komórek nowotworu [134]. Luźno rozrzucone „pączki” (*buds*) nie łączą się z cewami nowotworowymi, są obecne luźno w podścielisku w obrębie czoła inwazji nowotworu i stanowią oddzielną frakcję komórek nowotworowych.

W raku jelita grubego β -katenina nie zawsze lokalizowała się w cytoplazmie i w jądrze komórek nowotworowych. Dodatkowo, w wyżej zróżnicowanych fragmentach utkania nowotworowego β -katenina była obecna w błonie komórkowej, podobnie jak w prawidłowym nabłonku jelitowym [17]. Jądrowy odczyn stwierdzano w części nowotworu naciekającego pojedynczymi komórkami. W tym obszarze nowotworu komórki guza traciły błonową ekspresję E-kadheryny [18] oraz indukowały ekspresję markerów mezenchymalnych [88].

Proces, w którym dochodzi do uwolnienia się komórki z tkanki w wyniku zahamowania ekspresji białek odpowiedzialnych za przyleganie międzykomórkowe jest wieloetapowy i kontrolowany przez liczne wewnątrzkomórkowe czynniki regulatorowe [49]. Doświadczenia przeprowadzone na liniach komórkowych raka jelita grubego ujawniły szereg mechanizmów, które umożliwiają tę przemianę. Istotną rolę w tym procesie może odgrywać białko Slug. Jego ekspresję indukuje kompleks β -katenina-TCF [30], zaś wzmocnienie tego sygnału determinuje działanie receptorów posiadających aktywność kinazy tyrozynowej (ErbB-1, ErbB-2), które również wzbudzała β -katenina [158]. Wzrost ekspresji Slug hamował translację i ekspresję E-kadheryny [131]. Stwarza to regulacyjny krąg odwracalnej modulacji odpowiedniego fenotypu komórki nowotworowej poprzez wygaszanie i wzmacnianie ekspresji E-kadheryny, w którym współuczestniczy β -katenina.

Nadal niepoznany pozostaje czynnik inicjujący proces przerzutowania, który rozpoczyna się od uwalniania komórek guza ze zwartych układów tkankowych raka. Doświadczalne niszczenie połączeń międzykomórkowych także wpływa na aktywację beta-kateniny i jej zwiększoną akumulację w jądrze komórkowym, a następnie Slug-zależne wygaszenie ekspresji E-kadheryny [30]. Bardzo często wczesnym zjawiskiem w rozwoju raka jelita grubego jest występowanie aktywujących mutacji genu RAS [87]. Aktywacja RAS

może indukować m.in. fosforylację reszty tyrozynowej β -kateniny, co z kolei uwalnia ją z połączenia z E-kadheryną. W efekcie wzrasta stężenie cytoplazmatycznej wolnej frakcji β -kateniny oraz jej przechodzenie do jądra komórkowego.

W przerzutach nowotworowych komórki mogą tworzyć dwie populacje różniące się morfologicznie [18], co z kolei sugeruje występowanie przemiany odwrotnej do opisywanej powyżej a mianowicie transformacji mezenchmalno-nabłonkowej (MET) [18]. Przemiany tej nie można wytłumaczyć kolejnymi zaburzeniami zachodzącymi w obrębie genomu.

Fenotyp komórki stanowi końcowy efekt oddziaływania białek wewnątrzkomórkowych, jak również czynników mikrośrodowiska (*microenvironment*) bezpośrednio ją otaczającego [161;172]. Niektóre opracowania sugerują, że to właśnie sygnał płynący z mikrośrodowiska guza jest czynnikiem wyzwalającym procesy EMT i MET [15;162;192]. Daje to teoretyczną podstawę oddziaływania na komórki nowotworu poprzez celowaną modyfikację poszczególnych elementów podścieliska nowotworu [99]. Guz nowotworowy jest bowiem złożoną strukturą tkankową utworzoną przez komórki nowotworu oraz podścielisko [36]. Proces tworzenia podścieliska, zwany inaczej stromatogenezą [168], jest związany m.in. z rozwojem sieci nowych naczyń krwionośnych, będącej efektem neoangiogenezy [42;153]. W skład podścieliska wchodzi trzy główne grupy elementów, które odgrywają rolę w progresji nowotworów litych: nowe naczynia krwionośne, które są niezbędne dla odżywienia wzrastającej populacji komórek guza [199], komórki nacieku zapalnego oraz podścielisko włókniste [36]. Wszystkie te elementy oddziałują wzajemnie na siebie [52]. W tworzeniu powiązań czynnościowych w obrębie guza nowotworowego są zaangażowane nie tylko komórki nowotworowe ale również składniki nowotworowego podścieliska.

Głównym składnikiem podścieliska są fibroblasty, które mogą wpływać na rozwój nowotworu, ułatwiając inwazję i tworzenie przerzutów a tym samym zwiększać stopień zaawansowania choroby nowotworowej [129]. Proteazy obecne w czole inwazji nowotworu również wpływają na strukturę macierzy. Wspólne oddziaływanie fibroblastów i proteaz prowadzi do przebudowy substancji pozakomórkowej co z kolei może sprzyjać inwazji nowotworu [38;82]. Wzrost objętości podścieliska nowotworowego może zatem nasilać opisane powyżej procesy.

Do czynników biologicznie aktywnych odgrywających istotną rolę w tworzeniu podścieliska zalicza się: transformujący czynnik wzrostu beta (transforming growth factor beta, TGF β), płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet derived growth factor, PDGF), podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (basic fibroblast growth factor, bFGF), czynnik martwicy guza (tumor necrosis factor, TNF) oraz interleukiny. Wymienione czynniki wzrostu

regulują proliferację komórek śródbłonka, fibroblastów, wykazują także aktywność chemotaktyczną dla komórek zapalnych oraz umożliwiają syntezę i odkładanie macierzy pozakomórkowej [92]. TGF β odgrywa ważną rolę działając parakrynnie, powodując przemianę (*transdifferentiation*) fibroblastów w miofibroblasty oraz autokrynnie powodując oddziaływanie pomiędzy szlakiem TGF β a szlakiem β -kateniny [34].

Sposób oddziaływania podścieliska na nowotwór jest sprawą budzącą w dalszym ciągu wątpliwości. Eksperymentalne zahamowanie odczynu desmoplastycznego w czerniaku u świnek morskich wywołało rozsiew nowotworu [5], z kolei nasilenie procesu stromatogenezy w analizie raka płuca korelowało ze wzrostem potencjału przerzutowego komórek nowotworowych [123]. Różnice pomiędzy tymi badaniami sugerują, że procesy zachodzące w podścielisku mogą wpływać w różny sposób na przebieg miejscowego rozwoju nowotworu [190]. Najistotniejsza w ocenie podścieliska nowotworowego jest ocena jego jakości [189;190]. W procesie desmoplazji w raku jelita grubego w jego centralnej części dominuje kolagen typu I [60], który wywiera hamujący wpływ na proces przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT). W 2004 roku Ueno na grupie 862 przypadków raka odbytnicy potwierdził, że w podścielisku dojrzałym (zawierającym dużo włókien kolagenowych) rzadziej dochodzi do formowania się pączków (*buds*) w miejscu inwazji nowotworu. Całkowicie przeciwne są wyniki uzyskane w badaniach nad rakiem żołądka [98]. W tym nowotworze obecność kolagenu typu I w podścielisku wzmagало migrację i proliferację komórek nowotworowych w wyniku fosforylacji reszty tyrozynowej β -kateniny. Korelowało to z bardziej agresywnym, inwazyjnym wzrostem nowotworu, jak również sprzyjało tworzeniu przerzutów.

Rola podścieliska w raku jelita grubego nie ogranicza się tylko do wpływu na rozwój guza pierwotnego oraz jego zdolność do tworzenia przerzutów ale może również determinować wystąpienie wznowy miejscowej. Peng i wsp. wysunął hipotezę, w której to „pozostałości podścieliska” po usunięciu raka odbytnicy mogą mieć stymulujący wpływ na proliferację i transformację nabłonka gruczołowego w miejscu zespolenia przyczyniając się do miejscowego nawrotu choroby [145].

W raku jelita grubego jednym z najważniejszych czynników rokowniczych jest stopień zaawansowania choroby [29;96]. Rak jelita rozwija się początkowo w błonie śluzowej, następnie nacieka głębsze struktury ściany jelita i tworzy przerzuty w okolicznych węzłach chłonnych oraz w narządach odległych. Pięcioletnie przeżycie u pacjentów z guzami przekraczającymi ścianę jelita bez przerzutów do węzłów chłonnych (stopień zaawansowania II wg. TNM) wynosi 70-80% [127]. Zajęcie węzłów chłonnych przez przerzuty raka

wyraźnie pogarsza to przeżycie, które w tej grupie chorych wynosi 25-50% (stopień zaawansowania III) [156]. U części pacjentów po zabiegu może dochodzić do wznowy miejscowej lub przerzutów odległych, które również stanowią niekorzystny czynnik rokowniczy [40].

Diagnostyka i leczenie raka jelita grubego uległy znacznej zmianie w ciągu ostatnich lat, co zmodyfikowało rolę patologii w tym zakresie. W szczególności rozpoznanie histopatologiczne wpłynęło na decyzję dotyczącą stopnia resekcyjności nowotworu (pełna lub ograniczona), jak również zastosowania leczenia uzupełniającego (adjuwantowego). Indywidualizacja leczenia raka jelita grubego wymaga zatem określenia nowych czynników prognostycznych, które mogłyby ograniczyć grupę chorych o trudnym do przewidzenia przebiegu klinicznym.

Wśród potencjalnych czynników wpływających na przebieg choroby analizie poddano ekspresję białek adhezyjnych w raku jelita grubego. W niewielu publikacjach oceniono jednoczasową ekspresję tych białek w guzie pierwotnym i przerzutach, korelując te wyniki z czasem przeżycia chorych [21;39;94]. Dodatkowo, wyodrębniane grupy nie zawsze były jednorodne pod względem stopnia zaawansowania, a badane guzy przerzutowe miały różną lokalizację [21], co również utrudnia analizę otrzymanych wyników. Także zagadnienie wpływu ekspresji białek adhezyjnych na tworzony typ podścieliska i charakter wzrostu guza nie stanowiło częstego tematu prac badawczych [189-191]. Uchwycenie korelacji pomiędzy tymi parametrami może mieć znaczenie dla zrozumienia odmienności biologii raka jelita grubego, a potencjalnie stanowić czynnik mogący modyfikować procedury terapeutyczne w tym nowotworze, stąd podjęta przeze mnie próba poddania ich ocenie w niniejszej rozprawie.

II. Cele pracy

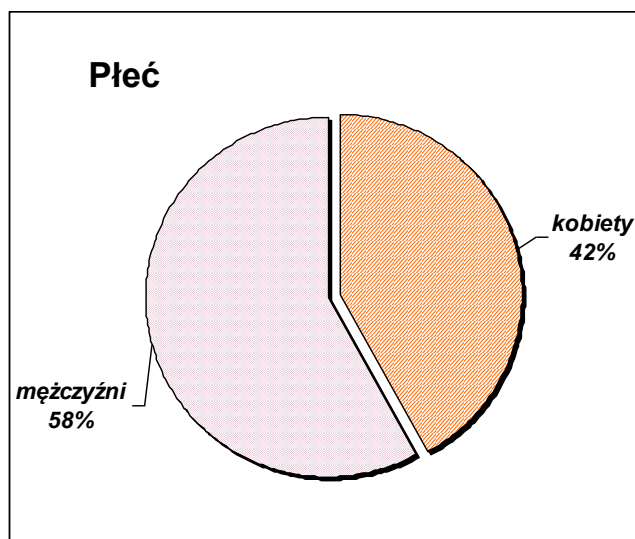
1. Korelacja ekspresji E-kadheryny i β -kateniny z wybranymi cechami patomorfologicznymi (stopniem zróżnicowania ogniska pierwotnego, zaawansowaniem miejscowym, relacjami pomiędzy guzem i podścieliskiem [charakter wzrostu, rodzaj i ilość podścieliska itp.], naciekaniem nerwów oraz zatorami w naczyniach limfatycznych).
2. Korelacja ekspresji badanych markerów z czasem przeżycia chorych oraz określenie ich wartości rokowniczej.

III. Materiał i metody

III.1. Materiał i opis badanej grupy

Badaniem objęto grupę 129 chorych z rozpoznaniem raka jelita grubego i z przerzutami do węzłów chłonnych, operowanych w Klinice Chirurgii Onkologicznej, I i II Klinice Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 1998-2004.

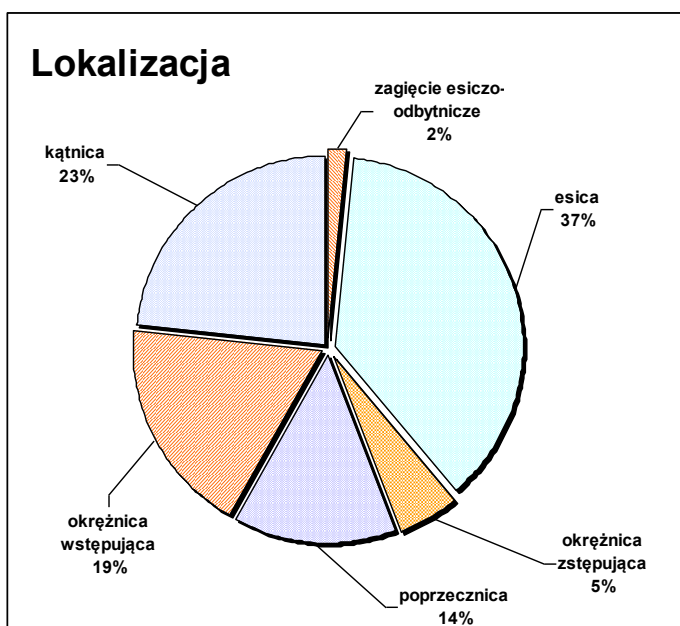
Badaną grupę stanowiły 54 kobiety (42%) i 75 mężczyzn (58%) (Rycina 1) w wieku od 32 do 91 lat (średnia wieku wynosiła 63,37 lat, mediana 65 lat).



Rycina 1- Płeć badanej grupy pacjentów

Materiał do badań stanowiły wycinki z resekowanego jelita grubego (esicy, poprzecznicy, okrężnicy prawostronnej, okrężnicy lewostronnej) z powodu raka tego narządu. W żadnym z badanych przypadków chorzy poddani zabiegowi nie przyjmowali uprzednio chemioterapii neoadjuwantowej.

Lokalizacja nowotworów była następująca: esica – 48 przypadków, kątnica – 30, okrężnica wstępująca – 24, okrężnica poprzeczna – 18, okrężnica zstępująca – 7 i okolica zgięcia esiczo-odbytniczego okrężnicy – 2 (Rycina 2). Chorych z rakiem odbytnicy nie kwalifikowano do badanej grupy ze względu na niejednorodną technikę operacyjną usunięcia mezorektum.



Rycina 2- Lokalizacja ogniska pierwotnego w badanej grupie pacjentów.

Liczba badanych węzłów chłonnych wynosiła od 1 do 28 węzłów (mediana liczby badanych węzłów – 9 sztuk). Liczba węzłów chłonnych z przerzutami wahała się od 1 do 21 węzłów (mediana 3 węzły).

Dla oceny stopnia zaawansowania choroby nowotworowej (pTNM) wykorzystano informacje zawarte w raportach histopatologicznych materiału pooperacyjnego oraz użyto ostatniej wersji klasyfikacji TNM (Sobin, Gospodarowicz, Wittekind, 7th edition, 2009).

W badanej grupie chorych zaawansowanie choroby nowotworowej rozkładało się następująco:

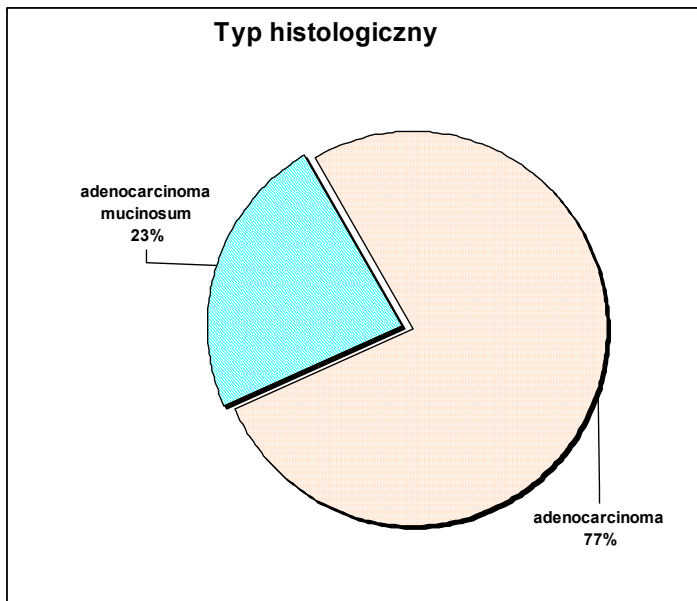
cecha pT: pT3 – 108 przypadków (84%), pT4 - 21 przypadków (16%)

cecha pN: pN1 – 67 przypadków (52%), pN2 – 62 przypadki (48%)

cecha pM: pMx – 106 przypadków (82%), pM1 – 23 przypadki (18%)

Łącznie 106 chorych z rakiem jelita grubego było w III stopniu, a 23 – w IV stopniu zaawansowania klinicznego.

W badaniu uwzględniono jedynie raki gruczołowe (99 przypadków) i raki śluzotwórcze (30 przypadków); pozostałe rzadsze typy histologiczne zostały wyłączone z dalszych analiz (Rycina 3).



Rycina 3- Typ histologiczny nowotworów występujących w ognisku pierwotnym

Stopień zróżnicowania histologicznego nowotworów oceniono używając trzystopniowej klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia z 2000 roku (The WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 2000 Lyon). Rozkład przypadków uwzględniający tę cechę był następujący: 8 (6%) przypadków G1, 94 (73%) guzy G2 oraz 27 (21%) nowotworów w stopniu G3. (charakterystyka badanej grupy patrz tabela 1).

Grupę kontrolną do badań immunohistochemicznych stanowiły wycinki migdałków podniebiennych i wątroby, pobrane od osób zmarłych podczas rutynowego badania sekcijnego. Warunkiem włączenia każdego z wycinków w grupie kontrolnej był typowy obraz utkania danego narządu bez zmian autolitycznych, wykładników uszkodzenia wątroby lub zapalenia migdałków.

Materiał tkankowy z nowotworów był utrwalony według standardowej procedury (materiał na świeżo rozcięty i rozpięty na styropianowych formach, w takiej formie utrwalony w formalinie 10% przez około 48h, następnie pobrane wycinki ulegają dehydratacji poprzez przeprowadzenie ich przez odpowiednie stężenia alkoholu i ksylenu i ostatecznie zatopione w parafinie niskotopliwej). Wycinki z przypadków analizowanych w grupie badanej poddano ponownej diagnostyce w preparatach barwionych rutynowo hematoksyliną i eozyną (H&E).

Tabela 1: Charakterystyka badanej grupy- podstawowe dane kliniczno-patologiczne.

PLEĆ:			
<i>kobiety</i>	54	42%	
<i>mężczyźni</i>	75	58%	
<i>razem</i>	129	pacjentów	
WIEK			
<i>Średnia</i>	63,37 lata	<i>Zakres</i>	[32 ÷ 91 lata]
<i>Mediana</i>	65 lat		
LOKALIZACJA:			
<i>zagięcie esiczo-odbytnicze</i>	2/129	(2%)	
<i>esica</i>	48/129	(37%)	
<i>okrężnica zstępująca</i>	7/129	(5%)	
<i>poprzecznicza</i>	18/129	(14%)	
<i>okrężnica wstępująca</i>	24/129	(19%)	
<i>kątnica</i>	30/129	(23%)	
TYP HISTOLOGICZNY I STOPIEŃ ZRÓŻNICOWANIA:			
<i>stopień zróżnicowania</i>			
	G1	8 przypadków	6%
	G2	94 przypadki	73%
	G3	27 przypadków	27%
<i>typ histologiczny</i>			
	<i>adenocarcinoma</i>	99 przypadków	
	<i>adenocarcinoma mucinosum-</i>	30 przypadków	
pTNM I STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA CHOROBY NOWOTWOROWEJ (wg. TNM- UICC):			
Pt	pT3	108 przypadków	84%
	pT4	21 przypadków	16%
pN	pN1	67 przypadków	52%
	pN2	62 przypadki	48%
pM	pMx	106 przypadków	82%
	pM1	23 przypadki	18%
<i>stopień zaawansowania</i>			
	III-	106 przypadków	82%
	IV-	23 przypadki	18%

W ten sposób zweryfikowano rozpoznanie histopatologiczne oraz stopień zaawansowania choroby. Spośród badanych preparatów dokonano także wyboru najbardziej reprezentatywnych fragmentów z nowotworu oraz z węzłów chłonnych zawierających przerzuty i spełniających poniższe kryteria:

- a) wycinek obrazujący utkanie nowotworu typowe dla danego rozpoznania.

- b) brak zmian martwiczych, uszkodzeń termicznych oraz aktywnego, ropnego nacieku zapalnego.
- c) w przypadku guzów pierwotnych, wycinek obrazujący czoło inwazji nowotworu wraz z otaczającym podścieliskiem
- d) w przypadku kilku ognisk przerzutowych do węzłów chłonnych, wybierano te o najlepiej zachowanej strukturze nowotworu oraz te, które technicznie umożliwiają wykonanie biopsji tkankowej.

Wybrane preparaty wraz z odpowiadającymi im blokami parafinowymi służyły do mapowania obszarów guza pobranych do mikromacierzy tkankowych. Zastosowano w tym celu igły o średnicy 1,5 mm. Biotaty fragmentów guzów umieszczano we wcześniej przygotowanych, beztkankowych blokach parafinowych – „biorcach” („recipient”). Tę samą procedurę zastosowano w odniesieniu do zmian przerzutowych w węzłach chłonnych. Całość tworzenia mikromacierzy tkankowych wykonano za pomocą aparatu Manual tissue arrayer I firmy Beecher Instruments (MTAI, K7 BioSystems). Zarówno z guzów pierwotnych jak i z ognisk wtórnych pobierano co najmniej trzy fragmenty (biotaty) tkanki nowotworowej. Powstało w ten sposób dziewięć mikromacierzy dla guzów pierwotnych i dziewięć dla przerzutowych węzłów. Dodatkowo w każdym nowopowstałym bloku „biorcy” umieszczono fragmenty migdałka podniebiennego oraz wątroby, które pełniły funkcję kontroli wewnętrznej i orientowały w bloku wycinki pobrane z różnych przypadków. Orientacja ta umożliwiała lokalizację i odnalezienie konkretnego wycinka z danego guza. Mikromacierze służyły wyłącznie do oceny ekspresji analizowanych markerów immunohistochemicznych (patrz niżej).

Dane o przeżyciach pacjentów uzyskano z dokumentacji medycznych kliniki, w których pacjenci byli operowani oraz z Zakładu Ubezpieczeń Społecznych w Gdańsku.

III.2. Ocena morfologiczna

Wszystkie poniżej wymienione parametry były oceniane w preparatach barwionych rutynowo H&E. Badano od 2 do 5 preparatów z guza. Użyto do tego celu mikroskopu Olympus CX41 wyposażonego w okular 10x i obiektywy 4x, 10x, 20x, 40x, powiększającego odpowiednio 40x, 100x, 200x i 400x.

Ocenie morfologicznej był poddane następujące cechy:

a) typ podścieliska

Dokonano jakościowej oceny podścieliska, wyodrębniając jego trzy rodzaje zgodnie z publikacją Ueno i wsp [190]: dojrzałe, pośrednie i niedojrzałe:

- dojrzałe – podścielisko utworzone z dojrzałych, cienkich i wydłużonych włókien kolagenowych wraz z fibrocytami ułożonymi warstwowo;
- pośrednie – podścielisko przypominające histologicznie bliznowiec (*keloid-like*) utworzone z grubych włókien kolagenu z obecnym kwasochłonnym szkliwieniem, przemieszanych z dojrzałymi włóknami kolagenowymi.
- niedojrzałe – podścielisko utworzone z nieregularnie ułożonych pasm kolagenu otoczonych śluzowaciejącym zrębem.

b) zawartość ilościowa (objętość) podścieliska

Cechę tę oceniono półilościowo, analizując jaki obszar w preparacie zajmuje podścielisko według następujących kryteriów:

- I° skąpe podścielisko (0-25% powierzchni pola badanego skrawka)
- II° średnio obfite podścielisko (25-50% powierzchni pola badanego skrawka)
- III° obfite podścielisko (powyżej 50% powierzchni pola badanego skrawka)

c) pączkowanie guza (tumor budding)

Guzy pączkujące definiowano jako luźno rozrzucone, pojedyncze komórki lub grupy utworzone co najwyżej z 5 komórek nowotworu. Komórki te były obecne zazwyczaj, ale nie zawsze, w czole inwazji guza. Ocenie poddawano cały przekrój guza w danym preparacie, najpierw oglądając go pod powiększeniem 100x w poszukiwaniu pól o największym zagęszczeniu pączków guza, następnie wybrane pola były oceniane pod powiększeniem 200x (pole widzenia 1,1mm²) z 3 pól o największym zagęszczeniu zliczano pączki. Podzielono je na cztery grupy: I – licząca od 0 do 4 „pączków”. II – 5-9, III – 10-19, IV – 20-28

d) typ wzrostu guza

Wyodrębniono dwa typy wzrostu guza: pączkujący (inwazyjny) i rozprężliwy. Oceny dokonano analizując granicę pomiędzy tkanką nowotworową a tkanką gospodarza.

e) naciekanie nerwów obwodowych

f) zatory z komórek nowotworowych w naczyniach limfatycznych.

Oceny dwóch powyższych parametrów dokonano stosując skalę dwustopniową w zależności od obecności lub braku danej cechy.

Jakość podścieliska i jego ilość były analizowane zarówno w ognisku pierwotnym jak i wtórnym. Pączkowanie guza, typ wzrostu, zatory w naczyniach limfatycznych i naciekanie nerwów obwodowych oceniano jedynie w guzie pierwotnym.

III.3. Badania immunohistochemiczne.

Przygotowanie preparatów

Barwienia immunohistochemiczne wykonywano na skrawkach tkankowych mikromacierzy o grubości 4 µm. Umieszczano je na szkiełkach „Superfrost PLUS”(firma Surgipath), a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez noc.

Zastosowane w badaniu przeciwciała wykrywające E-kadherynę i beta-kateninę wraz z metodyką wykonania barwień immunohistochemicznych zawiera Tabela 2.

Tabela 2. Przeciwciała oraz tryb badania immunohistochemicznego.

Przeciwciało	Odzyskiwanie epitopów	Długość ekspozycji	Stężenie	Kontrola pozytywna	Sposób oceny
E-cadherin klon NCH-38, monoklonalne (firma Dako)	Autoklaw	Noc	1:800	Migdałek podniebienny	półilościowa
Beta-catenin, klon 17C2 monoklonalne (firma Novocastra)	Autoklaw	Noc	1:800	Migdałek podniebienny	półilościowa

Barwienie immunohistochemiczne

Cała procedura była taka sam dla obu przeciwciał, składała się z kilku etapów:

I : Odparafinowanie preparatów w szeregu ksylen-alkohol (100%, 96%, 70%).

II: Odkrycie epitopów antygenów. Gotowanie w szybkowarze ciśnieniowym w temperaturze 120°C przez 2,5 min.

III: Blokada endogennej peroksydazy przy pomocy 0,03% roztworu nadtlenu wodoru przez 3 min.

IV: Ekspozycja z przeciwciałem pierwotnym (β -katenina lub E-kadheryna) w temperaturze 4°C – przez noc.

V: Ekspozycja z przeciwciałem wtórnym przez 30 min.

VI: Ekspozycja z DAB (diaminobenzodyna, firma DAKO) przez 2-8 min.

VII: Podbarwienie hematoksyliną Mayera przez 5-8 min.

VIII: Odwodnienie (szereg alkohol-ksylen) i nakrycie szkiełkiem nakrywkowym.

Z każdą badaną grupą preparatów były równocześnie badane próbki kontrolne pozytywne i negatywne (pominięcie w trakcie inkubacji przeciwciała pierwotnego).

Ocena odczynów immunohistochemicznych

Oceny ekspresji E-kadheryny dokonano w oparciu o dwustopniowa skalę:

- Odczyn dodatni: całkowity odczyn błonowy występujący w ponad 80% komórek.
- Odczyn ujemny: odczyn błonowy, który występował w mniej niż 80% komórek, lub odczyn niejednorodny bądź cytoplazmatyczny albo w przypadkach braku odczynu [6].

Oceniając ekspresję beta-kateniny uwzględniono jego lokalizację:

- błonową
- cytoplazmatyczną
- jądrową

W każdej ze wspomnianych lokalizacji subkomórkowych określano intensywność odczynu oraz odsetek dodatnich komórek. Dla oceny intensywności odczynu zastosowano skalę trójstopniową: 1 (słaby), 2 (średni), 3 (silny). Półilościową ocenę odsetka komórek dodatnich grupy dokonano w skali pięciostopniowej: 0 (0%), 1 (1-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%), 4 (76-100%). Ostateczna ocena stanowiła sumę dwóch powyższych parametrów. Na tej podstawie sklasyfikowano odczyny na: negatywny (0-2), słabo dodatni (3-5) i silnie dodatni (6-7). Dla potrzeb analizy statystycznej za dodatni uznano oba typy odczynu dodatniego – o natężeniu 3-7 [143].

III.4. Ocena statystyczna

Obecność znamiennej korelacji pomiędzy badanymi parametrami weryfikowano przy zastosowaniu testu chi-kwadrat (Pearsona, w przypadku tablic dwudzielnych z poprawką Yatesa).

Różnice pomiędzy rozkładem liczby ognisk pączkującego nowotworu (buds) w grupach różniących się obecnością zatorów w naczyniach limfatycznych oceniano za pomocą testu U Manna-Whitneya.

Do analizy czasu przeżycia zakwalifikowano 129 chorych, z czego o 16 pacjentach nie było pełnej informacji medycznej, obserwacja ich została przerwana w różnym czasie od zabiegu operacyjnego (powyższe dane zostały uwzględnione w analizie statystycznej). Analizę czasu przeżycia wykonano przy zastosowaniu metody Kaplana-Meiera, różnice pomiędzy krzywymi weryfikowano testem log-rank.

Wszystkie obliczenia i wykresy wykonano za pomocą programu Statistica 8 (StatSoft, Inc. Tulsa USA).

IV. Wyniki

IV.1. Ocena morfologiczna

IV.1.1. Ognisko pierwotne

a) jakość podścieliska

Najczęściej stwierdzanym typem podścieliska było pośrednie – 85 (65,8%) przypadków; typ dojrzały był obecny w 32 (24,8%) przypadkach, a niedojrzały – w 12 (9,4%) przypadkach.

b) objętość podścieliska

Skąpą (I°) ilość podścieliska stwierdzono w 39 (30,2%), średnio obfitą (II°) – w 75 (58,2%), a obfitą (III°) w 15 przypadkach (11,6%).

c) pączkowanie guza

W prawie połowie badanych nowotworów stwierdzono małą liczbę ognisk pączkującego nowotworu (grupa I – 60 przypadków), od 5 do 9 ognisk stwierdzono w 20 przypadkach (II grupa), grupa III (od 10 do 19 ognisk) obejmowała 37 przypadków, wysoką liczbę badanych ognisk (20 i więcej) stwierdzono w 12 guzach (grupa IV) – patrz tabela IV-01

Średnia w całej badanej grupie: 7,4 ognisk (zakres 0-28 ; mediana 5 ognisk nowotworowych)

d) typ wzrostu guza

W 49 przypadkach nowotwór wzrastał w sposób inwazyjny, w 80 - w sposób rozprężliwy.

e) naciekanie nerwów obwodowych

Naciekanie nerwów obwodowych przez nowotwór stwierdzono w 34 przypadkach.

f) zatory z komórek nowotworowych w naczyniach chłonnych

Cechę tę stwierdzono w 57 przypadkach

IV.1.2. Ognisko wtórne

a) typ podścieliska

Podścielisko typu dojrzałego stwierdzono w 85 (65,9%), typu pośredniego – w 35 (27,1%), a typu niedojrzałego – w 9 przypadkach (7%).

b) objętość podścieliska

Skąpą (I°) ilość podścieliska stwierdzono w 79 (61,3%), średnio obfitą (II°) w 39 (30,2%), a obfite podścielisko (III°) – w 11 (8,5%) przypadkach.

Tabela 3: Ocena parametrów morfologicznych w ognisku pierwotnym i przerzutach do węzłów chłonnych

Ognisko pierwotne			Ognisko wtórne	
Jakość podścieliska (typ)				
typ dojrzały	32 przypadki	24,8 %	85 przypadków	65,9 %
typ pośredni	85 przypadków	65,8 %	35 przypadków	27,1 %
typ niedojrzały	12 przypadków	9,4 %	9 przypadkach	7 %
Ilość podścieliska				
I° (skąpa)	39 przypadków	30,2 %	79 przypadków	61,3 %
II° (średnio obfita)	75 przypadków	58,2 %	39 przypadków	30,2 %
III° (obfita)	15 przypadków	11,6 %	11 przypadków	8,5 %
Ogniska pączkującego nowotworu (tumor budding)				
grupa I (1-4 ogniska)	60 przypadków	46,5 %		
grupa II (5-9 ognisk)	20 przypadków	15,5 %		
grupa III (10-19 ognisk)	37 przypadków	28,7 %		
grupa IV (20 i więcej)	12 przypadków	9,3 %		
Wzrost guza				
typ naciekający	49 przypadków	38 %		
typ uciskający	80 przypadków	62 %		
Naciekanie nerwów obwodowych				
Brak	95 przypadków	73,6 %		
obecne	34 przypadki	26,4 %		
Zatory z komórek nowotworowych				
Brak	72 przypadki	55,8 %		
obecne	57 przypadków	44,2 %		

IV.2. Ocena odczynów immunohistochemicznych

IV.2.1. Ognisko pierwotne

Charakterystyka ekspresji beta-keniny

Ekspresję β -kateniny ujawniono w 123 (95,4%) przypadkach. W 79 (61,3%) przypadkach odczyn miał charakter błonowy, w 45 (34,8%) – cytoplazmatyczny, a w 40 (31%) – jądrowy.

Ekspresja E-kadheryny

Ekspresja E-kadheryny była obecna w 78 (60,5%) przypadkach

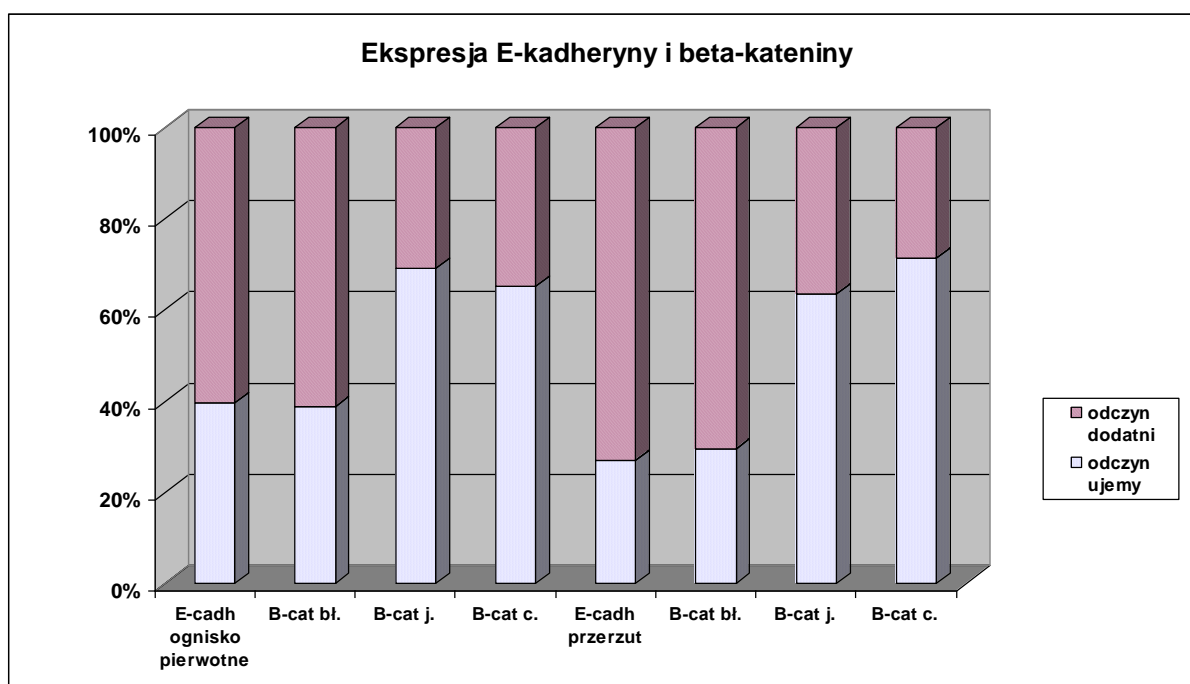
IV.2.2. Przerzuty do węzłów chłonnych

Charakterystyka ekspresji beta-kateniny

Ekspresję beta-kateniny wykazano w 127 (98,4%) przypadkach, z czego w 91 (70,5%) przypadkach odczyn był błonowy, w 37 (28,7%) – cytoplazmatyczny, a w 47 (36,4%) przypadkach –jądrowy

Ekspresja E-kadheryny

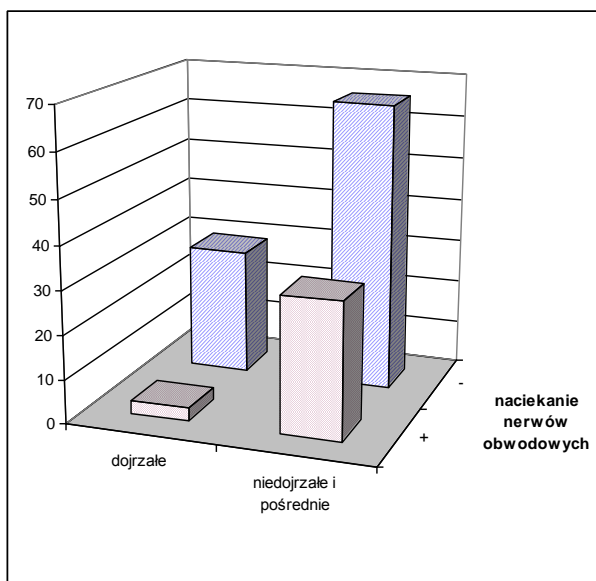
Ekspresję błonową E-kadheryny stwierdzono w 91 (72,8%) przypadkach



Rycina 4- Ekspresja E-kadheryny i beta-kateniny w ognisku pierwotnym i przerzutach do węzłów chłonnych.

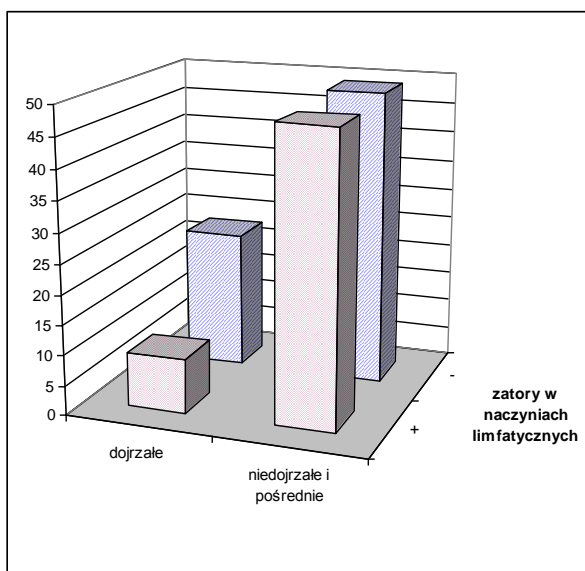
IV.3. Cechy morfologiczne badanej grupy raków jelita grubego

a) Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy typem podścieliska a naciekaniem nerwów obwodowych w ognisku pierwotnym. Ponad 90% nowotworów z naciekaniem nerwów obwodowych to przypadki z niedojrzałym i pośrednim typem podścieliska (test chi-kwadrat, $p=0,01$) (Rycina 5).



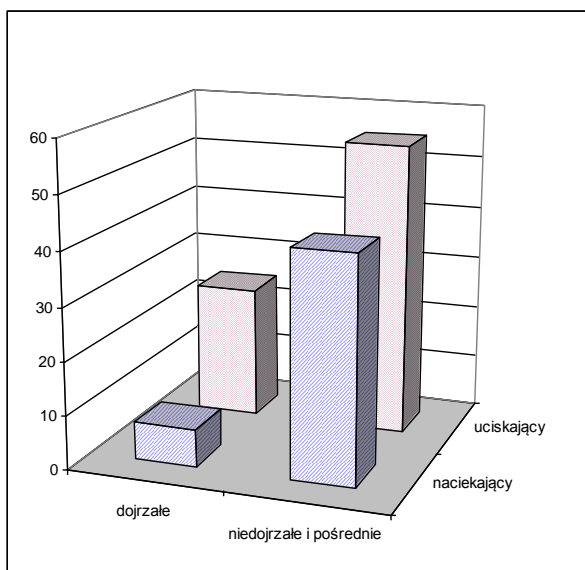
Rycina 5- Typ podścieliska i naciekanie nerwów obwodowych w ognisku pierwotnym.

b) Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy rodzajem podścieliska a obecnością zatorów w naczyniach limfatycznych w ognisku pierwotnym (chi kwadrat Pearsona $p=0,034$). Zatory w naczyniach limfatycznych zdecydowanie częściej stwierdzano w przypadkach z niedojrzałym i pośrednim typem podścieliska (Rycina 6).



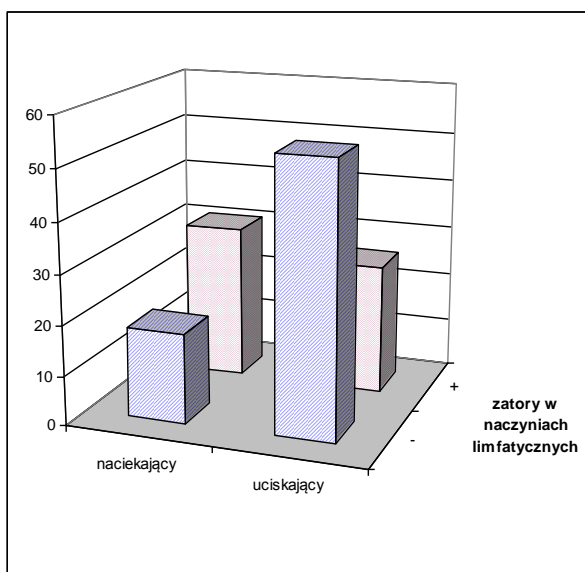
Rycina 6- Typ podścieliska i zatory w naczyniach limfatycznych.

c) Stwierdzono korelację pomiędzy typem wzrostu guza pierwotnego a rodzajem podścieliska (chi kwadrat Pearsona $p=0,03$). Typ wzrostu inwazyjny (naciekający) zdecydowanie częściej obserwowano w przypadkach z niedojrzałym i pośrednim typem podścieliska (Rycina 7).



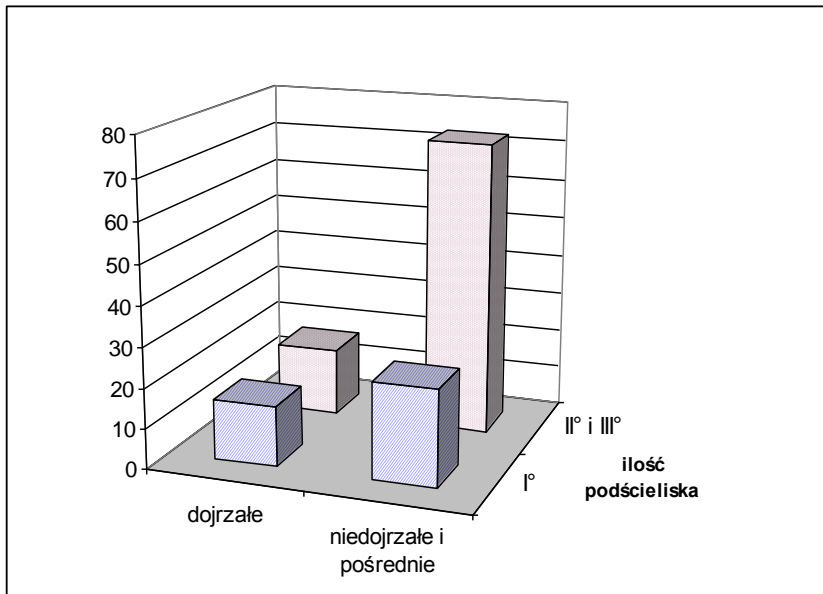
Rycina 7- Typ podścieliska i sposób wzrostu guza pierwotnego.

d) Stwierdzono korelację pomiędzy typem inwazyjnym (naciekającym) wzrostu guza pierwotnego a zatorami w naczyniach limfatycznych (chi kwadrat Pearsona $p < 0,001$) (Rycina 8).



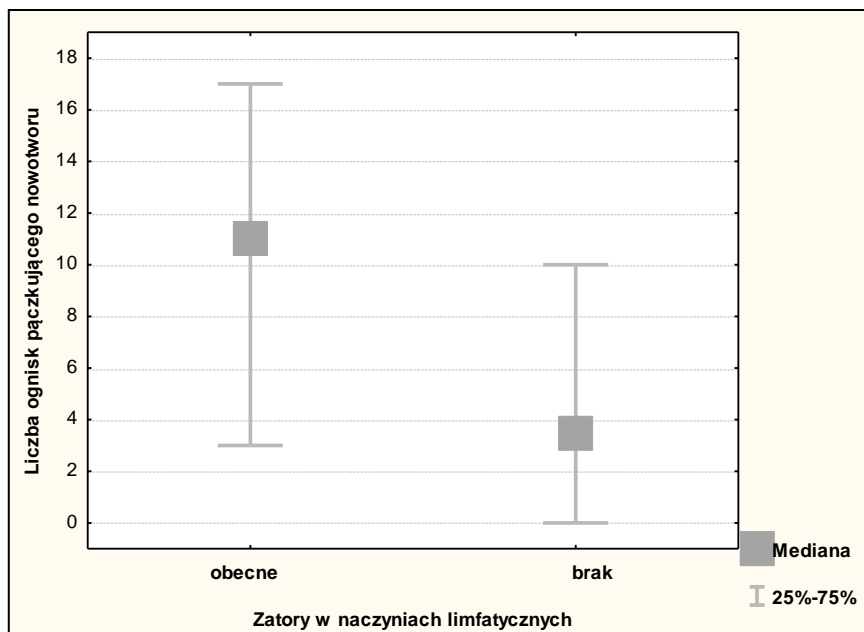
Rycina 8- Typ wzrostu i zatory w naczyniach limfatycznych.

e) W ognisku pierwotnym stwierdzono związek pomiędzy typem a ilością podścieliska ($p=0,03$). W nowotworach z niedojrzałym typem podścieliska zdecydowanie częściej obserwowano średnio obfitą i obfitą jego ilość (II° i III°) (Rycina 9).



Rycina 9- Typ podścieliska i jego ilość w ognisku pierwotnym

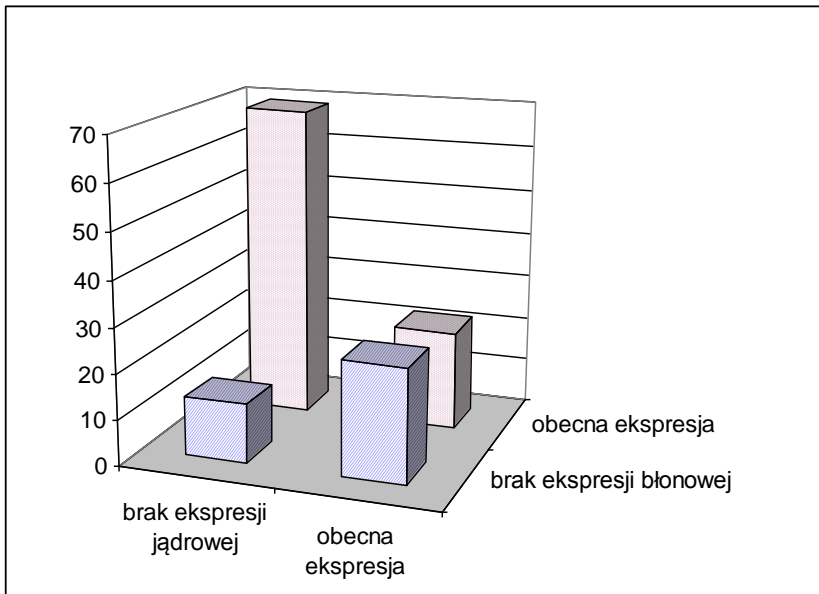
f) W grupie guzów z obecnością zatorów nowotworowych w naczyniach limfatycznych stwierdzono zwiększoną liczbę ognisk pączkującego nowotworu (buds) w czole inwazji (test U Manna-Whitneya, $p < 0,001$; Rycina 10).



Rycina 10- Liczba ognisk pączkującego nowotworu w grupach różniących się obecnością zatorów nowotworowych w naczyniach limfatycznych.

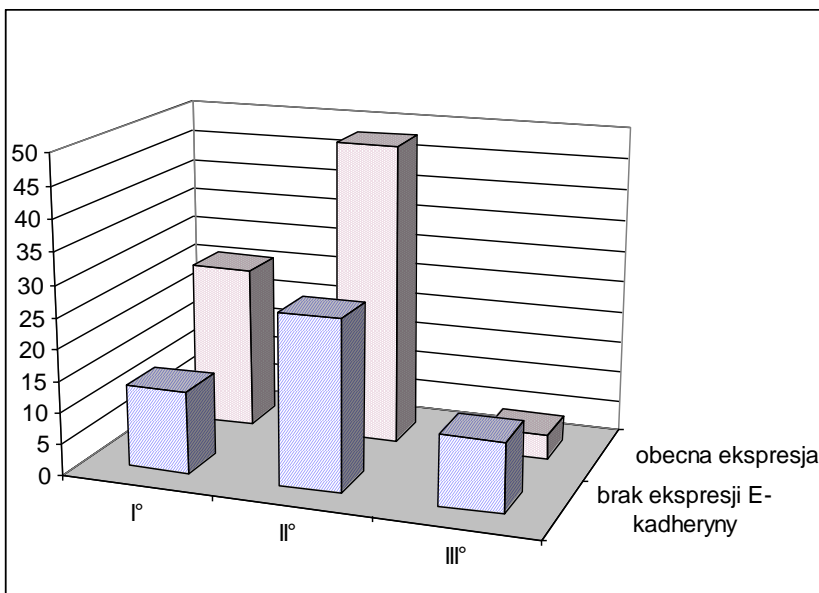
IV.4. Cechy immunohistochemiczne badanej grupy raków jelita grubego

- a) W badanej grupie nowotworów stwierdzono częstsze występowanie ekspresji E-kadheryny w guzie pierwotnym, jeśli wykazywał on wyższy stopień zróżnicowania histologicznego ($p=0,05$). Ponad 85% wysoko zróżnicowanych raków (G1) wykazywało ekspresję tego białka, podczas gdy w nisko zróżnicowanych nowotworach (G3) obecność E-kadheryny była obecna w 44% badanych guzów.
- b) Odsetek przypadków raka jelita grubego z błonową ekspresją beta-kateniny stopniowo zmniejszał się wraz ze wzrostem odróżnicowania nowotworu: w nowotworach wysoko, średnio i nisko zróżnicowanych (G1-G2-G3) wynosił odpowiednio 100%, 62% i 44% ($p=0,01$).
- c) W ognisku pierwotnym stwierdzono wyraźną korelację pomiędzy ekspresją E-kadheryny a błonową ekspresją β -kateniny ($p<0,001$). Jednoczesny brak ekspresji badanych markerów stwierdzono w 28,7% przypadków, zaś równoczesną obecność ekspresji E-kadheryny i ekspresji błonowej beta-kateniny zanotowano w ponad 50% guzów.
- d) Ekspresja E-kadheryny wykazywała odwrotną zależność z ekspresją cytoplazmatyczną β -kateniny ($p<0,001$). W ognisku pierwotnym w 91 nowotworach (70,5%) stwierdzono obecność jednego z badanych markerów przy jednoczesnym braku ekspresji drugiego białka.
- e) W przerzutach do węzłów chłonnych stwierdzono wyraźną odwrotną korelację pomiędzy ekspresją błonową i jądrową beta-kateniny ($p<0,001$). Przerzuty wykazujące dodatni odczyn błonowy zazwyczaj nie wykazywały ekspresji jądrowej tego białka (Rycina 11).



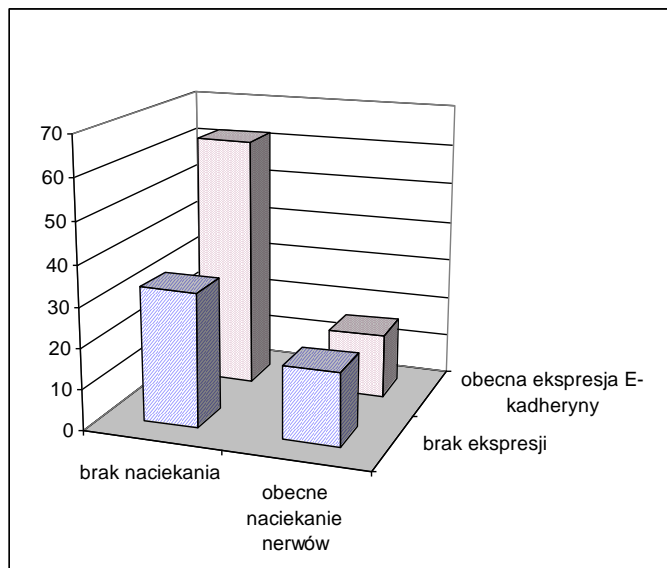
Rycina 11- Ekspresja jądrowa i błonowa beta-kateniny w przekrojach do węzłów chłonnych.

f) Ekspresja E-kadheryny w ognisku pierwotnym korelowała z ilością podścieliska ($p=0,017$). W guzach ze skąpą ilością podścieliska (I°) ekspresję E-kadheryny stwierdzono w 66% przypadków; w nowotworach z obfitą ilością podścieliska (III°) badane białko wykryto jedynie w 27% raków (Rycina 12).



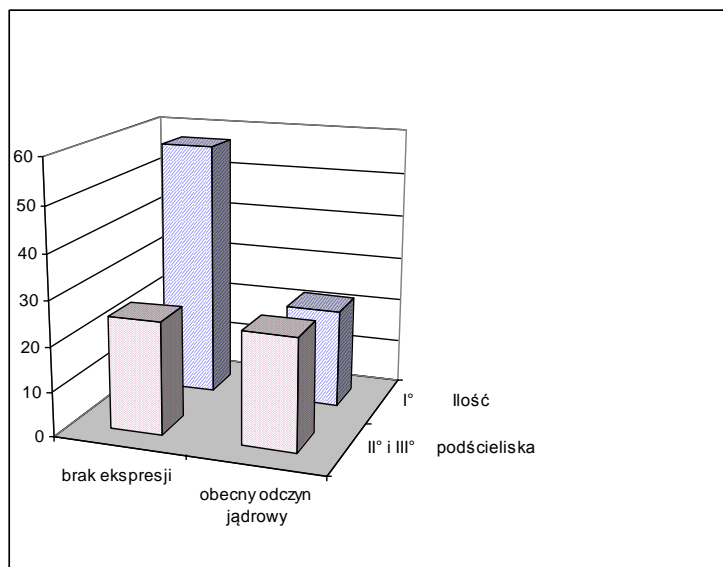
Rycina 12- Ekspresja E-kadheryny i ilość podścieliska w ognisku pierwotnym.

g) Stwierdzono odwrotną zależność pomiędzy ekspresją E-kadheryny w ognisku pierwotnym i obecnością nacieku nerwów, która nie osiągnęła znamiennej statystycznej ($p=0,06$) (Rycina 13).



Rycina 13- Ekspresja E-kadheryny i naciekanie nerwów obwodowych w ognisku pierwotnym.

h) Ilość podścieliska w przerzutach dodatnio koreluje z obecnością ekspresji jądrowej β -kateniny. W ponad 50% przerzutów wykazujących jądrową ekspresję beta-kateniny podścielisko było przynajmniej średnio obfite (II° i III°). Brak ekspresji jądrowej beta-kateniny charakteryzował guzy z dużą i średnią ilością podścieliska jedynie w 30% przypadków ($p=0,036$) (Rycina 14).



Rycina 14- Ekspresja jądrowa beta-kateniny w grupach różniących się ilością podścieliska w przerzutach do węzłów chłonnych.

IV.5. Analiza czasu przeżycia

Uwzględniono dane 104 chorych (pacjenci bez przerzutów odległych)

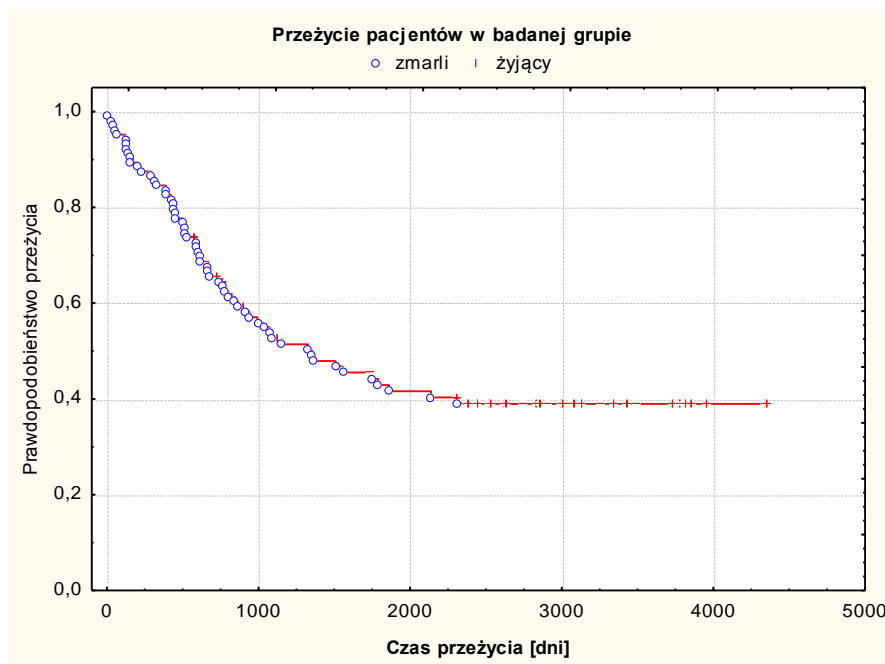
Czas obserwacji chorych wynosił od 9 do 4353 dni (11,9 lat).

W okresie obserwacji zmarło 58 pacjentów (55,7%).

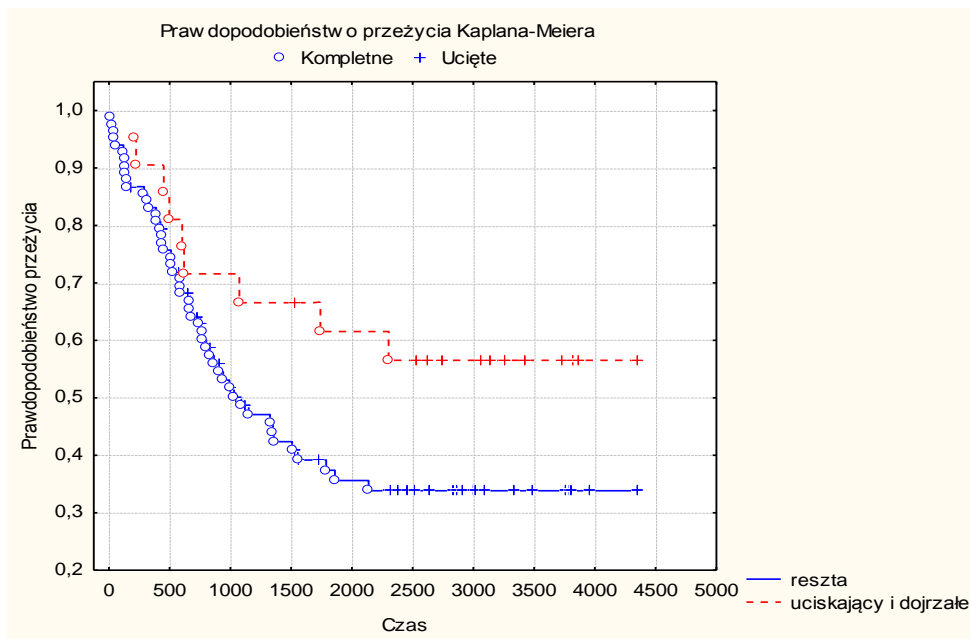
Przeżycie 5-letnie w badanej grupie wynosiło 42,9%, mediana czasu przeżycia 1332 dni (Rycina 15).

Analiza krzywych przeżycia wykazała :

a) Przypadki z dojrzałym typem podścieliska i rozprężliwym typem wzrostu guza pierwotnego lepiej rokują w porównaniu z pozostałymi grupami nowotworów (test log-rank; $p=0,05$) (Rycina 16).



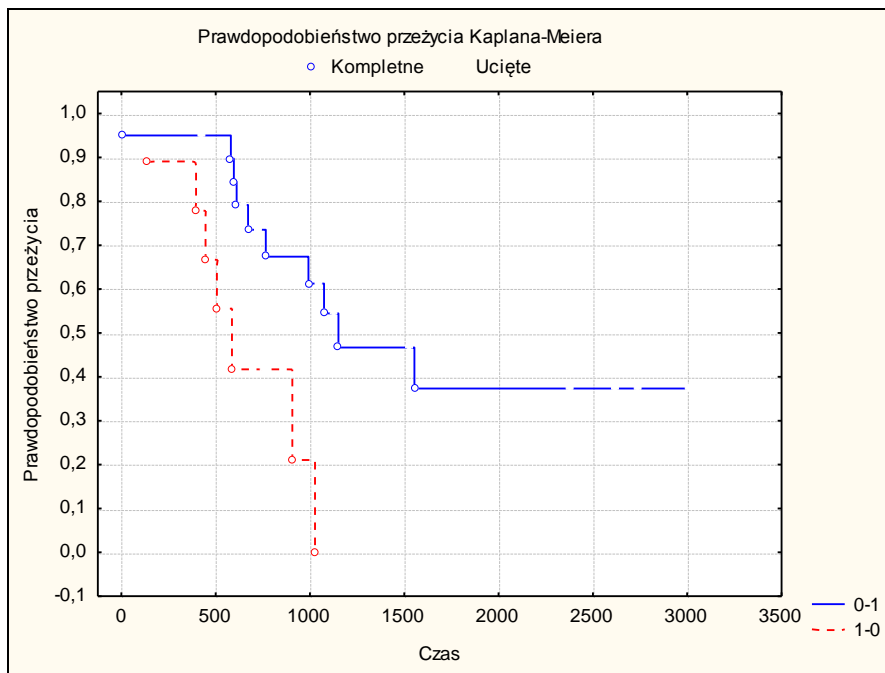
Rycina 15- Przeżycie pacjentów w badanej grupie



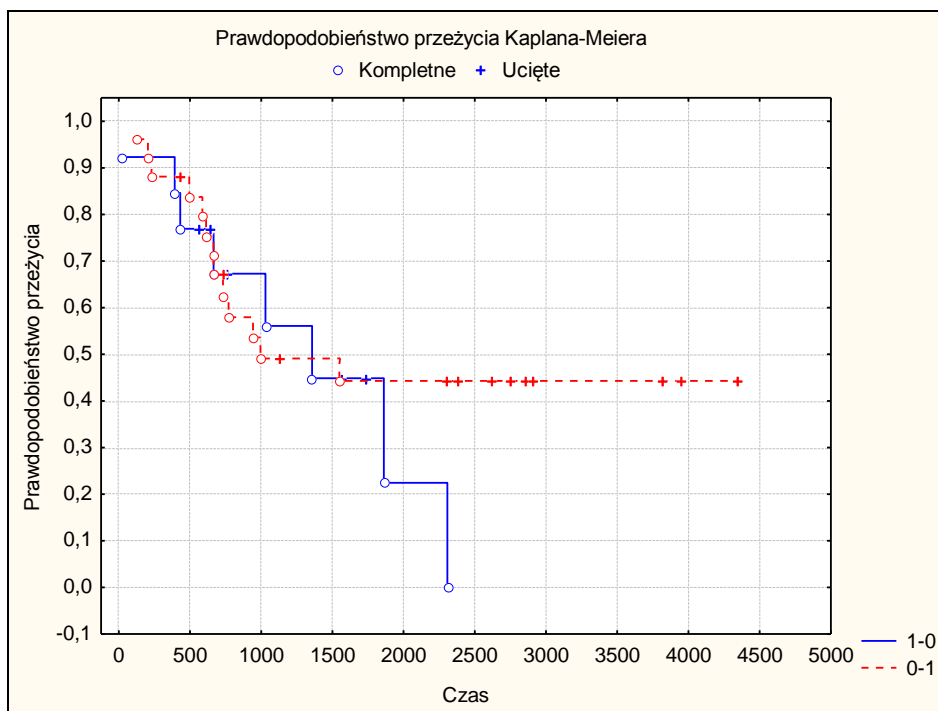
Rycina 16- Krzywe przeżycia w grupie chorych z nowotworami o rozprężliwym typie wzrostu i dojrzałym podścielisku oraz grupie chorych z naciekającym typem wzrostu i odmiennym typem podścieliska.

b) Przypadki z ekspresją błonową E-kadheryny w ognisku pierwotnym oraz brakiem ekspresji E-kadheryny w ognisku przerzutowym (kod grupy 1-0) rokowały gorzej niż przypadki z brakiem ekspresji E-kadheryny w ognisku pierwotnym i obecną ekspresją w przerzucie do węzłów chłonnych (kod grupy 0-1)- test log rank; ($p=0,02$) (Rycina 17).

c) Przypadki z utratą ekspresji błonowej β -kateniny w przerzutach do węzłów chłonnych (kod grupy 1-0) gorzej rokują w porównaniu z grupą wykazującą ekspresję błonową (kod grupy 0-1), ale różnice nie są znamienne statystycznie (Rycina 18).



Rycina 17- Krzywe przeżycia chorych w grupach z odmienną ekspresją E-kadheryny w ognisku pierwotnym i przerzutach.



Rycina 18- Krzywe przeżycia chorych w grupach z odmienną błonową ekspresją beta-kateniny w ognisku pierwotnym i przerzutach.

V. Dyskusja

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie rolą białek regulujących przyleganie międzykomórkowe oraz znaczeniem tego procesu dla rozwoju raka jelita grubego. Podjęto próby określenia wpływu ekspresji cząstek adhezyjnych na rokowanie u chorych z tym nowotworem [85;86;100]. Identyfikacja niekorzystnych czynników rokowniczych umożliwia bowiem intensyfikację leczenia uzupełniającego w celu uzyskania najbardziej optymalnego efektu terapeutycznego. Indywidualizacja leczenia systemowego u chorych z nowotworami postępuje w miarę poszerzania naszej wiedzy na temat biologii nowotworów, a doskonałym tego przykładem jest choćby rak piersi [2] oraz nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego [179]. W raku jelita grubego ujawniono różne czynniki biologiczne wpływające na transformację i progresję nowotworu (np. K-ras) [150], ale żadnego z nich nie włączono do standardowego protokołu leczenia adjuwantowego.

Zaburzenie funkcji cząsteczek adhezyjnych nabłonka (E-kadheryny i β -kateniny) wpływa na inwazyjność i tworzenie przerzutów w różnych nowotworach złośliwych, w tym również w raku jelita grubego. β -katenina pełni podwójną rolę w komórce: odpowiada za przyleganie komórkowe oraz pełni rolę mediatora wewnątrzkomórkowego szlaku Wnt [1;195]. Utrata ekspresji błonowej β -kateniny prowadzi do rozluźnienia połączeń międzykomórkowych, natomiast nasilenie jej ekspresji jądrowej wiąże się z przemianą nabłonkowo-mezenchymalną (EMT) [15] obecną w czole inwazji nowotworu. Akumulacja jądrowa β -kateniny nie jest jedyną przyczyną EMT [65]. Podczas niej komórki nowotworowe tracą zdolność tworzenia struktur nabłonkowych a zyskują fenotyp mezenchymalny, który umożliwia im oddzielenie się od guza pierwotnego i rozprzestrzenianie w zrębie otaczającym zasadniczą masę nowotworu [183]. Wydaje się, że ogniska pączkującego nowotworu stanowią najbardziej istotną biologicznie część guza. W eksperymentalnych badaniach z dimetylohydrazyną na myszach udowodniono, że pierwszy etap inwazji podścieliska jest związany z odróżnicowaniem i dysocjacją komórek nowotworowych [43]. Proces ten ściśle koreluje z pączkowaniem raka jelita grubego u ludzi. Czynnościowo, towarzyszy mu utrata ekspresji kompleksu E-kadheryna-katenina (ECCU *E-cadherin-catenin unit*) [172] i wzrost ekspresji lamininy 5 γ 2 oraz metaloproteinazy 7 [111;113] w ogniskach pączkującego nowotworu. W pozostałych obszarach guza odczyn β -kateniny może być błonowy, cytoplazmatyczny bądź jądrowy. Nie do końca poznano implikacje kliniczne związane z różną dystrybucją odmiennych typów odczynu β -kateniny w guzie [28]. Wiadomo natomiast, że ogniska pączkującego nowotworu wykazują zmniejszoną aktywność proliferacyjną [159],

co wiąże się z zaburzeniami cyklu komórkowego zależnymi od wewnątrzkomórkowej ścieżki regulacyjnej p16/cyklina D1/pRb [141].

Guz nowotworowy stanowi złożony konglomerat tkanek, który tworzą komórki właściwe nowotworu oraz podścielisko zawierające zarówno elementy komórkowe jak i substancje pozakomórkowe. Wszystkie te elementy oddziałują wzajemnie na siebie modyfikując także właściwości biologiczne nowotworu [52]. Obecnie wiadomo, że podścielisko guza nie stanowi jedynie biernego składnika, który spaja jego komórki. Mikrośrodowisko wywiera ogromny wpływ na jego progresję [9;173], umożliwia oddziaływanie pomiędzy nowotworem a tkankami gospodarza, a także może regulować dystrybucję wewnątrzkomórkowej β -kateniny [97], co wpływa na zachowanie komórek nowotworowych [18]. Pozakomórkowe elementy podścieliska mogą hamować ekspresję E-kadheryny w komórkach nowotworu poprzez kinazy związane z integrzynami (Integrin-linked kinase, ILK). Efektem tego jest przechodzenie β -kateniny do jądra z następową aktywacją docelowych genów [137]. Dodatkowo, podścielisko nowotworowe może modyfikować metylację promotorów odpowiednich genów [18]. Zależność tę wykazano w naciekającym raku piersi, gdzie dochodzi do wzmożonej metylacji promotora E-kadheryny, co powoduje wyciszenie tego genu i utratę ekspresji kodowanego białka [24].

Celem niniejszej pracy było porównanie ekspresji E-kadheryny i β -kateniny oraz wybranych elementów morfologicznych, charakteryzujących relacje pomiędzy nowotworem i gospodarzem w ognisku pierwotnym i przerzutach do węzłów chłonnych.

V.1. Analiza cech morfologicznych

V.1.1. Rodzaj podścieliska

Przybliżony opis warunków panujących na granicy pomiędzy masą nowotworową a tkankami zdrowymi jest możliwy dzięki zdefiniowaniu charakteru podścieliska oraz określeniu jego ilości. W raku jelita grubego wyodrębniono trzy rodzaje podścieliska: dojrzałe, pośrednie i niedojrzałe [190]. Różnią się one od siebie zarówno pod względem składu jak i struktury. Podścielisko dojrzałe jest wielowarstwowe, utworzone z dojrzałych, cienkich włókien kolagenowych (dominuje w nim kolagen typu I). Podścielisko pośrednie przypomina budowę histologiczną bliznowiec (keloid-like), gdyż tworzą je szerokie wiązki kolagenu, częściowo zeszkliwiałego, przemieszanego z dojrzałymi włóknami kolagenowymi. Z kolei podścielisko niedojrzałe jest zbudowane z nieregularnie i luźno ułożonych pasm kolagenu otoczonych śluzowaciejącym zrębem.

Z piśmiennictwa i z moich badań wynika, że odzwierciedleniem różnic mikrośrodowiska obecnego w utkaniu nowotworu pierwotnego i w ogniskach przerzutowych w węzłach chłonnych są odmienne typy podścieliska, które wykształca się w otoczeniu nacieku raka. W mojej serii, nowotwór pierwotny zazwyczaj indukował powstanie podścieliska typu pośredniego (65,8% przypadków). W serii obejmującej 862 chorych z rakiem jelita grubego Ueno i wsp. [190] stwierdzili, że w guzach pierwotnych przeważa typ dojrzały (55%), zaś pośredni stanowił 33% analizowanych przypadków. Różnice pomiędzy tymi seriami mogą wynikać z różnic stopnia zaawansowania nowotworów włączonych do tych badań. W serii Ueno i wsp. przeważał niski stopień zaawansowania (Dukes A), a w większości te „wczesne” nowotwory wykazują dojrzały typ podścieliska (98% przypadków). W analizowanej przeze mnie grupie nowotworów dominował natomiast wysoki stopień zaawansowania (Dukes C1) stąd też w mniejszym stopniu były reprezentowane raki z dojrzałym podścieliskiem zaś w większym odsetku z podścieliskiem typu pośredniego.

Korelacje odnoszące się do typu podścieliska w przerzutach raka jelita grubego do węzłów chłonnych są niemożliwe, gdyż według dokonanego przeze mnie przeglądu piśmiennictwa kwestia ta nie była do tej pory analizowana.

V.1.2. Zawartość ilościowa podścieliska

Miejscowy naciek nowotworu wpływa nie tylko na jakościowy skład podścieliska, może także determinować jego objętość. Obrazowo ujął to Dvorak, który porównał wykształcenie podścieliska nowotworowego do rany, która nigdy się nie goi [36]. Ocena ilościowa tego komponentu nowotworowego jest możliwa z wykorzystaniem barwień immunohistochemicznych ujawniających wimentynę [129] albo α -aktynę mięśni gładkich [187]. Alternatywnie, można wykorzystać w tym celu rutynowe barwienie hematoksyliną i eozyną (H&E) [116], co zastosowałem w niniejszym badaniu.

W analizowanej serii zarysowały się wyraźnie różnice ilościowe podścieliska pomiędzy ogniskiem pierwotnym i zmianami przerzutowymi. Guzy pierwotne wykazywały zazwyczaj bardziej obfite podścielisko (69,8% przypadków II-III^o), niż ogniska przerzutowe. W węzłach chłonnych zajętych rakiem przeważało bowiem objętościowo skąpe podścielisko (I^o), które stwierdziłem w 61,3% przypadków. Różnice w ilości podścieliska w ognisku pierwotnym i przerzutowym również odzwierciedlają zmiany w zakresie *milieu* otaczającego utkanie raka (patrz wyżej).

W wielu publikacjach objętość podścieliska nowotworowego stanowiła potencjalny niezależny czynnik rokowniczy. Wyniki tych analiz były jednak rozbieżne [32;50;54;116]. W większości analiz, duża ilość podścieliska (stroma-high) wpływała w sposób niekorzystny na przebieg choroby. Potwierdzają to badania przeprowadzone *in vivo* na liniach komórkowych oraz modelach zwierzęcych, gdzie wykazano wpływ fibroblastów na karcynogenezę. W raku prostaty i w raku piersi fibroblasty pochodzące z podścieliska guza przyspieszały wzrost nabłonka a tym samym stanowiły lepsze wsparcie dla rozwoju raka, w porównaniu z fibroblastami niezwiązanymi z nowotworem [138;139]. Potwierdza to hipotezę, że podścielisko wpływa na zachowanie guza nowotworowego. W naszej pracy nie wykazano opisanej powyżej zależności, może to wynikać z faktu, że w badaniu tym wyróżniono trzy ilościowe grupy podścieliska (I^o, II^o, III^o). We wszystkich pracach, w których stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ilością podścieliska a rokowaniem były dwie grupy (obfite i skąpe podścielisko), co umożliwia w większym stopniu wykrycie zależności statystycznych pomiędzy tymi parametrami.

V.1.3. Korelacja cech morfologicznych

Według Ueno i wsp. [190] typ niedojrzały podścieliska tworzy pewnego rodzaju barierę chroniącą komórki nowotworowe przed układem odpornościowym gospodarza. Ułatwia ona ich przeżycie, a w konsekwencji może sprzyjać rozsiewowi nowotworu w organizmie. W dużym stopniu odpowiadają za to miofibroblasty, stanowiące jeden ze składników komórkowych podścieliska [102]. Ich obecność ma także związek z szybszym nawrotem choroby zasadniczej [187]. Tę hipotezę zdają się potwierdzać wyniki mojej pracy. Występowanie niedojrzałego podścieliska w ognisku pierwotnym korelowało zarówno z naciekającym typem wzrostu guza jak i ze szczególnymi manifestacjami tego procesu, jakimi są: szerzenie się wzdłuż pni nerwowych oraz występowanie zatorów nowotworowych w obrębie naczyń limfatycznych. Wymienione cechy stanowią wykładniki większej złośliwości choroby nowotworowej.

Wydaje się, że typ podścieliska nowotworowego może odgrywać odmienną rolę w zależności od typu nowotworu, a nawet narządu, w którym się on rozwija. Nie wszystkie publikacje opisują przemiany nowotworowego podścieliska dzieląc je na wspomniane podtypy. W niektórych doniesieniach autorzy koncentrują się na poszczególnych typach białek tworzących stromę guza, np. na kolagenie typu I. Ten rodzaj kolagenu szczególnie obficie występuje w podścielisku o typie dojrzałym, stąd uzyskane wyniki nowotworów obfitujących w kolagen typu I próbuje się utożsamiać z tym właśnie typem podścieliska.

W analizach relacji stroma-nowotwór w raku trzustki i żołądka kolagen typu I korelował z utratą błonowej ekspresji E-kadheryny oraz sprzyjał gromadzeniu β -kateniny w jądrze komórkowym. Jednocześnie, ten typ kolagenu w podścielisku charakteryzował nowotwory wykazujące naciekający sposób wzrostu oraz obecność przerzutów [90;98]. Dodatkowo, choć pośrednie, potwierdzenie powyższych wyników dostarczyły badania na liniach komórkowych ludzkiego raka jelita grubego. Stwierdzono w nich, że kolagen typu I indukuje przemianę EMT, hamując różnicowanie komórek nowotworowych oraz zwiększając ekspresję markerów komórek macierzystych [89].

Odmienne niż w raku żołądka i raku trzustki, kolagen typu I obecny w podścielisku czerniaka złośliwego wykazywał aktywność hamującą wzrost guza. Zaobserwowano, że jego obecność w podścielisku guza zatrzymuje przejście komórek czerniaka z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego. To zahamowanie związane jest z nadmierną aktywnością inhibitora cykliny p27/KIP1 [58]. Moje wyniki korelują z wnioskami Ueno i wsp, którzy stwierdzili, że dojrzałe podścielisko występowało w guzach z lepszym rokowaniem [190]. Nie zostało to potwierdzone jako zależność statystyczna w badaniu jednoczynnikowym ale w badaniu wieloczynnikowym (patrz niżej) stanowiło to czynnik rokowniczy.

Wykładnikiem złośliwości miejscowej nowotworu jest także oddzielanie pojedynczych grup lub pojedynczych komórek od głównej masy guza (pączkowanie, budding), co może korelować z przerzutami i wznową miejscową procesa. Znajomość tej zależności wynika głównie z analiz przebiegu klinicznego CRC w niższych stopniach zaawansowania klinicznego – I i II [111;112;121;188;198]; publikacje dotyczące tej zależności w rakach jelita grubego w III stopniu zaawansowania są rzadkie [26]. W mojej analizie tego procesu, pączkowanie nowotworu nie korelowało z określonym typem podścieliska. Przyczyną tego może być dość jednolity, lecz zaawansowany stopień choroby w badanej grupie chorych, jak również wyłączenie z analizowanej grupy raka odbytnicy. Jednorodność grupy wpłynęła na względnie niski stopień zróżnicowania nowotworów pod względem charakteru podścieliska, które w większości przypadków miało utkanie pośrednie. Z kolei Ueno i wsp. [190] wykazali korelację typu niedojrzałego podścieliska ze zwiększoną liczbą pączkujących ognisk nowotworu, ale ich pracy dotyczyła raka odbytnicy, w którym naciek obejmował mezorektum. Jego histologiczna struktura może bowiem decydować o odmienności wzrostu i biologii analizowanych nowotworów.

Liczba ognisk pączkującego nowotworu silnie korelowała z obecnością zatorów w naczyniach limfatycznych. W rakach jelita grubego w stopniu zaawansowania T3N0 jest to jedna z głównych cech mających wpływ na dalsze rokowanie u chorych [198]. Zajęcie

naczyń chłonnych także w moich analizach korelowało z bardziej inwazyjnym typem wzrostu guza pierwotnego. Te cechy morfologiczne przemawiają za większą agresywnością nowotworu i stanowią istotny wykładnik ryzyka niekorzystnego przebiegu choroby [65;77;121;122;134].

W mojej pracy wykazałem związek pomiędzy typem podścieliska a jego objętością. Typ niedojrzały podścieliska zdecydowanie częściej korelował z II-III^o nasilenia objętości desmoplastycznego zrębu. Znaczenie obu tych czynników określonych wcześniej jako niezależne i niekorzystne rokowniczo [116;190] nie znalazło potwierdzenia w moich badaniach nad rakiem jelita grubego.

Wcześniejsze badania nad progresją i czynnikami rokowniczymi w raku jelita grubego wykazały, że czynniki sprzyjające lub hamujące rozwój tego nowotworu nie odgrywają takiej roli niezależnie od siebie. Najważniejszy wpływ na biologię raka jelita grubego ma bowiem równowaga pomiędzy tymi czynnikami [206]. Czoło inwazji nowotworu jest ciągłym „polem walki”, gdzie dochodzi do starcia pomiędzy nowotworem a gospodarzem. Z jednej strony obecne są czynniki sprzyjające rozprzestrzenianiu się nowotworu takie jak: pączkowanie obwodowe nowotworu, naciekanie naczyń limfatycznych i nerwów obwodowych, a z drugiej przeciwdziała temu oddziaływanie podścieliska [190] i układu immunologicznego [75].

V.2. Analiza cech immunohistochemicznych

Istotny problem metodyczny z jakim zetknąłem się w niniejszym badaniu wynikał z faktu zastosowania techniki mikromacierzy tkankowej (TMA – Tissue microarray) do badań immunohistochemicznych. Dotyczył on reprezentatywności pobranych fragmentów guza dla oceny ekspresji analizowanych markerów. Zastosowanie metody TMA z jednej strony warunkuje zachowanie analogicznych warunków przeprowadzenia i interpretacji odczynów immunohistochemicznych oraz wysoki poziom ich standaryzacji. Potwierdzają to wcześniejsze badania, w których zastosowano tę technikę przy ocenie podobnego panelu przeciwciał w raku jelita grubego [28;41;106]. Z drugiej strony technika ta polega na pobraniu drobnych skrawków z bloków tkankowych, co w przypadku zmiany o strukturze niejednorodnej morfologicznie powoduje możliwość uzyskania materiału zawierającego niewielki odsetek elementów analizowanych. Dodatkowym utrudnieniem jest możliwa zmienność ekspresji badanych markerów w populacji komórek nowotworu. Istotne zatem jest ściśle topograficzne zlokalizowanie pożądaných fragmentów tkankowych, jak również dobór liczby i wielkości bioptatów. W naszym badaniu pobrano co najmniej po trzy biopsje z każdego guza pierwotnego i wtórnego ogniska. W świetle doniesień z piśmiennictwa

[62;64;132;152] oraz doświadczeń własnych, które także ukazały się w postaci publikacji [163] zarówno liczba jak i wielkość bioptatów gwarantuje uzyskanie odpowiednio reprezentatywnego materiału. Dotyczyć to może nawet tak niewielkiego materiału poddanego analizie TMA i tak drobnoogniskowego, jak rak Pageta brodawki piersiowej [163]. Różna grubość pobranych bioptatów z bloków parafinowych powoduje także nierównomierną utratę badanego materiału, czemu można także zapobiegać bioptując obszary guza z bloków zawierających zmienną ilość zawartej tkanki. W trakcie analizy immunohistochemicznej badanych mikromacierzy tkankowych nie udało się ocenić 6 (4%) ze 129 przypadków. Wynik ten mieści się w przyjętych wartościach i należy do znanych niekorzystnych cech metodycznych tej techniki [63], ale także potwierdza zasadność zastosowania tej techniki w niniejszym projekcie.

V.2.1. β -katenina

Ekspresję β -kateniny oceniałem w trzech lokalizacjach komórkowych: błonowej, cytoplazmatycznej i jądrowej. W guzie pierwotnym odczyn jądrowy stwierdziłem w 31%, błonowy w 61,3%, a cytoplazmatyczny w 34,8% przypadków. Tylko w 6% przypadków odczyn był wyłącznie błonowy, przypominając normalną lokalizację tego białka w nabłonku gruczołowym prawidłowej błony śluzowej jelita grubego. Zaburzenie metabolizmu komórkowego β -kateniny manifestuje się pojawieniem odczynu jądrowego i cytoplazmatycznego. Jądrową obecność β -kateniny obserwuje się w komórkach wykazujących nasiloną dysplazję, tzn. w gruczolakach jelita grubego, zwłaszcza tych, które ulegają szybkiej progresji do gruczolaka [53]. Jest ona zatem wczesnym i specyficznym wskaźnikiem transformacji złośliwej w jelicie grubym [69]. Obserwuje się ją nie tylko w nowotworach rozwijających się na podłożu zespołu polipowatości rodzinnej (FAP), ale również w około 80% sporadycznych raków jelita grubego [147]. W części publikacji wyniki analiz ekspresji jądrowej β -kateniny w guzie pierwotnym w znaczny sposób odbiegały od moich wyników, i były dwu-trzykrotnie wyższe, niezależnie od tego, czy analizowano całe skrawki guza czy wykorzystywano w nich metodę mikromacierzy [69;106]. W innych donisieniach poziom ekspresji β -kateniny jądrowej był porównywalny z moimi wynikami [142;176]. Te rozbieżności wynikają najprawdopodobniej z niejednorodnego sposobu przeprowadzania barwień immunohistochemicznych, stosowania różnych klonów przeciwciał oraz różnych kryteriów oceniania ekspresji β -kateniny.

Dodatkową obserwacją było stwierdzenie ekspresji jądrowej β -kateniny w komórkach raka w guzie pierwotnym, które utraciły odczyn błonowy tego markera. Jednak zależność

statystyczną tej cechy (obecność ekspresji jądrowej przy braku ekspresji błonowej β -kateniny) stwierdzono jedynie w przerzutach do węzłów chłonnych. Jest to porównywalne z wynikami innych analiz [69;106]. Czynnościowo zmiana lokalizacji subkomórkowej β -kateniny wpływa na pobudzenie przez nią czynników transkrypcyjnych LEF/TCF i docelowo aktywuje transkrypcję określonych onkogenów [68;195].

Autorzy wielu badań zwracają uwagę, że istotna dla biologii komórki danego nowotworu jest nie tylko lokalizacja subkomórkowa β -kateniny, ale i jej obecność w określonych obszarach nowotworu. Podkreśla się, że jedynie odczyn jądrowy obecny w komórkach czoła inwazji guza pierwotnego (ekspresja w marginesie nowotworu, „positive margin only”) jest ważnym i niezależnym czynnikiem rokowniczym w nowotworach złośliwych [176]. Według tych doniesień, ten typ ekspresji ma determinować złośliwość raka, m.in. poprzez oddziaływanie z podścieliskiem. W przypadku β -kateniny istotna dla określenia ryzyka przebiegu choroby wydaje się zatem istotna analiza jej ekspresji w całym guzie nowotworowym [4;66]. Różnice w ekspresji danego markera w zależności od obszaru guza (centrum, margines brzeżny) powodują, że określenie jej w badaniach z zastosowaniem techniki TMA może okazać się trudne lub niemożliwe [28;106]. Jednak opierając się na uprzednich doniesieniach o roli, jaką odgrywa ekspresja beta-kateniny w komórkach czoła wzrostu raka jelita grubego, uważam, że staranne pozyskanie materiału ze wspomnianego obszaru umożliwi jego ocenę także w mikromacierzach tkankowych.

Utratę ekspresji błonowej β -kateniny w ognisku pierwotnym obserwowałem częściej w nowotworach o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego (grade 3). Tę zależność potwierdzono w innych badaniach nad rakiem jelita grubego [181] jak i w raku przełyku [124]. Jej brak stwierdzono jedynie w przypadku raka żołądka [79].

Dyskusyjnym zagadnieniem jest znaczenie ekspresji cytoplazmatycznej β -kateniny. Maruyama opisał w raku jelita grubego, że jedynie wzrost ekspresji cytoplazmatycznej β -kateniny jest niesprzyjającym czynnikiem w przeżyciu wolnym od przerzutów (metastasis free survival) [110]. Także w raku sutka wykazano, że cytoplazmatyczny odczyn β -kateniny jest parametrem, który zalicza się do niekorzystnych czynników rokowniczych [105]. W naszej pracy brak było tej zależności co może wynikać z przyczyn opisanych przy ocenie ekspresji jądrowej beta-kateniny (wielkość fragmentów badanego guza, brak standaryzacji w ocenie wyników pozytywnych i negatywnych, różne rodzaje barwień immunohistochemiczny) oraz stopnia zaawansowania analizowanej grupy guzów.

V.2.2. E-kadheryna

Proces rozsiewu nowotworów złośliwych w dużym stopniu zależy od zmniejszenia przylegania międzykomórkowego w ognisku pierwotnym. Umożliwia to oddzielanie komórek z masy guza i wnikanie ich do naczyń chłonnych i krwionośnych. Proces ten na poziomie komórki polega na utracie połączeń międzykomórkowych, które tworzą m.in. białka adhezyjne. W nowotworach nabłonkowych dużą rolę odgrywają białka z rodziny E-kadheryny, która często traci swoją ekspresję w guzie pierwotnym. W analizowanej serii przypadków raka jelita grubego utratę ekspresji tego białka stwierdziłem w 39,5% guzów pierwotnych, i w 27,2% przerzutów do węzłów chłonnych. W części przypadków (28%) występowała różnica w ekspresji E-kadheryny pomiędzy komórkami guza pierwotnego i przerzutami w węzłach chłonnych. Zjawisko „odzyskania” (reekspresji) tego białka w ogniskach przerzutowych, które było nieobecne w guzie pierwotnym opisywano już wcześniej w raku jelita grubego [6;84] oraz w raku piersi, żołądka, płuc i przetyku [13;22;91;104]. Nabywanie ekspresji E-kadheryny przez komórki nowotworowe zagnieżdżające się w węzłach chłonnych może umożliwiać im miejscowy rozwój [48]. Hipotez związanych z odzyskaniem ekspresji E-kadheryny w ogniskach wtórnych jest kilka. Najczęściej utratę ekspresji E-kadheryny w ognisku pierwotnym przypisuje się zaburzeniom epigenetycznym, gdyż obserwowaną „odwracalność” ekspresji tego białka trudno wyjaśnić zaburzeniami strukturalnymi (mutacjami) genu *CDH1*. Oddziaływanie „środowiska” węzła chłonnego może hamować epigenetyczne wyciszenie ekspresji E-kadheryny w przerzucie. Inna z teorii sugeruje, że E-kadheryno-dodatnie komórki nowotworowe w przerzucie pochodzą z komórek niewielkiego ogniska o podobnym fenotypie z E-kadheryno-ujemnego guza pierwotnego. W tym przypadku komórki raka w przerzutach nie tyle nie odzyskały ekspresji E-kadheryny, lecz zachowują pierwotny profil fenotypowy charakterystyczny dla niewielkiego klonu komórek guza. Ta teoria jest mniej prawdopodobna, ale uzmysławia nam, że mechanizmów kontrolujących ekspresję E-kadheryny w przerzutach może być więcej [11;72].

V.3. Korelacja cech morfologicznych z molekularnym fenotypem nowotworu

Obraz morfologiczny nowotworu stanowi efekt ekspresji różnorodnych genów w jego komórkach. Analizując obecność badanych białek adhezyjnych udało się zaobserwować pewne korelacje pomiędzy nimi a utkaniem guza. Wzrost ekspresji jądrowej β -kateniny w przerzutach do węzłów chłonnych korelował z większą objętością podścieliska obecnego w ogniskach wtórnych. W ponad połowie przerzutów z jądrową ekspresją β -kateniny

stwierdzono średnią i dużą objętość podścieliska (II-III°). Natomiast w przypadkach, gdy ekspresja jądrowa β -kateniny nie występowała, obfite podścielisko (II-III°) stwierdzano jedynie w 30% przerzutów. Obserwacja ta potwierdza teorię (odnoszącą się do guzów pierwotnych), że nowotwory, które prezentują „niekorzystny” profil ekspresji β -kateniny [66] częściej zawierają dużą ilość podścieliska, co ma stanowić czynnik sprzyjający progresji choroby [129].

Obecność ekspresji błonowej E-kadheryny koreluje z kolei z wysokim stopniem zróżnicowania histologicznego guzów pierwotnych [94;128;193]. W naszym badaniu w 85% ognisk pierwotnych z I stopniem zróżnicowania wykazano na błonie komórkowej obecność E-kadheryny. Ponadto ekspresji E-kadheryny towarzyszył odczyn błonowy β -kateniny. W komórkach nowotworowych, w których doszło do utraty ekspresji E-kadheryny, analiza wykazywała wzrost cytoplazmatycznej ekspresji β -kateniny. Wszystkie te trzy zależności potwierdzają badania Lugi i wsp., również wykonane na macierzach tkankowych [106]. Ostatnią zależność (utrata ekspresji E-kadheryny a wzrost ekspresji cytoplazmatycznej β -kateniny) potwierdzono również w badaniu *in vitro* na komórkach czerniaka złośliwego, gdzie cytoplazmatyczna frakcja β -kateniny indukowała czynnik jądrowy NF κ B, odgrywający istotną rolę w procesie nowotworzenia czerniaka złośliwego [93].

Utracie ekspresji E-kadheryny w guzie pierwotnym towarzyszyło zwiększenie ilości podścieliska. Ma ono związek z zaawansowaniem choroby nowotworowej [129] oraz ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia wznowy miejscowej [145]. Ponadto analiza guzów pierwotnych, w których nie stwierdzono ekspresji E-kadheryny wykazała obecność naciekania nerwów obwodowych. Jest to kolejny parametr mający wpływ na powstanie wznowy miejscowej w miejscu po usuniętym wcześniej guzie, który został potwierdzony we wcześniejszych publikacjach [101;185].

V.4. Ocena wpływu cech morfologicznych i immunohistochemicznych na przeżycie chorych

Typ wzrostu guza pierwotnego stanowi cechę patologiczną zawartą już w klasyfikacji raka jelita grubego Jassa i Morsona z 1987 roku [78]. Cechy tej nie uwzględniają późniejsze metody raportowania tego nowotworu, jak to dzieje się w przypadku raków głowy i szyi. W tych ostatnich nowotworach stanowi to jeden z ważniejszych czynników, który wpływa na ryzyko wystąpienia przerzutów i wznowy miejscowej [20;107]. Z kolei ocena jakości i szczegółowego składu podścieliska ma znaczenie w rozpoznaniu wielu nowotworów, m.in. w czerniaku złośliwym, w raku żołądka, czy trzustki [58;90;98], a także w raku jelita grubego

[190]. W naszym badaniu określenie typu wzrostu nowotworu oraz cech jakościowych podścieliska w ognisku pierwotnym umożliwiło wyodrębnienie wśród chorych dwóch grup kliniczno-patologicznych, które różniły się przebiegiem klinicznym. Przeżycie chorych z rakiem, który wykazywał rozprężliwy wzrost oraz typ dojrzały wykształconego podścieliska było dłuższe w porównaniu z pozostałymi grupami chorych.

W badaniach dotyczących ekspresji E-kadheryny w ogniskach pierwotnych i wtórnych udowodniono, że w większości ocenianych przypadków dochodzi do utraty ekspresji błonowej w ognisku pierwotnym, a następnie do odzyskania tej ekspresji w ognisku przerzutowym (kod grupy 0-1) [6]. W moich badaniach wyodrębniłem grupę chorych, których rak jelita grubego wykazywał odwrotny profil ekspresji tego białka w guzie pierwotnym i przerzucie (kod grupy 1-0). Taki profil ekspresji E-kadheryny korelował z krótszym czasem przeżycia chorych w porównaniu z chorymi, u których ekspresja E-kadheryny w przerzucie kontrastowała z jej brakiem w guzie pierwotnym. Wyniki te potwierdzają uprzednie obserwacje z dwóch wcześniejszych badań [39;44]. Jednak analizowane przez nich grupy chorych były niejednorodne pod względem zaawansowania klinicznego, badana grupa zawierała przypadki w stopniu zaawansowania B-D wg. Dukes'a. Dodatkowo porównywane przerzuty pochodziły z różnych narządów.

Obie powyższe korelacje przedstawiające wpływ cech morfologicznych i immunohistochemicznych na przeżycie chorych zawierają oryginalne wyniki badań i nie były do tej pory opublikowane przez żadnego z autorów.

Dodatkową obserwacją poczynioną w niniejszym badaniu było stwierdzenie krótszego czasu przeżycia u chorych, u których ogniska rozsiewu raka jelita grubego traciły ekspresję błonową β -kateniny, pomimo jej obecności w guzie pierwotnym. Jest to zbieżne z wynikami badań Buhmeida i wsp. [21]. Jednak w moich analizach wynik ten nie osiągnął poziomu znaczenia statystycznego, co najprawdopodobniej wynika z faktu, że ekspresja β -kateniny była przez mnie oceniana metodą TMA. Ze względu na heterogenność odczynu β -kateniny w raku jelita grubego, zaleca się jej ocenę w całym przekroju guza [66;142] a nie w jego fragmencie, co determinuje technika TMA. Znaczenie może mieć także rozlana i jedynie brzeżna obecność jądrowego odczynu w tkance guza. Wykazał to dobitnie Horst i wsp. [66]. Rokowanie w przypadku chorych z oboma typami ekspresji β -kateniny może różnić się zasadniczo. Zastosowanie techniki TMA może ograniczyć tego rodzaju niedodiagnozowanie przypadków z ograniczoną brzeżną ekspresją, jedynie w przypadku biopsji różnych części guza (centrum, obwód).

Wyniki moich badań ujawniły wpływ mikrośrodowiska guza oraz ekspresji w obrębie kompleksu ECCU na czas przeżycia chorych z rakiem jelita grubego. Skłania to do poszukiwania przyszłych celów terapeutycznych ingerujących w sygnalizację Wnt.

VI. Wnioski

- 1.** Przypadki z dojrzałym typem podścieliska i rozprężliwym typem wzrostu guza pierwotnego lepiej rokują w porównaniu z pozostałymi grupami nowotworów.
- 2.** Przypadki z ekspresją błonową E-kadheryny w ognisku pierwotnym oraz brakiem ekspresji E-kadheryny w ognisku przerzutowym rokowały gorzej niż przypadki z brakiem ekspresji E-kadheryny w ognisku pierwotnym i obecną ekspresją w ognisku wtórnym.
- 3.** Niedojrzały typ podścieliska związany jest z naciekaniem nerwów obwodowych, obecnością zatorów w naczyniach limfatycznych oraz inwazyjnym typem wzrostu guza pierwotnego.

VII. Streszczenie

Rak jelita grubego jest schorzeniem charakteryzującym się największą dynamiką wzrostu nowych zachorowań wśród chorób nowotworowych w Polsce. Zajmuje on drugie miejsce pod względem zachorowalności na nowotwory złośliwe, a wśród przyczyn zgonów jest na trzecim miejscu u kobiet i na drugim u mężczyzn. W tym typie nowotworu jednym z najważniejszych czynników rokowniczych jest stopień zaawansowania choroby. Pięcioletnie przeżycie u pacjentów z guzami przekraczającymi ścianę jelita bez przerzutów do węzłów chłonnych wynosi 70-80%. Jeżeli ognisku pierwotnemu towarzyszy zajęcie węzłów chłonnych przez przerzuty to przeżycie wyraźnie się skraca i wynosi 25-50%.

W celu indywidualizacji postępowania terapeutycznego poszukuje się nowych czynników prognostycznych, które mogłyby ograniczyć grupę chorych o niepewnym rokowaniu. Jednym z intensywnie badanych parametrów jest ekspresja białek odpowiedzialnych za przyleganie komórkowe.

Badaniem objęto grupę 129 chorych z rozpoznaniem raka gruczołowego jelita grubego w III i IV stopniu zaawansowania operowanych w latach 1998-2004. Badaną grupę stanowiły 54 kobiety (42%) i 75 mężczyzn (58%) w wieku od 32 do 91 lat. Lokalizacja nowotworów była następująca: okrężnica esowata – 48 przypadków, kątnica – 30, okrężnica wstępująca – 24, okrężnica poprzeczna – 18, okrężnica zstępująca – 7 i okolica zgięcia esiczo-odbytniczego okrężnicy – 2. Chorych z rakiem odbytnicy nie objęto analizą ze względu na niejednorodną technikę operacyjną usunięcia mezorektum. W badaniu uwzględniono jedynie raki gruczołowe (99 przypadków) i raki śluzotwórcze (30 przypadków).

Łącznie do badania zakwalifikowano 106 chorych z rakiem jelita grubego w III stopniu, a 23 – w IV stopniu zaawansowania klinicznego. Stopień zróżnicowania nowotworu był następujący: 8 (6%) przypadków – grade 1, 94 (73%) – grade 2 oraz 27 (21%) nowotworów w stopniu 3.

Analizie poddano cechy kliniczne chorych oraz histopatologiczne nowotworów. Ekspresję E-kadheryny i β -kateniny określono zarówno w guzie pierwotnym jak i w przerzutach do węzłów chłonnych. Dodatkowo wśród wykładników morfologicznych oceniono typ i objętość podścieliska towarzyszącego guzowi, typ wzrostu guza, obecność pączkowania guza (budding) oraz naciekania nerwów obwodowych oraz zatorów w naczyniach limfatycznych. Pierwsze dwie cechy morfologiczne były ocenione zarówno w ognisku pierwotnym jak i wtórnym, pozostałe zbadano tylko w guzie pierwotnym. Analizy statystyczne przeprowadzono wykorzystując test chi-kwadrat oraz test U Manna-Whitneya,

analizę przeżycia metodą Kaplana-Mayera, różnice pomiędzy krzywymi weryfikowano testem log-rank.

W guzach pierwotnych stwierdzono korelację pomiędzy występowaniem niedojrzałego i pośredniego typu podścieliska guza z obecnością nacieku nerwów obwodowych ($p=0,01$) i zatorów w naczyniach limfatycznych ($p=0,034$) oraz naciekającym typem wzrostu nowotworu ($p=0,03$). Wykazano również korelację pomiędzy średnio obfitą i obfitą ilością podścieliska a typem niedojrzałym podścieliska ($p=0,03$) w guzie pierwotnym oraz średnio obfitą i obfitą (II° i III°) ilością podścieliska a obecnością ekspresji jądrowej beta-kateniny w przerzutach do węzłów chłonnych ($p=0,036$). Dodatkowo w guzach ze skąpą ilością podścieliska (I°) stwierdzano dodatni odczyn na obecność E-kadheryny w komórkach raka ($p=0,017$). Inwazyjny typ wzrostu guza pierwotnego korelował z występowaniem zatorów w naczyniach limfatycznych ($p<0,001$). Obecność zatorów w świetle naczyń limfatycznych stwierdzono w 57 przypadkach i korelowała ona z występowaniem ognisk pączkującego nowotworu (buds) w obszarze brzeżnym guza (test U Manna-Whitneya, $p<0,001$).

Ekspresja E-kadheryny była obecna w 60,5% przypadków guzów pierwotnych i wykazywała ona dodatnią korelację z błonową ekspresją beta-kateniny ($p<0,001$) oraz odwrotną zależność z cytoplazmatyczną ekspresją beta-kateniny. Ponadto guzy wykazujące ekspresję E-kadheryny miały wyższy stopień zróżnicowania histologicznego ($p=0,01$).

Ekspresję beta-kateniny w ognisku pierwotnym ujawniono w 123 (95,4%) przypadkach. W 79 przypadkach odczyn miał charakter błonowy, w 45 – cytoplazmatyczny, a w 40 – jądrowy. W ogniskach przerzutowych wykazano ekspresję beta-kateniny w 127 (98,4%) przypadkach, z czego w 91 przypadkach odczyn był błonowy, w 37 – cytoplazmatyczny, a w 47 przypadkach – jądrowy. Ekspresja błonowa beta-kateniny częściej występowała w nowotworach z wysokim lub średnim stopniem zróżnicowania histologicznego (G1 lub G2) ($p=0,01$). W przerzutach do węzłów chłonnych ekspresja błonowa i jądrowa wzajemnie się wykluczały ($p<0,001$).

Analiza krzywych przeżycia wykazała dwie istotne zależności. Przypadki z dojrzałym typem podścieliska i rozprężliwym typem wzrostu guza pierwotnego miały lepszy przebieg kliniczny w porównaniu z pozostałymi grupami nowotworów. Przypadki z ekspresją błonową E-kadheryny w ognisku pierwotnym oraz brakiem ekspresji E-kadheryny w ognisku przerzutowym rokowały gorzej niż przypadki z brakiem ekspresji E-kadheryny w ognisku pierwotnym i obecną ekspresją w ognisku wtórnym.

VIII. Summary

The colorectal carcinoma (CRC) is the second most common malignancy in Poland. It is the second cause of mortality among men and the third among women. Staging is one of the most important prognostic factor in CRC. Five-year survival in patients with T3/4N0 stage is between 70-80%. If local lymph node metastases are present, five-year survival falls between 25-50%. Currently the new prognostic factors in CRC are extensively investigated, and adhesion molecules are one of the targets of these studies.

The study group included 129 patients diagnosed with colorectal adenocarcinoma and metastases to the lymph nodes operated on during 1998 - 2004. The study group comprised 54 women (42%) and 75 men (58%) aged from 32 to 91 years. Location of tumors was as follows: sigmoid - 48 cases, the cecum - 30, ascending colon - 24, transverse colon - 18, descending colon - 7 and the region of rectosigmoid junction - 2. Rectal cancer was excluded from analyses due to various surgical approach associated with the mesorectum resection. There were 106 stage III and 23 stage IV patients. Histologically, adenocarcinoma (99 cases) and mucinous adenocarcinoma (30 cases) were included. Tumor grade was following: 8 (6%) grade 1, 94 (73%) grade 2 and 27 (21%) grade 3 tumors.

We analyzed the clinical and histopathological features of the primary tumors and lymph node metastases. Special interest concerned type and volume of tumor-related stroma, type of tumor growth, presence of tumor budding, infiltration of the nerves and neoplastic emboli in the lymphatic vessels. The former two morphological traits were evaluated in both the primary tumor and metastases, the others only in the primary tumor. Expression of E-cadherin and β -catenin was determined in primary tumors and lymph node metastases. Statistical analysis was performed by means of chi-square and Mann-Whitney U test, Kaplan-Mayer survival analysis, the differences between the curves verified by log-rank.

The immature and intermediate-type tumor-related stroma in primary tumors correlated with presence of nerve infiltration of ($p=0,01$), lymph vessel emboli ($p=0,34$) and the invasive type of growth ($p=0,03$). Primary tumors with immature type of stroma usually showed more copious stromal component ($p=0,03$). Amount of tumor-related stroma correlated with the nuclear expression of beta-catenin in lymph node metastases ($p=0,036$). Scarce tumor-related stroma (I°) was more characteristic for E-cadherin-positive CRC ($p=0,017$). Invasive type of tumor growth correlated with the lymphatic cancer involvement ($p<0,001$). The latter also correlated with the presence of tumor budding in the margin of invasion (U Mann-Whitney, $p<0,001$).

60.5% of primary tumors expressed E-cadherin and this feature correlated with the membranous expression of beta-catenin ($p < 0,001$) and inverse correlated with the cytoplasmic expression of beta-catenin. Furthermore, expression of E-cadherin more commonly occurred in CRC with lower histological grade ($p = 0,01$).

Beta-catenin was revealed in 123 (95.4%) primary tumors. Its immunoreactivity was membranous in 79, cytoplasmic in 45, and nuclear in 40 cases. Lymph node metastases showed beta-catenin expression in 127 (98.4%) cases, with respective pattern present in 91, 37 and 47 cases. Membranous expression of beta-catenin was more common in G1 and G2 tumors ($p = 0,01$). Lymph node metastases showed mutually exclusive pattern of membranous and nuclear beta-catenin expression ($p < 0,001$).

Prognostically, mature type of stroma and expansile type of growth in the primary tumor had more favorable outcome. Membranous E-cadherin at the primary site with loss of expression in the metastases correlated with worse clinical course than cases with lack of E-cadherin in the primary tumor that acquired E-cadherin in metastatic deposits.

IX. Piśmiennictwo

- 1 Aberle H, Schwartz H, Kemler R: Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 1996;61:514-523.
- 2 Acharya CR, Hsu DS, Anders CK, Anguiano A, Salter KH, Walters KS, Redman RC, Tuchman SA, Moylan CA, Mukherjee S, Barry WT, Dressman HK, Ginsburg GS, Marcom KP, Garman KS, Lyman GH, Nevins JR, Potti A: Gene expression signatures, clinicopathological features, and individualized therapy in breast cancer. *JAMA* 2008;299:1574-1587.
- 3 Angst BD, Marozzi C, Magee AI: The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 2001;114:629-641.
- 4 Bandapalli OR, Dihlmann S, Helwa R, Macher-Goeppinger S, Weitz J, Schirmacher P, Brand K: Transcriptional activation of the beta-catenin gene at the invasion front of colorectal liver metastases. *J Pathol* 2009;218:370-379.
- 5 Barsky SH, Gopalakrishna R: Increased invasion and spontaneous metastasis of BL6 melanoma with inhibition of the desmoplastic response in C57 BL/6 mice. *Cancer Res* 1987;47:1663-1667.
- 6 Batistatou A, Charalabopoulos AK, Scopa CD, Nakanishi Y, Kappas A, Hirohashi S, Agnantis NJ, Charalabopoulos K: Expression patterns of dysadherin and E-cadherin in lymph node metastases of colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 2006;448:763-767.
- 7 Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W: Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996;382:638-642.
- 8 Bird RP: Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 1987;37:147-151.
- 9 Bissell MJ, Weaver VM, Lelievre SA, Wang F, Petersen OW, Schmeichel KL: Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer Res* 1999;59:1757-1763s.
- 10 Boateng J, Verghese M, Shackelford L, Walker LT, Khatiwada J, Ogotu S, Williams DS, Jones J, Guyton M, Asiamah D, Henderson F, Grant L, DeBruce M, Johnson A, Washington S, Chawan CB: Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats. *Food Chem Toxicol* 2007;45:725-732.
- 11 Bogenrieder T, Herlyn M: Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 2003;22:6524-6536.
- 12 Boland CR, Goel A: Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010;138:2073-2087.

- 13 Bongiorno PF, al-Kasspooles M, Lee SW, Rachwal WJ, Moore JH, Whyte RI, Orringer MB, Beer DG: E-cadherin expression in primary and metastatic thoracic neoplasms and in Barrett's oesophagus. *Br J Cancer* 1995;71:166-172.
- 14 Bosetti C, Pelucchi C, La Vecchia C: Diet and cancer in Mediterranean countries: carbohydrates and fats. *Public Health Nutr* 2009;12:1595-1600.
- 15 Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T: Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* 2005;179:56-65.
- 16 Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T: beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 1999;155:1033-1038.
- 17 Brabletz T, Jung A, Hermann K, Gunther K, Hohenberger W, Kirchner T: Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract* 1998;194:701-704.
- 18 Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T: Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10356-10361.
- 19 Bruce WR, Wolever TM, Giacca A: Mechanisms linking diet and colorectal cancer: the possible role of insulin resistance. *Nutr Cancer* 2000;37:19-26.
- 20 Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E: New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989;18:432-437.
- 21 Buhmeida A, Elzagheid A, Algars A, Collan Y, Syrjanen K, Pyrhonen S: Expression of the cell-cell adhesion molecule beta-catenin in colorectal carcinomas and their metastases. *APMIS* 2008;116:1-9.
- 22 Bukholm IK, Nesland JM, Borresen-Dale AL: Re-expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin, but not of gamma-catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients. *J Pathol* 2000;190:15-19.
- 23 Burgart LJ: Colorectal polyps and other precursor lesions. Need for an expanded view. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:959-970.
- 24 Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, Neto FA, Rainho CA, Rogatto SR: CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. *BMC Cancer* 2006;6:48.
- 25 Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofori G: Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett* 2002;176:123-128.

- 26 Choi HJ, Park KJ, Shin JS, Roh MS, Kwon HC, Lee HS: Tumor budding as a prognostic marker in stage-III rectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis* 2007;22:863-868.
- 27 Choi YS, Shim YM, Kim SH, Son DS, Lee HS, Kim GY, Han J, Kim J: Prognostic significance of E-cadherin and beta-catenin in resected stage I non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;24:441-449.
- 28 Chung GG, Provost E, Kielhorn EP, Charette LA, Smith BL, Rimm DL: Tissue microarray analysis of beta-catenin in colorectal cancer shows nuclear phospho-beta-catenin is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res* 2001;7:4013-4020.
- 29 Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C: Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:979-994.
- 30 Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev A: Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 2003;163:847-857.
- 31 Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM: The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 1999;18:2883-2891.
- 32 de Kruijf EM, van Nes JG, van de Velde CJ, Putter H, Smit VT, Liefers GJ, Kuppen PJ, Tollenaar RA, Mesker WE: Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast Cancer Res Treat* 2011;125:687-696.
- 33 de la Chapelle A: Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:769-780.
- 34 De Wever O, Mareel M: Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 2003;200:429-447.
- 35 DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer. *Prog Exp Tumor Res* 2003;37:124-37.
- 36 Dvorak HF: Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986;315:1650-1659.
- 37 Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF: The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001;48:526-535.
- 38 Egeblad M, Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161-174.
- 39 Elzagheid A, Algars A, Bendardaf R, Lamlum H, Ristamaki R, Collan Y, Syrjanen K, Pyrhonen S: E-cadherin expression pattern in primary colorectal

- carcinomas and their metastases reflects disease outcome. *World J Gastroenterol* 2006;12:4304-4309.
- 40 Feezor RJ, Copeland EM3, Hochwald SN: Significance of micrometastases in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2002;9:944-953.
- 41 Fernebro E, Bendahl PO, Dictor M, Persson A, Ferno M, Nilbert M: Immunohistochemical patterns in rectal cancer: application of tissue microarray with prognostic correlations. *Int J Cancer* 2004;111:921-928.
- 42 Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
- 43 Gabbert H, Wagner R, Moll R, Gerharz CD: Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion. *Clin Exp Metastasis* 1985;3:257-279.
- 44 Gagliardi G, Kandemir O, Liu D, Guida M, Benvestito S, Ruers TG, Benjamin IS, Northover JM, Stamp GW, Talbot IC, .: Changes in E-cadherin immunoreactivity in the adenoma-carcinoma sequence of the large bowel. *Virchows Arch* 1995;426:149-154.
- 45 Ghadimi BM, Behrens J, Hoffmann I, Haensch W, Birchmeier W, Schlag PM: Immunohistological analysis of E-cadherin, alpha-, beta- and gamma-catenin expression in colorectal cancer: implications for cell adhesion and signaling. *Eur J Cancer* 1999;35:60-65.
- 46 Gradl D, Kuhl M, Wedlich D: The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Mol Cell Biol* 1999;19:5576-5587.
- 47 Gumbiner BM: Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996;84:345-357.
- 48 Gupta A, Deshpande CG, Badve S: Role of E-cadherins in development of lymphatic tumor emboli. *Cancer* 2003;97:2341-2347.
- 49 Hahn-Stromberg V, Edvardsson H, Bodin L, Franzen L: Disturbed expression of E-cadherin, beta-catenin and tight junction proteins in colon carcinoma is unrelated to growth pattern and genetic polymorphisms. *APMIS* 2008;116:253-262.
- 50 Halvorsen TB, Seim E: Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 1989;42:162-166.
- 51 Hamakawa H, Nakashiro K, Sumida T, Shintani S, Myers JN, Takes RP, Rinaldo A, Ferlito A: Basic evidence of molecular targeted therapy for oral cancer and salivary gland cancer. *Head Neck* 2008;30:800-809.
- 52 Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- 53 Hao X, Tomlinson I, Ilyas M, Palazzo JP, Talbot IC: Reciprocity between membranous and nuclear expression of beta-catenin in colorectal tumours. *Virchows Arch* 1997;431:167-172.

- 54 Harrison JC, Dean PJ, el-Zeky F, Vander Zwaag R: From Dukes through Jass: pathological prognostic indicators in rectal cancer. *Hum Pathol* 1994;25:498-505.
- 55 Hay ED: An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 1995;154:8-20.
- 56 Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K: Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1014:155-63.
- 57 Heasman J, Crawford A, Goldstone K, Garner-Hamrick P, Gumbiner B, McCrea P, Kintner C, Noro CY, Wylie C: Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* 1994;79:791-803.
- 58 Henriët P, Blavier L, Declerck YA: Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS* 1999;107:111-119.
- 59 Herszenyi L, Farinati F, Miheller P, Tulassay Z: Chemoprevention of colorectal cancer: feasibility in everyday practice? *Eur J Cancer Prev* 2008;17:502-514.
- 60 Hewitt RE, Powe DG, Carter GI, Turner DR: Desmoplasia and its relevance to colorectal tumour invasion. *Int J Cancer* 1993;53:62-69.
- 61 Hirohashi S: Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998;153:333-339.
- 62 Hoos A, Cordon-Cardo C: Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest* 2001;81:1331-1338.
- 63 Hoos A, Nissan A, Stojadinovic A, Shia J, Hedvat CV, Leung DH, Paty PB, Klimstra D, Cordon-Cardo C, Wong WD: Tissue microarray molecular profiling of early, node-negative adenocarcinoma of the rectum: a comprehensive analysis. *Clin Cancer Res* 2002;8:3841-3849.
- 64 Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH, Kuo D, Brennan MF, Lewis JJ, Cordon-Cardo C: Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol* 2001;158:1245-1251.
- 65 Horkko TT, Klintrup K, Makinen JM, Napankangas JB, Tuominen HJ, Makela J, Karttunen TJ, Makinen MJ: Budding invasive margin and prognosis in colorectal cancer--no direct association with beta-catenin expression. *Eur J Cancer* 2006;42:964-971.
- 66 Horst D, Reu S, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A: The intratumoral distribution of nuclear beta-catenin is a prognostic marker in colon cancer. *Cancer* 2009;115:2063-2070.
- 67 Hu FB, Manson JE, Liu S, Hunter D, Colditz GA, Michels KB, Speizer FE, Giovannucci E: Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:542-547.

- 68 Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R: Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 1996;59:3-10.
- 69 Hugh TJ, Dillon SA, O'Dowd G, Getty B, Pignatelli M, Poston GJ, Kinsella AR: beta-catenin expression in primary and metastatic colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1999;82:504-511.
- 70 Hulpiau P, van RF: Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:349-369.
- 71 Hurlstone DP, Karajeh M, Sanders DS, Drew SK, Cross SS: Rectal aberrant crypt foci identified using high-magnification-chromoscopic colonoscopy: biomarkers for flat and depressed neoplasia. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1283-1289.
- 72 Ilyas M: Adhesion molecule expression in breast cancer: the phoenix in tumour metastasis? *J Pathol* 2000;190:3-5.
- 73 Ilyas M, Tomlinson IP: The interactions of APC, E-cadherin and beta-catenin in tumour development and progression. *J Pathol* 1997;182:128-137.
- 74 Imperiale TF: Aspirin and the prevention of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:879-880.
- 75 Jass JR: Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol* 1986;39:585-589.
- 76 Jass JR: Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 2002;82:891-904.
- 77 Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, Bussey HJ, Morson BC, Northover JM, Todd IP: The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology* 1986;10:437-459.
- 78 Jass JR, Morson BC: Reporting colorectal cancer. *J Clin Pathol* 1987;40:1016-1023.
- 79 Jawhari A, Jordan S, Poole S, Browne P, Pignatelli M, Farthing MJ: Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. *Gastroenterology* 1997;112:46-54.
- 80 Jess T, Gomborg M, Matzen P, Munkholm P, Sorensen TI: Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2724-2729.
- 81 Joo YE, Park CS, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Kim SJ: Prognostic significance of E-cadherin/catenin complex expression in gastric cancer. *J Korean Med Sci* 2000;15:655-666.
- 82 Kalluri R, Zeisberg M: Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:392-401.

- 83 Kanamaru T, Tanaka K, Kotani J, Ueno K, Yamamoto M, Idei Y, Hisatomi H, Takeyama Y: Telomerase activity and hTERT mRNA in development and progression of adenoma to colorectal cancer. *Int J Mol Med* 2002;10:205-210.
- 84 Kanazawa N, Oda T, Gunji N, Nozue M, Kawamoto T, Todoroki T, Fukao K: E-cadherin expression in the primary tumors and metastatic lymph nodes of poorly differentiated types of rectal cancer. *Surg Today* 2002;32:123-128.
- 85 Kang H, Min BS, Lee KY, Kim NK, Kim SN, Choi J, Kim H: Loss of E-cadherin and MUC2 Expressions Correlated with Poor Survival in Patients with Stages II and III Colorectal Carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2010.
- 86 Karamitopoulou E, Lugli A, Panayiotides I, Karakitsos P, Peros G, Rallis G, Patsouris ES, Terracciano L, Zlobec I: Systematic assessment of protein phenotypes characterizing high-grade tumour budding in mismatch repair-proficient colorectal cancer. *Histopathology* 2010;57:233-243.
- 87 Kinzler KW, Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-170.
- 88 Kirchner T, Brabletz T: Patterning and nuclear beta-catenin expression in the colonic adenoma-carcinoma sequence. Analogies with embryonic gastrulation. *Am J Pathol* 2000;157:1113-1121.
- 89 Kirkland SC: Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer* 2009;101:320-326.
- 90 Koenig A, Mueller C, Hasel C, Adler G, Menke A: Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2006;66:4662-4671.
- 91 Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG: E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res* 2003;5:R217-R222.
- 92 Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J: *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. ed 8th, Philadelphia, Saunders, 2009.
- 93 Kuphal S, Poser I, Jobin C, Hellerbrand C, Bosserhoff AK: Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma. *Oncogene* 2004;23:8509-8519.
- 94 Kwak JM, Min BW, Lee JH, Choi JS, Lee SI, Park SS, Kim J, Um JW, Kim SH, Moon HY: The prognostic significance of E-cadherin and liver intestine-cadherin expression in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2007;50:1873-1880.
- 95 Lanas A: Nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase inhibition in the gastrointestinal tract: a trip from peptic ulcer to colon cancer. *Am J Med Sci* 2009;338:96-106.
- 96 Laohavinij S, Maneechavakajorn J, Techatanol P: Prognostic factors for survival in colorectal cancer patients. *J Med Assoc Thai* 2010;93:1156-1166.

- 97 Le NH, Franken P, Fodde R: Tumour-stroma interactions in colorectal cancer: converging on beta-catenin activation and cancer stemness. *Br J Cancer* 2008;98:1886-1893.
- 98 Li A, Zhou T, Guo L, Si J: Collagen type I regulates beta-catenin tyrosine phosphorylation and nuclear translocation to promote migration and proliferation of gastric carcinoma cells. *Oncol Rep* 2010;23:1247-1255.
- 99 Li H, Fan X, Houghton J: Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem* 2007;101:805-815.
- 100 Li H, Pamukcu R, Thompson WJ: beta-Catenin signaling: therapeutic strategies in oncology. *Cancer Biol Ther* 2002;1:621-625.
- 101 Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, Berger DH, Albo D: Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:5131-5137.
- 102 Lieubeau B, Heymann MF, Henry F, Barbieux I, Meflah K, Gregoire M: Immunomodulatory effects of tumor-associated fibroblasts in colorectal-tumor development. *Int J Cancer* 1999;81:629-636.
- 103 Lin J, Zhang SM, Cook NR, Rexrode KM, Lee IM, Buring JE: Body mass index and risk of colorectal cancer in women (United States). *Cancer Causes Control* 2004;15:581-589.
- 104 Liu J, Ikeguchi M, Nakamura S, Kaibara N: Re-expression of the cadherin-catenin complex in lymph nodes with metastasis in advanced gastric cancer: the relationship with patient survival. *J Exp Clin Cancer Res* 2002;21:65-71.
- 105 Lopez-Knowles E, Zardawi SJ, McNeil CM, Millar EK, Crea P, Musgrove EA, Sutherland RL, O'Toole SA: Cytoplasmic localization of beta-catenin is a marker of poor outcome in breast cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:301-309.
- 106 Lugli A, Zlobec I, Minoo P, Baker K, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR: Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, beta-catenin and E-cadherin in colorectal cancer: a tissue microarray-based analysis. *Histopathology* 2007;50:453-464.
- 107 Macfarlane GJ, Boyle P, Scully C: Oral cancer in Scotland: changing incidence and mortality. *BMJ* 1992;305:1121-1123.
- 108 Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C: Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1603-1608.
- 109 Martinez MC, Ochiishi T, Majewski M, Kosik KS: Dual regulation of neuronal morphogenesis by a delta-catenin-cortactin complex and Rho. *J Cell Biol* 2003;162:99-111.

- 110 Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, Nakamura S, Baba S, Moriya Y, Hirohashi S: Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. *Oncology* 2000;59:302-309.
- 111 Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Izumisato Y, Sakamoto A, Atomi Y: Laminin-5 gamma2 chain expression as a possible determinant of tumor aggressiveness in T1 colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci* 2003;48:272-278.
- 112 Masaki T, Sugiyama M, Matsuoka H, Abe N, Izumisato Y, Goto A, Sakamoto A, Atomi Y: Clinical utility of grading criteria for submucosal invasion in the prognosis of T1 colorectal carcinomas. *J Gastroenterol* 2003;38:37-44.
- 113 Masaki T, Sugiyama M, Matsuoka H, Abe N, Izumisato Y, Sakamoto A, Atomi Y: Coexpression of matrilysin and laminin-5 gamma2 chain may contribute to tumor cell migration in colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci* 2003;48:1262-1267.
- 114 Matsuyama M, Yoshimura R: A novel approach to anticancer therapies: peroxisome proliferator activator-receptor-gamma as a new target therapy in the treatment of human urological cancer. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009;9:76-83.
- 115 McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B: A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* 1991;254:1359-1361.
- 116 Mesker WE, Liefers GJ, Junggeburst JM, van Pelt GW, Alberici P, Kuppen PJ, Miranda NF, van Leeuwen KA, Morreau H, Szuhai K, Tollenaar RA, Tanke HJ: Presence of a high amount of stroma and downregulation of SMAD4 predict for worse survival for stage I-II colon cancer patients. *Cell Oncol* 2009;31:169-178.
- 117 Miller JR, Moon RT: Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev* 1996;10:2527-2539.
- 118 Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H: XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 1996;86:391-399.
- 119 Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW: Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275:1787-1790.
- 120 Morita N, Uemura H, Tsumatani K, Cho M, Hirao Y, Okajima E, Konishi N, Hiasa Y: E-cadherin and alpha-, beta- and gamma-catenin expression in prostate cancers: correlation with tumour invasion. *Br J Cancer* 1999;79:1879-1883.
- 121 Nakamura T, Mitomi H, Kanazawa H, Ohkura Y, Watanabe M: Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2008;51:568-572.
- 122 Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S, Ohtani Y, Sato K: Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver

- after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005;52:1432-1435.
- 123 Nakanishi H, Oguri K, Takenaga K, Hosoda S, Okayama M: Differential fibrotic stromal responses of host tissue to low- and high-metastatic cloned Lewis lung carcinoma cells. *Lab Invest* 1994;70:324-332.
- 124 Nakanishi Y, Ochiai A, Akimoto S, Kato H, Watanabe H, Tachimori Y, Yamamoto S, Hirohashi S: Expression of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin and plakoglobin in esophageal carcinomas and its prognostic significance: immunohistochemical analysis of 96 lesions. *Oncology* 1997;54:158-165.
- 125 Narayan S, Roy D: Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer* 2003;2:41.
- 126 Natt E, Magenis RE, Zimmer J, Mansouri A, Scherer G: Regional assignment of the human loci for uvomorulin (UVO) and chymotrypsinogen B (CTRB) with the help of two overlapping deletions on the long arm of chromosome 16. *Cytogenet Cell Genet* 1989;50:145-148.
- 127 Newland RC, Dent OF, Chapuis PH, Bokey L: Survival after curative resection of lymph node negative colorectal carcinoma. A prospective study of 910 patients. *Cancer* 1995;76:564-571.
- 128 Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, Ezumi K, Terayama M, Hemmi H, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Monden M: A multivariate analysis of adhesion molecules expression in assessment of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2007;95:652-662.
- 129 Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, Tsujino T, Man-i M, Ikeda JI, Konishi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M: Quantitative evaluation of vimentin expression in tumour stroma of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2007;96:986-992.
- 130 Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ: N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 1999;147:631-644.
- 131 Nieto MA: The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:155-166.
- 132 Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G: Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer* 2001;94:1-5.
- 133 O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, Amoroso M, Farrar FA: Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1491-1501.
- 134 Ogawa T, Yoshida T, Tsuruta T, Tokuyama W, Adachi S, Kikuchi M, Mikami T, Saigenji K, Okayasu I: Tumor budding is predictive of lymphatic involvement

- and lymph node metastases in submucosal invasive colorectal adenocarcinomas and in non-polypoid compared with polypoid growths. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:605-614.
- 135 Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, Takatsuka Y, Matsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M, .: Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 1993;53:1696-1701.
- 136 Okegawa T, Li Y, Pong RC, Hsieh JT: Cell adhesion proteins as tumor suppressors. *J Urol* 2002;167:1836-1843.
- 137 Oloumi A, McPhee T, Dedhar S: Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochim Biophys Acta* 2004;1691:1-15.
- 138 Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR: Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999;59:5002-5011.
- 139 Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA: Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005;121:335-348.
- 140 Ozawa M, Ringwald M, Kemler R: Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4246-4250.
- 141 Palmqvist R, Rutegard JN, Bozoky B, Landberg G, Stenling R: Human colorectal cancers with an intact p16/cyclin D1/pRb pathway have up-regulated p16 expression and decreased proliferation in small invasive tumor clusters. *Am J Pathol* 2000;157:1947-1953.
- 142 Pancione M, Forte N, Fucci A, Sabatino L, Febbraro A, Di BA, Daniele B, Parente D, Colantuoni V: Prognostic role of beta-catenin and p53 expression in the metastatic progression of sporadic colorectal cancer. *Hum Pathol* 2010;41:867-876.
- 143 Pancione M, Forte N, Sabatino L, Tomaselli E, Parente D, Febbraro A, Colantuoni V: Reduced beta-catenin and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression levels are associated with colorectal cancer metastatic progression: correlation with tumor-associated macrophages, cyclooxygenase 2, and patient outcome. *Hum Pathol* 2009;40:714-725.
- 144 Paraf F, Jothy S, Van Meir EG: Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases? *J Clin Oncol* 1997;15:2744-2758.
- 145 Peng JY, Wang Y: Tumor stroma: a determinant role in local recurrence of rectal cancer patients receiving total mesorectal excision? *Med Hypotheses* 2010;75:442-444.

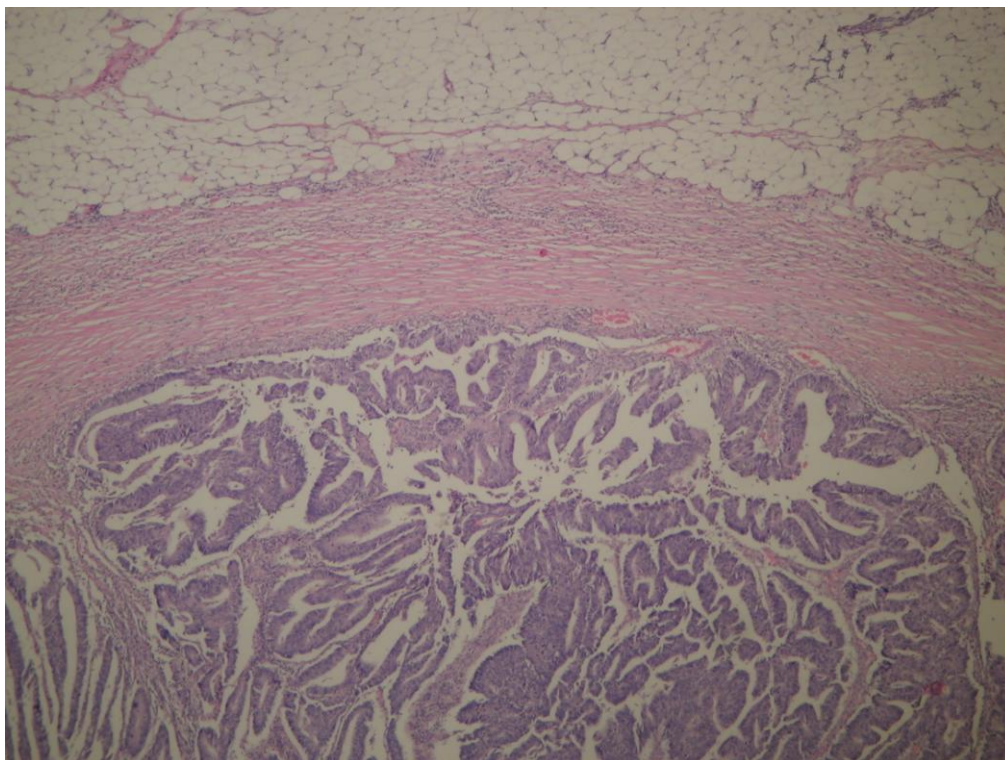
- 146 Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G: A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998;392:190-193.
- 147 Pinto D, Clevers H: Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biol Cell* 2005;97:185-196.
- 148 Prall F: Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2007;50:151-162.
- 149 Pyke C, Salo S, Ralfkiaer E, Romer J, Dano K, Tryggvason K: Laminin-5 is a marker of invading cancer cells in some human carcinomas and is coexpressed with the receptor for urokinase plasminogen activator in budding cancer cells in colon adenocarcinomas. *Cancer Res* 1995;55:4132-4139.
- 150 Ramos FJ, Macarulla T, Capdevila J, Elez E, Tabernero J: Understanding the predictive role of K-ras for epidermal growth factor receptor-targeted therapies in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2008;7 Suppl 2:S52-7.
- 151 Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z: Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 1994;14:8333-8342.
- 152 Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Olsen DA, Provost E: Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. *Exp Mol Pathol* 2001;70:255-264.
- 153 Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674.
- 154 Roncucci L, Pedroni M, Fante R, Di GC, Ponz de LM: Cell kinetic evaluation of human colonic aberrant crypts. (Colorectal Cancer Study Group of the University of Modena and the Health Care District 16, Modena, Italy). *Cancer Res* 1993;53:3726-3729.
- 155 Roncucci L, Stamp D, Medline A, Cullen JB, Bruce WR: Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol* 1991;22:287-294.
- 156 Rosen M, Chan L, Beart RW, Jr., Vukasin P, Anthone G: Follow-up of colorectal cancer: a meta-analysis. *Dis Colon Rectum* 1998;41:1116-1126.
- 157 Rosivatz E, Becker I, Bamba M, Schott C, Diebold J, Mayr D, Hofler H, Becker KF: Neoeexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers. *Int J Cancer* 2004;111:711-719.
- 158 Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de HA, Dunach M: Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1999;274:36734-36740.
- 159 Rubio CA: Arrest of cell proliferation in budding tumor cells ahead of the invading edge of colonic carcinomas. A preliminary report. *Anticancer Res* 2008;28:2417-2420.

- 160 Sato T, Tanigami A, Yamakawa K, Akiyama F, Kasumi F, Sakamoto G, Nakamura Y: Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Res* 1990;50:7184-7189.
- 161 Savagner P, Boyer B, Valles AM, Jouanneau J, Thiery JP: Modulations of the epithelial phenotype during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Treat Res* 1994;71:229-49.
- 162 Scheel C, Onder T, Karnoub A, Weinberg RA: Adaptation versus selection: the origins of metastatic behavior. *Cancer Res* 2007;67:11476-11479.
- 163 Sek P, Zawrocki A, Biernat W, Piekarski JH: HER2 molecular subtype is a dominant subtype of mammary Paget's cells. An immunohistochemical study. *Histopathology* 2010;57:564-571.
- 164 Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M, .: Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol* 1995;128:949-957.
- 165 Shike M: Body weight and colon cancer. *Am J Clin Nutr* 1996;63:442S-444S.
- 166 Shpitz B, Bomstein Y, Mekori Y, Cohen R, Kaufman Z, Neufeld D, Galkin M, Bernheim J: Aberrant crypt foci in human colons: distribution and histomorphologic characteristics. *Hum Pathol* 1998;29:469-475.
- 167 Siu IM, Pretlow TG, Amini SB, Pretlow TP: Identification of dysplasia in human colonic aberrant crypt foci. *Am J Pathol* 1997;150:1805-1813.
- 168 Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI: "Stromatogenesis" and tumor progression. *Int J Surg Pathol* 2004;12:1-9.
- 169 Slattery ML, Ballard-Barbash R, Edwards S, Caan BJ, Potter JD: Body mass index and colon cancer: an evaluation of the modifying effects of estrogen (United States). *Cancer Causes Control* 2003;14:75-84.
- 170 Soderlund S, Tribukait B, Ost A, Brostrom O, Karlen P, Lofberg R, Askling J, Sjoqvist U: Colitis-associated DNA aneuploidy and dysplasia in Crohn's disease and risk of colorectal cancer. *Inflamm Bowel Dis* 2010.[Epub ahead of print].
- 171 Solomon E, Voss R, Hall V, Bodmer WF, Jass JR, Jeffrey AJ, Lucibello FC, Patel I, Rider SH: Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* 1987;328:616-619.
- 172 Sordat I, Rousselle P, Chaubert P, Petermann O, Aberdam D, Bosman FT, Sordat B: Tumor cell budding and laminin-5 expression in colorectal carcinoma can be modulated by the tissue micro-environment. *Int J Cancer* 2000;88:708-717.
- 173 Spencer VA, Xu R, Bissell MJ: Extracellular matrix, nuclear and chromatin structure, and gene expression in normal tissues and malignant tumors: a work in progress. *Adv Cancer Res* 2007;97:275-94.

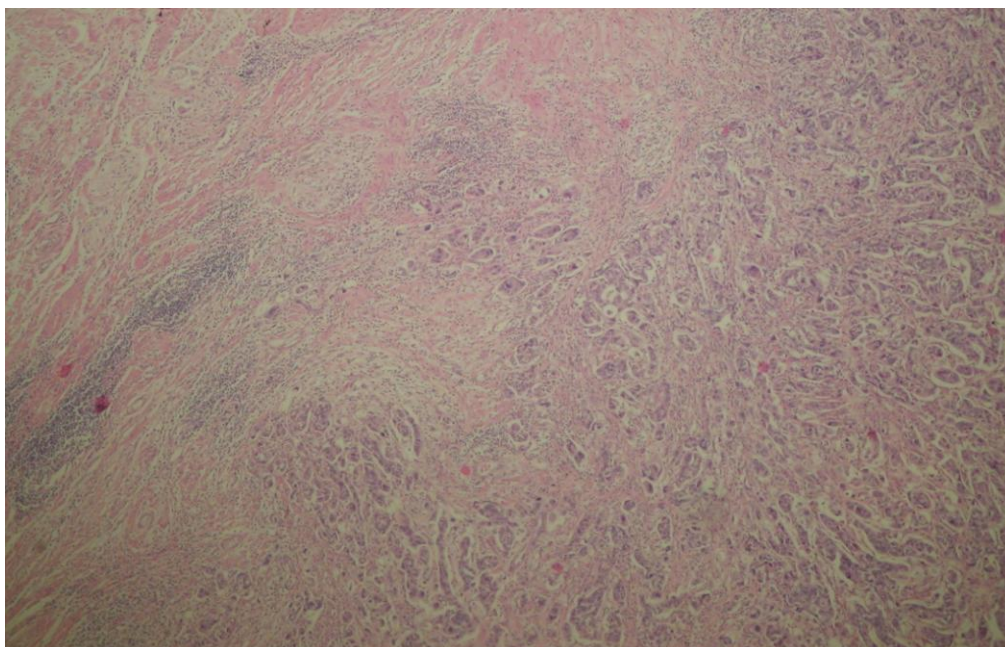
- 174 Stenling R, Jonsson BO, Palmqvist R, Rutegard JN: DNA aneuploidy in ulcerative colitis and in colorectal carcinoma--a comparative study. *Anal Cell Pathol* 1999;18:69-72.
- 175 Stratthdee G: Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol* 2002;12:373-379.
- 176 Suzuki H, Masuda N, Shimura T, Araki K, Kobayashi T, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H: Nuclear beta-catenin expression at the invasive front and in the vessels predicts liver metastasis in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2008;28:1821-1830.
- 177 Takahashi H, Hosono K, Uchiyama T, Sugiyama M, Sakai E, Endo H, Maeda S, Schaefer KL, Nakagama H, Nakajima A: PPARgamma Ligand as a Promising Candidate for Colorectal Cancer Chemoprevention: A Pilot Study. *PPAR Res* 2010;2010. pii: 257835. Epub 2010 Aug 2.
- 178 Takahashi H, Yoneda K, Tomimoto A, Endo H, Fujisawa T, Iida H, Mawatari H, Nozaki Y, Ikeda T, Akiyama T, Yoneda M, Inamori M, Abe Y, Saito S, Nakajima A, Nakagama H: Life style-related diseases of the digestive system: colorectal cancer as a life style-related disease: from carcinogenesis to medical treatment. *J Pharmacol Sci* 2007;105:129-132.
- 179 Takahashi T, Nakajima K, Nishitani A, Souma Y, Hirota S, Sawa Y, Nishida T: An enhanced risk-group stratification system for more practical prognostication of clinically malignant gastrointestinal stromal tumors. *Int J Clin Oncol* 2007;12:369-374.
- 180 Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, Kato J, Kogawa K, Miyake H, Niitsu Y: Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med* 1998;339:1277-1284.
- 181 Takayama T, Shiozaki H, Doki Y, Oka H, Inoue M, Yamamoto M, Tamura S, Shibamoto S, Ito F, Monden M: Aberrant expression and phosphorylation of beta-catenin in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998;77:605-613.
- 182 Takeichi M: Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:806-811.
- 183 Thiery JP, Sleeman JP: Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:131-142.
- 184 Thompson MD, Monga SP: WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* 2007;45:1298-1305.
- 185 Tsai HL, Chu KS, Huang YH, Su YC, Wu JY, Kuo CH, Chen CW, Wang JY: Predictive factors of early relapse in UICC stage I-III colorectal cancer patients after curative resection. *J Surg Oncol* 2009;100:736-743.
- 186 Tsuda H, Zhang WD, Shimosato Y, Yokota J, Terada M, Sugimura T, Miyamura T, Hirohashi S: Allele loss on chromosome 16 associated with

- progression of human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:6791-6794.
- 187 Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M: Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:2082-2090.
- 188 Ueno H, Hashiguchi Y, Kajiwara Y, Shinto E, Shimazaki H, Kurihara H, Mochizuki H, Hase K: Proposed objective criteria for "grade 3" in early invasive colorectal cancer. *Am J Clin Pathol* 2010;134:312-322.
- 189 Ueno H, Jones A, Jass JR, Talbot IC: Clinicopathological significance of the 'keloid-like' collagen and myxoid stroma in advanced rectal cancer. *Histopathology* 2002;40:327-334.
- 190 Ueno H, Jones AM, Wilkinson KH, Jass JR, Talbot IC: Histological categorisation of fibrotic cancer stroma in advanced rectal cancer. *Gut* 2004;53:581-586.
- 191 Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC: Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 2002;40:127-132.
- 192 Unger M, Weaver VM: The tissue microenvironment as an epigenetic tumor modifier. *Methods Mol Biol* 2003;223:315-47.
- 193 Van Aken J, Cuvelier CA, De Wever N, Roels J, Gao Y, Mareel MM: Immunohistochemical analysis of E-cadherin expression in human colorectal tumours. *Pathol Res Pract* 1993;189:975-978.
- 194 van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H: The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002;111:241-250.
- 195 van Es JH, Barker N, Clevers H: You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:28-33.
- 196 Vano YA, Rodrigues MJ, Schneider SM: [Epidemiological link between eating habits and cancer: the example of colorectal cancer]. *Bull Cancer* 2009;96:647-658.
- 197 Wang D, DuBois RN: The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* 2010;29:781-788.
- 198 Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O'Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, O'Donoghue D, Sheahan K: Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2009;33:134-141.
- 199 Weidner N: Tumour vascularity and proliferation: clear evidence of a close relationship. *J Pathol* 1999;189:297-299.

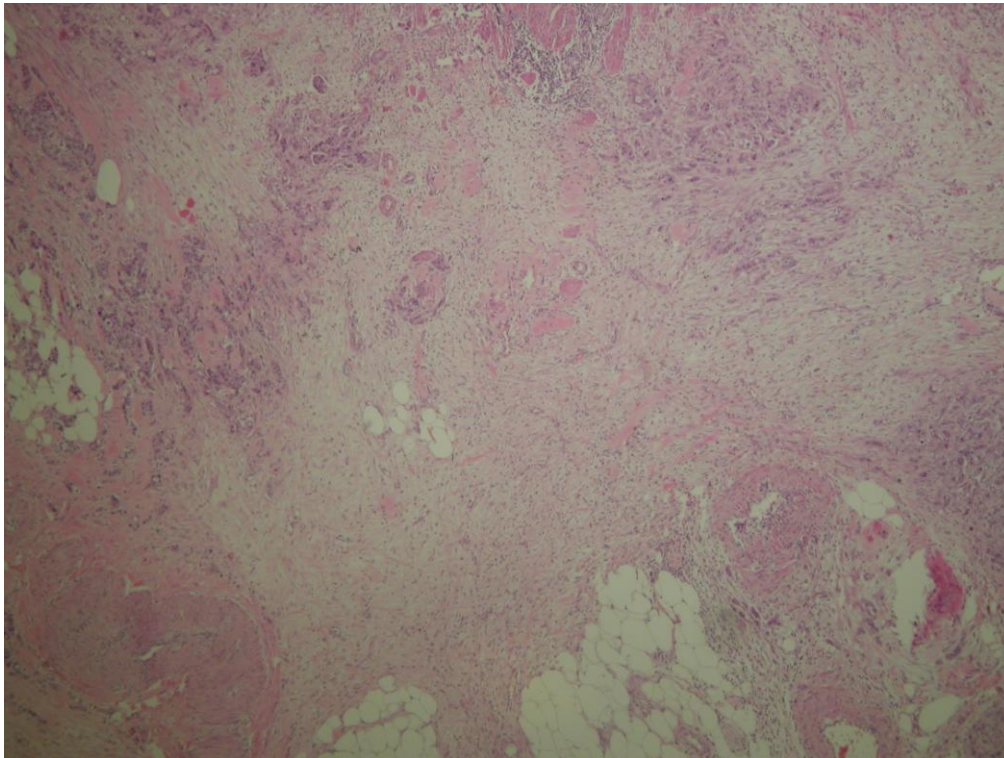
- 200 Weis WI, Nelson WJ: Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J Biol Chem* 2006;281:35593-35597.
- 201 Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H, Pals ST: Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 1999;154:515-523.
- 202 Winczyk K: [The role of peroxisome proliferators-activated receptors (PPARgamma) in neoplasms of endocrine glands]. *Endokrynol Pol* 2008;59:156-166.
- 203 Wojciechowska U, Didkowska J, Zatonski W: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2006 roku. Warszawa, Wyd.Centrum Onkologii-Instytut, 2008.
- 204 Wynter CV, Walsh MD, Higuchi T, Leggett BA, Young J, Jass JR: Methylation patterns define two types of hyperplastic polyp associated with colorectal cancer. *Gut* 2004;53:573-580.
- 205 Yokota T, Sugano K, Kondo H, Saito D, Sugihara K, Fukayama N, Ohkura H, Ochiai A, Yoshida S: Detection of aberrant crypt foci by magnifying colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 1997;46:61-65.
- 206 Zlobec I, Lugli A: Invasive front of colorectal cancer: dynamic interface of pro-/anti-tumor factors. *World J Gastroenterol* 2009;15:5898-5906.



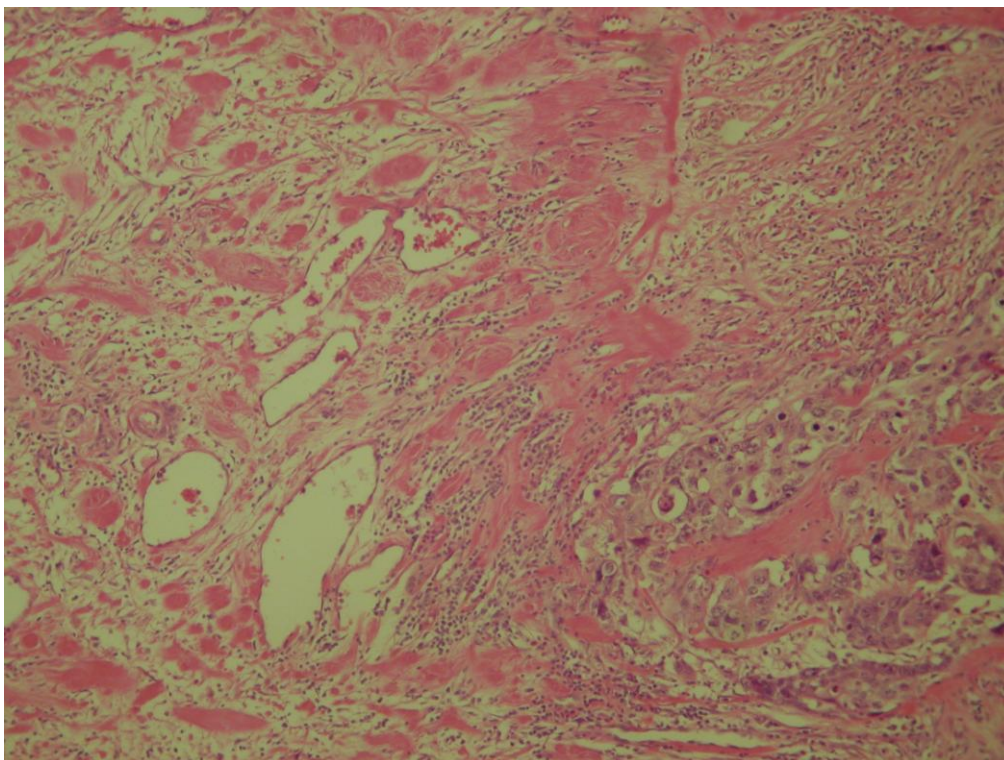
Rycina 19- Rozprężliwy typ wzrostu guza pierwotnego z dojrzałym typem podścieliska (H&E, x100).



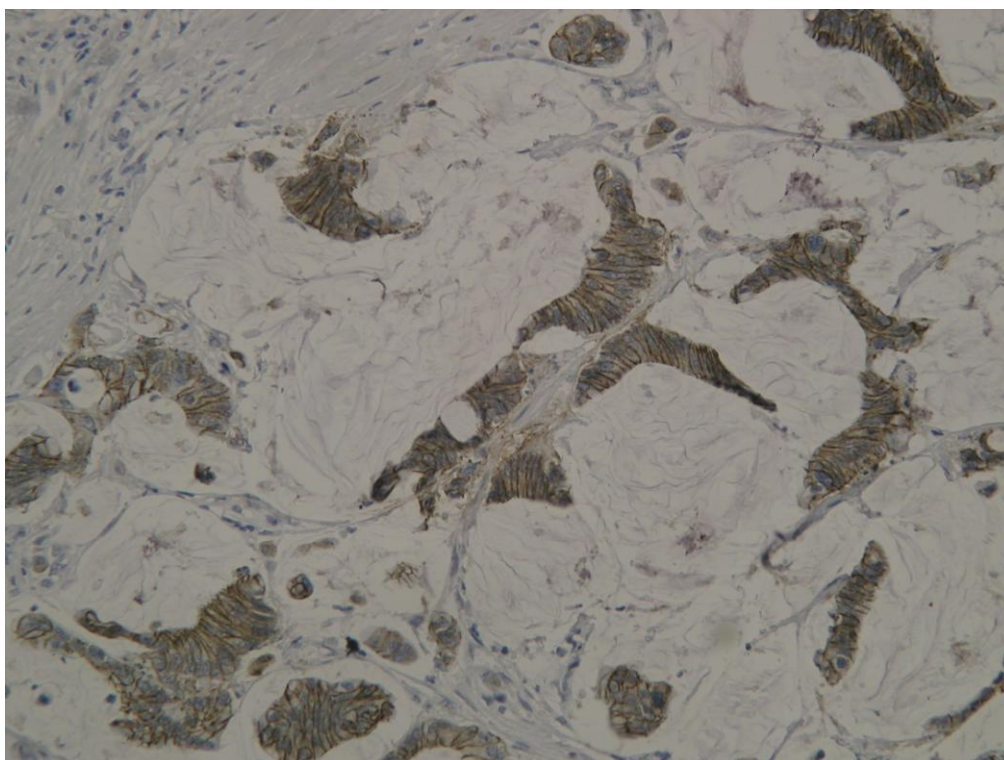
Rycina 20- Inwazyjny typ wzrostu guza pierwotnego (H&E, x100)



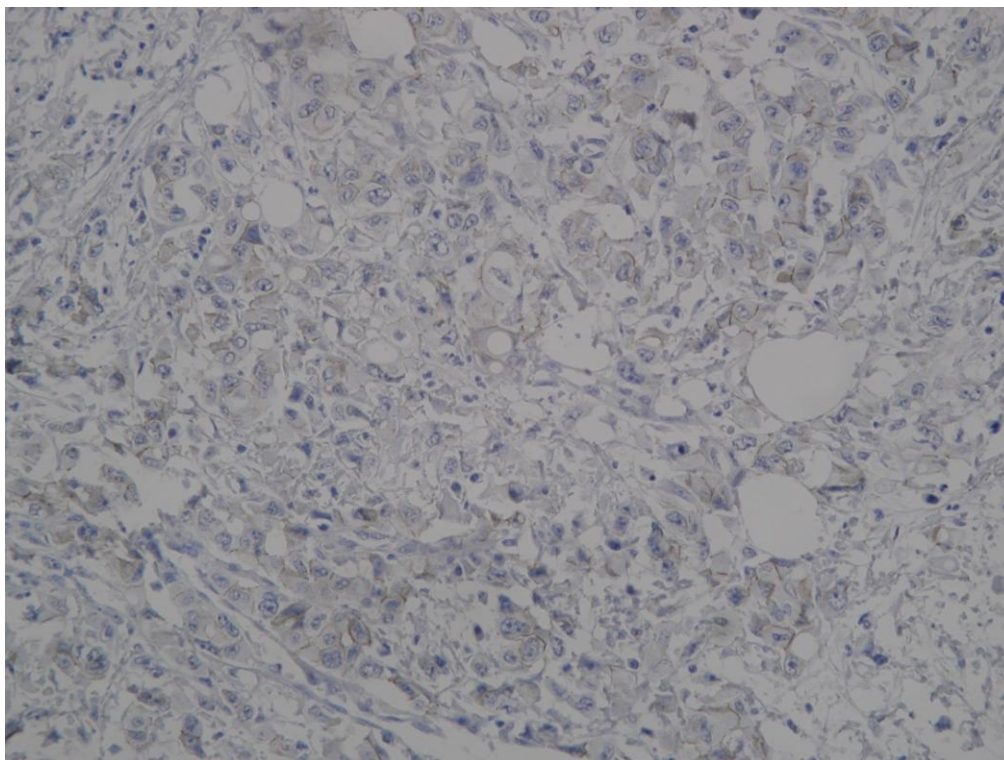
Rycina 21- Niedojrzały typ podścieliska w „czole inwazji” guza pierwotnego (H&E, x100).



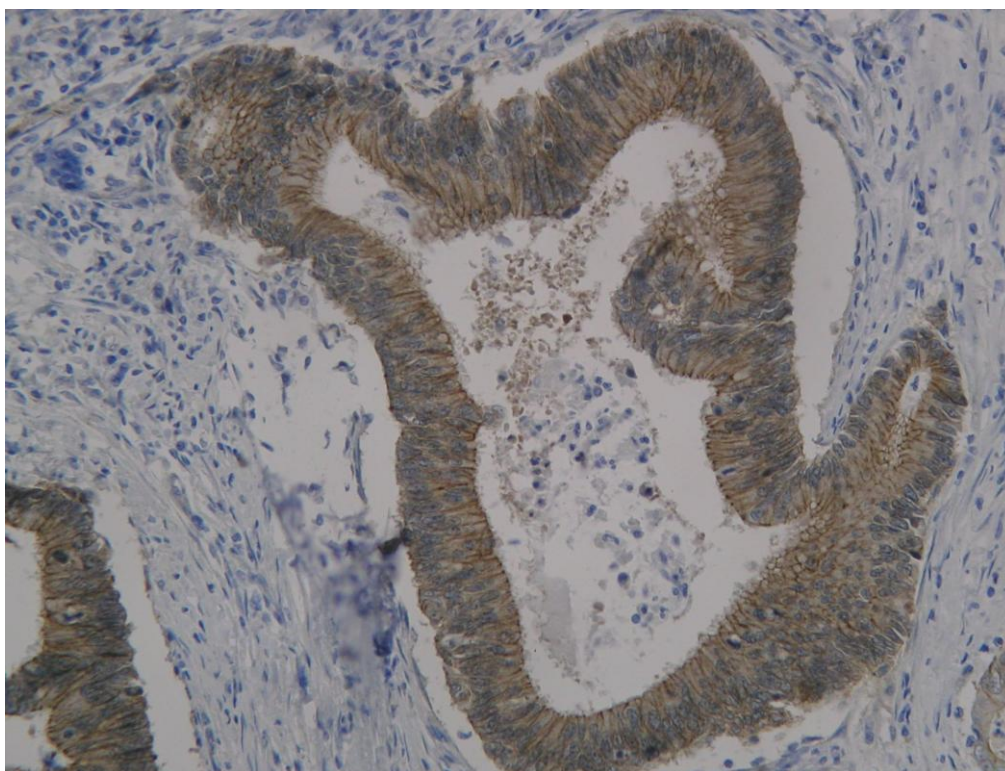
Rycina 22- Pośredni typ podścieliska (*keloid-like*) (H&E, x200).



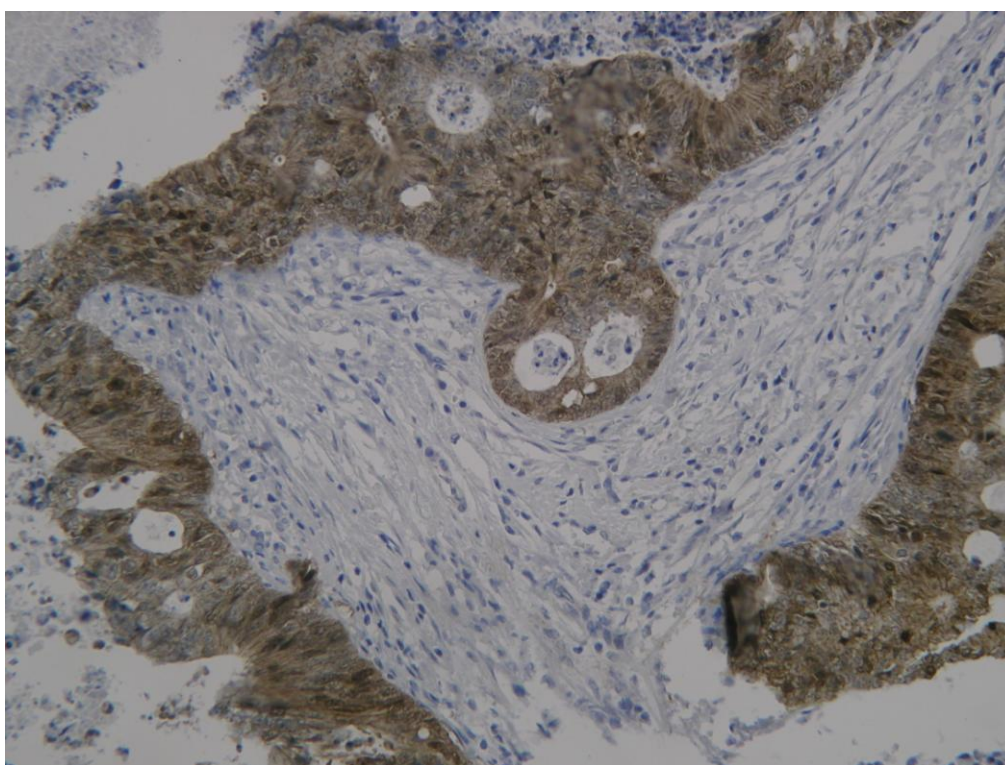
Rycina 23- Ekspresja E-kadheryny w ognisku pierwotnym w raku śluzotwórczym (E-kadherin, x200).



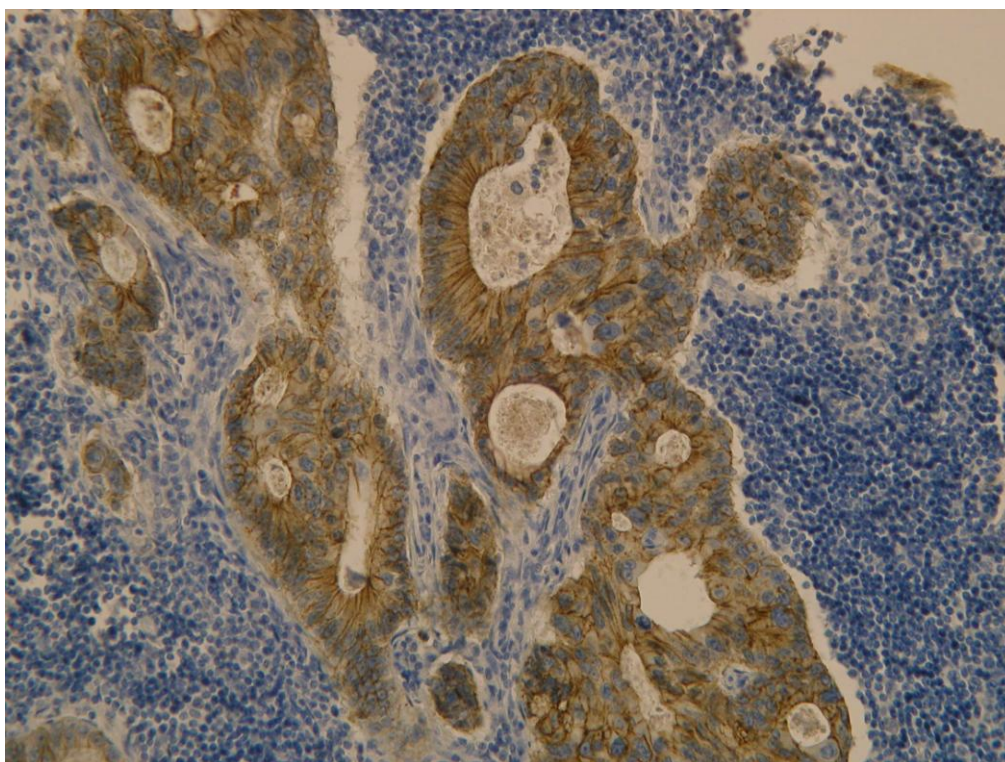
Rycina 24- Brak ekspresji E-kadheryny w ognisku pierwotnym (E-cadherin, x200).



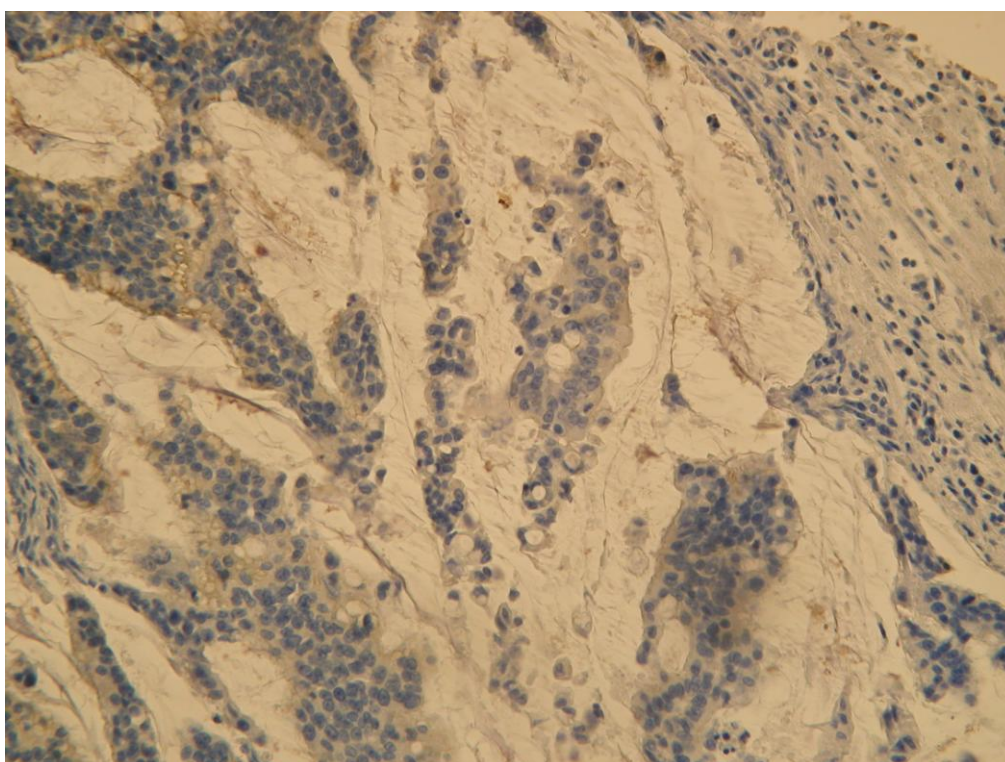
Rycina 25- Błonowy odczyn beta-kateniny w ognisku pierwotnym (beta-catenin, x200).



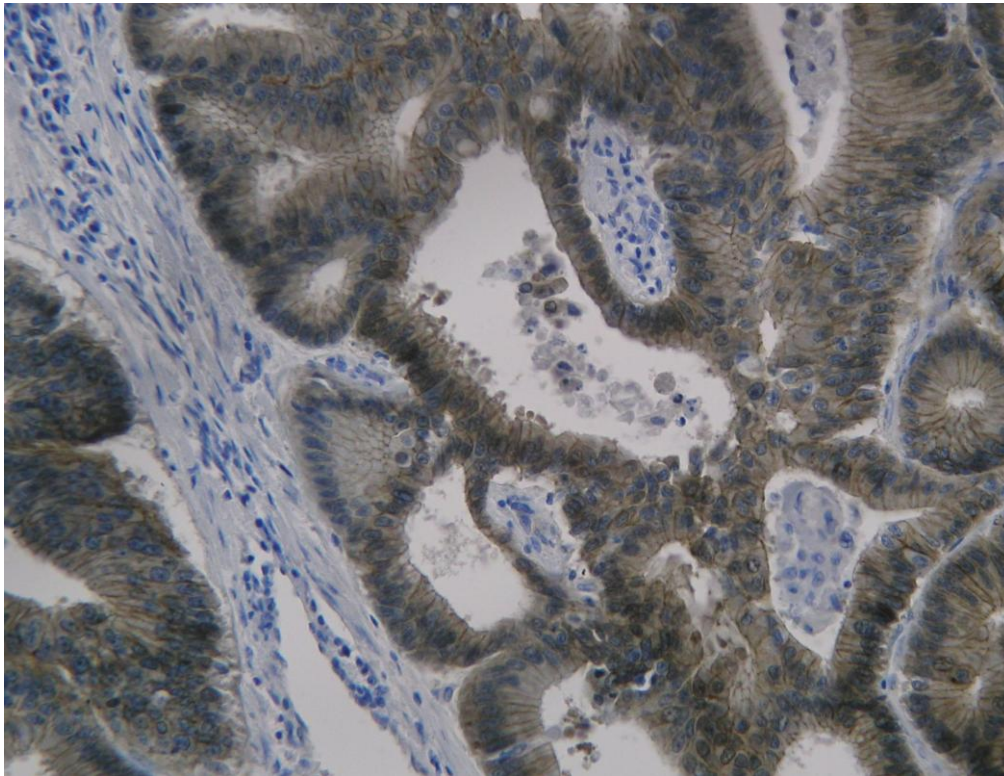
Rycina 26- Odczyn jądrowy beta-kateniny w ognisku pierwotnym (beta-catenin, x200).



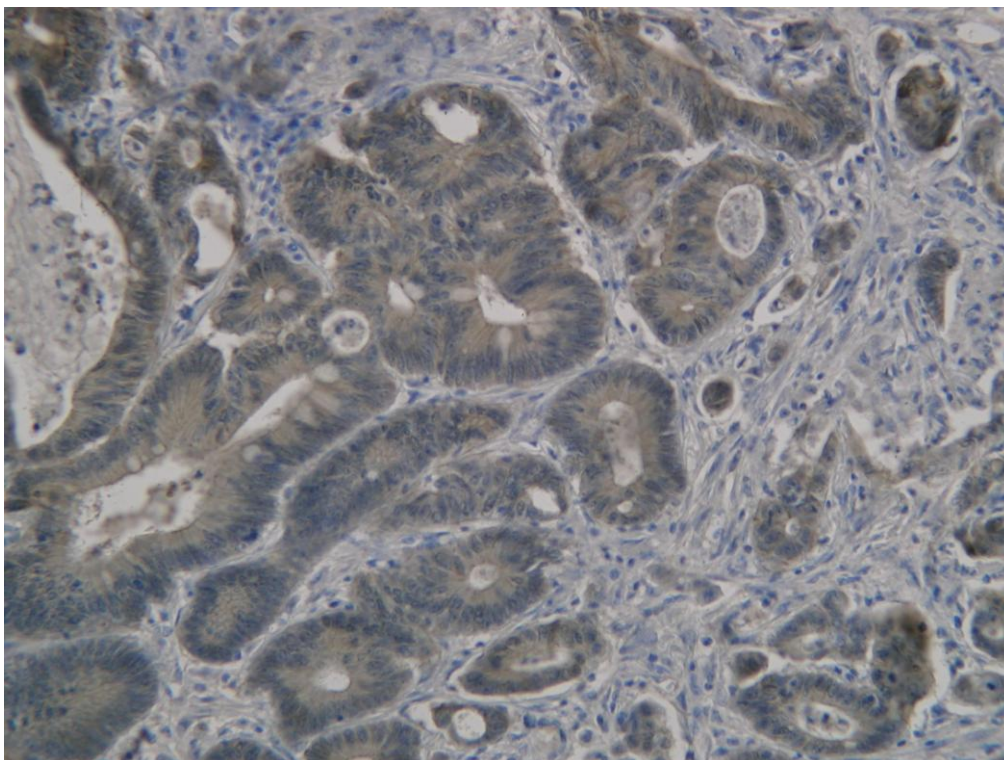
Rycina 27- Ekspresja błonowa E-kadheryny w przekrozie do węzła chłonnego (E-cadherin, x200).



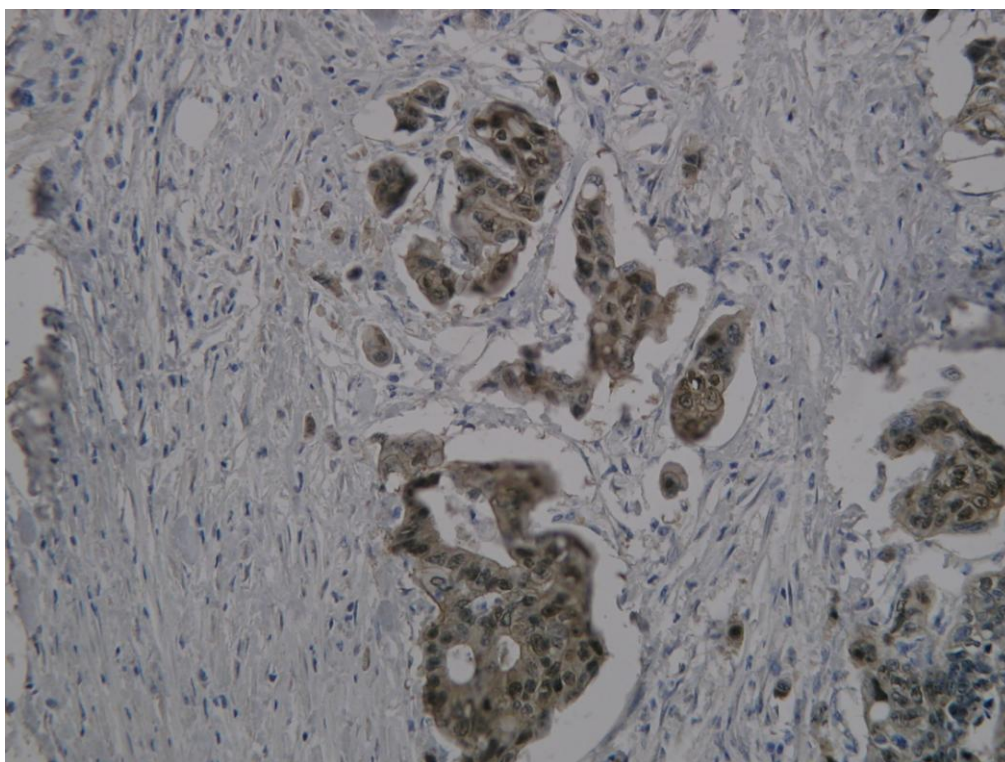
Rycina 28- Brak ekspresji E-kadheryny w przekroju węzła chłonnym (E-cadherin, x200).



Rycina 29- Błonowy odczyn beta-kateniny w przekrozie do węzła chłonnego (beta-catenin, x200).



Rycina 30- Cytoplazmatyczny odczyn beta-cateniny w ognisku wtórnym (beta-catenin, x200).



Rycina 31- Odczyn jądrowy beta-kateniny w ognisku przerzutowym (beta-catenin, x200).