

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XLIII
2013
SUPPLEMENT 16**

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Zoran Stojčev

Markery molekularne w raku żołądka

Molecular markers in gastric cancer

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Klinika Chirurgii Onkologicznej,
Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik: prof. dr hab. Janusz Jaśkiewicz

GDAŃSK 2013

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY
EDITOR-IN-CHIEF
Marek Grzybiak

HONOROWY REDAKTOR NACZELNY
HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
Stefan Raszeja

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
z-ca redaktora naczelnego – Adam Szarszewski
sekretarz redakcji – Włodzimierz Kuta
redaktor techniczny – Tadeusz Skowrya
Tomasz Bączek, Zdzisław Bereznowski, Dariusz Kozłowski, Anna Grygorowicz, An-
drzej Hellmann, Jerzy Kuczkowski, Krzysztof Narkiewicz, Michał Obuchowski,
Zbigniew Kmieć, Julian Świerczyński, Aleksandra Żurowska

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@gumed.edu.pl

Artykuły opublikowane w Annales Academiae Medicae Gedanensis
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published in Annales Academiae Medicae Gedanensis are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303-4135

Gdański Uniwersytet Medyczny

Składam serdecznie podziękowania:

Pani Profesor Barbarze Jarząb, Kierownikowi Zakładu Medycyny Nuklearnej i Onkologii Endokrynologicznej, za merytoryczny nadzór i inspiracje naukowe; Paniom Mgr Katarzynie Kędzior i Mgr Małgorzacie Kowalskiej oraz Panom Dr n. med. Michałowi Jarząbowi i Mgr Tomaszowi Tyszkiewiczowi za wykonanie badań molekularnych, analizy bioinformatyczne i cenną pomoc techniczną.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP.....	9
1.1. Rak żołądka, jako problem onkologiczny	9
1.1.1. Dane epidemiologiczne	9
1.2. Etiologia raka żołądka.....	12
1.3. Symptomatologia raka żołądka.....	13
1.4. Diagnostyka raka żołądka	13
1.5. Klasyfikacja histopatologiczna nowotworów złośliwych żołądka (wg WHO, 1990).....	14
1.6. Klasyfikacja Laurena	14
1.7. Rak wczesny i zaawansowany	15
1.8. Klasyfikacja makroskopowa (endoskopowa) raków: wczesnego i zaawansowanego.....	17
1.9. Klasyfikacja topograficzna raka połączenia przełykowo-żołądkowego	18
1.10. Klasyfikacja kliniczna raka żołądka – TNM, wg Międzynarodowej Unii Przeciwrakowej (UICC, 1997).....	19
1.11. Stopnie zaawansowania raka żołądka	19
1.12. Drogi rozsiewu raka żołądka.....	20
1.12.1. Rozsiew raka żołądka drogą układu chłonnego	20
1.13. Strategia leczenia raka żołądka	22
1.13.1. Taktyka onkologiczna leczenia raka żołądka.....	23
1.13.2. Taktyka chirurgiczna leczenia raka żołądka	25
1.13.3. Metody rekonstrukcji ciągłości przewodu pokarmowego po operacji z powodu raka żołądka	27
1.13.4. Wyniki leczenia raka żołądka	30
1.13.5. Przyczyny niepowodzeń leczenia raka żołądka	30
1.13.6. Elementy kontrowersyjne diagnostyki i leczenia raka żołądka	31
1.14. Perspektywy na przyszłość poprawy skuteczności leczenia raka żołądka	32
1.15. Biologia raka żołądka	32
1.15.1. Zwiększona ekspresja genów w raku żołądka	33
1.15.2. Wyciszanie ekspresji genów w raku żołądka.....	35
1.15.3. Aktywność telomerazy w komórkach raka żołądka.....	37
1.15.4. Zmiany epigenetyczne	37
1.15.5. Rola mikroRNA w rozwoju raka żołądka.....	38
1.15.6. Niestabilność genomowa	39
1.15.7. Predyspozycja genetyczna do raka żołądka.....	40
1.15.8. Molekularne podstawy procesu nowotworowego w jelitowym i rozlanym typie raka żołądka	42
1.15.9. Infekcja <i>Helicobacter pylori</i>	43
1.15.10. Komórki macierzyste w raku żołądka.....	44
1.15.11. Kliniczne i molekularne czynniki rokownicze w raku żołądka	45
2. CEL PRACY	49
3. MATERIAŁ I METODY	50
3.1. Pacjenci i materiał badany	50
3.1.1. Ogólna charakterystyka materiału klinicznego.....	50
3.1.2. Pozyskiwanie i przechowywanie materiału klinicznego do badań	50

3.2. Metody badań molekularnych. Izolacja RNA	51
3.2.1. Izolacja całkowitego RNA z pooperacyjnych fragmentów raka żołądka metodą Chomczyńskiego i Sacchi	51
3.2.2. Oczyszczanie i ocena jakości RNA	52
3.3. Analiza ekspresji genów za pomocą mikromacierzy oligonukleotydowych....	55
3.3.1. Synteza znakowanego i fragmentowanego aRNA (Gene Chip 3' IVT Express Kit)	57
3.3.2. Hybrydyzacja, płukanie i skanowanie mikromacierzy	60
3.4. Analiza ekspresji genów za pomocą techniki ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym	61
3.5. Bioinformatyczna i statystyczna analiza danych	61
4. WYNIKI.....	62
4.1. Ocena jakości uzyskanego RNA pod kątem analizy ekspresji genów	62
4.2. Ocena techniczna jakości wykonanych badań mikromacierzowych.....	64
4.3. Analiza ekspresji genów na podstawie badania metodą mikromacierzy w próbkach raka żołądka w zależności od wybranych parametrów histoklinicznych	68
4.4. Analiza ekspresji genów na podstawie badania metodą mikromacierzy w próbkach raka żołądka w zależności od czasu przeżycia chorych i głównych źródeł zmienności w ekspresji genów	90
4.5. Porównanie ekspresji genów w raku żołądka i sąsiadującej niezmięnionej nowotworowo śluzówce żołądka metodą mikromacierzy.....	101
4.6. Analiza wpływu degradacji RNA na profil ekspresji genów w badaniu techniką mikromacierzy	106
4.7. Analiza wpływu różnic między utkaniem raka i niezmięnionej śluzówki oraz różnic związanych z degradacją RNA na ekspresję badanych genów istotnych dla raka żołądka	113
4.8. Analiza związku z czasem przeżycia dla panelu genów badanego techniką QPCR	115
5. DYSKUSJA	120
5.1. Podsumowanie uzyskanych wyników i ich potencjalnego znaczenia dla dalszych badań	120
5.2. Różnice w ekspresji genów między utkaniem raka i otaczającymi niezmięzionymi nowotworowo komórkami błony śluzowej	121
5.3. Znaczenie degradacji RNA dla badania markerów molekularnych w raku żołądka	135
6. WNIOSKI.....	137
7. PIŚMIENNICTWO	138
8. STRESZCZENIE	159
9. SUMMARY	162

1. WSTĘP

1.1. Rak żołądka, jako problem onkologiczny

1.1.1. Dane epidemiologiczne

Rak żołądka (*carcinoma ventriculi*) należy do nowotworów o dużej złośliwości i nadal jest przyczyną znacznej zachorowalności i umieralności. Zachorowanie na najczęstsze nowotwory złośliwe w Polsce przedstawiono w tabeli 1.

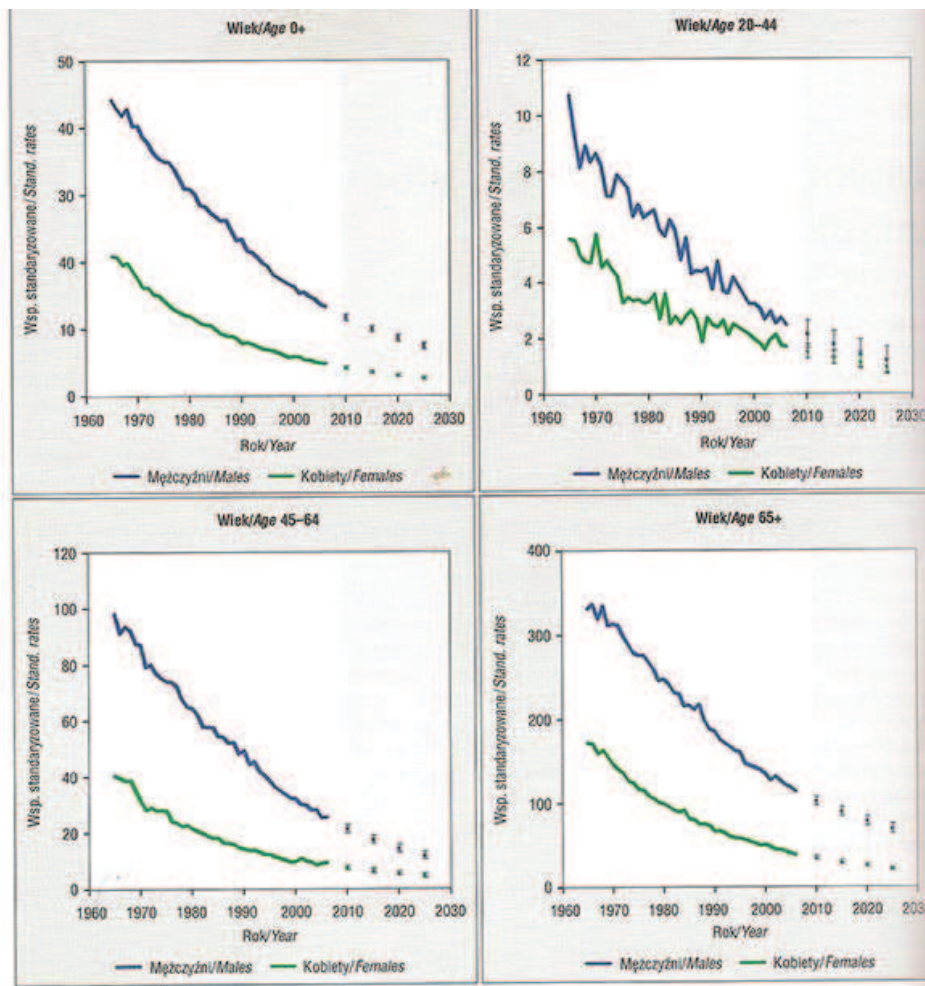
Tabela 1. Zachorowania na najczęstsze nowotwory złośliwe w Polsce (2010).

Table 1. New cases of the most frequent types of malignant neoplasms in Poland (2010).

Mężczyźni			Kobiety		
Umiejscowienie	N	%	Umiejscowienie	N	%
Płuco	14128	21,5	Pierś	14576	22,2
Gruzoł krokowy	8268	12,6	Płuco	5718	8,1
Pęcherz moczowy	4539	6,9	Trzon macicy	4820	7,3
Okrężnica	4298	6,5	Skóra	4502	6,8
Skóra	4177	6,3	Okrężnica	3960	6,0
Żołądek	3265	4,9	Jajniki	3280	5,
Odbytnica	3188	4,8	Szyjka macicy	3270	4,9
Nerka	2469	3,7	Odbytnica	2150	3,2
Krtań	2075	3,1	Żołądek	1838	2,8
Trzustka	1658	2,8	Trzustka	1695	2,5

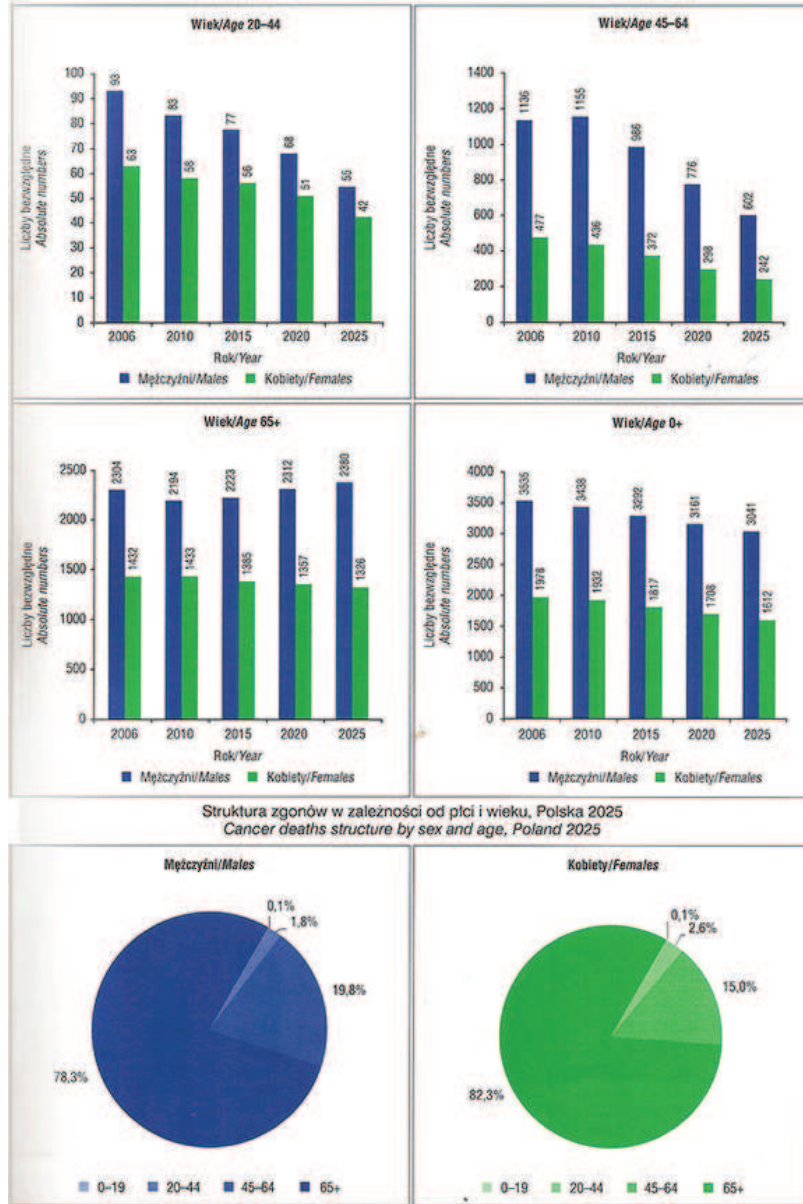
Według W. Zatońskiego [267]

W ostatnich latach liczba zachorowań na raka żołądka stopniowo się obniża, stąd plasuje się on u mężczyzn i kobiet w drugiej połowie dziesięciu najczęstszych nowotworów, ale nadal w Polsce i na świecie, poza Japonią, pozostaje on nowotworem układu pokarmowego o wysokim współczynniku umieralności, choć obserwuje się stały trend spadku umieralności, co w odniesieniu do Polski przedstawiono na rycinach 1 i 2 [2].



Ryc. 1. Trendy umieralności na nowotwory złośliwe żołądka w Polsce w latach 1965–2006, prognoza do 2025 roku (według: Didkowska J., Wojciechowska U., Zatoński W. „Prognozy zachorowań i zgonów na wybrane nowotwory złośliwe w Polsce do 2025 roku”, Wyd. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, 2009, s. 20).

Fig. 1. Malignant gastric cancer mortality trends in Poland from 1965 to 2006, a forecast for up to 2025 (according to: Didkowska J., Wojciechowska U., Zatoński W. „Prognozy zachorowań i zgonów na wybrane nowotwory złośliwe w Polsce do 2025 roku”, Wyd. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, 2009, s. 20).



Ryc. 2. Trendy umieralności na nowotwory złośliwe żołądka w Polsce w latach 1965–2006, prognoza do 2025 roku (według: Didkowska J., Wojciechowska U., Zatoński W. „Prognozy zachorowań i zgonów na wybrane nowotwory złośliwe w Polsce do 2025 roku”, Wyd. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, 2009, s. 21).

Fig. 2. Malignant gastric cancer mortality trends in Poland from 1965 to 2006, a forecast for up to 2025 (according to: Didkowska J., Wojciechowska U., Zatoński W. „Prognozy zachorowań i zgonów na wybrane nowotwory złośliwe w Polsce do 2025 roku”, Wyd. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, 2009, s. 21).

W populacji chorych na raka żołądka obserwuje się również zmiany w strukturze zachorowalności, które polegają na zmniejszaniu się częstości zachorowań na raka dystalnej części żołądka (*antrum*), a wzroście częstości zachorowań na raka proksymalnej części żołądka (*cardia et pars subcardiaca*).

1.2. Etiologia raka żołądka

Wśród czynników etiologicznych raka żołądka wyróżnia się czynniki endogenne (wewnętrzne) i egzogenne (zewnętrzne).

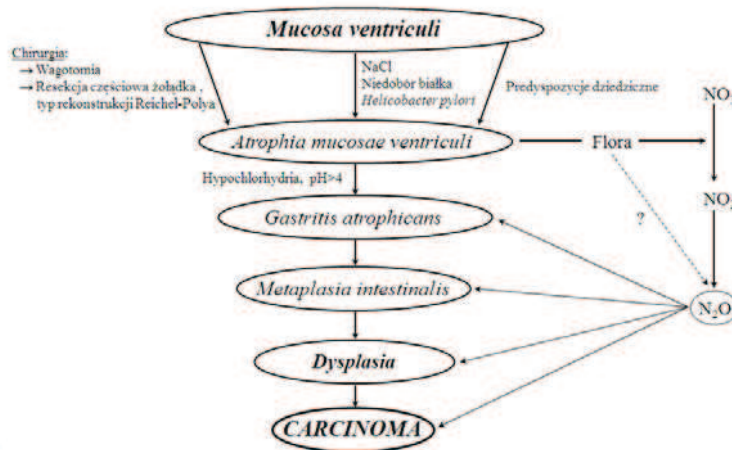
Czynniki endogenne:

- Hypogammaglobulinemia (zwiększa 50-krotnie ryzyko zachorowania na raka żołądka)
- zapalenie zanikowe błony śluzowej (*gastritis atrophicans*)
- Choroba Biermera (*anemia perniciososa*) – wzrost 6-krotny zachorowań na raka żołądka
- Choroba Menetriera (*gastritis atrophicans gigantea*) – 10% przypadków
- Polipy żołądka:
 - gruczolaki (adenoma) – 10–15% przypadków
 - hyperplastyczne – 7–9% przypadków
- kikut poresekcyjny żołądka (ewolucja 5–15 lat) – 7–10% przypadków
- przewlekły trawienny wrzód żołądka (*ulcus pepticum chronicum*) – 3–4% przypadków

Do czynników egzogennych zaliczane są:

- czynniki żywieniowe (dieta ubogobiałkowa i ubogowitaminowa, azotany i azotyny, policykliczne węglowodory i aminokwasy aromatyczne w diecie, spożywanie w dużych ilościach pokarmów: wędzonych, smażonych szczególnie na grillu, pikantnych, mocno solonych, a także alkoholu wysokoprocentowego w czystej postaci i tłuszczu zwierzęcego)
- czynnik dziedziczny
- czynnik socjalno-ekonomiczny (niski status materialny, palenie tytoniu, ekspozycja na pyły nieorganiczne, praca przy przetwarzaniu gumy, rafinacji ropy, przeróbce niklu)
- czynniki zakaźne (zakażenia bakteryjne *Helicobacter pylori*, zakażenia grzybiczne – wytwarzanie aflatoksyn)

Czynniki etiologiczne raka żołądka oddziałują na prawidłową błonę śluzową żołądka i uruchamiają kaskadę zdarzeń prowadzącą poprzez zapalenie zanikowe błony śluzowej (*gastritis atrophicans*) – metaplastję jelitową – dysplazję – i w końcu do inwazyjnego nowotworu. Schemat karcinogenezy raka żołądka przedstawiono na rycinie 3 [5].



Ryc. 3. Karcinogeneza raka żołądka według Pablo Correa (1988) [5]

Fig. 3. Gastric carcinogenesis according to Pablo Correa (1988) [5].

1.3. Symptomatologia raka żołądka

Kliniczne objawy raka żołądka można podzielić na specyficzne i niespecyficzne. Dolegliwości dyspeptyczne (zgaga, „gniecenie” w dołku podsercowym, okresowe pobolewania w nadbrzuszu), należą do objawów niespecyficznych. Do objawów specyficznych raka żołądka zalicza się: bóle w nadbrzuszu o charakterze ciągłym, bóle poposiłkowe, utratę apetytu, nudności, chudnięcie, krwawienie z górnego odcinka przewodu pokarmowego, dysfagię, niedokrwistość z niedoboru żelaza, wyczuwalny guz w nadbrzuszu.

Gdy pacjent zgłasza objawy specyficzne, nowotwór jest zwykle w stadium zaawansowanym, trudnym do radykalnego leczenia.

1.4. Diagnostyka raka żołądka

W rozpoznawaniu raka żołądka obowiązuje wykonanie badań zasadniczych, do których zalicza się: badanie radiologiczne górnego odcinka przewodu pokarmowego i badanie gastroskopowe z pobraniem od 3 do 5 reprezentatywnych wycinków, w celu ustalenia przedoperacyjnego rozpoznania histopatologicznego.

Ponadto, przy braku przeciwwskazań do leczenia z tytułu stanu ogólnego, wykonywane są badania ustalające stopień zaawansowania klinicznego nowotworu (*staging*): badanie radiologiczne klatki piersiowej, badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej, ultrasonografia endoskopowa (EUS), tomografia komputerowa (TK) lub, w przypadkach wątpliwych, rezonans magnetyczny (MRI), ewentualnie laparoscopia.

1.5. Klasyfikacja histopatologiczna nowotworów złośliwych żołądka (wg WHO, 1990)

Nowotwory złośliwe żołądka pochodzenia nabłonkowego (raki):

- Gruczolakorak (*Adenocarcinoma*)
 - brodawkowaty (*Adenocarcinoma papillare*)
 - cewkowy (*Adenocarcinoma tubulare*)
 - śluzowy (*Adenocarcinoma mucinosum*)
 - sygnetowatokomórkowy (*Signet-ring Cell Carcinoma*)
- Rak gruczolowo-płaskonabłonkowy (*Carcinoma adenosquamosum*)
- Rak płaskonabłonkowy (*Carcinoma planoepitheliale*)
- Rak drobnokomórkowy (*Carcinoma microcellulare*)
- Rak niezróżnicowany (*Carcinoma nondifferentiatum*)

W opisie badania histopatologicznego podawany jest również stopień zróżnicowania histologicznego – cecha G (*grade*). Wyróżnia się następujące stopnie:

- G1 – wysokozróżnicowany
- G2 – średnierzóżnicowany
- G3 – niskozróżnicowany

1.6. Klasyfikacja Laurena

typ jelitowy (*typus intestinalis*) – wzrost rozprężający

typ rozlany (*typus diffusus*) – wzrost naciekający

Tabela 2. Zasadnicze cechy typów raka żołądka według klasyfikacji Laurena.

Table 2. The basic characteristics of gastric cancer types according to Lauren classification.

Cechy	Typ raka rozlany	Typ raka jelitowy
wiek	względnie młodzi	względnie starsi
płeć: kobieca/męska	około 1	>1
lokalizacja	część proksymalna	część dystalna
czynnik grupy krwi	grupa „A”	–
czynniki predysponujące	niedokrwistość złośliwa hypogammaglobulinemia	zapalenie zanikowe błony śluzowej, metaplazja jelitowa
postać makroskopowa	Owrzodziała	polipowata
rokowanie	Złe	lepsze

Cechy	Typ raka rozlany	Typ raka jelitowy
czynnik dziedziczny	+++	+
czynnik środowiskowy	+	+++

Według: A.Szawłowski, Wykład: „Leczenie skojarzone nowotworów przewodu pokarmowego”, IX Polska Szkoła Onkologii, 1998 – za zgodą Autora.

Dla celów badań epidemiologicznych, a także z uwagi na implikacje kliniczne, znalazła zastosowanie klasyfikacja raków żołądka według Laurena, dzieląca raki żołądka na typ jelitowy (*intestinalis*) i typ rozlany (*diffusus*). Typ jelitowy przypomina histologicznie raka jelita cienkiego lub grubego i składa się głównie z pojedynczych, rozproszonych komórek gruczołowych, rzadko tworzących struktury gruczołowe. Zlokalizowany jest zwykle w części przedodźwiernikowej żołądka (*antrum*). Często towarzyszy mu zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka (*gastritis atrophicans*) i metaplasja jelitowa (*metaplasia intestinalis*), czyli przekształcenie się dojrzałej błony śluzowej żołądka w równie dojrzałą błonę śluzową jelita grubego lub cienkiego. Cechuje go lepsze rokowanie od typu rozlanego oraz trend malejący częstości występowania odpowiadający zmniejszającej się zachorowalności na raka żołądka na świecie. W Polsce częściej występuje typ jelitowy raka żołądka, zwłaszcza u starszych mężczyzn.

Typ rozlany raka żołądka jest częściej spotykany u młodych kobiet. Zlokalizowany jest zwykle w górnej części żołądka. Rokowanie w typie rozlanym jest gorsze w stosunku do typu jelitowego.

1.7. Rak wczesny i zaawansowany

Termin „wczesny rak żołądka” wprowadzony został w 1979 roku przez Japońskie Towarzystwo Gastroenterologiczne [144] dla określenia postaci raka żołądka o nacieku powierzchniowym – zajmującego wyłącznie błonę śluzową i podśluzową bez względu na zasięg w płaszczyźnie poziomej i zajęcie węzłów chłonnych. Dzięki postępowi technik obrazowania i wprowadzeniu do praktyki klinicznej ultrasonografii endoskopowej (EUS) podzielono dodatkowo wczesnego raka żołądka na:

- nacieki obejmujący tylko warstwę śluzową ściany żołądka (tzw. rak wewnętrznośluzówkowy; *ep – epithelial lesion*)
- nacieki dochodzący, ale nieprzekraczający warstwy mięśniowej błony śluzowej (*mm – muscularis mucosae lesion*)
- nacieki dochodzący, ale nieprzekraczający warstwy podśluzowej ściany żołądka (*sm – submucosal lesion*)

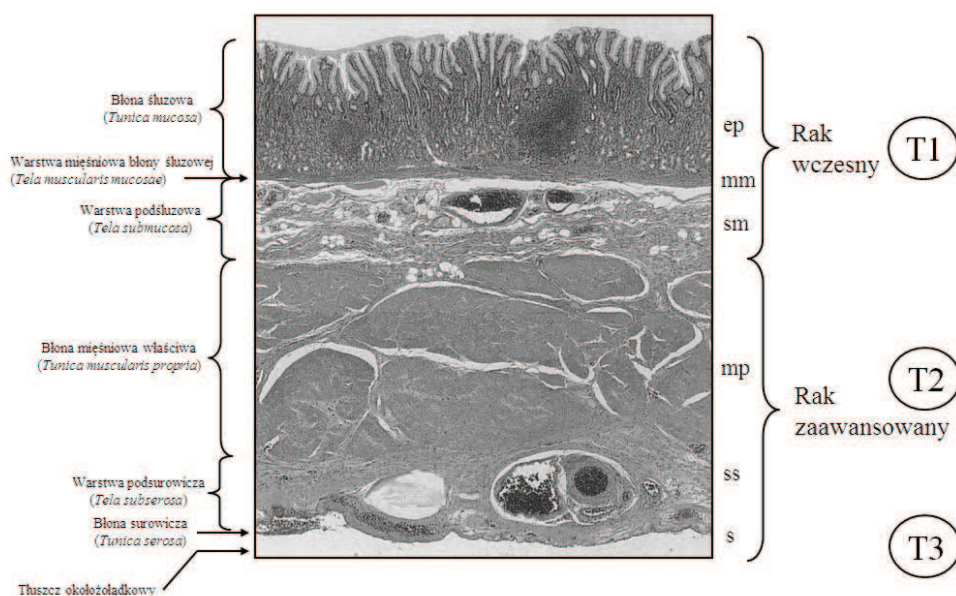
Podział ten ma wyraźne implikacje kliniczne. W warstwie śluzowej nie ma naczyń chłonnych, dlatego też nacieki nieprzekraczające tej warstwy stwarzają pewność, co do wyleczenia (100% wyleczalności) nawet przy zastosowaniu zabiegów miejscowych (np. wycięcie drogą endoskopową). Nacieki dochodzące do warstwy mięśniowej błony śluzowej (*mm*) i do warstwy podśluzowej (*sm*), z uwagi na obecność naczyń chłonnych śródściennych stwarzają ryzyko wystąpienia mikroprzerzutów w węzłach chłonnych

regionalnych, a szerząc się również w płaszczyźnie poziomej (rak szerzący się powierzchniowo), teoretycznie mogą obejmować całą długość żołądka. Dlatego też w takich przypadkach zabieg chirurgiczny, jako zasadnicza metoda leczenia, powinien obejmować swym zakresem odpowiednią długość ściany żołądka (całkowita lub prawie całkowita resekcja żołądka) wraz z regionalnymi węzłami chłonnymi.

Za postać „zaawansowaną” raka żołądka uważa się każdy naciek przekraczający warstwę podśluzową i penetrujący warstwę mięśniową i dalej w głąb warstwę surowiczą i tkanki otaczające.

Zaawansowanego raka żołądka nie można wyleczyć we wszystkich przypadkach stosując wyłącznie jedną metodę główną (zabieg operacyjny) i dlatego, w poszukiwaniu dodatkowych metod terapeutycznych dla poprawy wyników leczenia chirurgicznego wprowadzono termin „miejscowo zaawansowany rak żołądka” (*locally advanced gastric cancer* – LAGC), dla którego w ramach badań klinicznych może być zastosowanie dodatkowe leczenie przed- i/lub pooperacyjne.

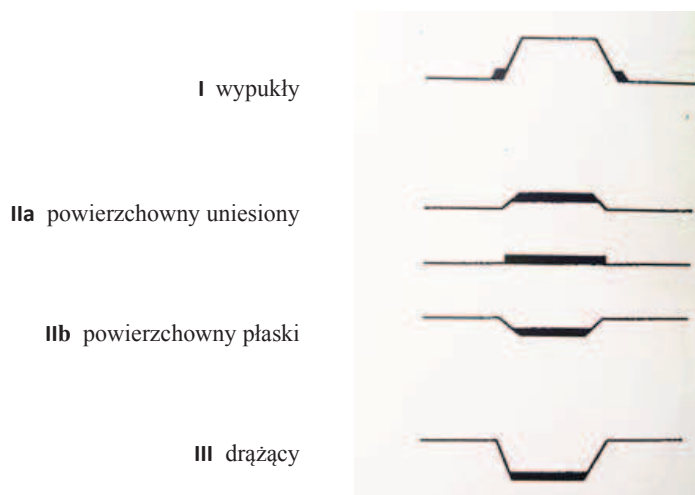
Raka wczesnego i zaawansowanego zilustrowano graficznie na rycinie 4.



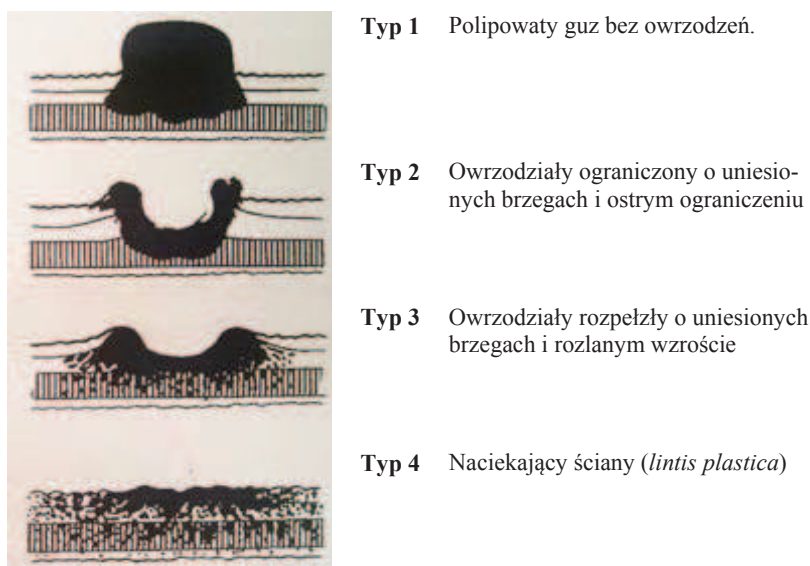
Ryc. 4. Rak wczesny i zaawansowany – naciekanie w głąb ściany żołądka. (według A. Szawłowski, Wykład: „Leczenie skojarzone nowotworów przewodu pokarmowego”, IX Polska Szkoła Onkologii, 1998 r. – za zgodą Autora).

Fig. 4. Early and advanced cancer – stomach wall infiltration.

1.8. Klasyfikacja makroskopowa (endoskopowa) raków: wczesnego i zaawansowanego

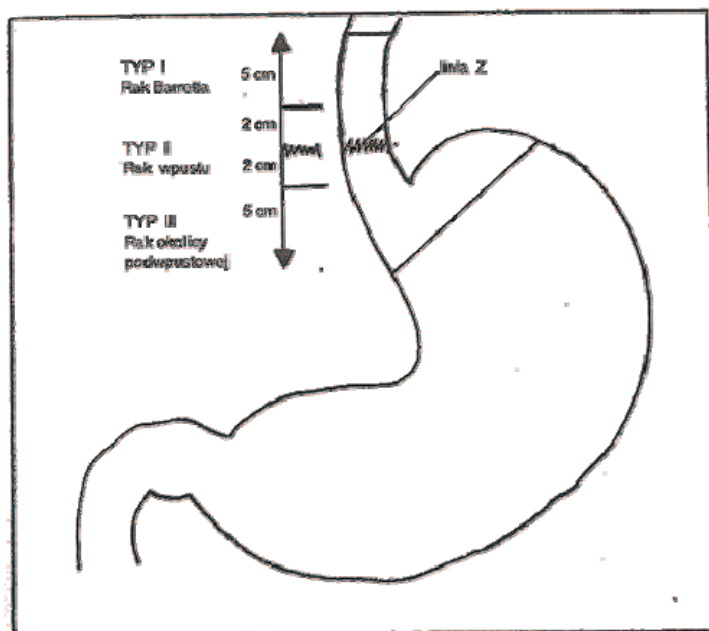


Ryc. 5. Typ endoskopowy nacieku wczesnego raka żołądka – według klasyfikacji japońskiej.
Fig. 5. Endoscopic type of infiltration in early gastric cancer according to Japanese classification.



Ryc. 6. Typ endoskopowy nacieku zaawansowanego raka żołądka – według klasyfikacji Bormanna.
Fig. 6. Endoscopic type of infiltration in advanced gastric cancer according to Borrmann classification.

1.9. Klasyfikacja topograficzna raka połączenia przełykowo-żołądkowego



Ryc. 7. Klasyfikacja topograficzna raka połączenia przełykowo-żołądkowego według Międzynarodowego Stowarzyszenia do Badań Raka Żołądka – IGCA (J.R. Siewert), 1997.

Fig. 7. Topographic classification of gastroesophageal junction cancer according to the International Gastric Cancer Association (J.R. Siewert), 1997.

Linia graniczną pomiędzy przełykiem a żołądkiem jest linia Z. W tym miejscu od strony przełyku kończy się nabłonek płaski (podłoże dla raków płaskonabłonkowych) i dalej od strony żołądka zaczyna się nabłonek walcowaty (podłoże dla raków gruczołowych). Zwykle na wysokości linii Z znajduje się też anatomiczne miejsce przejścia przełyku w żołądek, zwane ujściem wpustkowym (*ostium cardiacum*) lub wpustem (*cardia*). Przede wszystkim dla celów taktyki chirurgicznej ustalono klasyfikację topograficzną połączenia przełykowo-żołądkowego zaakceptowaną przez Międzynarodowe Stowarzyszenie do Badań Raka Żołądka (International Gastric Cancer Association – IGCA). Klasyfikacja ta powstała również w oparciu o obserwacje kliniczne występowania w tej okolicy raków gruczołowych (*adenocarcinoma*). Jako obszar, gdzie występują raki wpustu (typ II raka połączenia przełykowo-żołądkowego) przyjęto odcinek 2 centymetrów ponad i 2 centymetrów poniżej linii Z. Rak okolicy podwpustowej (typ III raka połączenia przełykowo-żołądkowego) zlokalizowany jest od drugiego centymetra poniżej linii Z do 5 centymetrów od tego poziomu (tj. 7 centymetrów poniżej linii Z). W przypadku zaś raków gruczołowych przełyku typu Barretta (typ I raka połączenia przełykowo-żołądkowego) zlokalizowane są one, poczynając od poziomu drugiego centymetra ponad linią Z do 5 centymetrów od tego poziomu (tj. zwykle do 7 centymetrów ponad linią Z).

1.10. Klasyfikacja kliniczna raka żołądka – TNM, wg Międzynarodowej Unii Przeciwrakowej (UICC, 1997)

Cecha T (*tumor* – guz) (ryc. 4)

- T0 – nie stwierdza się guza pierwotnego
- Tis – rak przedinwazyjny (*carcinoma in situ*)
- T1 – guz nacieka błonę śluzową lub warstwę podśluzową ściany żołądka
- T2 – guz nacieka warstwę mięśniową właściwą (*muscularis propria*) lub warstwę podsurowiczą
- T3 – guz nacieka błonę surowiczą
- T4 – guz nacieka przyległe struktury

Cecha N (*noduli* – okoliczne węzły chłonne)

- Nx – nie można ocenić okolicznych węzłów chłonnych
- N0 – brak przerzutów do węzłów chłonnych
- N1 – przerzuty w 1–6 regionalnych węzłach chłonnych
- N2 – przerzuty w 7–15 regionalnych węzłach chłonnych
- N3 – przerzuty w więcej niż w 15 regionalnych węzłach chłonnych

Cecha M (*metastases* – przerzuty odległe)

- Mx – nie można ocenić przerzutów odległych
- M0 – brak przerzutów odległych
- M1 – obecne przerzuty odległe

Kategorie histologiczne (*grade* – stopień histologicznego zróżnicowania)

- Gx – brak oceny
- G1 – rak dobrze zróżnicowany
- G2 – rak średnio zróżnicowany
- G3 – rak nisko zróżnicowany
- G4 – rak niezróżnicowany

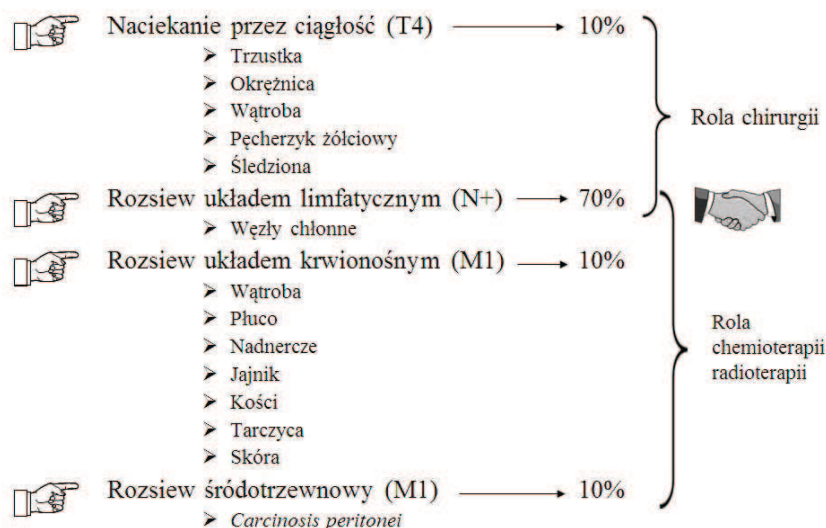
1.11. Stopnie zaawansowania raka żołądka

Tabela 3. Stopnie zaawansowania raka żołądka w oparciu o klasyfikację TNM/ pTNM.
Table 3. Gastric cancer staging according to TNM/ pTNM classification.

Stopień zaawansowania	TNM / pTNM
IA	T1 N0 M0
IB	T1 N1 M0; T2 N0 M0
II	T1 N2 M0; T2 N1 M0; T3 N0 M0
IIIA	T2 N2 M0; T3 N1 M0; T4 N0 M0
IIIB	T3 N2 M0
IV	T4 N1 i zawsze, gdy M1 lub N3

1.12. Drogi rozsiewu raka żołądka

Drogi rozsiewu raka żołądka przedstawiono graficznie na rycinie 8.



Ryc. 8. Drogi rozsiewu raka żołądka.

Fig. 8. Ways gastric cancer can spread.

1.12.1. Rozsiew raka żołądka drogą układu chłonnego

Bogate unaczynienie chłonne żołądka tłumaczy dużą częstość występowania przerzutów raka żołądka do węzłów chłonnych, zarówno regionalnych, jak i pozaregionalnych. Częstość występowania przerzutów w węzłach chłonnych u chorych na zaawansowanego raka żołądka oceniana jest na ponad 70%.

Rozsiew drogą układu chłonnego należy do jednego z zasadniczych sposobów rozsiewu raka żołądka, co w istotny sposób wpływa na taktykę leczenia i rokowanie. Na układ chłonny żołądka składają się naczynia chłonne śródścienne (*vasa lymphatica intramuralia*) oraz naczynia i węzły chłonne położone na zewnątrz ściany żołądka (*vasa et nodi lymphatici extramurales*). Wśród naczyń chłonnych śródściennych najbogatsza jest sieć chłonna śródmięśniówkowa i podsurowicza. Dlatego guz wnikający do tych warstw stwarza znaczne ryzyko przerzutów do węzłów chłonnych. Japońskie Towarzystwo do Badań nad Rakiem Żołądka na podstawie wielu lat badań podzieliło węzły chłonne żołądka, w których mogą znajdować się przerzuty, na 4 grupy. Grupa 1 odpowiada kategorii N1 według UICC (tzw. węzły chłonne okołożołądkowe), grupa 2 odpowiada kategorii N2 według UICC, grupa 3 określana jest w piśmiennictwie, jako kategoria N3, a grupa 4 jako kategoria N4. Podział węzłów chłonnych raka żołądka w poszczególnych grupach i według stałych numerów zilustrowany jest w tabelach 4-6 (według Japońskiego Towarzystwa do Badań nad Rakiem Żołądka – JRSJC, 1995).

Tabela 4. Układ chłonny żołądka – węzły chłonne grupy 1.*Table 4.* Lymphatic system of the stomach – group 1 lymph nodes.

Nr	Grupa 1 N1 (wg ICC)
1	wpustowe prawostronne
2	wpustowe lewostronne
3	krzywizny mniejszej
4	krzywizny większej:
4 sa	naczyń krótkich
4 sb	tętnicy żołądkowo-sieciowej lewej
4 d	tętnicy żołądkowo-sieciowej prawej
5	Nadodźwiernikowe
6	Pododźwiernikowe

Tabela 5. Układ chłonny żołądka – węzły chłonne grupy 2.*Table 5.* Lymphatic system of the stomach – group 2 lymph nodes.

Nr	Grupa 2 N2 (wg UICC)
7	tętnicy żołądkowej lewej
8a	tętnicy wątrobowej wspólnej (przednio-górna grupa)
9	pnia trzewnego
10	wnęki śledziony
11	tętnicy śledzionowej

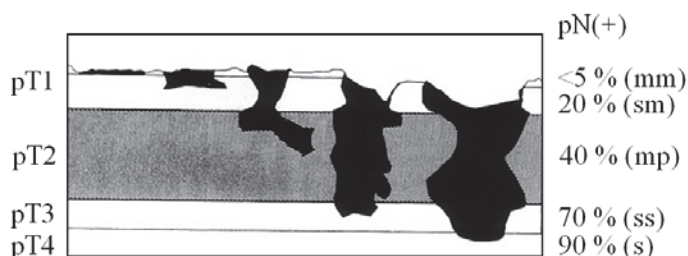
Tabela 6. Układ chłonny żołądka – węzły chłonne grupy 3.*Table 6.* Lymphatic system of the stomach – group 3 lymph nodes.

Nr	Grupa 3 N3 (M1 LYM wg UICC)
8p	tętnicy wątrobowej wspólnej (tylna grupa)
12	więzadła wątrobowo-dwunastniczego
13	głowy trzustki (tylna powierzchnia)
14v	żyły krezkowej górnej
14a	tętnicy krezkowej górnej
15	tętnicy okrężniczej środkowej
20	rozworu przełykowego przepony
110	przyprzełykowe śródpiersia dolnego (regionalne dla raka wpustu)
111	nadprzeponowe (regionalne dla raka wpustu)

Tabela 7. Układ chłonny żołądka – węzły chłonne grupy 4.**Table 7.** Lymphatic system of the stomach – group 4 lymph nodes.

Nr	Grupa 4	N4 (M1 LYM wg UICC)
16	wokół aorty brzusznej	
17	głowy trzustki (przednia powierzchnia)	
18	dolnego brzegu trzustki	
19	podprzeponowe rozworu aorty	

Zależność pomiędzy głębokością naciekania guza w głąb ściany żołądka a występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych przedstawiono na rycinie 9.



Ryc. 9. Wpływ naciekania guza w głąb ściany żołądka na występowanie przerzutów do węzłów chłonnych; mm – warstwa błony mięśniowej błony śluzowej, sm – warstwa podśluzowa, mp – warstwa mięśniowa właściwa, ss – warstwa podsurowicza, s – warstwa surowicza.

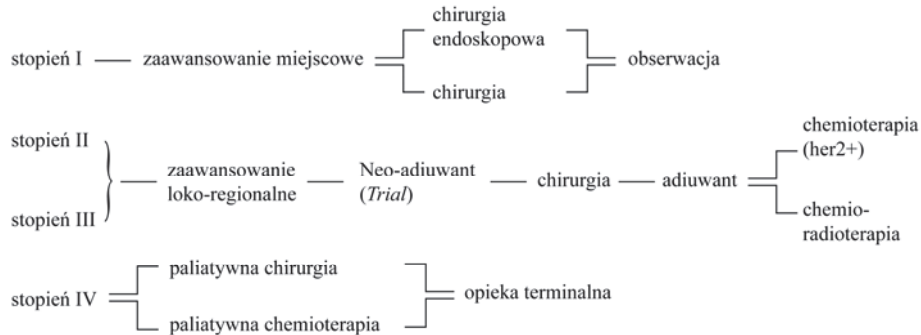
Fig. 9. Impact of tumour infiltration of the stomach wall on the metastasis to lymph nodes; mm – muscular layer of the mucosa (lamina muscularis mucosae), sm – submucosal layer (lamina submucosa), mp – proper muscular layer (lamina muscularis propria), ss – subserous layer (lamina submucosa), s – serous layer (lamina serosa).

Z ryciny 9 wynika, że im głębiej wnika naciekanie w głąb ściany żołądka, tym większe jest prawdopodobieństwo obecności przerzutów w węzłach chłonnych. Ten fakt, jak i generalnie 70% ryzyko wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych w zaawansowanym raku żołądka, jest istotnym argumentem za koniecznością wykonywania limfadenektomii w leczeniu z intencją wyleczenia raka żołądka.

1.13. Strategia leczenia raka żołądka

Rak żołądka należy do grupy nowotworów litych i w tych przypadkach chirurgiczne leczenie było, jest i przez dłuższy czas na pewno będzie główną metodą leczenia. Chemioterapia i/lub radioterapia mają znaczenie pomocnicze, jako leczenie przedoperacyjne (neo-adiuwantowe) lub pooperacyjne (uzupełniające – adiuwantowe).

Aktualny schemat leczenia raka żołądka w zależności od stopnia zaawansowania według klasyfikacji TNM przedstawiono na rycinie 10.



Ryc. 10. Schemat leczenia raka żołądka (modyfikacja, według A. Szawłowski. Nowotwory górnego odcinka układu pokarmowego, W: A. Kułakowski, E. Towpik (red.). Zasady rozpoznawania i leczenia nowotworów. Wyd. PFESO, Warszawa 1997) [4].

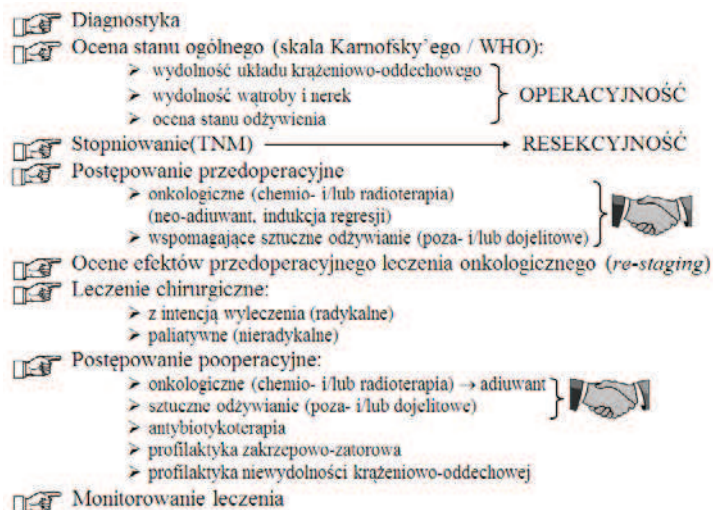
Fig. 10. Gastric cancer treatment scheme (modification, according to: A. Szawłowski. Nowotwory górnego odcinka układu pokarmowego, W: A. Kułakowski, E. Towpik (red.). Zasady rozpoznawania i leczenia nowotworów. Wyd. PFESO, Warszawa 1997) [4].

Do podstawowych elementów strategii leczenia raka żołądka należą:

1. taktyka onkologiczna;
2. taktyka chirurgiczna.

1.13.1. Taktyka onkologiczna leczenia raka żołądka

Podstawowe elementy taktyki onkologicznej w leczeniu raka żołądka przedstawiono zbiorczo na rycinie 11.

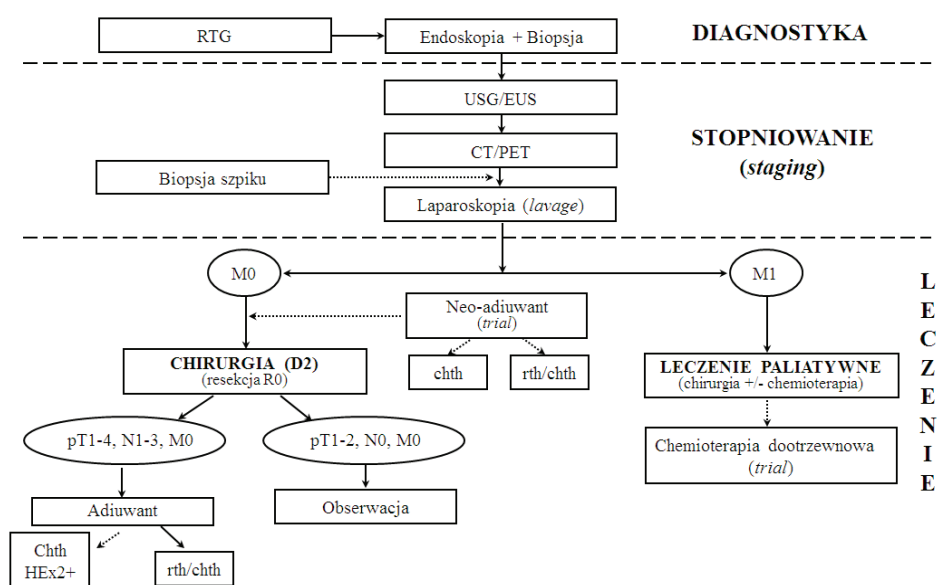


Ryc. 11. Taktyka onkologiczna w leczeniu raka żołądka.

Fig. 11. Oncological tactics in gastric cancer treatment.

Punktem wyjściowym taktyki onkologicznej jest diagnostyka mająca na celu ustalenie rozpoznania mikroskopowego, następnie ocena stanu ogólnego, aby ustalić czy chory będzie się kwalifikował do leczenia operacyjnego (tzw. „operacyjność”), potem ustalenie stopnia zaawansowania według TNM, aby określić z jednej strony techniczne możliwości resekcji (tzw. „resekcyjność”) oraz ewentualna potrzeba leczenia przedoperacyjnego (neo-adiuwantowego lub indukcyjnego), następnie w przypadku skojarzonego leczenia ocenić efekty przedoperacyjnego leczenia (*re-staging*), potem główna metoda leczenia w postaci leczenia chirurgicznego (radykałnego lub paliatywnego), następnie pooperacyjne postępowanie aby wyprowadzić chorego z zagrożeń wywołanych rozległą operacją (sztuczne odżywianie: poza- i/lub dojelitowe, antybiotykoterapia, profilaktyka zakrzepowo-zatorowa, profilaktyka niewydolności krążeniowo-oddechowej), a po otrzymaniu wyniku badania histopatologicznego ustalenie wskazań do onkologicznego leczenia uzupełniającego (adiuwant) i na koniec monitorowanie efektów leczenia, aby kontrolować dalszą ewolucję choroby i w przypadku nawrotu nowotworu (wznowa miejscowa i/lub przerzuty) ustalić możliwości dalszego leczenia.

Związany z tym onkologicznym postępowaniem proces decyzyjny, zbiorczo przedstawiono na rycinie 12.

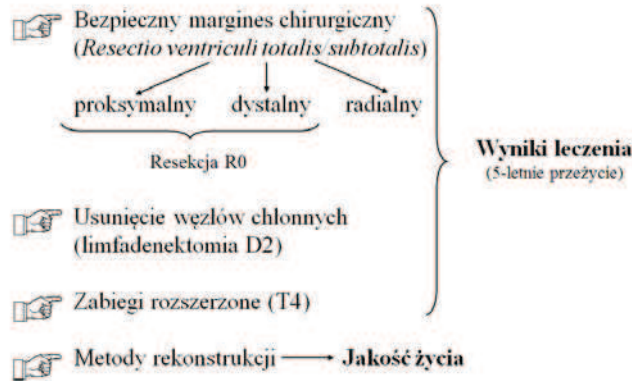


Ryc. 12. Proces decyzyjny w przypadku raka żołądka.

Fig. 12. Decision-making process in gastric cancer.

1.13.2. Taktyka chirurgiczna leczenia raka żołądka

Kluczowe elementy chirurgicznej taktyki leczenia raka żołądka przedstawiono na rycinie 13.



Ryc. 13. Kluczowe elementy chirurgicznej taktyki leczenia raka żołądka.

Fig. 13. Key elements of surgical treatment tactics in gastric cancer.

Pierwszym zasadniczym elementem chirurgicznego leczenia raka żołądka jest uzyskanie bezpiecznego chirurgicznego marginesu (klasyfikacja R; R0 – brak komórek nowotworowych w marginesie proksymalnym i dystalnym, R1 – obecne w badaniu mikroskopowym komórki nowotworowe w marginesie proksymalnym i/lub dystalnym, R2 – margines proksymalny i/lub dystalny mikroskopowo niedoszczętny. Wadą tej klasyfikacji jest brak określenia istotnego marginesu radialnego). Obowiązujące w tym względzie wytyczne radykalnej onkologicznie chirurgii przedstawiono na rycinie 14.

- Guz wpustu: obwodowo minimum 6 cm ściany żołądka z usunięciem krzywizny mniejszej + proksymalnie 4 cm ściany przełyku (*Resectio ventriculi subtotalis superior*)
- Guz trzonu: całkowite wycięcie żołądka (*Gastrectomia*)
- Guz części przedodźwiernikowej: proksymalnie minimum 6 cm ściany żołądka z usunięciem krzywizny mniejszej + dystalnie 3 cm ściany dwunastnicy (*Resectio ventriculi subtotalis inferior*)

Ryc. 14. Wytyczne dla zapewnienia bezpiecznego marginesu chirurgicznego w leczeniu raka żołądka

Fig. 14. Guidelines for the provision of a safe surgical margin in gastric cancer treatment.

Podstawowe elementy tkankowego bloku usuwanego podczas określonej jako onkologicznie radykalna (doszczętna) operacja z powodu raka żołądka przedstawiono zbiorowo na rycinie 15.

- ☞ Żołądek
- ☞ Usunięcie sieci większej
- ☞ Usunięcie sieci mniejszej
- ☞ Bursektomia
- ☞ Splenektomia (opcjonalnie)
- ☞ Limfadenektomia D2*

* Wymagania minimalne (IGCA – International Gastric Cancer Association, 1997):

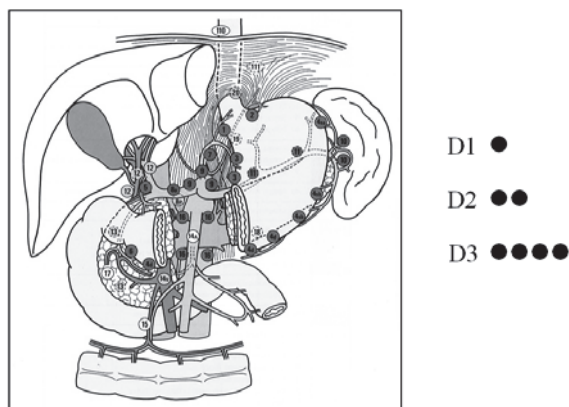
- 15 w/ch w preparacie dla ustalenia stopnia zaawansowania pTNM
- 25 w/ch w preparacie aby uznać zabieg za radykalny

Ryc. 15. Elementy operacji radykalnej z powodu raka żołądka.

Fig. 15. Elements of radical surgery due to gastric cancer.

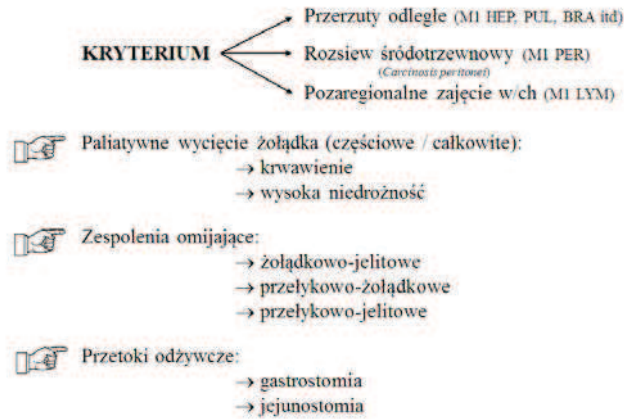
W przypadku usuwania żołądka wraz z guzem zakres zabiegu dotyczy zwykle całkowitego wycięcia żołądka (*gastrectomia totalis*) lub prawie całkowitego wycięcia żołądka górnego (*resectio ventriculi subtotalis superior*) albo prawie całkowitego wycięcia żołądka dolnego (*resectio subtotalis ventriculi inferior*). Tętnicę żołądkową lewą (*arteria gastrica sinistra*) należy w każdym przypadku podwiązać na wysokości pnia trzewnego (*truncus coeliacus*).

Drugim zasadniczym elementem radykalnego chirurgicznego leczenia raka żołądka jest usunięcie regionalnych węzłów chłonnych (limfadenektomia). Za obecnie obowiązujący minimalny chirurgiczny standard uważa się limfadenektomię D2 (węzły chłonne okołożołądkowe, wzdłuż tętnicy wątrobowej wspólnej, pnia trzewnego). Zakres limfadenektomii w raku żołądka graficznie przedstawiono na rycinie 16.



Ryc. 16. Zakres limfadenektomii w radykalnym leczeniu raka żołądka.

Fig. 16. Scope of lymphadenectomy in the radical treatment of gastric cancer.



Ryc. 17. Typy paliatywnych operacji wykonywanych u chorych z rakiem żołądka.

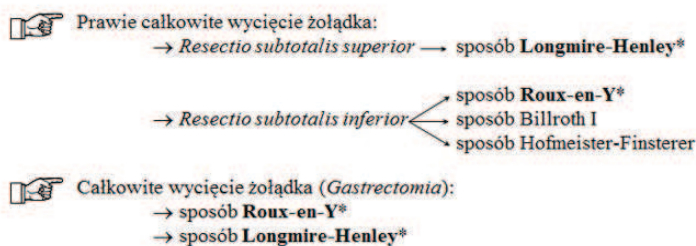
Fig. 17. Types of palliative surgeries in patients with gastric cancer.

W przypadku kiedy chory zgłasza się do leczenia w rozsianym stadium raka żołądka, można jedynie zaproponować operację paliatywną. Typy paliatywnych operacji i wskazania do nich przedstawiono na rycinie 17.

1.13.3. Metody rekonstrukcji ciągłości przewodu pokarmowego po operacji z powodu raka żołądka

W przypadku chirurgicznego leczenia raka żołądka resekcja decyduje o wynikach leczenia (kryterium: przeżycie 5-letnie), a rekonstrukcja ciągłości przewodu pokarmowego o jakości życia chorego (drugi zasadniczy element skuteczności onkologicznego leczenia).

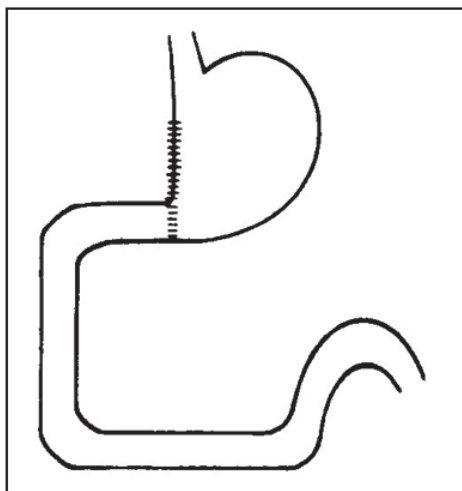
Preferowane przez Autora metody rekonstrukcji ciągłości przewodu pokarmowego w zależności od zakresu resekcji przedstawiono na rycinach 18–22.



* standard Autora

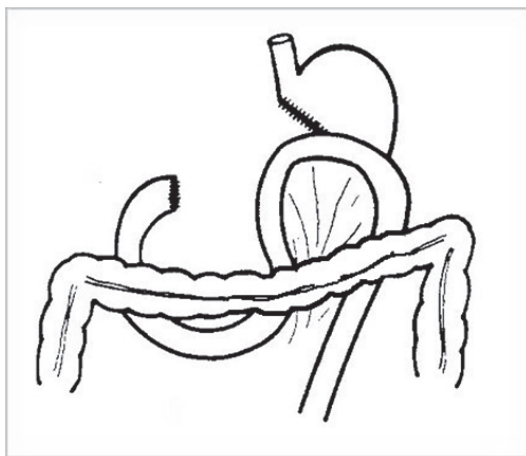
Ryc. 18. Preferowane metody rekonstrukcji ciągłości przewodu pokarmowego po operacji z powodu raka żołądka.

Fig. 18. Preferred methods of reconstruction of the digestive tract continuity after gastric cancer surgery.



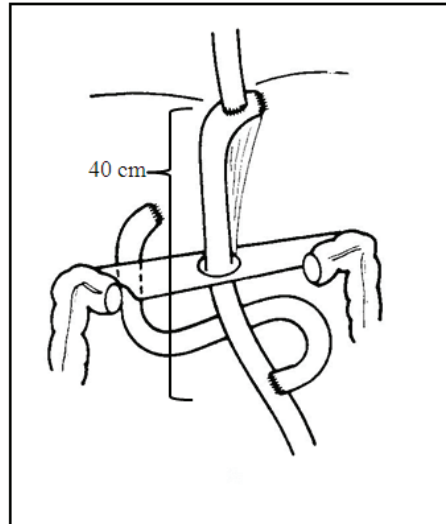
Ryc. 19. Rekonstrukcja sposobem Billroth I (*anastomosis gastro-duodenalis*) po prawie całkowitym dolnym wycięciu żołądka.

Fig. 19. *Billroth I reconstruction (anastomosis gastro-duodenalis) after subtotal lower gastrectomy.*



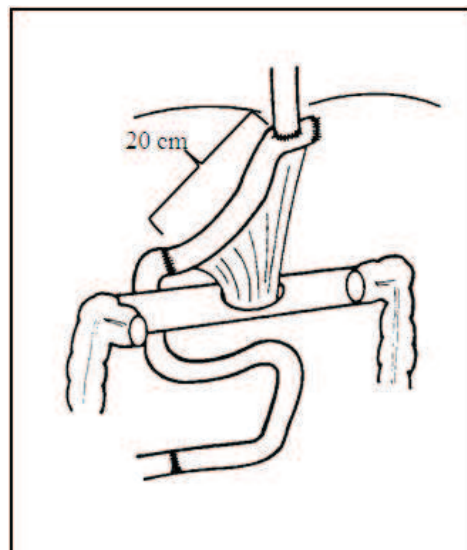
Ryc. 20. Rekonstrukcja sposobem Hofmeister-Finsterer (*gastro-jejunoanastomosis retrocolica*) po prawie całkowitym dolnym wycięciu żołądka.

Fig. 20. *Hofmeister-Finsterer reconstruction (gastro-jejunoanastomosis retrocolica) after subtotal lower gastrectomy.*



Ryc. 21. Rekonstrukcja sposobem Roux-en-Y (*anastomosis oesophago-jejunalis termino-lateralis cum jejuno-jejunoanastomosis termino-/latero-lateralis*) po całkowitym wycięciu żołądka.

Fig. 21. Roux-en-Y reconstruction (*anastomosis oesophago-jejunalis termino-lateralis cum jejuno-jejunoanastomosis termino-/latero-lateralis*) after total gastrectomy.



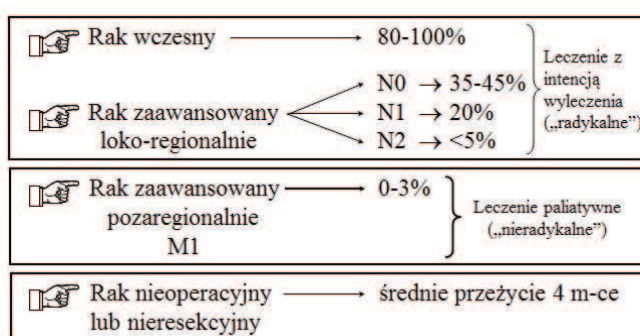
Ryc. 22. Rekonstrukcja wstawką jelitową sposobem Longmire-Henley (*anastomosis oesophago-jejunalis termino-lateralis cum jejuno-duodenoanastomosis termino-terminalis*) po całkowitym wycięciu żołądka

Fig. 22. Longmire-Henley reconstruction with an intestinal insert (*anastomosis oesophago-jejunalis termino-lateralis cum jejuno-duodenoanastomosis termino-terminalis*) after total gastrectomy

1.13.4. Wyniki leczenia raka żołądka

Najlepsze wyniki leczenia raka żołądka uzyskuje się w Japonii, gdzie udoskonalono system wczesnej diagnostyki w oparciu o badania radiologiczne (podwójny kontrast) i badania gastroskopowe z celowaną biopsją stąd wczesne raki żołądka rozpoznaje się w 60–70% przypadków, w Europie w ok 20% przypadków, zaś w Polsce w około 8% przypadkach.

W oparciu o dostępne statystyczne dane podsumowania szans chorych na 5-letnie przeżycie w raku żołądka zbiorowo przedstawiono na rycinie 23.



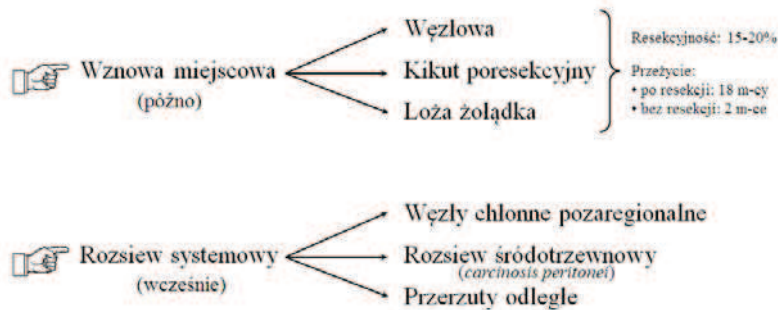
Ryc. 23. Przeżycie 5-letnie w raku żołądka.

Fig. 23. 5-year survival in gastric cancer.

1.13.5. Przyczyny niepowodzeń leczenia raka żołądka

Za niepowodzenie leczenia nowotworów uznaje się wznowy miejscowe (*recidiva*) i/lub dalszy systemowy rozsiew, który prowadzi do powstania odległych przerzutów drogą układu chłonnego (pozaregionalne węzły chłonne), drogą układu krwionośnego (narządy mięszone np.: wątroba, płuca, mózg, nadnercza) lub rozsiew śródtrzewnowy, co prowadzi do zrakowacenia otrzewnej (*carcinosis peritonei*). Wychwyceniu niepowodzeń leczenia służy końcowy etap onkologicznego postępowania, jakim jest monitorowanie leczenia.

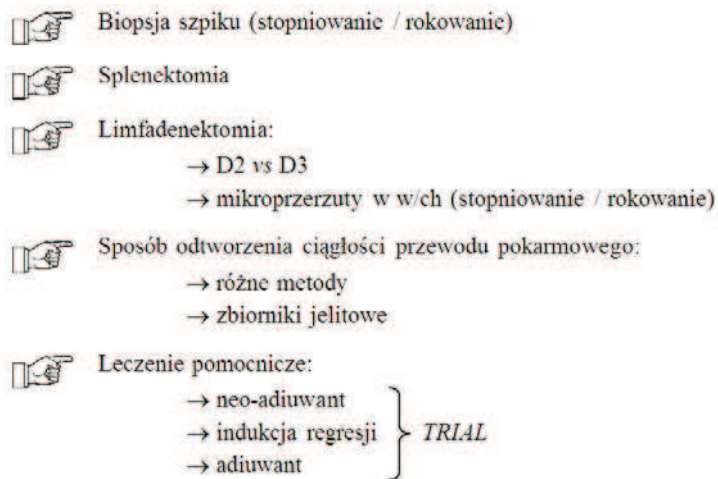
Podsumowanie przyczyn niepowodzeń leczenia raka żołądka z określeniem dalszych szans na leczenie zbiorczo przedstawiono na rycinie 24.



Ryc. 24. Przyczyny niepowodzeń leczenia raka żołądka.
 Fig. 24. Causes of gastric cancer treatment failure.

1.13.6. Elementy kontrowersyjne diagnostyki i leczenia raka żołądka

Leczenie raka żołądka jest trudnym technicznym problemem i nadal istnieje wiele elementów kontrowersyjnych, które zbiorczo przedstawiono na rycinie 25.



Ryc. 25. Elementy kontrowersyjne diagnostyki i leczenia raka żołądka.
 Fig. 25. Controversial elements of diagnostics and treatment of gastric cancer.

1.14. Perspektywy na przyszłość poprawy skuteczności leczenia raka żołądka

Niewątpliwie podstawowym elementem skuteczności w rozwiązywaniu onkologicznych problemów jest szeroko pojęta profilaktyka, następnie wczesna diagnostyka, potem standaryzacja metod diagnostyki, w tym poszukiwanie nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych, potem standaryzacja metod leczenia chirurgicznego oraz randomizowane kliniczne badania w poszukiwaniu skutecznych form onkologicznego leczenia (terapię celowaną).

Sumarycznie kluczowe elementy poprawy skuteczności leczenia raka żołądka przedstawiono na rycinie 26.



Ryc. 26. Kluczowe elementy poprawy skuteczności leczenia raka żołądka.

Fig. 26. Key elements for an improvement of the effectiveness of gastric cancer treatment.

1.15. Biologia raka żołądka

Proces powstawania nowotworu – kancerogeneza w śluzówce żołądka jest zjawiskiem wielostopniowym, podczas którego następuje akumulacja wielu zmian genetycznych. Obejmują one aktywację i nadekspresję onkogenów oraz metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, wyciszanie genów supresorowych, inaktywację genów naprawy DNA i cząsteczek adhezji komórkowej. Zmiany te definiują biologiczne cechy komórek raka i mogą stanowić potencjalny cel terapii antynowotworowej. Utrata heterozygotyczności, mutacje punktowe oraz modyfikacje epigenetyczne obejmujące metylację DNA i regulację transkrypcji przez cząsteczki microRNA również są istotnymi czynnikami wpływającymi na rozwój raka żołądka [254].

W początkowej fazie rozwoju nowotworów żołądka decydujący wpływ mają: aktywacja telomerazy, mutacje punktowe geny p53 oraz niestabilność chromosomów i loci mikrosatelitarnych. Zwiększenie ekspresji genu hTERT i zwiększona aktywność telome-

razy powodują nieśmiertelność komórek nowotworowych, natomiast amplifikacja i zwiększona ekspresja (nadekspresja) genu *c-met*, receptora EGFR i cycliny E może być związana ze stopniem zaawansowania raka żołądka. Nadekspresja czynników wzrostu i angiogenezy prowadzi do progresji raka i powstawania przerzutów. Część tych zmian występuje w dobrze i słabo zróżnicowanych typach raków, a niektóre są specyficzne dla podtypu histologicznego (rozlanego lub jelitowego; [247]).

1.15.1. Zwiększona ekspresja genów w raku żołądka

Amplifikacja niektórych kinaz tyrozynowych (*c-met*, *K-sam* i *HER2*) jest związana z progresją raka żołądka. Alternatywny splicing transkryptów i zwiększony poziom ekspresji niektórych kinaz tyrozynowych związane są z wynikiem klinicznym pacjentów chorych na raka żołądka [155].

Onkogen *c-met*, kodujący receptor dla czynnika wzrostu hepatocytów, ulega amplifikacji w rozlanym typie guza. Nadekspresja genu *c-met* jest związana ze stopniem zaawansowania raka żołądka, rokowaniem i krótszym czasem przeżycia chorych [48].

Innym czynnikiem wzrostu ulegającym nadekspresji jest białko *K-sam*, które jest członkiem rodziny receptora czynnika wzrostu fibroblastów i najczęściej ulega aktywacji w rozlanym typie guzów. Nadekspresję genu *K-sam* wykazuje 32% przypadków rozlanego typu raka żołądka i rokowanie u pacjentów z aktywowanym genem *K-sam* jest gorsze niż w przypadku pacjentów z inaktywowanym *K-sam* [215].

Naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) reguluje podział komórki, migrację, przyleganie komórek, różnicowanie i apoptozę. Wysoki poziom białka EGF okazał się być istotnym czynnikiem prognostycznym nawrotu choroby i złego rokowania w nowotworach żołądka. Nadekspresja białka EGFR jest wczesnym zjawiskiem, ponieważ wzrost ekspresji genu EGFR jest związany ze stopniem rozwoju dysplazji w stanach przednowotworowych. W nowotworach żołądka odkryto, że równoczesna ekspresja czynników wzrostu EGF/TGF-alfa i ich receptora EGFR jest związany z progresją raka i koreluje ze złym rokowaniem oraz czasem przeżycia chorego [250].

Produkt genu *HER2*, który również ulega nadekspresji w raku żołądka, jest glikoproteiną o aktywności kinazy tyrozynowej, homologiczną do receptora naskórkowego czynnika wzrostu. Przeprowadzone badania wykazały, że nadekspresja genu *HER2* zachodzi jelitowym typie raka żołądka i może służyć jako prognostyczny marker inwazji guza i przerzutowania do węzłów chłonnych. Nadekspresja genu *HER2* jest niezależnym prognostycznym czynnikiem związanym z krótszym czasem wolnym od choroby i całkowitym przeżyciem [64].

Wykazano również korelację pomiędzy nadekspresją kinazy GSK-3 β , a gorszym rokowaniem pacjentów chorych na raka żołądka. Podwyższenie poziomu białka GSK-3 β prowadzi poprzez indukcję białek Snail i β -kateniny do zwiększenia migracji komórek raka [138].

Ścieżka sygnalizacyjna genu *Wnt*, który oddziałuje z β -kateniną, często ulega aktywacji w raku żołądka. Podwyższona ekspresja *Wnt* i/lub receptora ligandu *Wnt* wraz z podwyższeniem poziomu białka *Rac1* i inaktywacją genu *APC* prowadzi do powstania słabo zróżnicowanego guza o większej inwazyjności [203].

Onkogen *c-myc* koduje wielofunkcyjną, fosfoproteinę jądrową, która odgrywa istotną rolę w postępie cyklu komórkowego, apoptozie i transformacji komórkowej poprzez

regulację transkrypcji określonych genów docelowych. Wykazano, że ilość białka c-myc jest znacząco podwyższona w dobrze zróżnicowanych rakach żołądka i związana z gorszym rokowaniem [183]. W prawidłowych komórkach białko c-myc ulega szybkiej degradacji, jego stabilność jest zwiększona w komórkach transformowanych nowotworowo. Jedną z przyczyn zwiększenia stabilności jest zwiększona ekspresja białka onkogenego CIP2A, a ekspresja białka CIP2A związana jest z zmniejszonym całkowitym przeżyciem pacjentów chorych na raka żołądka [91].

Nadekspresja cykliny E, która reguluje przejście cyklu komórki z fazy G1 do S, jest związana z inwazyjnością i proliferacją komórek nowotworowych i może być markerem agresywności guza. Podwyższona ekspresja tego genu zwiększa głębokość inwazji guza i potencjał metastatyczny zarówno w rozlanym, jak i w jelitowym typie raka żołądka [108].

Gen PRL3 koduje białko należące do klasy prenylowanych białek fosfataz tyrozynowych. Białka te są cząsteczkami sygnałowymi, które regulują różne procesy komórkowe. Bessette i współpracownicy [14] wykazali istotną rolę prognostyczną genu PRL3 w guzach litych guzach, m.in. w raku żołądka. Wysoka ekspresja PRL3 wiąże się z kilkoma klinicznymi parametrami, takimi jak wielkość guza, głębokość inwazji, przerzutów do węzłów chłonnych, zaawansowanym stadium rozwoju oraz krótszym całkowitym przeżyciem.

Jednym z kluczowych izoenzymów w produkcji prostaglandyn jest białko COX2. Jego nadekspresja jest związana z procesem kancerogenezy. Wykazano, że aktywacja genu COX2 w raku żołądka wpływa na wiele procesów prowadzących do inwazji guza, takich jak angiogeneza, przetrwanie, proliferacja, różnicowanie, inwazja i immunosupresja, skutkując złym rokowaniem [212].

Angiogeneza jest regulowana przez kilka czynników produkowanych przez komórki raka i podścieliska. Powstanie nowych naczyń krwionośnych pobudza wzrost pierwotnego guza i proces przerzutowania. W raku żołądka wykazano związek pomiędzy ilością mikronaczyń, potencjałem metastatycznym i złym rokowaniem. Wśród najlepszych znanych czynników angiogenezy komórek raka żołądka jest naczyniowy czynnik wzrostu nabłonka (VEGF), interleukina (IL-8), podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) i pochodny trombocytów, czynnik wzrostu komórki nabłonkowych (PDECGF; [49]). Wykazano związek z podwyższoną ekspresją genu VEGF z przerzutami do węzłów chłonnych, co skutkuje złym rokowaniem u pacjentów chorych na raka żołądka. Większość przypadków raka żołądka wykazuje podwyższoną ekspresję IL-8 i receptora IL-8, co koreluje z procesem neowaskularyzacji [225].

Czynnik indukowany hipoksją HIF1 α , jest czynnikiem transkrypcji, który odgrywa podstawową rolę w procesie komórkowej i ogólnoustrojowej odpowiedzi na niedotlenienie. Białko HIF1 α pobudza ekspresje genów związanych z angiogenezą m.in. VEGF. Podwyższony poziom czynnika HIF1 α związany jest z krótszym całkowitym przeżyciem pacjentów chorych na raka żołądka [67].

Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) to rodzina cynkowo-zależnych endopeptydaz związanych z procesami degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, remodelingiem tkanki, inwazji nowotworowej i przerzutowaniu. Wykazano, że nadekspresja MMP7 i MMP-11 skutkuje krótszym czasem przeżycia u chorych na raka żołądka [107].

Proteazy i ich inhibitory również odgrywają istotną rolę w inwazji guza i metastazie. Podwyższony poziom ekspresji genu uPA oraz zmniejszony jego inhibitora PAI1 skutkuje większą inwazyjnością raka żołądka i gorszym rokowaniem [15].

Osteonektyna (SPARC) moduluje oddziaływanie komórka – macierz pozakomórkowa. SPARC zmienia przepuszczalność błony komórkowej, kształt komórki, proliferację, migrację i połączenia komórkowe, może również odgrywać znaczącą rolę w angiogenezie. Wykazano związek z nadekspresją tego genu w raku żołądka, wystąpieniem przerzutów odległych i gorszym rokowaniem [87].

Mucyna jest wysoko-cząsteczkową glikoproteiną zawierającą oligosacharydy, która tworzy główne komponenty śluzu ochraniającego nabłonek żołądka. Nadekspresja genu mucyny 1 (MUC1) przyspiesza inwazję guza przez zmniejszenie ilości białka kadheryny E, co wiąże się ze złym rokowaniem u pacjentów chorych na raka żołądka [258].

1.15.2. Wyciszanie ekspresji genów w raku żołądka

Utrata obu rodzicielskich alleli (LOH) genów supresorowych (TSG – *tumor suppressor genes*) skutkuje transformacją nowotworową komórek. Wyciszanie ekspresji genów TSGs może nastąpić w wyniku mutacji punktowych, utraty heterozygotyczności oraz metylacji promotora [55].

Jednym z najważniejszych genów supresorowych jest p53, nazywany strażnikiem genomu. Produkt genu p53 odgrywa podstawową rolę we wzroście i podziale komórki. Białko p53 w momencie wykrycia uszkodzeń DNA zatrzymuje cykl komórkowy i inicjuje naprawę DNA lub, w przypadku poważnych uszkodzeń, prowadzi do kontrolowanej śmierci komórki (apoptoza). Utrata funkcji p53 najczęściej następuje w wyniku utraty heterozygotyczności i mutacji DNA. Mutacje p53 są obecne w około 40% wczesnych i zaawansowanych, dobrze zróżnicowanych raków żołądka. Niższą częstotliwość mutacji genu p53 wykryto u młodszych pacjentów w porównaniu do starszych [178].

Białko p53 regulujące cykl komórkowy pełni swoją funkcję poprzez inne czynniki. Jednym z nich jest cyklino-zależny inhibitor 1 kinazy (CDK1) – białko p21. Punkty kontrolne cyklu komórkowego są kontrolowane przez kaskadę fosforylacji. Kinazy, czyli białka fosforyzujące, są aktywowane przez cykliny i są dezaktywowane przez CDK1, chociaż poziom białka p21 jest podwyższony nie tylko przez oddziaływanie p53, ale również przez gen TGFβRII. Poziom ekspresji p21 wskazuje nieobecność funkcjonalnego białka p53 w komórkach nowotworowych. Wykazano, że czas przeżycia pacjentów chorych na raka żołądka z guzem o podwyższonej ekspresji p21 jest znacząco dłuższy niż chorych z guzem bez ekspresji p21 [108]. Poziom ekspresji genu p21 zwykle jest szacowany w połączeniu z oznaczeniem statusu genu p53 i wykorzystuje się go do przewidywania rezultatu klinicznego u chorych na raka żołądka [190].

Sugeruje się również, że inny cyklino-zależny inhibitor p27, który podobnie jak białko p21 kontroluje przejście z fazy G1 do S cyklu komórki, ma znaczenie rokownicze w raku żołądka. Zmniejszenie ekspresji genu p27 jest obserwowane w 40–50% przypadków [161]. Wykazano również, że guzy o niskim poziomie białka p27 są słabo zróżnicowane i bardziej agresywne. Gen p27 w połączeniu z p53 i p21 wykorzystuje się jako markery prognostyczne [237].

Do genów supresorowych, które również ulegają dezaktywacji w raku żołądka należy RUNX3 kodujący czynnik transkrypcyjny (*member of the runt domain-containing family of transcription factors*). Gen ten pozytywnie reguluje ekspresję BIM i p21 i ujemnie reguluje naczyniowy czynnik wzrostu (VEGF), w ten sposób oddziałując na apoptozę, hamowanie wzrostu komórki i angiogenezę. Utrata ekspresji genu RUNX3

następuje w wyniku hemizygotycznej delecji oraz hypermetylacji u około 55% pacjentów chorych na raka żołądka i wiąże się z krótszym czasem przeżycia [76].

Białka BCL2 i p53 biorą wspólnie udział w regulacji apoptozy. Utrata heterozygotyczności loci genu BCL2 często jest wykrywana w raku żołądka. Jednakże wykazano również, że nadekspresja genu BCL2 może odgrywać istotną rolę w procesie kancerogenezy śluzówki żołądka. Zwiększony poziom białka BCL2 zmniejsza aktywność proliferacyjną komórki i wiąże się z mniej agresywnym zachowaniem guza. Prognostyczna rola BCL2 nie została jeszcze wyjaśniona [115].

Inny gen supresorowy pRb (Retinoblastoma) koduje białko, które jest negatywnym regulatorem cyklu komórki. Gen supresorowy Rb ulega zmianom w mniej niż 10% przypadków raka żołądka. Z powodu dużej wielkości i natury zmian tego genu trudno jest niezawodnie identyfikować jego mutacje. Wykazano również związek ze spadkiem ekspresji genu Rb i złym rokowaniem u pacjentów chorych na raka żołądka [59].

Gen FHIT koduje hydrolazę Ap3A należącą do rodziny genów triady histydynowej (*histidine triad*) i jest inaktywowany przez delecję albo metylację w raku żołądka. Dezaktywacja białka FHIT umożliwia przejście cyklu komórkowego z fazy G1 do S, co koreluje z wyższym stadium guza (*stage*) i stopniem histopatologicznym, jak również z krótszym całkowitym przeżyciem pacjentów [264].

W rakach żołądka często dochodzi do inaktywacji genu APC, którego funkcją jest degradacja β -kateniny. W wyniku spadku poziomu białka APC następuje akumulacja β -kateniny, co prowadzi do zwiększenia ekspresji genów związanych ze wzrostem inwazyjności nowotworu żołądka [124].

Białko NM23 (kinaza difosforanu nukleozydu) jest członkiem rodziny kinaz NDP. Ekspresja genu NM23 jest zmniejszona w przerzutującym czerniaku i liniach komórkowych raka piersi. Transfekcja tego genu do linii komórkowych oddziałuje na inwazyjność, ruchliwość, kolonizację, różnicowanie i metastazę. Zmniejszoną ilość białka NM23 obserwowano w zaawansowanych stadiach wielu rodzajów nowotworów, w tym w raku żołądka [102]. Wykazano, że obecność białka NM23 w raku żołądka jest związana ze znacznie mniejszym potencjałem metastatycznym i z przedłużonym całkowitym przeżyciem. Jednakże część badaczy sugeruje brak związku pomiędzy ekspresją tego genu a przerzutowaniem w przypadkach raka żołądka [151].

Cząsteczki adhezji komórkowe są ściśle związane z rozwojem nowotworów. Superrodzina glikoprotein błonowych – kadheryn tworzy jedną z czterech klas cząsteczek adhezji. Kadheryna E, jeden z członków tej rodziny ulegający ekspresji w tkance nabłonkowej, jest nie tylko cząsteczką przylegania komórek, ale też odgrywa istotną rolę we wzroście komórek i rozwoju raka. Prawidłową funkcją kadheryny E jest utrzymanie polarności tkanki nabłonkowej i jej strukturalnej integralności. Około 25–40% dziedzicznych raków żołądka typu rozlanego jest spowodowanych przez heterozygotyczność oraz inaktywację drugiego allelu w następstwie mutacji lub metylacji promotora tego genu, co skutkuje unieczynnieniem funkcji białka [13]. Zredukowany poziom białka kadheryny E koreluje z większą agresywnością raka żołądka – naciekaniami i zdolnością przerzutowania. Chorzy na raka żołądka z wysokim poziomem kadheryny E wykazywali znacząco wyższy współczynnik 3- i 5-letniego czasu przeżycia, w porównaniu do pacjentów z inaktywowanym białkiem kadheryny E [157].

W raku żołądka często dochodzi do wyciszenia ekspresji czynnika TFF1 poprzez hipermetylację promotora tego genu. W prawidłowej śluzówce żołądka białko TFF1 stabilizuje mucyny wydzielane przez tkanki żołądka, posiada również aktywność anty-

proliferacyjną i proapoptotyczną, a także bierze udział w różnicowaniu komórek. W przypadku obniżonej ekspresji genu TFF1 następuje szybki rozwój i progresja raka żołądka [60].

1.15.3. Aktywność telomerazy w komórkach raka żołądka

W prawidłowych komórkach, przy każdym podziale następuje skracanie telomerów, których podstawową funkcją jest utrzymanie integralności chromosomów. W trakcie podziału komórki telomery ulegają skróceniu, chroniąc komórki przed transformacją nowotworową i prawdopodobnie odpowiada za proces starzenia się komórek. Komórki nowotworowe nabierają cech nieśmiertelności dzięki aktywnej telomerazie, która zapobiega skracaniu telomerów. W raku żołądka, niezależnie od typu histologicznego i stadium nowotworu, wykazano zwiększoną aktywność telomerazy (hTERT) [125].

Innym czynnikiem biorącym udział w funkcjonowaniu telomerów jest białko POT1, które również przyłącza telomerazę do końców chromosomów. W początkowym stadium raka żołądka wykazano obniżony poziom tego białka skutkujący dysfunkcją telomerów, powodując powstawanie mostków anafazowych oraz niestabilność chromosomów inicjując proces transformacji nowotworowej. Natomiast w zaawansowanym raku żołądka poziom ekspresji genu POT1 ulega podwyższeniu [103].

1.15.4. Zmiany epigenetyczne

Wśród zmian epigenetycznych, odwracalnych zmian ekspresji genów, które następują w raku żołądka, nieprawidłowa transkrypcja regulowana przez czynniki transkrypcji, modyfikacje potranskrypcyjne (takie jak ubikwitynozależna degradacja białek). Regulacja ekspresji genów na poziomie transkrypcyjnym, taka jak metylacja DNA, modyfikacja histonów i remodeling chromatyny działają jak przycisk włącz-wyłącz, natomiast czynniki transkrypcji służą jako przełącznik głośności [247]. Zwiększona metylacja wysp CpG prowadzi do wyciszenia transkrypcji i inaktywacji genów supresorowych, chroniących komórki przed transformacją nowotworową. W raku żołądka nieprawidłowa metylacja obejmuje geny supresorowe, takie jak *p16*, *CDHI*, *hMLH1*, *RAR - beta*, *RUNX3*, *MGMT* (O6-metylguanina metyltransferaza), *TSPI* (thrombospondin-1), *HLTF* (helicase-like transcription factor) i *RIZ1* (retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene-1), z częstotliwością metylacji od 10% do 70%. Zwiększona metylacja DNA przynajmniej 5 genów spośród: *hMLH1*, *MGMT*, *p16*, *CDHI*, *RAR - beta*, *HLTF*, *RIZ1*, *TM*, *FLNs*, *LOX*, *HRASLS*, *HAND1* była częściej obserwowana w III i IV w stopniu zaawansowania raków niż w I i II. Wskazuje to wskazuje, że metylacja DNA genów supresorowych postępuje w trakcie progresji guza [160].

Zwiększenie stopnia upakowania struktury chromatyny przez deacetylację histonów również istotnie wpływa na wyciszenie ekspresji genów. W raku żołądka stopień hypoacetylacji jest związany z głębokością inwazji guza i z przerzutami węzłowymi. Hypoacetylacja histonów H3 i H4 w regionie promotora genu p21 występuje w przeszło połowie przypadków raka żołądka i związana z zmniejszoną ekspresją p21, bez względu na status genu p53 [135]. Zwiększona acetylacja histonów w liniach komórkowych raka żołądka, uzyskana poprzez traktowanie trichostatyną-A (inhibitor deacetylazy histonów - HDAC)

wywołuje zahamowanie wzrostu, wywołuje programowaną śmierć komórkową (apoptozę) i hamuje inwazję guza. Modyfikacja histonów może w przyszłości stanowić cel terapii antynowotworowej [16].

Spadek metylacji onkogenów (genów, których aktywacja związana jest z rozwojem nowotworów), takich jak CDH1 [65], DKK3 [256], PTEN i MGMT [82], oraz prawdopodobnych onkogenów, takich jak TFPI2 i CACNA2D3 oraz innych genów związanych z procesem transformacji nowotworowej (PCDH10 i SOX2), wiąże się z krótszym czasem wolnym od choroby i całkowitym przeżyciem [38].

Połączone użycie markerów metylacji *APC* i *CDH1* charakteryzowało podgrupę pacjentów z gorszym rokowaniem. Odwrotnie jest w przypadku metylacji pojedynczych genów związanych lepszą prognozą w niektórych przypadkach. Chorzy na raka żołądka wykazujący metylację genu *APC*, regionu M1 promotora genu *MAL* i oraz genu *COX2* wykazywali dłuższy czas przeżycia, w porównaniu do pacjentów bez metylacji tych genów [109].

1.15.5. Rola mikroRNA w rozwoju raka żołądka

Ostatnio wiele uwagi poświęca się roli microRNA w rozwoju i progresji raka żołądka. miRNA jest nową klasą małych, niekodujących cząsteczek RNA o długości 19-25 nukleotydów, które powstają z prekursorowego (pre-miRNA) o długości od 60 do 110 zasad przez kompleks białkowy Dicer [23]. Jednoniciowe cząsteczki miRNA wiążą przez całkowitą lub częściową komplementarność sekwencji do regionu nietranskrybowanego 3' docelowych genów, powodując degradację mRNA lub zahamowanie translacji. Ekspresja ponad 30% ludzkich genów jest regulowana przez ten mechanizm. badania sugerują, że cząsteczki miRNAs mogą brać udział w procesach transformacji nowotworowej i posiadają właściwości antynowotworowe lub onkogenne w zależności regulacji docelowych genów. Opisano wiele różnych cząsteczek miRNA o zmniejszonym poziomie ekspresji miR -9, miR -31, miR -141, miR -143, miR -145 i miR -433, jak również o podwyższonym poziomie miR -34, miR -128 i miR -421 w raku żołądka [251].

Ueda i wsp. [221] badali zależność pomiędzy ekspresją miRNA i progresją oraz rokowaniem raka żołądka w populacji japońskiej wykorzystując analizę mikromacierzową. Wykazali podwyższoną ekspresję 22 miRNA (miR-181d, miR -181a, miR -181c, miR -181b, miR -21, miR -25, miR -92, miR -93, miR -17-5p, miR -106a, miR -20b, miR -135a, miR -425, miR -106b, miR -20a, miR -19b, miR -224, miR -18a, miR -135b, miR -19a, miR -345 i miR -191, kiedy na obniżone miRNAs zawierają miR -148a, miR -148b, miR -375, miR -29b, miR -29c, miR -152, miR -218, miR -451, miR -30d, miR -30a, miR -30b, miR -30c i miR -422b) i 13 było obniżonych w raku żołądka w porównaniu do niezmięnionej nowotworowo śluzówki żołądka. W związku z klasyfikacją histologiczną raka żołądka, miR -105, miR -100, miR -125b, miR -199a, miR -99a, miR -143, miR -145 i miR -133a ulegają nadekspresji w rozlanym typie, podczas gdy miR -373, miR -498, miR -202 i miR -494 są podwyższone w jelitowym typie. Cząsteczki miR -125b, miR -199a i miR -433 są najważniejszymi miRNAs włączonymi w progresję raka. Niska ekspresja let-7g i miR -433 i oraz wysoki poziom miR -214 są niekorzystnymi markerami prognostycznymi w analizie wielu zmiennych.

Inne badania ekspresji cząsteczek miRNAs wykazały zmniejszony poziom miR -200a, miR -200b, miR -200c i miR -141 w rozlanym typie raka żołądka. Ważnym

czynnikiem rozwoju raka żołądka typu rozlanego jest przejście epidermalno-mezenchymatyczne (EMT – epithelial-mesenchymal transition) inicjujące proces przerzutowania przez zwiększenie ruchliwości komórek guza. Przekształcenie EMT wywołane przez czynnik TGF β w systemie mysich komórek nabłonkowych sutka, poziom ekspresji klasy miR-200 ulega zmniejszeniu. nadekspresja miR-200 hamuje EMT przez podwyższenie poziomu białka kadheryny E poprzez inaktywację genów ZEB1 i ZEB2, które kodują represory transkrypcji kadheryny E. W wyniku zmniejszonej ekspresji cząsteczek klasy miR-200 następuje rozwój raka żołądka typu rozlanego [105].

Około 40% przypadków raka żołądka wykazuje nadekspresję czynnika transkrypcji E2F-1. Gen E2F-1 dodatkowo reguluje ekspresję miR-106b, miR-93 i miR-25, które hamują syntezę białek p21 i Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) uniemożliwiając zatrzymanie cyklu komórki i apoptozę [166].

Wiadomo również, że ekspresja genów kodujących cząsteczki miRNA, tak jak geny kodujące białka, również jest regulowana przez metylację DNA i remodeling chromatyny [188]. Infekcja *H. pylori* sprzyja rozwojowi raka żołądka. U osób chorych na raka żołądka oraz zdrowych badano poziom metylacji trzech genów kodujących miRNA (miR-124a-1, miR-124a-2 i miR-124a-3) w śluzówce żołądka z i bez infekcji *H. pylori*. W śluzówce żołądka pochodzącej od zdrowych osób, poziomy metylacji były znacząco wyższe w przypadku infekcji *H. pylori* niż. Wykazano również, że poziom metylacji były znacząco wyższy w śluzówce niez zmienionej nowotworowo pochodzącej od pacjentów chorych na raka żołądka niż pochodzącej od zdrowych osób. Poziomy metylacji w raku żołądka były wysoce zmienne, co sugeruje, że metylacja genów miRNA, oraz genów kodujących białka, predysponuje do raka żołądka [6].

1.15.6. Niestabilność genomowa

Wyróżniamy dwa typy niestabilności genomowej występujące w raku żołądka: niestabilność mikrosatelit (MSI) oraz niestabilność chromosomów (CIN). Niestabilność loci mikrosatelitarnych jest spowodowana w wyniku nieprawidłowego funkcjonowanie systemu naprawy złego dopasowania DNA (DNA mismatch repair system; [74]). MSI jest wynikiem spontanicznych błędów replikacji DNA w prostych powtarzających się sekwencjach. Standardowy panel markerów mikrosatelitarnych (panel Bezeza), obejmujących jednonuklotydowe (*BAT26* i *BAT25*) i dwunuklotydowe (*D2S123*, *D5S346* i *D17S250*) powtórzenia pozwala zidentyfikować 3 poziomy niestabilności mikrosatelitarnej: wysoki poziom MSI (MSI-H), niski poziom MSI (MSI-L) i stabilne mikrosatelity (MSS; [17]). Wykazano, że powtórzenia jednonukleotydydowe mogą posłużyć do wykrywania guzów o wysokim poziomie niestabilności (MSI-H) z powodu ich wysokiej czułości i specyficzności oraz, że MSI-L jest zdefiniowana jako niestałość ograniczona do loci dwunukleotydydowych. Wykorzystując panel Betezda, fenotyp MSI-H wykryto w 5%–50% przypadków raka żołądka (występowały znaczące różnice różnych grupach etnicznych; [62]). MSI-H okazał się być markerem fenotypowych uszkodzeń komórkowych związanych z naprawą złego dopasowania DNA (DNA mismatch repair MMR). Funkcjonalna inaktywacja, poprzez mutacje albo epigenetyczne modyfikacje genów MMR, w tym *hMLH1* i *hMSH2*, jest odpowiedzialna za fenotyp MSI-H w żołądkowym raku. Wykryto utratę ekspresji białka *hMLH1* albo *hMSH2* w rakach żołądka z wysokim poziomem niestabilności mikrosatelitarnej (MSI-H; [196]).

MSI-H w raku żołądka związane są z molekularną ścieżką progresji guza, charakteryzującą się obecnością licznych mutacji przesunięcia ramki odczytu (frameshift) oddziałujących na geny włączone w ścieżki molekularne związane z procesami kancerogenezy w śluzówce żołądka, które kontrolują komórkową homeostazę na różnych poziomach i obejmują geny regulujące cykl komórkowy i apoptozę takie jak TGFβRII, IGF1R, TCF4, RIZ, BAX, CASPASE5, FAS, BCL10 i APAF1 [78]. Ponadto, geny włączone w utrzymanie stabilności genomowej, np.: hMSH6, hMSH3, MED1, RAD50, BLM, ATR i MRE11, również ulegają zmianom w guzach MSI-H. W większości przypadków raka żołądka o fenotypie MSI-H, wiele docelowych genów ulega mutacjom, a ilość tych zmian wpływa na różne geny w tej samej ścieżce molekularnej. W przypadku raków żołądka z o fenotypie MSS i MSI-L dominują mutacje genu p53 [95].

Niestabilność chromosomowa (CIN) jest cechą różnych nowotworów, w raka żołądka. CIN zwykle związane z aberracjami chromosomowymi odpowiedzialnymi za główne modyfikacje DNA, np.: zmiana w liczby kopii chromosomu, utrata heterozygotyczności, delecje genów lub ich amplifikacja [182]. Wszystkie te zmiany mogą prowadzić do aktywacji onkogenów lub inaktywacji genów supresorowych. Aneuploidalność w raku żołądka jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym [150].

Wysoki poziom CIN związany jest z krótszym przeżyciem chorych na raka żołądka, a wysoki częstość LOH została wykryta w kilku chromosomach: 1p, 3p, 4p, 5q, 7p, 8p, 8q, 9p, 12p, 13q, 17p, 18q, 20q i 22q [22]. Allelotype raka żołądka jest podobny do raka odbytnicy i raka przetyku, co sugeruje obecność wspólnej ścieżki genetycznej rozwoju tych nowotworów. Niektóre z tych chromosomowych segmentów zawierają geny, którzy silnie związane są transformacją nowotworową, np. gen p53 na chromosomie 17, geny DCC, DPC4 i SMAD2 na chromosomie 18 oraz APC i MCC gen na chromosomie 5. niektóre badania wskazują, że raki z LOH w chromosomie 5q, 18q lub 17p mają gorsze rokowanie [10].

1.15.7. Predyspozycja genetyczna do raka żołądka

Badania epidemiologiczne opisują kilka stosunkowo powszechnych genetycznych wariantów jako biomarkerów predyspozycji rozwoju raka żołądka, tj. polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNPs). Zmiany te mogą modulować skutki ekspozycji na czynniki środowiskowe poprzez regulowanie wielu ścieżek biologicznych podczas karcynogenezy śluzówki żołądka [253].

Genetyczne warianty w genach związanych z odpowiedzią immunologiczną na zapalenie, szczególnie cytokiny i ich receptory, odgrywają istotną rolę w inicjacji i progresji nowotworowej [63]. Badania przeprowadzone przez Zhuang i wsp. [265] wykazały, że polimorfizm promotora interleukiny 10 (IL -10) -592C >A może być związany z rakiem żołądka w populacji azjatyckiej. Won i wsp. [239] wykazali wpływ polimorfizmu IL-10-1082 A>G na ryzyko zachorowania na raka żołądka w populacji Azji Wschodniej, polimorfizm ten nie odgrywa istotnej roli w populacji kaukaskiej, co może wskazywać na różne mechanizmy selekcji w populacji azjatyckiej i kaukaskiej. Inni badacze wskazują na związek między wariantem IL17F A7488G interleukiny i rozwojem raka żołądka, szczególnie typu jelitowego. Persson i wsp. [165] wykonali metaanalizę polimorfizmów genów związanych z odpowiedzią immunologiczną na zapalenie. Badania te wykazały związek pomiędzy polimorfizmem IL -1RN2 i ryzykiem wystąpie-

nia raka żołądka w populacjach nie azjatyckich. W populacji azjatyckiej nosiciele polimorfizmu C dla IL1 β -31 mieli zmniejszone ryzyko raka.

Genetyczne warianty SNP w genach niezwiązanych z zapaleniem również wykazują z transformacją nowotworową w śluzówce żołądka. Saeki i wsp. [180] wskazują zwiększone ryzyko rozwoju raka żołądka, w szczególności typu rozlanego, u nosicieli polimorfizmu rs4072037 w genie mucyny 1 (MUC1). Wykazali również, że polimorfizm rs4072037 odgrywa również rolę w regulacji selekcji miejsca splicingu genu MUC1.

Proces metylacji DNA jest główną epigenetyczną modyfikacją, a nieprawidłowy proces metylacji genów często obserwowany jest w nowotworach [58]. Dlatego też, poddano badaniom promotor genu metylotransferazy DNA 3 β (DNMT3 β). Okazało się, że allel 579G zmniejszał ryzyko rozwoju raka żołądka, przeciwnie genotyp -599TT predysponował do raka [77].

Ścieżka sygnałowa czynnika wzrostu TGF β jest jedną z najważniejszych ścieżek genów supresorowych. Białka SMAD są decydującymi komponentami ścieżki TGF β , która hamuje wzrost i prowadzi do apoptozy komórek nabłonkowych [40]. Utrata ekspresji białka SMAD4 prowadzi do progresji raka żołądka. Wu i wsp. [241] wykazali związek genetycznych wariantów w genie SMAD4 z ryzykiem rozwoju raka żołądka. Zmniejszone ryzyko rozwoju raka związane było z występowaniem allelu C w pozycji rs17663887 i allelu G w pozycji rs12456284 oraz zwiększoną ekspresją genu SMAD4.

Proteolityczna degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej jest istotnym czynnikiem w procesie angiogenezy, inwazji guza i przerzutowaniu. Gen SERPINE1 (Serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1), odgrywa kluczową rolę w kancerogenezie zapobiegając nadmiernej proteolizie, która jest konieczna w morfogenezie naczyń włosowatych, migracji komórek i inwazji [41]. Według Ju i wsp. [86] polimorfizm w intronie 7 genu SERPINE1 (c.1162 + 162C > T) silnie jest związany z predyspozycją wystąpienia raka żołądka typu rozlanego.

Białko NAT1 posiada aktywność N-acetyltransferazy, która katalizuje acetylację i modyfikacje aromatycznych i heterocyklicznych, aminowych czynników rakotwórczych. Znacząco zwiększone ryzyko wystąpienia raka żołądka jest związane z polimorfizmami 1088 T > A oraz 1095 C > A występującymi w genie NAT1 [63].

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) w domenie międzybłonowej genu HER2 (655 Ile>Val, A> G) znacząco podwyższa ryzyko wystąpienia raka żołądka. SNP w regionach promotora genu metaloproteinazy MMP9 (-1562 C/T) nie zmienia podatności na raka ale jest związany z inwazją, metastazą, lub stadium raka żołądka [134]. Inne polimorfizmy genów związanych z rozwojem raka żołądka występują w cyklinie D1, CDH1, EGFR, p16, p21 i innych [53]. Ostatnio wykazano, że genetyczna zmiana w genie PSCA (*prostate stem cell antigen*) jest związana z podatnością na raka żołądka typu rozlanego i obejmuje m.in. intronowy SNP (rs2976392). Gen PSCA ulega ekspresji w zróżnicowanych komórkach nabłonka żołądka i często jest inaktywowany w raku żołądka. Białko PSCA hamuje proliferację komórek. Substytucja C allelem ryzyka T w rs2294008 w pierwszym eksonie genu PSCA zmniejsza aktywność transkrypcyjną tego genu [205].

Polimorfizmy genetyczne są związane również ze skutecznością i toksycznością terapii z zastosowaniem leków antynowotworowych. Genotyp CYP2C19 wpływa tempo zwalczania infekcji *H. pylori* i jest wykorzystywany do przewidywania skuteczności leczenia [207]. Ważnym czynnikiem, który wpływa na toksyczność chemioterapii jest genotyp genu glukuronozylotransferazy UGT1A1 (UDP-glucuronosyltransferase 1A1).

Polimorfizm VNTR w regionie promotora genu TYMS (*synthase thymidylate*) wpływa na leczenie z wykorzystaniem 5-fluorouracylu [80].

Istnieje ścisła zależność pomiędzy występowaniem polimorfizmów genetycznych a ryzykiem występowania raka żołądka. Polimorfizmy te odgrywają zasadniczą rolę rozwoju raka i wraz z czynnikami środowiskowymi może dostarczyć cennych wskazówek, by wyjaśnić ryzyko wystąpienia choroby w różnych populacjach [175].

1.15.8. Molekularne podstawy procesu nowotworowego w jelitowym i rozlanym typie raka żołądka

Klasyfikacja histologiczna oparta na strukturze gruczołowej rozróżnia raki zróżnicowane i niezróżnicowane lub typy jelitowy i rozlany na podstawie ekspresji mucyn, m.in. MUC5AC, MUC6, MUC2 i CD10 [214]. Wykazano, że gen SOX2 (SRV-related HMG-box2) jest specyficzny dla typu rozlanego, a czynniki transkrypcji CDX1 i CDX2 ulegają ekspresji w jelitowym typie raka żołądka [218]. Ta klasyfikacja jest istotna, ponieważ molekularne różnice między typem rozlanym i jelitowym obejmują m.in. metylację DNA genów naprawy złego dopasowania i niestabilność mikrosatelit, które częściej występują w typie rozlanym G, oraz mutacje genu p53 następują częściej w typie jelitowym raka żołądka. Sugeruje się, że rak żołądka typu jelitowego jest bardziej agresywny biologicznie w porównaniu z guzem typu rozlanego [209].

Wykorzystując metodę seryjnej analizy ekspresji genów (SAGE) poszukiwano nowe geny różnicujące typ rozlany i jelitowy raka żołądka [246]. Metoda ta pozwala na ilościową analizę ekspresji genów, bez wcześniejszej znajomości dokładnej sekwencji poszukiwanych genów. Okazało się, że geny takie jak Reg IV, OLFM4 i CLDN18 wykazywały istotną różnicę ekspresji w zależności od fenotypu guza [249].

Ekspresja genu RegIV (regenerating islet-derived family, member 4) wykrywana jest w ok. 30% przypadków raków żołądka, a białko Reg IV w surowicy 30% pacjentów chorych na raka żołądka [141]. Ekspresja RegIV w liniach komórek raka żołądka wywołała ekspresję fosforylowanej formy receptora EGFR, Bcl-2, Bcl-XL, surwiwiny i AKT. Mucyno-zależna reekspresja RegIV w raku żołądka jest związana z MUC2-pozytywnym typem jelitowym raka żołądka. Gen CDX2 inicjuje ekspresję Reg IV i jest dodatnim regulatorem ekspresji genu RegIV [246]. Natomiast białko SOX9, będące czynnikiem transkrypcji, jest ujemnym regulatorem RegIV. Znaczna część przypadków raka żołądka typu jelitowego wykazuje ekspresję genu SOX9 [186]. Ekspresja genu kadheryny 17 (CDH17) jest również związana z typem jelitowym raka żołądka. Białko CDX2 oraz aktywacja genu EGFR stymulują ekspresję Kadheryny 17 [36].

Olfaktomedyna 4 (OLFM4), została wykryta w ludzkich komórkach szpiku, a produkt tego genu wykazuje aktywność antyapoptotyczną przyspieszając wzrost guza i inwazję. W normalnej śluzówce żołądka, OLFM4 jest ulega ekspresji w wysokich komórkach walcowatych nabłonka na dnie krypty jelitowej. Silna ekspresja OLFM4e jest obecna w 60% przypadków raka żołądka, szczególnie w dobrze zróżnicowanych guzach nie wykazujących ekspresji genu RegIV. Ekspresję genu OLFM4 częściej obserwuje się w typie rozlanym raka żołądka [251].

Gen supresorowy CLDN18 (claudin-18) ulega ekspresji w typie rozlanym raka żołądka [181]. Klaudyny obejmujący 24 członków (*claudins* 1-24) są komponentami silnych nici połączeń (*components of tight junction strands*), które zapobiegają swobodne-

mu przemieszczaniu się wody i substancji rozpuszczonej w przestrzeniach międzykomórkowych nabłonka i śródbłonka, regulują również transdukcję sygnałów i zachowanie biegunowości komórek, a ich ekspresja jest narządowo-specyficzna [220]. Ekspresja genu CLDN18 w śluzówce żołądka jest regulowana przez ścieżkę genów PKC/MAPK/AP-1 (*protein kinase C/mitogen-activated protein kinase/activator protein-1*). CLDN18 ulega ekspresji w błonie komórek nabłonkowych normalnej śluzówki żołądka. W jelitowym typie raka żołądka z ekspresją MUC2 następuje utrata białka CLDN18, natomiast guz MUC5AC-pozytywny typu rozlanego zachowuje ekspresję genu CLDN18, przez co Klaudyna 18 uczestniczy w transformacji raka żołądka typu rozlanego [153].

1.15.9. Infekcja *Helicobacter pylori*

Czynniki wirulecji bakterii *Helicobacter pylori* oraz odpowiedź immunologiczna wywołana są istotnymi czynnikami w rozwoju raka żołądka. Najlepiej zbadanym czynnikiem systemu sekrecji typu IV jest PAI (cag pathogenicity island), który może wywołać ostrą odpowiedź immunologiczną i zwiększyć ryzyko rozwoju raka żołądka [57]. Typ IV systemu sekrecji bierze udział w początkowej fazie infekcji i wywołuje translokację czynników zjadliwości patogenetycznej *H. pylori* np. antygeny CagA (associated antigen A) do komórek nabłonka żołądka. CagA szybko ulega fosforylacji przez kinazę gospodarza Src, zmieniając wewnątrzkomórkową transdukcję sygnałów i zakłóca połączenia komórek nabłonka [178]. Wprowadzone białka CagA prowadzi do aktywacji ścieżki białka MAPK (*Ras-mitogen-activated protein kinase*), w tym zależnej od Ras kinazy ERK1 i ERK2. Aktywacja kaskady Ras-Erk zależna od białka zwiększa również uwalnianie interleukiny 8 (IL8), co prowadzi do aktywacji genu NFκB odpowiedzialnego za inwazję granulocytów neutrofilnych do śluzówki żołądka [20]. Następnie w wyniku infekcji *H. pylori* następuje uwolnienie białka Tip-α indukującego czynnik śmierci guza β (TGFβ) wywołując wysoką ekspresję TGFβ z późniejszą aktywacją ścieżek sygnałowych zależnych od IL8 i COX2 [110]. Opisane wydarzenia przyspieszają procesy transformacji nowotworowej w śluzówce żołądka.

Współdziałanie CagA z systemem kadheryny E i β-kateniny może prowadzić do indukcji genu CDX1 wywołując zmiany metaplastyczne w śluzówce żołądka. Sądzi się, że białko CagA przyczynia się do transformacji nabłonkowo-mezenchymatycznej [9].

Przeprowadzone badania wykazały, że na zwiększenie ryzyka rozwoju raka żołądka, w przypadku pozytywnego statusu CagA, nie wpływają czynniki środowiskowe takie jak dieta, palenie papierosów, albo masa ciała. Jednakże niektóre prace wskazują, że ekspresja CagA może zostać zwiększona przez dietę z dużą zawartością soli, prowadzącą też zwiększone wydzielanie IL8 [123]. Ponadto, zmienność genetyczna bakterii *H. pylori* odgrywa istotną rolę procesie kancerogenezy spowodowanej infekcją. Wprowadzony do komórki CagA jest fosforylowany w motywie glutamina-izoleucyna-tyrozyna-alanina (EPIYA), wywołując zmiany w otaczającej sekwencji aminokwasów. Opisano cztery różne motywy EPIYA (EPIYA -A, -B, -C, -D; [147]). Motywy te wpływają na odpowiedź immunologiczną wywołaną przez CagA, jak również na ryzyko rozwoju raka żołądka. Podobnie jest w przypadku cytotoksyny VacA wykazującym zmiany w strukturze genu, która może zostać podzielona na region sygnalizacyjny (s), środkowy (m) i pośredni (i). Zidentyfikowanie szczepu s1/m1 wykazującego wyższe ryzyko rozwoju

raka żołądka, wykazano również związek nie tylko z rozwojem dysplazji, ale też złośliwą inwazyjnością tkanki [46]. Białko VacA, poprzez fosforylację indukowaną przez Akt/PI3K (phosphatidylinositol - 3 - kinaza), hamuje ścieżkę sygnalizacyjną genu GSK3 β (kinaza synthase glycogen 3 β). Prowadzi to do uwolnienia β -kateniny i moduluje regulację apoptozy i cyklu komórkowego [129].

Zewnętrzblonowe białko BabA ulega ekspresji w 40–95% szczepów *H. pylori* w zależności od regionu geograficznego. Pacjenci zakażeni bakterią z obecnym białkiem BabA wykazywali większą gęstość kolonii bakteryjnych w żołądku i mieli silniejsze zapalenie spowodowane podwyższonym poziomem IL8. Szepy *H. pylori* z ekspresją wszystkich trzech genów (CagA, VacA, BabA) są związane z najwyższym ryzykiem rozwoju raka żołądka [170].

Odpowiedź śluzówki żołądka na zapalenie wywołane infekcją *H. pylori* jest procesem złożonym. Kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej na zakażenie bakterią i odgrywają białka regulujące limfocyty T, głównie CD4, CD25, Treg [226].

Białko Treg wykazuje związek ze zwiększoną liczbą kolonii bakteryjnych, przewlekłymi zmianami zapalnymi [81] i ekspresją immunosupresyjnych cytokin takich jak IL10, IL17 i TGF β [88]. Podczas leczenia infekcji *H. pylori* następuje znaczny spadek liczby komórek T i poziomu ekspresji cytokin w śluzówce żołądka. W przypadku raka żołądka, liczba komórek T jest ulega znacznemu zwiększeniu zarówno w śluzówce jak i we krwi obwodowej [56]. Szczególnie, stosunek komórek Th1 do Th2, który jest najwyższy w bezobjawowym niezycie żołądka wykazuje duży spadek w metaplazji i neoplazji nabłonkowej i gruczolakoraku żołądka. Jest to związane ze wzrostem ilości komórek T w krwi obwodowej i utrzymywaniu się wysokiego poziomu białka CagA sprzyjających przewlekłemu zapaleniu zależnego od komórek T [231]. Badania wykazały, że zwiększona liczba komórek T z ekspresją genu FOXP3 i niskim poziomem CD4, CD25, CD117 związana jest z naczyniową, limfatyczną i odległą inwazją komórek raka żołądka. Podwyższona liczba komórek T koreluje większym stopniem zaawansowania guza [164].

1.15.10. Komórki macierzyste w raku żołądka

Chociaż procesy transformacji nowotworowej mogą nastąpić na poziomie pojedynczej komórki, większość raków składa się z różnorodnych populacji komórek naśladujących model hierarchiczny linii komórek macierzystych. Hipoteza komórek macierzystych raka nie jest całkowicie nowa, a istnienie komórek macierzystych raka odkryto w ostrej białaczce szpikowej, a następnie potwierdzono ich istnienie w guzach litych m.in. w nowotworach piersi, mózgu, prostaty, trzustki oraz żołądka [88]. Komórki macierzyste raka to komórki, które posiadają zdolność samoodnawiania się i powodują powstanie linii heterogennych komórek nowotworowych, które tworzą guz. Istotną cechą komórek macierzystych raka jest odporność na terapię antynowotworową. Komórki te wykazują ekspresję białek transportujących ATP (*ATP-binding cassette family of transporter proteins*), które wypompowują z komórki leki chemoterapeutyczne [32].

W przypadku raka żołądka, Haraguchi i wps. [69] badając subpopulację SP (side population) komórek macierzystych wykazali, że komórki SP stanowiły 0,6-2,2% komórek raka. Komórki SP charakteryzują się ekspresją białek transportujących ABCG2 (*ATP-binding cassette, subfamily G, group 2*) i ABCB1 (*ATP-binding cassette, subfamili-*

ly B, member 1) oraz wykazują zdolność do chemooporności, samoodnowienia oraz różnicowania i wysokiego potencjału rakotwórczego [61]. Wykazują również podwyższony poziom czynników adhezji komórkowej, co wiąże się z wysoką zdolnością naciekania otrzewnej oraz tworzenia przerzutów [154].

Identyfikacja markerów powierzchniowych komórek macierzystych raka jest ważna, w badaniu biologii i znaczenia klinicznego nowotworów żołądka. Zidentyfikowano wiele markerów powierzchniowych komórek nowotworów różnych narządów np.: w ostrej białaczce szpikowej CD34⁺ i CD38⁻, dla raka piersi CD44⁺, CD24^{-/niski}, ESA (*epithelial-specific antigen*), CD44⁺, CD24⁺, ESA⁺ dla raka trzustki, CD44⁺, integryna $\alpha2/\beta1$ ⁺ dla raka prostaty, w nowotworach mózgu i odbytnicy CD133⁺ [4, 224]. Chociaż w raku żołądka, specyficznych markerów powierzchniowych nie zidentyfikowano, to komórki raka żołądka z obecnością antygenu CD44 wykazują własności komórek macierzystych i mogą pobudzać komórki CD44-ujemne. Zablokowanie ekspresji genu CD44 spowodowało zmniejszoną zdolność tworzenia kolonii sferoidalnych, która jest charakterystyczna dla komórek macierzystych raka i wolniejszy wzrost guza u myszy z niedoborem odporności. Komórki SP raka żołądka charakteryzują się silną ekspresją CD44, integryny $\alpha2$, $\alpha5$, $\beta3$, $\beta5$ oraz markerów komórek macierzystych, takich jak Oct3 i 4 oraz Sox2. Ostatnie badania donoszą, że inne markery komórek macierzystych raka, takie jak CD24, CD133, CD166, SSEA1 (stage-specific embryonic antigen-1) i SSEA4 nie wykazują związku z procesem kancerogenezy w raku żołądka [210].

Komórki macierzyste raka posiadają zdolność samoodnawiania podobnie jak prawidłowe komórki macierzyste. Clark i Fuller [31] przedstawili dwie ścieżki rozwoju takich komórek. W pierwszej, mutacje onkogenów inaktywują mechanizmy ograniczające rozrost prawidłowych komórek macierzystych, powodując powstanie komórek macierzystych raka. Sugeruje się, że różnica pomiędzy normalnymi komórkami macierzystymi i komórkami macierzystymi raka wynika ze stopnia zależności od niszy komórki oraz przystosowania do mikrośrodowiska, w którym te komórki się znajdują.

W drugim, mutacje onkogenne mogą prowadzić do nieprawidłowej aktywacji mechanizmu regulującego samoodnowienie komórek macierzystych w komórkach przejściowo-wzmacniający (TA; transient-amplifying; [117]). W badaniach komórek macierzystych żołądka, wykazano, że mutacje mitochondrialnego DNA występują już w normalnej błonie śluzowej i metaplazji jelitowej, co daje wyobrażenie o tym, jak rozwija się proces kancerogenezy. Jednak nie zostało jeszcze rozstrzygnięte, czy komórki macierzyste raka żołądka rozwijają się z normalnych komórek macierzystych lub przejściowo-wzmacniających komórek progenitorowych [136].

1.15.11. Kliniczne i molekularne czynniki rokownicze w raku żołądka

Do klinicznych czynników rokowniczych w raku żołądka należą:

1. Czynniki zależne od chorego:

- wiek (gorsze rokowanie u chorych poniżej 35 roku życia niż u chorych powyżej 60 roku życia)
- płeć (lepsze rokowanie u kobiet niż u mężczyzn)
- przedoperacyjny stan odżywienia (gorsze rokowanie u chorych z niedożywieniem nowotworowym niż u chorych bez cech niedożywienia)

- przedoperacyjny stan układu immunologicznego (chorzy z obniżoną wartością limfocytów we krwi obwodowej rokują gorzej niż chorzy z prawidłowymi wartościami limfocytów)

2. Czynniki zależne od przeprowadzonego leczenia:

- radykalność zabiegu według klasyfikacji R – UICC (Międzynarodowej Unii Przeciwrakowej) (chorzy po zabiegach nieradykalnych: R1-mikroskopowo lub R2-makroskopowo rokują zdecydowanie gorzej niż chorzy po zabiegach R0-mikro-/makroskopowo radykalnych)
- rodzaj zabiegu (chorzy po całkowitym wycięciu żołądka rokują lepiej niż po częściowym wycięciu)
- zakres wycięcia węzłów chłonnych (chorzy po limfadenektomii D2 rokują lepiej niż po limfadenektomii D1)
- rodzaj leczenia uzupełniającego (chorzy ze złymi czynnikami rokowniczymi wymagający leczenia uzupełniającego leczeni chemioradioterapią pooperacyjną rokują lepiej niż leczeni tylko chemioterapią poza chorymi, u których stwierdzono obecność receptora Her2)

3. Czynniki zależne od patologii guza:

- lokalizacja i rozmiar guza (raki okolicy połączenia przełykowo-żołądkowego rokują gorzej niż raki trzonu żołądka; małe guzy poniżej 5 cm średnicy rokują lepiej niż te powyżej 5 cm średnicy)
- typ nacieku według Borrmanna (typ polipowaty rokuje lepiej niż typ naciekający tzw. linitis plastica)
- stopień zróżnicowanie histologicznego (nacieki dobrze zróżnicowane- G1 rokują lepiej niż źle zróżnicowane-G3)
- typ histologiczny według klasyfikacji Laurena (typ jelitowy rokuje lepiej niż typ rozlany)
- głębokość nacieku czyli cecha T według UICC (nacieki T1 rokują zdecydowanie lepiej niż T2, a te lepiej niż T3 i T4)
- ilość zmienionych przerzutowo węzłów chłonnych (N1-przerzuty w 1-6 regionalnych węzłach chłonnych rokują lepiej niż N2-przerzuty w 7-15 węzłach chłonnych i dalej lepiej niż N3- przerzuty w więcej niż 15 regionalnych węzłach chłonnych)
- stosunek ilości węzłów chłonnych zmienionych do całkowitej ilości usuniętych węzłów chłonnych (jeśli ten współczynnik jest poniżej 0,2 to rokowanie jest lepsze, niż gdy jest on powyżej 0,2)
- obecność przerzutów odległych czyli cecha M według UICC (chorzy bez przerzutów odległych – M0 rokują lepiej niż chorzy z przerzutami odległymi-M1 czyli po operacjach paliatywnych)
- obecność nacieku okołonerwowego jest złym czynnikiem rokowniczymi
- obecność nacieku limfatycznego i żylnego jest złym czynnikiem rokowniczymi.

Spośród wymienionych klinicznych cech rokowniczych dla raka żołądka największe znaczenie mają: radykalność zabiegu (klasyfikacja R) stosunek ilości węzłów chłonnych zmienionych do całkowitej ilości usuniętych węzłów chłonnych oraz głębokość nacieku (cecha T)

Jednym z bardziej interesujących podejść do molekularnej identyfikacji czynników rokowniczych o znaczeniu prognostycznym była seria prac, zapoczątkowana przez Perou [163] i Sorlie [199]. Autorzy analizowali przebieg kliniczny raka piersi w odniesieniu do profilu ekspresji genów badanego metodą mikromacierzy. Nie był to jednak ani profil „przypadkowy”, ani też profil selekcyonowany pod kątem związku z rokowaniem choroby. Wzięto pod uwagę te geny, których ekspresja wykazywała dużą zmienność w obrębie raka piersi, w tym w porównaniu do uktania nienowotworowego sutka i wielu wycinków pobranych z guza. Stwierdzono, że podtypy molekularne raka piersi wyodrębnione w ten sposób istotnie różnią się rokowaniem, a podział choroby na 4 grupy (podtyp luminalny A i B, podtyp HER2 i podtyp bazalny) jest obecnie podstawą systemu klinicznej stratyfikacji ryzyka we wczesnym raku piersi i jest w Europie rutynowo stosowany w praktyce klinicznej.

Jednym z pierwszych badań dotyczących raka żołądka jest opublikowana już w 2004 r. przez Jinawath i wsp. analiza dotycząca różnic między rozlanym i jelitowym typem raka żołądka (Jinawath N i wsp. *Oncogene* PubMed 15273739). W ślad za tą analizą pojawiły się pierwsze próby wykorzystania badania mikromacierzowego do identyfikacji genów powiązanych z rokowaniem w tej chorobie, np. Kim i wsp. (*Clin Cancer Res* 2005 PubMed 15701830), jednak postęp badań tego typu w raku żołądka wydaje się wolniejszy niż w innych nowotworach. Następne publikacje dotyczące powiązania ekspresji genów z rokowaniem dotyczyły m.in. znaczenia cząsteczki CD117 (Lee HJ i wsp. *Gastroenterology* 2010), CXCL1 (Xu i wsp. *Int J Cancer* 2012 PubMed 21387301) czy też HOXA10 (Sentani i wsp. 2012, *Carcinogenesis* 2012 PubMed 22411957).

Jednym z ostatnich badań w których wykorzystano technikę profilowania ekspresji genów za pomocą mikromacierzy DNA jest opublikowana w grudniu 2013 analiza Yin i wsp. (*Plos One*, PubMed 24312559). Praca ta oparta jest o wcześniejsze badania autorów dotyczące różnic między ekspresją genów w raku żołądka w porównaniu do zmian które nie uległy transformacji nowotworowej i znaczeniu genów kodujących różne warianty kolagenu. Badanie wykonano za pomocą własnej mikromacierzy zawierającej nieco ponad 1000 wybranych transkryptów potencjalnie istotnych dla raka żołądka. Autorzy podejmują próbę identyfikacji ich znaczenia prognostycznego i pokazują że jest to potencjalnie możliwe; równocześnie jednak opracowany przez nich test nadal nie jest optymalny do zastosowania w diagnostyce klinicznej – pole pod krzywą charakterystyki operacyjnej odbiornika (ROC, *receiver-operating characteristic curve*) jest względnie niskie (AUC=0,56), a dyskryminacja czasu przeżycia w uzyskanych grupach słaba. Dodatkowo, wykonana analiza nie uwzględnia znaczenia czynników klinicznych istotnych dla rokowania ani różnic w ekspresji badanych genów pomiędzy normalną śluzówką żołądka a utkaniem raka. Ten ostatni czynnik może mieć duże znaczenie, gdyż tylko geny wykazujące dużą różnicę ekspresji między rakiem a jego otoczeniem są „odporne” na nieuniknione w rutynowych warunkach pobierania materiału zanieczyszczenie utkania guza podścieliskiem i otaczającymi tkankami które nie uległy pełnej transformacji nowotworowej.

We wcześniej wykonanych przez nas badaniach (Kędzior K. – praca magisterska pt Analiza poziomu ekspresji wybranych genów w raku żołądka. Stojcev Z, Kędzior K i wsp. Comparison of gene expression changes of cell adhesion and angiogenesis-related genes in gastric cancer. Manuskrypt w przygotowaniu) analizowaliśmy szereg wybranych na podstawie dostępnego piśmiennictwa genów potencjalnie o istotnych zmianach w ekspresji w raku żołądka (geny ACK, CCL18, CD36, COL1A, COL4A2, COL6A3,

FN1, LAMC2, MAPK1, OPCML, PDGFD, PIM1, RNASE1, RRM2, SLAM, SLC2A1, SPARC, SPP1, TFF1, THBS2, TIMP1, TOP2A, YES1). Potwierdziliśmy, że część z tych genów wykazuje istotne różnice między ekspresją w raku żołądka a zdrową, niezmienną nowotworowo śluzówką żołądka. To wstępne doniesienie stanowiło punkt wyjścia do dalszych badań nad poszukiwaniem markerów o znaczeniu rokowniczym, czemu poświęcona jest niniejsza rozprawa.

2. CEL PRACY

Celem pracy jest ocena ekspresji profilu ekspresji genów w raku żołądka pod kątem ich potencjalnego znaczenia prognostycznego, w tym związku z zaawansowaniem choroby i czasem przeżycia pacjenta. Analiza znaczenia prognostycznego będzie odbywać się w kontekście różnic między ekspresją genu w utkaniu raka w stosunku do sąsiadującej błony śluzowej żołądka, gdyż mają one kluczową rolę dla skonstruowania trafnego testu diagnostycznego.

Szczegółowe cele pracy obejmują:

1. Poszukiwanie genów powiązanych z zaawansowaniem raka żołądka, stopniem zróżnicowania i innymi cechami histoklinicznymi za pomocą techniki mikromacierzy DNA
2. Poszukiwanie genów powiązanych z czasem przeżycia chorych na raka żołądka za pomocą techniki mikromacierzy DNA
3. Analizę rokowniczego znaczenia ocenianego wcześniej panelu genów potencjalnie istotnych dla raka żołądka: ACK, CCL18, CD36, COL1A, COL4A2, COL6A3, FN1LAMC2, MAPK1, OPCML, PDGFD, PIM1RNASE1, RRM2, SLAM, SLC2A1, SPARC, SPP1, TFF1, THBS2, TIMP1, TOP2A, YES1.
4. Ocenę ekspresji wybranych genów o potencjalnym znaczeniu rokowniczym pomiędzy utkaniem raka żołądka a śluzówką nowotworowo niezmienną oraz ocenę wpływu degradacji RNA na wyniki oceny ekspresji tych genów.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Pacjenci i materiał badany

3.1.1. *Ogólna charakterystyka materiału klinicznego*

W okresie od 1 stycznia 2003 roku do 31 grudnia 2008 roku w Oddziale Chirurgii Onkologicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. Janusza Korczaka w Słupsku Autor operował 57 kolejnych chorych z powodu zweryfikowanego gruczolakoraka (adenocarcinoma) żołądka, u których pobrano próbki do badań genetycznych. Wśród zoperowanych chorych były 23 kobiety (40,5%) i 34 mężczyźni (59,5%); wiek: 46 – 84 lata (średni wiek: 64,2 lata).

W analizowanej grupie chorych wykonano 50 (88%) gastrektomii czyli całkowitego wycięcia żołądka (*gastrectomia totalis*), zaś u 7 chorych (12%) subtotalną resekcję żołądka górną lub dolną (*resectio ventriculi subtotalis superior/inferior*).

Ostateczny stopień zaawansowania (pTNM) określono w oparciu o wynik badania histopatologicznego pooperacyjnego według klasyfikacji Międzynarodowej Unii Przeciwrakowej (Union Internationale contre le Cancer – UICC), stwierdzając:

Stopień IA	–	0 chorych
Stopień IB	–	2 chorych (3,5%)
Stopień II	–	14 chorych (24,5%)
Stopień IIIA	–	17 chorych (30%)
Stopień IIIB	–	17 chorych (30%)
Stopień IV	–	7 chorych (12%)

Chorzy ze złymi czynnikami rokowniczymi (znaczne zaawansowanie loko-regionalne: pT3/4, N+, współczynnik zajętych węzłów chłonnych do usuniętych powyżej 0,2; cecha M1 – przerzuty odległe) otrzymywali pooperacyjną chemioterapię według programu PELF (cisplatyna, epirubicyna, leukoworyna, 5-fluorouracyl).

Wśród zoperowanych chorych stwierdzono 6 pooperacyjnych zgonów (10,5%) do 30 dnia po operacji. Byli to chorzy o znacznym zaawansowaniu loko-regionalnym (stopień IIIB) lub w stadium rozsianym (stopień IV), u których były nagłe wskazania do operacji (objawy wysokiej niedrożności, krwawienie z górnego odcinka przewodu pokarmowego). Przeżycie średnie dla całej grupy zoperowanych chorych (z wyłączeniem zgonów pooperacyjnych) wyniosło 32 miesiące (zakres: 2-90 miesięcy), zaś odsetek chorych którzy przeżyli 5 lat wyniósł 17,6%.

3.1.2. *Pozyskiwanie i przechowywanie materiału klinicznego do badań*

Badaniu poddano całkowity RNA wyizolowany z materiału pobranego od chorych na raka żołądka pooperacyjnie. Ze świeżo pobranego materiału, przed jego umieszczeniem w formalinie, pobierano wycinek guza oraz wycinek tkaniny makroskopowo niezmienionej ściany żołądka (głównie błona śluzowa). Pobrany materiał był umieszczany w roztworze stabilizującym RNAlater (Qiagen) Odczynnik ten stabilizuje i chroni RNA przed degradacją, umożliwiając dłuższe przechowywanie bez konieczności zamrażania

traktowanej tkanki (7 dni w temperaturze 18-25°C, 30 dni w temperaturze 4°C). Następnie zebrany materiał przechowywano w zamrażarce niskotemperaturowej (-80°C).

W przypadku 54 pacjentów dysponowano parą wycinków (guza oraz tkanki niezmienionej nowotworowo), u 3 chorych dysponowano tylko próbką guza.

3.2. Metody badań molekularnych. Izolacja RNA

3.2.1. *Izolacja całkowitego RNA z pooperacyjnych fragmentów raka żółdka metodą Chomczyńskiego i Sacchi*

Do izolacji całkowitego RNA z fragmentów pooperacyjnych wykorzystano najczęściej stosowaną w laboratoriach metodę Chomczyńskiego i Sacchi. Metoda ta w początkowym etapie polega na lizie komórek w obecności TRIzol, który jest mieszaniną fenolu, izoamylu i izotiocyanianu guanidyny. Następuje rozbicie błon komórkowych i uwolnienie białek oraz kwasów nukleinowych. Kwaśny odczyn fenolu powoduje denaturację i wytrącenie białek, w tym rybonukleaz (RNaz) powodujących degradację RNA, oraz DNA. Następnie tak uzyskany materiał poddaje się ekstrakcji w obecności chloroformu. Podczas wirowania następuje rozdział mieszaniny na trzy fazy: wodną, w której znajdują się RNA, interfazę oraz fazę fenolu, w których znajdują się DNA i białka.

W celu zahamowania degradacji RNA powodowanej przez rybonukleazy, każdorazowo przygotowano naczynia i odczynniki wolne od RNaz. Moździerz, tłuczki i homogenizatory, wykorzystane do krojenia i rozdrabniania tkanki, myto detergentem oraz płukano 5 M NaOH i 70% roztworem alkoholu etylowego, inkubowano w 0,1% roztworze dietylopoliwęglanu (DEPC). Następnie poddawano sterylizacji w wysokiej temperaturze.

Przed przystąpieniem do izolacji sterylne skalpele chłodzono w temperaturze -100°C. Fragmenty preparatu o masie ok. 30-50 mg odcinano sterylnym skalpelem, umieszczano w moździerzu i rozcierano w obecności ciekłego azotu do momentu uzyskania jednorodnego proszku. cały proces przebiegał bez rozmrożenia materiału. Do roztrąconego materiału dodawano 1 ml roztworu denaturującego (solution D) z β -ME (1 ml solution D: 7,2 μ l β -ME) i rozcierano w homogenizatorze (Fast PrepTM FP 120). Homogenat przenoszono do sterylnej probówki obj. 15 ml (Falcon, Sarsted). Dodawano 100 μ l 2 M octanu sodu o pH 4,0. Wymieszano i dodano 1 ml fenolu wysycanego wodą, ponownie mieszano i dodano 200 μ l mieszaniny chloroform – alkohol izoamylowy (w stosunku 49:1). Wytrząsano 10 sekund i inkubowano na lodzie przez 15 minut. Następnie wirowano 25 minut przy 10000g w temperaturze 4°C (wirówka 3K30 firmy Sigma, stosowano we wszystkich wirowaniach). Po zwirowaniu fazę wodną przenoszono do nowej probówki i dodawano izopropanolu o objętości równej objętości otrzymanej fazy wodnej. Otrzymaną mieszaninę inkubowano w temperaturze -20°C co najmniej przez godzinę. Następnie wirowano 20 minut przy 10000g w temperaturze 4°C. Odciągano supernatant a pozostały osad oczyszczano i trawiono DNazą I.

3.2.2. *Oczyszczanie i ocena jakości RNA*

W następnym etapie całkowity RNA, uzyskany za pomocą metody Chomczyńskiego i Sacchi, podano procesowi oczyszczania i trawienia DNazą I z wykorzystaniem zestawu Micro Kit (Qiagen). Procedura ta wykorzystuje kolumny, które zawierają złożę krzemionkowe posiadające właściwość selektywnego wiązania RNA. Próbkę poddawano lizie w obecności buforu denaturującego RLT, zawierającego izotiocyanian guanidyny (GITC), który inaktywuje RNazy. Następnie dodaje się etanolu w celu wytworzenia odpowiednich warunków do związania RNA ze złożem. Kolejnym krokiem jest usuwanie zanieczyszczeń z próbki wykorzystując bufor czyszczący RW1 i RPE. Na koniec RNA wypłukuje się za pomocą wody wolnej od RNaz. Procedura ta pozwala uzyskać cząsteczki RNA pozbawione zanieczyszczeń o długości powyżej 200 nukleotydów.

Do wyizolowanego całkowitego RNA dodawano 350 μ l mieszaniny buforu RLT i β -ME w proporcji 1 ml RLT: 10 μ l β -merkaptotanolu a następnie 96% etanolu (250 μ l). Całość dokładnie mieszano i przenoszono na kolumnę i wirowano 15 sekund przy 9000g (10000rpm; wirówka typu 1-5 firmy Sigma, używana we wszystkich wirowaniach). RNA ponownie ulega związaniu z membraną krzemionkową. Przesącz wylano i dodano 350 μ l buforu RW1, wirowano 15 sekund przy 8000g, przesącz ponownie odlano. Następnie do 10 μ l DNazy I dodano 70 μ l buforu RDD, całość naniesiono na środek membrany i inkubowano przez 15 s w temperaturze pokojowej. Po inkubacji dodano 350 μ l buforu RW1 i wirowano 15 s przy 9000g. Kolumny przełożono na nowe próbki (2 ml), dodano 500 μ l buforu RPE i wirowano 15 sekund przy 9000g, przesącz odlano. Ponownie dodano 500 μ l buforu RPE i wirowano 2 min przy 9000g. Kolumny przeniesiono na nowe opisane próbki (1,5 ml), wypłukiwano z nich RNA dodając 33 μ l wody wolnej od RNaz i wirując 1 minutę przy 8000 g. Z uzyskanych 33 μ l RNA pobrano 2,5 μ l do pomiaru spektrofotometrycznego i oceny jakościowej z użyciem bioanalyzera, resztę materiału zamrożono przechowywano w temperaturze -70°C .

Do wyznaczenia stężenia RNA skorzystano z prawa Lamberta-Beera:

$$A = \varepsilon \cdot x \cdot c$$

gdzie: A – absorbancja, ε – molowy współczynnik absorpcji [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], x – grubość warstwy absorbującej [cm], c – stężenie molowe [mol/dm^3].

Po przekształceniu:

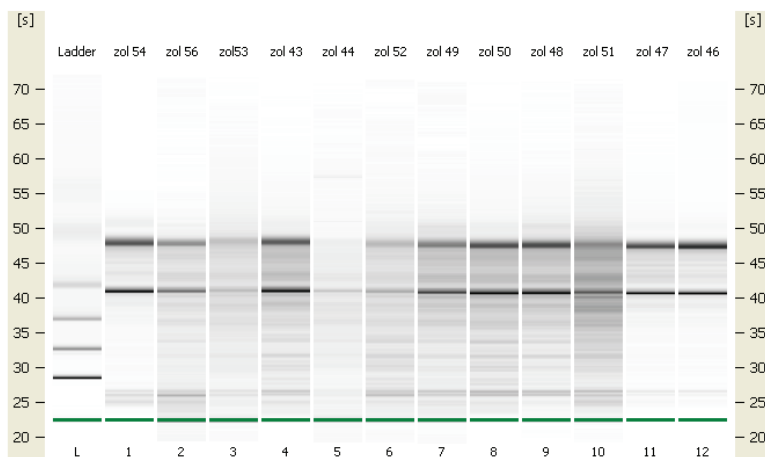
$$c = A / (\varepsilon \cdot x)$$

Absorbancję A wyznaczono metodą spektrofotometryczną przy długości fali 260 nm (A_{260}).

Metodą spektrofotometryczną sprawdzano także czystość RNA. Wartość współczynnika A_{260}/A_{280} , która mieściła się w przedziale 1,8-2,2 co oznacza, że absorbancja przy maksimum dla kwasów nukleinowych (A_{260}) jest 2x większa niż absorbancja tła i zanieczyszczeń. Do pomiaru części próbek użyto spektrofotometr ND-1000 NanoDrop.

Do oceny jakości RNA zastosowano technologię opartą na elektroforezie mikropilarnej fragmentów cząsteczek RNA na podstawie ich wielkości. Elektroforeza ta za-

chodzi na szklanym chipie, który zawiera połączone ze sobą mikrokanaly i zbiorniki. Analizę wykonano na bioanalizatorze (system Lab-on-a-Chip, urządzenie Agilent Bioanalyzer 2100). Jako wzorzec wielkości wykorzystano marker RNA 6000 Nano Ladder. Ryc. 28 przedstawia przykładowe zdjęcie żelu po elektroforezie 12 próbek RNA izolowanego z tkanek żołądka.



Ryc. 27. Przykładowy obraz żelu. W ścieżkach widoczne są dwa prążki odpowiadające podjednostkom 28S i 18S RNA rybosomalnego.

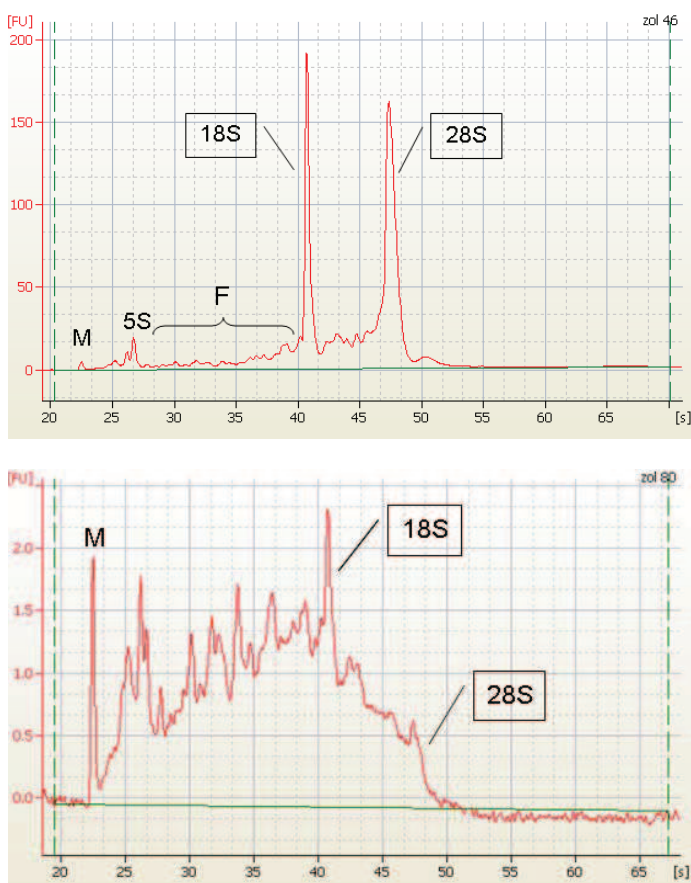
Fig. 27. Sample gel image. Two stripes equivalent to subunits 28S and 18S of ribosomal RNA can be seen in the lanes.

Za pomocą zestawu RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies) badano próbki o stężeniu RNA powyżej 50 ng/μl. Zestaw ten umożliwia jednoczesną analizę 12 próbek. Do 65 μl żelu (RNA 6000 Nano Gel Matrix) dodano 1 μl barwnika (RNA 6000 Nano Dye Concentrate). Do 65 μl żelu (RNA 6000 Nano Gel Matrix) dodano 1 μl barwnika (RNA 6000 Nano Dye Concentrate), całość dokładnie wymieszano z wykorzystaniem wortexu (IKA WORKS), a następnie wirowano 10 minut przy 13000·g (wirówka 5415D firmy Eppendorf). Płytkę (RNA Nano Chip) umieszczono w statywie (Chip Priming Station). Na płytkę w odpowiedni dołek naniesiono 9 μl żelu z barwnikiem fluorescencyjnym. Wykorzystując pompkę ze statywu rozprowadzono równomiernie żel w kapilarach. Następnie rozpipetowano po 9 μl mieszaniny żel-barwnik do kolejnych dwóch dołków. Do pozostałych 13 dołków nałożono po 5 μl znacznika (RNA 6000 Nano Marker). Do 12 dołków nakładano po 1 μl badanego RNA i do pozostałego dołka 1 μl markera. Próbkę i marker przed nałożeniem inkubowano w temperaturze 70°C przez 2 minuty.

Próbki o stężeniu RNA poniżej 50 ng/μl analizowano za pomocą zestawu RNA 6000 Pico Assay (Agilent Technologies). Do 65 μl żelu (RNA 6000 Pico Gel Matrix) dodano 1 μl barwnika (RNA 6000 Pico Dye Concentrate). Dokładnie wymieszano wykorzystując vortex (IKA WORKS) i wirowano (10 min, 13000 g wirówka 5415D firmy Eppendorf). Płytkę (RNA Pico Chip) została następnie umieszczona w statywie (Chip

Priming Station). W odpowiednie miejsce naniesiono 9 μ l żelu z barwnikiem fluorescencyjnym i przy użyciu pompki ze statywu żel został równomiernie rozprowadzony w kapilarach. Następnie rozpipetowano po 9 μ l mieszaniny żel-barwnik do 2 kolejnych dołków. Do oznaczonego dołka dodano 9 μ l roztworu kondycjonującego (RNA 6000 Pico Conditioning Solution). Do pozostałych 12 dołków nałożono po 5 μ l znacznika (RNA 6000 Pico Marker). Do 11 dołków nałożono po 1 μ l badanego RNA i do oznaczonego dołka 1 μ l markera. Zarówno próbki jak i marker przed nałożeniem inkubowano przez 2 minuty w 70°C.

W obu przypadkach elektroforezę przeprowadzono na bioanalizatorze Agilent 2100, a jako wynik otrzymano elektroforogram określający stopień degradacji badanych próbek RNA.



Ryc. 28. U góry elektroforogram próbki nr 46 (bardzo dobra jakość RNA – RIN 8,8). Poniżej próbka 80 (RIN 2,8 – RNA niskiej jakości). M – marker; 5S, 18S, 28S – podjednostki rybosomalnego RNA, F-frakcja szybkiego regionu.

Fig. 28. Above: electropherogram for sample no. 46 (very good RNA quality – RIN 8.8; below: sample 80 (RIN 2.8 – poor quality RNA). M – marker; 5S, 18S, 28S – subunits of ribosomal RNA, F – fast region fraction.

Elektroforeza mikrokapilarna wyizolowanych próbek RNA, przeprowadzona na bioanalizatorze, a uzyskane wyniki w postaci elektroforogramu świadczyły o jakości uzyskanego materiału. Ilość zmierzonej fluorescencji, przedstawionej na wykresie elektroforezy zależy od ilości RNA danej wielkości. Algorytm oprogramowania na podstawie parametrów takich jak: współczynnik całkowitego RNA, wysokość pików 28S, współczynnik powierzchni pod pikiem 28S, porównanie powierzchni pików 28S i 18S do powierzchni pików szybkiego regionu (region pomiędzy pikami 5S i 18S), wartość regresji liniowej w końcowym punkcie szybkiego regionu, ilość wykrytych fragmentów RNA w szybkim regionie, obecność lub brak pików 18S (słabsza lub mocniejsza degradacja RNA) oraz stosunek całkowitej średniej wartości wysokości pików do ich mediany, oblicza wartość współczynnika RIN (RNA Integrity Number). Współczynnik RIN określa jakość próbki, stopień jej degradacji, jego wartość mieści się w zakresie od 1 do 10, gdzie wartość 1 to RNA całkowicie zdegradowane a 10 RNA doskonałej jakości [187].

3.3. Analiza ekspresji genów za pomocą mikromacierzy oligonukleotydowych

Do badania różnic w ekspresji genów pomiędzy rakiem i niezmienną nowotworowo śluzówką żołądka wykorzystano oligonukleotydowe macierze wysokiej gęstości firmy Affymetrix (typ HG_U133 2.0). Macierze te zbudowane są ze krzemionkowej płytki, na którą nanosi się za pomocą techniki fotolitografii, 25 nukleotydowe sondy i wykorzystują zjawisko hybrydyzacji między sondą a badanymi cząsteczkami RNA. Jeden gen jest reprezentowany przez zestaw (tzw. Spot) 11-16 sond o pełnej komplementarności (perfect match) oraz sond różniących się jednym nukleotydem (mismatch). Sygnał powstający w wyniku hybrydyzacji z sondą mismatch traktowany jest jako tło, a jego wartość odejmowana jest od sygnału sondy perfectmatch. Analiza składa się kilku etapów:

1. synteza pierwszej nici DNA z próbek całkowitego RNA;
2. synteza drugiej nici cDNA;
3. synteza znakowanego biotyną cRNA;
4. fragmentacja cRNA i przygotowanie koktajlu hybrydyzacyjnego;
5. hybrydyzacja na macierzy;
6. płukanie i skanowanie macierzy.

Pierwszego dnia procedury wykonuje się punkty od a do c, drugiego d i e, a trzeciego wykonuje się płukanie i skanowanie macierzy.

Badanie przeprowadzono na 8 próbkach raka żołądka i 8 próbkach niezmienniej nowotworowo śluzówki żołądka z wykorzystaniem macierzy typu HG_U133 2.0 (tab. 8A i B) oraz 25 próbkach raka żołądka z wykorzystaniem macierzy typu HG_133A_2 (tab. 9A i B). Zbiór 16 macierzy raka i zdrowej śluzówki dobrano tak, by zagwarantować optymalną jakość wybranych do badania próbek RNA, tak by czynnik jakościowy nie wpływał na wyniki porównania. Z kolei, zbiór 25 próbek raka żołądka dobrano tak, by materiał kliniczny reprezentował jak najlepiej przekrój zaawansowanych chorych na operacyjnego raka żołądka i równocześnie, by zróżnicować stopień degradacji badanych próbek RNA – tak, by możliwa była ocena wpływu tego czynnika na wyniki badania

ekspresji wybranych genów stanowiących potencjalne markery kliniczne (celem badania była selekcja markerów potencjalnie odpornych na degradację RNA). Stąd, w badanej grupie uwzględniono 10 chorych o bardzo wysokiej jakości RNA (RIN powyżej 7), 10 chorych o homogenicznie przeciętnej jakości RNA (RIN w zakresie 6-7) oraz mniejszą grupę 5 chorych wykazujących dużą degradację RNA (RIN około 2).

Tabela 8a. Próbki analizowane z wykorzystaniem macierzy HG_U133 2.0

Table 8a. Samples analyzed using a microarray HG_U133 2.0

NR	Status	Stężenie RNA (µg/µl)	RIN
3	T	652,42	8,1
4	N	423,69	7,9
6	N	120,93	7,0
9	T	636,42	8,3
12	N	666,60	6,9
16	T	1263,39	9,2
17	N	446,67	7,3
26	T	2509,00	7,9
31	N	243,34	7,7
33	N	318,58	7,1
54	T	1097,00	8,6
58	T	733,18	7,9
71	N	147,07	7,4
77	N	153,24	7,9
88	T	1939,40	7,9
98	T	246,28	8,0

Tabela 8b. Podsumowanie stopnia degradacji – próbki analizowane z wykorzystaniem macierzy HG_U133 2.0

Table 8b. Summary of degradation level – sample analyzed with the microarray HG_U133 2.0

RIN	Numer próbki	
	T	N
7-10	3, 9, 16, 26, 54, 58, 88, 98	4, 6, 17, 31, 33, 71, 77
6-7	0	12
<6	0	0

Tabela 9a. Próbkki analizowane z wykorzystaniem macierzy HG_U133_A_2
Table 9a. Samples analyzed using a microarray HG_U133_A_2

NR	Status	Stężenie RNA (µg/µl)	RIN	NR	Status	Stężenie RNA (µg/µl)	RIN
20	T	100,13	6,7	90	T	210,32	6,9
30	T	354,58	7,5	92	T	718,12	6,7
34	T	844,67	6,8	94	T	537,5	6,4
48	T	64,81	7,1	96	T	100,13	6,7
52	T	718,12	6,7	106	T	254,14	6,7
64	T	1376,1	7,7	112	T	1917,7	2,2
68	T	199,22	6,9	114	T	320,6	2,7
70	T	463,96	7,7	116	T	860,4	7,3
74	T	17,52	6,9	124	T	641,76	2,6
76	T	1263,39	9,2	126	T	347,19	2,7
78	T	1736	7,7	132	T	761,27	7,3
82	T	1489,4	7,8	134	T	497,84	2,6
86	T	1939,4	7,9				

Tabela 9b. Podsumowanie stopnia degradacji – próbki analizowane z wykorzystaniem macierzy HG_U133_A_2
Table 9b. Summary of degradation level – sample analyzed with the microarray HG_U133_A_2

RIN	Numer próbki
7-10	30, 48, 64, 70, 76, 78, 82, 86, 116, 132
6-7	20, 34, 52, 68, 74, 90, 92, 96, 94, 106
<6	112, 114, 124, 126, 134

3.3.1. Synteza znakowanego i fragmentowanego aRNA (Gene Chip 3' IVT Express Kit)

W pierwszym etapie przygotowano rozcieńczenia kontroli Poly-A (Poly-A-RNA controls – SPIKE-IN), używanego do określenia jakości hybrydyzacji. Sporządzono 4 serie kolejnych rozcieńczeń:

1. rozcieńczenie pierwsze 1:20 – 2 µl Poly-A Control Stock i 38 µl Poly-A Dil Buffer;
2. rozcieńczenie drugie 1:50 – 2 µl rozcieńczenia pierwszego i 98 µl Poly-A Dil Buffer;
3. rozcieńczenie trzecie: 1:50 – 2 µl rozcieńczenia drugiego i 98 µl Poly-A Dil Buffer;
4. rozcieńczenie czwarte 1:4 – 5 µl rozcieńczenia trzeciego i 15 µl Poly-A Dil Buffer.

Przygotowano mieszaninę składającą się z całkowitego RNA (0,25 µg) i kontroli Poli-A:

Tabela 10. Skład mieszaniny RNA/kontrola Poly-A.*Table 10. Components of the RNA/Poly-A control mix.*

Składnik mieszaniny	Objętość
Próbka całkowitego RNA 0,25 µg	zmienna
Rozcieńczona kontrola Poly-A	2 µl
Woda wolna od RNaz	zmienna
Końcowa objętość	5 µl

Kolejnym etapem była synteza pierwszej nici cDNA. W tym celu przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą o objętości 5 µl (na jedną próbkę) się z 4 µl buforu (First-Strand Buffet Mix) i 1 µl odwrotnej transkryptazy (First-Strand Enzyme Mix). 5 µl mieszaniny rozpipetowano do probówek reakcyjnych (objętość 0,2 ml) i dodano 5 µl mieszaniny całkowite RNA/kontrola Poly-A. Całość dokładnie wymieszano i inkubowano przez 2 h w temperaturze 42°C w termocyklerze PTC-100 firmy MJ Research (termocykler używany we wszystkich etapach).

Następnie przeprowadzono syntezę drugiej nici cDNA. Do probówek zawierających zsyntetyzowaną pierwszą nić cDNA dodano 20 µl mieszaniny reakcyjnej (tab. 11), całość dokładnie wymieszano i inkubowano 1h w 16 °C a następnie 10 min w 65°C.

Tabela 11. Skład mieszaniny do syntezy drugiej nici cDNA.*Table 11. Components of the mix for the synthesis of the second cDNA thread.*

Składnik mieszaniny	Objętość
Secondo-Strand Enzym MIX	2 µl
Second-Strand Buffer MIX	5 µl
Woda wolna od RNaz	13 µl
Końcowa objętość	20 µl

Po otrzymaniu drugiej nici cDNA następuje synteza znakowanego biotyną aRNA. W tym celu sporządzono mieszaninę reakcyjną w składzie:

Tabela 12. Skład mieszaniny reakcyjnej do syntezy aRNA.*Table 12. Components of reaction mix for aRNA synthesis.*

Składnik mieszaniny	Objętość
IVT biotyn Label	4 μ l
IVT Labeling Buffer	20 μ l
IVT Enzyme Mix	6 μ l
Końcowa objętość	30 μ l

Całość dokładnie wymieszano, wirowano, rozpietowano po 30 μ l do próbek zawierających dwuniciowe cDNA, a następnie inkubowano 16h w temperaturze 40°C. Otrzymane aRNA poddano procesowi oczyszczania. Próbkę aRNA najpierw inkubowano przez 10 minut w temperaturze 55°C. Następnie do każdej próbki dodano 10 μ l roztworu zawierającego kulki magnetyczne wiążące RNA (RNA Binding Beads) oraz 50 μ l buforu wiążącego (aRNA Binding Buffer Concentrate). Tak przygotowane próbki aRNA przeniesiono na płytkę (U-bottom Plate) i wymieszano przez pipetowanie. Następnie dodano 120 μ l 99,8% etanolu, wymieszano przez pipetowanie i umieszczono na kołysce laboratoryjnej (2 min, ustawienie 4, Lab-Line Titer Plate Shaker). Płytkę przeniesiono na statyw magnetyczny i wychwytywano kulki przez 5 min (do czasu uzyskania klarownej mieszaniny). Supernatant delikatnie usunięto, a do dołków dodano roztworu płuczającego (aRNA Wash Solution), płytkę umieszczono na kołysce (1 min, ustawienie 7, Lab-Line Titer Plate Shaker). Następnie płytkę ponownie umieszczono na statywie magnetycznym i odciągnięto powstały supernatant. Procedurę z użyciem roztworu płuczającego powtórzono, a następnie umieszczono płytkę na kołysce laboratoryjnej i mieszało energicznie przez 1 min aż do wyparowania reszty etanolu (ustawienie 10).

W celu elucji oczyszczonego aRNA z magnetycznych kuleczek wiążących dodano 50 μ l roztworu aRNA Elution Solution (wcześniej roztwór został podgrzany do 55°C). Płytkę umieszczono na kołysce laboratoryjnej i mieszało aż do całkowitego rozproszenia kulek magnetycznych (3 min, ustawienie 10, Lab-Line Titer Plate Shaker). Następnie płytkę przeniesiono na statyw magnetyczny, a otrzymany klarowny supernatant przeniesiono do próbek PCR. Stężenie oczyszczonego aRNA zmierzono używając spektrofotometr NanoDrop 1000. W kolejnym etapie oczyszczone próbki aRNA poddano fragmentacji. Do poszczególnych próbek dodano 30 μ l mieszaniny do reakcji fragmentacji, która zawierała:

Tabela 13. Skład mieszaniny do reakcji fragmentacji aRNA.*Table 13. Components of reaction mix for aRNA fragmentation.*

Składnik mieszaniny	Objętość
aRNA	12 μ g (1-23,6 μ l)
5x Array Fragmentation Buffer	6,4 μ l
Woda wolna od RNaz	zmienna (do objętości 30 μ l)
Końcowa objętość	30 μ l

Całość inkubowano w termocyklerze przez 35 minut w temperaturze 94°C. Następnie produkt fragmentacji poddano analizie jakości z wykorzystaniem bioanalyzera (Agilent Bioanalyzer 2100, Agilent RNA 6000 Nano Kit). Produktem prawidłowej reakcji fragmentacji są cząsteczki aRNA długości od 35 do 200 zasad z głównym pikiem na wykresie elektroforezy między 100-120 zasad

3.3.2. *Hybrydyzacja, płukanie i skanowanie mikromacierzy*

Do przygotowania koktajlu hybrydyzacyjnego należy użyć:

Tabela 14. Skład koktajlu hybrydyzacyjnego.

Table 14. Components of the hybridisation cocktail.

Składnik mieszaniny	Objętość
Znakowany i pofragmentowany aRNA	10 µg (26,7 µl)
Control Oligonucleotide B2 3nM)	3,3 µl
20× Hybridization Controls (należy wcześniej inkubować 5 min w 65°C)	10 µl
2× Hybridization Mix	100 µl
DMSO	20 µl
Woda wolna od RNaz	40 µl
Końcowa objętość	200 µl

Na przygotowaną macierz (doprowadzoną wcześniej do temperatury pokojowej) należy 130 µl nałożyć mieszaniny pre-hybrydyzacyjnej (pre_hybridization Mix) i inkubować w piecu hybrydyzacyjnym (GeneChip Hybridization Oven 640) przez 10 minut w temperaturze 45°C przy 60 obr/min. Przygotowaną wcześniej mieszaninę hybrydyzacyjną (tab. 16) należy inkubować 5 minut w temperaturze 99°C, następnie kolejne 5 minut w temperaturze 45°C, a po zakończeniu inkubacji zwirować 5 minut przy max obrotach wirówki. Po zakończeniu wstępnej inkubacji macierzy odciągano mieszaninę pre-hybrydyzacyjną i nakładano 130 µl koktajlu hybrydyzacyjnego i inkubowano przez 16h w temperaturze 45°C przy 60 obr/min.

Tak przygotowane macierze umieszczano w stacji płuczącej (GeneChip Fluidics Stadion 450) i płukano według protokołu FS450_0007, a następnie skanowano w urządzeniu GeneChip Scanner. Wyniki otrzymano w postaci pliku cell, który zawiera wartości sygnału poszczególnych sond zawartych na macierzy,

3.4. Analiza ekspresji genów za pomocą techniki ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym

W pracy dokonano także ponownej analizy wcześniej uzyskanych wyników pomiaru metodą QPCR ekspresji wybranych genów w utkaniu raka żołądka w próbkach zgromadzonych przez Autora. Wyniki te były przedmiotem wcześniejszej analizy dokonanej przez mgr Katarzynę Kujawę (Kędzior), opublikowanej w postaci pracy magisterskiej pod tytułem „Analiza poziomu ekspresji wybranych genów w raku żołądka” (promotor prof. Barbara Jarzab). W niniejszej pracy dokonano analizy uzyskanych wartości ekspresji genów w badanych próbkach raka i niezmięnionej nowotworowo śluzówki pod kątem czynników związanych z zaawansowaniem nowotworu i czasem przeżycia. Ten aspekt nie był podejmowany w pracy magisterskiej mgr Katarzyny Kujawy (Kędzior). Opis metodyczny technik wykorzystanych do uzyskania wartości pomiarów zamieszczono w cytowanej pracy magisterskiej oraz w maszynopisie publikacji (Kędzior K. – praca magisterska pt. „Analiza poziomu ekspresji wybranych genów w raku żołądka”, Stojcev Z, Kędzior K i wsp. Comparison of gene expression changes of cell adhesion and angiogenesis-related genes in gastric cancer. Manuskrypt w przygotowaniu)

3.5. Bioinformatyczna i statystyczna analiza danych

Dane uzyskane z odczytu mikromacierzy w postaci plików *.CEL poddano przetwarzaniu wstępnemu za pomocą algorytmu *justRMA*. Listę transkryptów (mierzonych za pomocą zestawów sond, ang. probeset) przefiltrowano, wyłączając transkrypty o małej zmienności (dla których mniej niż 10% próbek wykazywało większą niż 1,5-krotną różnicę w stosunku do mediany ekspresji danego genu). Uzyskano w ten sposób ostateczną listę 13 190 mierzonych transkryptów.

Porównania między grupami prowadzono za pomocą testu T lub testu F (w zależności od tego czy porównanie dotyczyło dwóch czy też większej liczby klas). Jako podstawowe kryterium przyjęto poziom istotności statystycznej $p < 0,001$ (przyjęto restrykcyjny poziom p , biorąc pod uwagę znaczną liczbę porównań – przy takich parametrach w każdym porównaniu oczekuje się ok. 13 transkryptów fałszywie dodatnich). Równocześnie, by zapewnić wystarczającą pewność wnioskowania, dla każdego transkryptu szacowano równocześnie współczynnik FDR (*False Discovery Rate*), jako istotne traktowano wyniki z $FDR < 5\%$.

Analizy wykonano za pomocą system BRB-ArrayTools w wersji 4.3.2 (wersja z września 2013), opracowanego przez Dr. Richarda Simona i zespół. Wykorzystano pakiety systemu R w wersji 3.0.1 (maj 2013). Annotacji genów dokonano za pomocą pakietu Bioconductor (www.bioconductor.org) hgu133a2.db (wersja 2.9.0) w listopadzie 2013.

4. WYNIKI

4.1. Ocena jakości uzyskanego RNA pod kątem analizy ekspresji genów

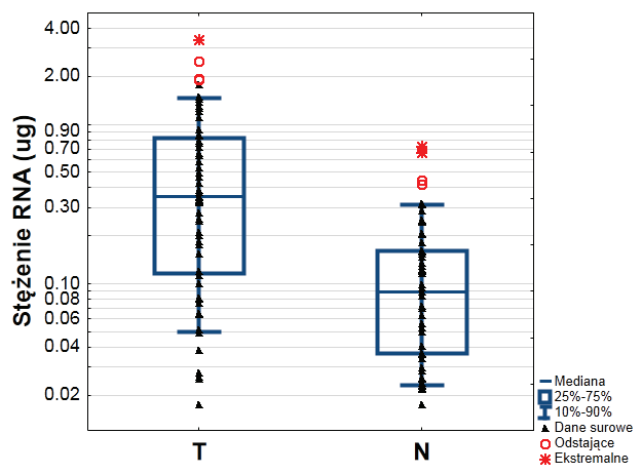
Otrzymane ilości RNA dla próbek z utkaniem nowotworowym raka żołądka mieściły się w zakresie od 0,02-3,39 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (średnia wynosiła 0,63 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), a dla próbek niezmiennych nowotworowo od 0,02-0,45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (średnia wynosiła 0,11 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Wydajność izolacji z fragmentów guza wynosiła średnio 20,66 μg , a z fragmentów tkanki normalnej żołądka wynosiła 3,79 μg (tab. 15).

Tabela 15. Stężenie RNA i wydajność izolacji próbek badanych.

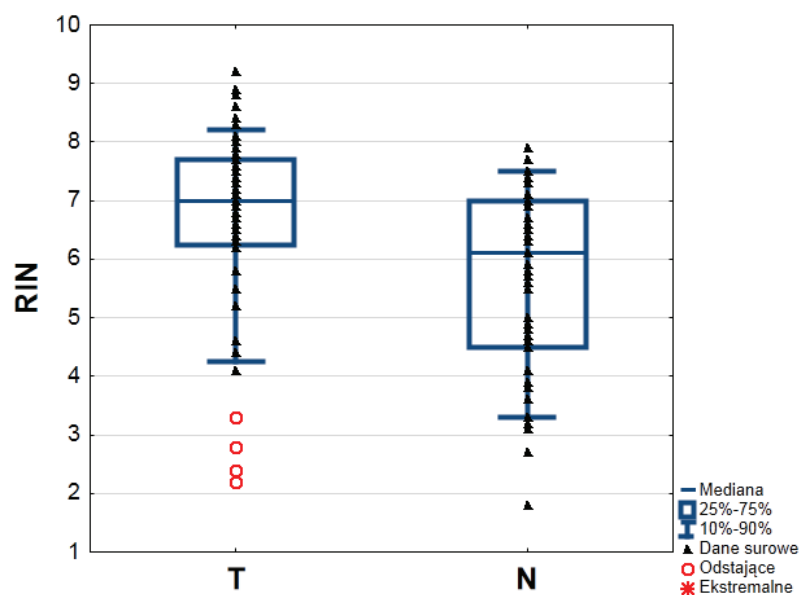
Table 15. RNA concentrations and the yield of isolation of the analysed samples.

Zakres stężenia RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Tumor		Normal	
	Liczba próbek	Wydajność Izolacji (μg)	Liczba próbek	Wydajność Izolacji (μg)
>2	2	97,40	0	—
1-2	10	48,80	0	—
0,8-1	3	28,87	0	—
0,7-0,8	4	24,73	0	—
0,6-0,7	2	21,24	0	—
0,5-0,6	2	18,50	0	—
0,4-0,5	4	15,59	2	14,36
0,3-0,4	9	11,41	2	10,39
0,2-0,3	4	8,15	6	7,90
0,1-0,2	6	5,19	13	4,52
0,05-0,1	7	2,37	14	2,33
<0,05	5	1,01	17	0,96

Ponieważ do izolacji każdorazowo wykorzystano ok. 30 mg tkanki, wydajność w przeliczeniu na 1 mg tkanki wynosiła odpowiednio 0,69 μg i 0,13 μg . Wydajność izolacji z fragmentów raka była znacząco wyższa w porównaniu do fragmentów prawidłowego utkania żołądka (ryc. 29, $p < 0,001$, nieparametryczny test Wilcoxon).



Ryc. 29. Porównanie wydajności izolacji z próbek guza i fragmentów prawidłowej tkanki żołądka.
Fig. 29. A comparison of the yield of isolation from tumor samples and fragments of normal stomach tissue.



Ryc. 30. Porównanie jakości RNA z próbek guza i fragmentów prawidłowej tkanki żołądka.
Fig. 30. A comparison of the quality of RNA from tumor samples and fragments of normal stomach tissue.

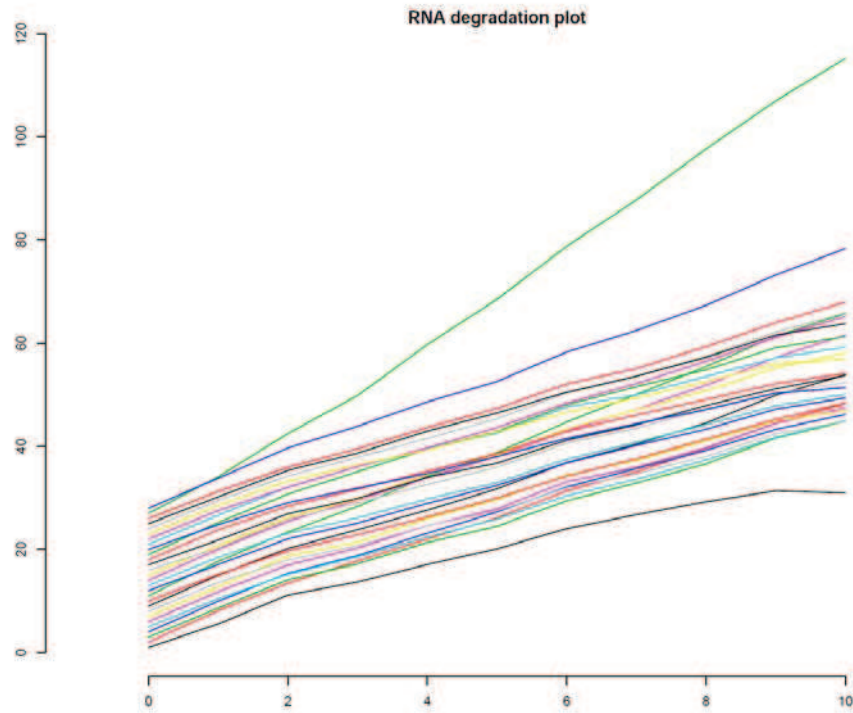
Wartość współczynnika RIN dla próbek raka żołądka wynosiła od 2,2 do 9,2. W przypadku fragmentów tkanki niezmiętej nowotworowo wartość ta wynosiła od 1,8

do 7,9 (przedstawiono szczegółowo w rozdziale „Materiał i metody”). Wykazano istotne statystycznie różnice w jakości RNA izolowanego z próbek raka i nie zmienionej nowotworowo ściany żołądka ($p=0,008418$, test rangowanych znaków Wilcozona, ryc. 30).

W podsumowaniu tej części wyników stwierdzono, że – mimo starannego pobrania po zabiegu operacyjnym – jakość RNA w badanym świeżo utrwalonym za pomocą RNAlater materiale jest zmienna, a część próbek wykazuje cechy degradacji. Wymaga to uwzględnienia starannych technik normalizacji dla uwzględnienia wpływu degradacji na pomiar ekspresji oraz wyboru do dalszych badań markerów odpornych na cechy degradacji.

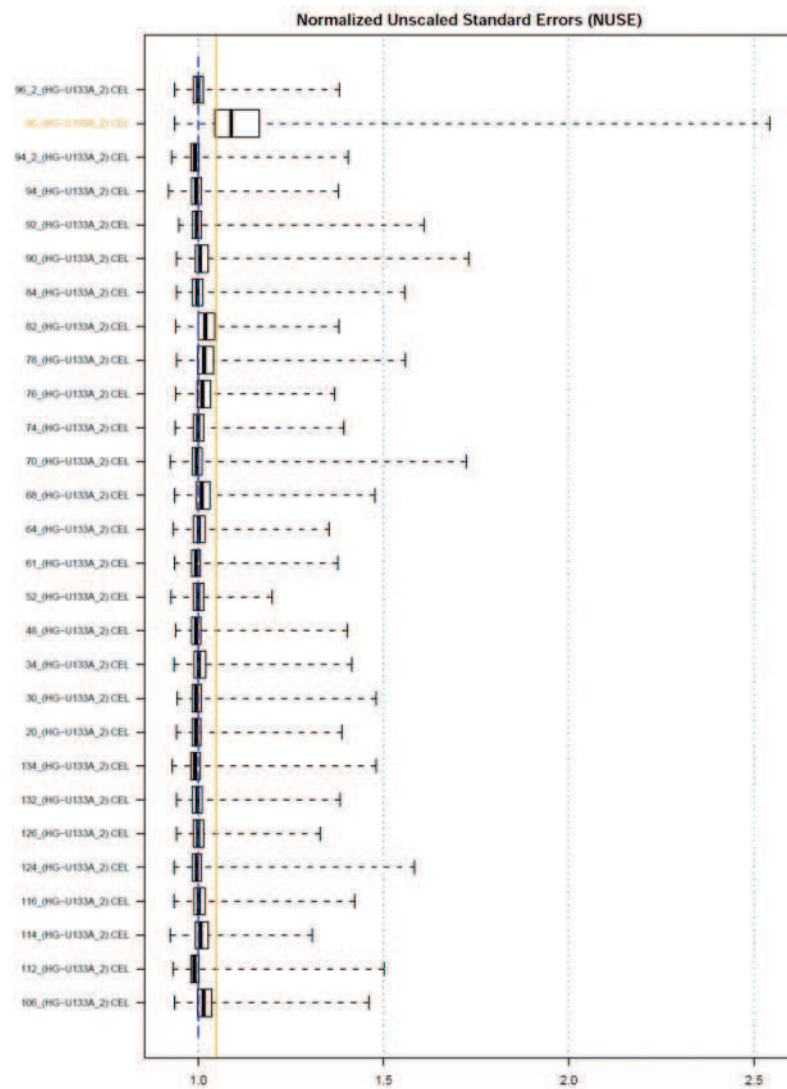
4.2. Ocena techniczna jakości wykonanych badań mikromacierzowych

Dokonano oceny jakości wykonanych badań mikromacierzowych zarówno zbioru 25 mikromacierzy raka żołądka, jak i zbioru 16 mikromacierzy raka i zdrowej śluzówki. W zbiorze 25 mikromacierzy, zawierającym próbki o zróżnicowanym stopniu degradacji, 9 mikromacierzy spośród próbek o najwyższym RIN nie wykazywało podwyższenia współczynników degradacji genów wskaźnikowych (beta-aktyny i GAPDH) powyżej poziomu różnicy w ekspresji między końcem 5' i 3' powyżej 2,5 raza. Mimo to, analiza stopnia degradacji za pomocą zarówno wykresu degradacji (Ryc. 31) wskazującego na znormalizowaną zależność sygnału hybrydyzacji sondy w zależności od odległości od końca transkryptu, jak i wykresów znormalizowanego nieskalowanego błędu standardowego (*Normalized Unscaled Standard Error*, NUSE, rys.32) oraz względnego logarytmowanego sygnału ekspresji (and. Relative Log Expression, RLE, rys. 33) potwierdza dużą homogenność badanego zbioru pod tym względem. Jedyne jedna próbka (nr 96) wykazuje znacząco różne nachylenie krzywej degradacji, wyższy błąd standardowy NUSE oraz współczynnik RLE. Mimo obserwowanej degradacji RNA średniego stopnia stwierdzanej w części próbek możliwa była porównawcza analiza badanych mikromacierzy celem oceny, jak degradacja RNA wpływa na potencjalnie istotne klinicznie markery rokowania w raku żołądka.



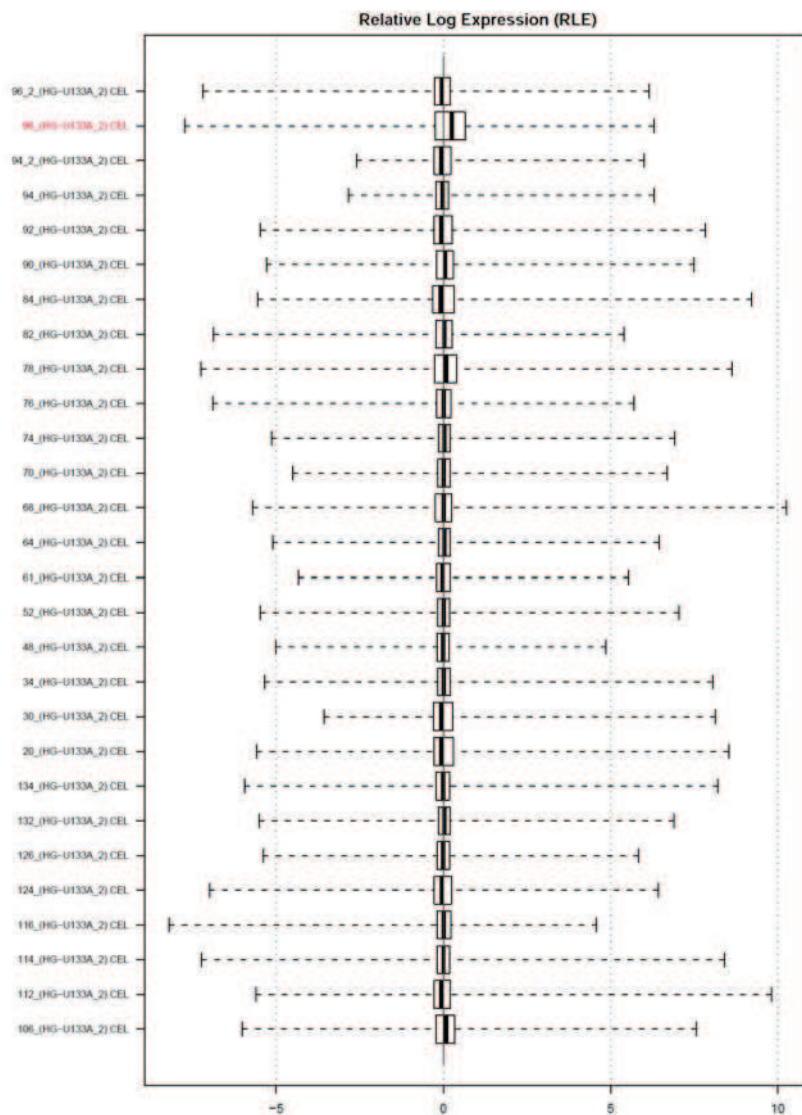
Ryc. 31. Wykres degradacji RNA w badanych próbkach. Na osi X przedstawiono lokalizację sond w genie (odległość od końca transkryptu), na osi Y wartość ekspresji dla danej sondy. Nachylenie krzywej wskazuje na stopień degradacji – tylko w jednej próbce, nr 96, jest on globalnie wyraźnie inny niż w pozostałych.

Fig. 31. Chart RNA degradation in the tested samples. The X-axis shows the location of the probes in the gene (the distance from the end of the transcript), the Y-axis value of the expression for the probe. The slope of the curve indicates the degree of degradation - in only one sample, No. 96, is globally distinctly different than the other.



Ryc. 32. Wykres normalizowanego nieskalowanego błędu standardowego (NUSE). Wskazuje on na rozrzut pomiarów ekspresji w obrębie sond na każdej z mikromacierzy w stosunku do całego zbioru. Macierz nr 96 wykazuje wartości wyraźnie odstające.

Fig. 32. Graph of normalized unscaled standard error (Nuse). Indicates an expression of the scattering of the measurements within each of the probes on the microarray in relation to the whole set. Matrix No. 96 shows the clear outliers.



Ryc. 33. Wykres względnej wartości ekspresji po zlogarytmowaniu (RLE). Próbkę nr 96 wykazuje silnie odstającą od całego zbioru średnią wartość RLE.

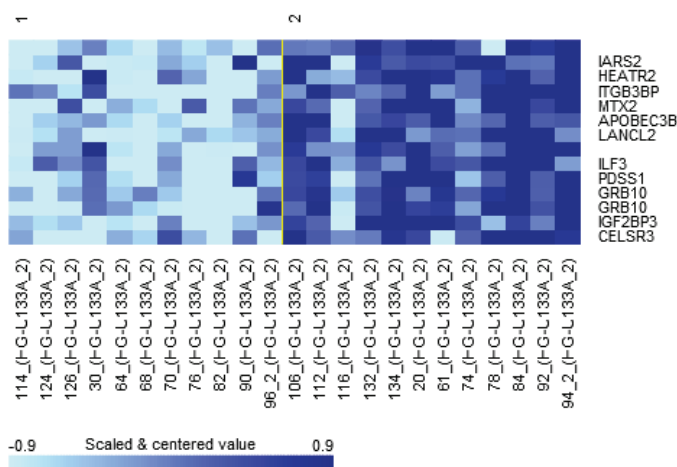
Fig. 33. Graph of relative expression values after taking the logarithm (RLE). Sample No. 96 exhibits a strongly projecting from the whole set of the average value of RLE.

Podobnej analizie poddano zbiór 16 macierzy (8 próbek raka i 8 próbek zdrowej śluzówki) – wyjściowo o bardzo dobrej jakości RNA, 15/16 próbek ze współczynnikiem RIN>7. Analiza techniczna potwierdziła bardzo dobrą jakość próbek, wszystkie mikro-macierze spełniały surowe wymagania techniczne, a wykresy degradacji, NUSE i RLE ujawniały pełną homogenność zbioru (szczegółowych rycin nie przedstawiono).

4.3. Analiza ekspresji genów na podstawie badania metodą mikromacierzy w próbkach raka żołądka w zależności od wybranych parametrów histoklinicznych

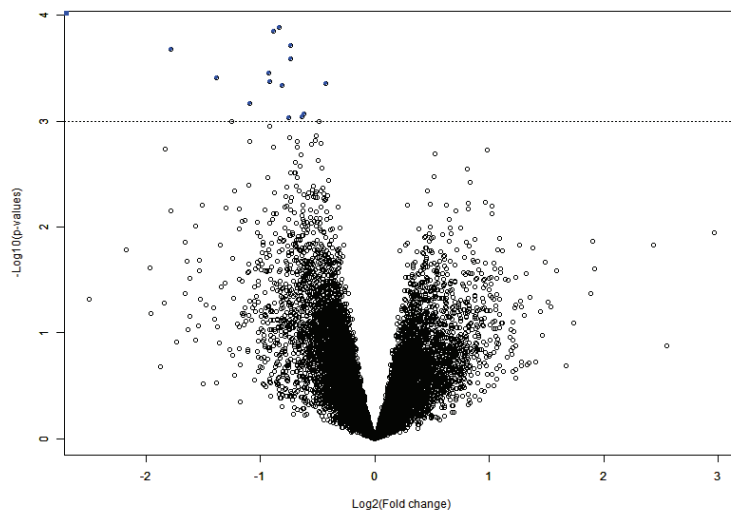
Profil ekspresji genów w grupie 25 próbek raka żołądka poddano analizie mikromacierzowej pod kątem wybranych czynników histoklinicznych w ocenianej grupie chorych. W pierwszym etapie porównano ekspresję chorych między chorymi którzy zachorowali w młodszym wieku (<65 r.ż., grupa 1) w stosunku do chorych starszych (>65 r.ż., grupa 2). Do wybrania granicy wieku posłużyła przeciętna wieku w badanej populacji pacjentów.

Stwierdzono, że przy poziomie odcięcia $p < 0,001$ (kryterium odcięcia bez korekcji na krotność porównań) 14 zestawów sond wykazuje różnice między grupami. Odsetek wyników fałszywie dodatnich (FDR, *False Discovery Rate*) w tak wyselekcjonowanej grupie można szacować na około 60%. Wskazuje to na małą istotność statystyczną różnic powiązanych z wiekiem i przemawia za małym udziałem tej cechy w kształtowaniu profilu ekspresji genów badanych próbek raka żołądka. Wyniki analiz przedstawiono na wykresie typu mapy termicznej ryc. 34), wykresie punktowym (ryc. 36) oraz w tab. 16. Przedstawiono także wyniki nienadzorowanej analizy zbioru metodą skalowania wielowymiarowego pod kątem wieku, które wskazują iż ta cecha nie rzutuje na główne źródła zmienności w badanym zbiorze.



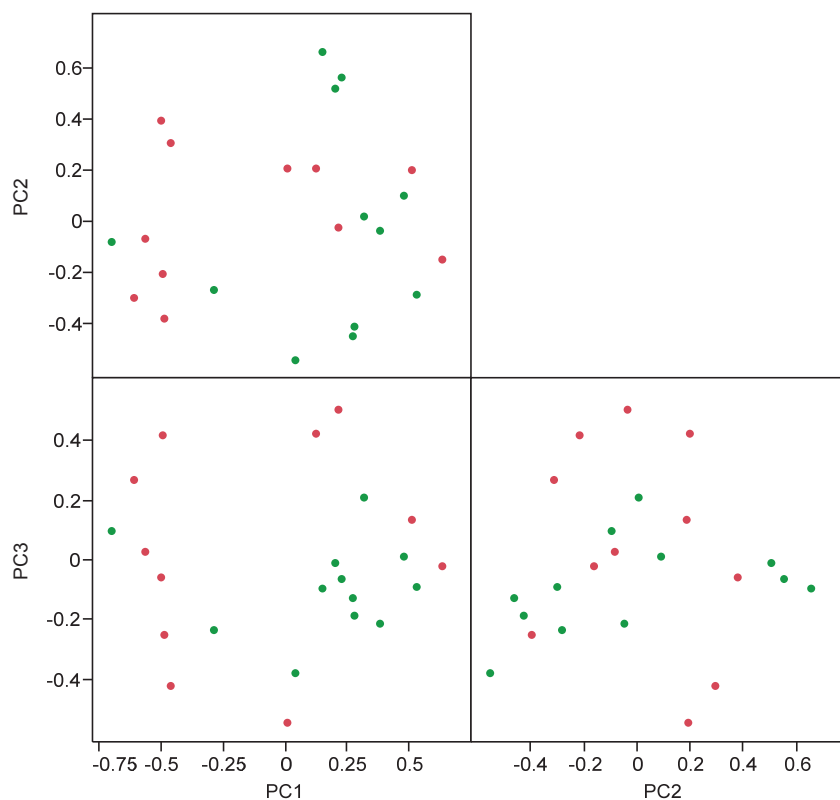
Ryc. 34. Wykres typu mapy termicznej (ang. heatmap) dla różnic w ekspresji genów powiązanych z wiekiem chorych (grupa 1 – poniżej 65 r.ż., grupa 2 – powyżej 65 r.ż.). Ekspresję genów zakodowaną graficznie (wg skali poniżej wykresu, natężenie koloru niebieskiego odpowiada ekspresji genów) przedstawiono w wierszach, wszystkie zestawy sond wykazują istotną statystycznie różnicę ($p < 0,001$). Ekspresja genów przedstawiona na wykresie została poddana normalizacji (centrowanie i skalowanie).

Fig. 34. Chart thermal map type (called heatmap) for differences in gene expression associated with the age of patients (Group 1 – less than 65 years, group 2 – 65 years). Graphically encoded gene expression (according to the scale below the graph, the intensity of blue color corresponding to the expression of genes) are shown in the rows, all probe sets show a statistically significant difference ($p < 0.001$). Expression of genes represented on the graph has been subjected to standardization (centering and scaling).



Ryc. 35. Wykres zależności krotności różnicy ($\text{Log}_2(\text{Fold change})$) przedstawionej na osi X od znamienności statystycznej tej różnicy ($-\text{Log}_{10}(\text{p-value})$) w zależności od wieku chorych (grupa 1 – poniżej 65 r.ż., grupa 2 – powyżej 65 r.ż.). Zestawy sond wykazujące istotną statystycznie różnicę zaznaczono kolorem niebieskim ($p < 0,001$).

Fig. 35. A plot of the difference times ($\log_2(\text{Fold change})$) shown on the X axis statistical significance of the difference ($-\log_{10}(\text{p-value})$) based on the age of the patients (Group 1 – less than 65 years, group 2 – 65 years). Probe sets showing a statistically significant difference was noted in blue ($p < 0.001$).



Ryc. 36. Analiza nienadzorowana metodą skalowania wielowymiarowego. Kropkami koloru zielonego oznaczono chorych powyżej 65 lat, kolorem czerwonym chorych poniżej 65 lat. Rycina pokazuje zależność trzech pierwszych składowych (PC1, PC2, PC3) oddających trzy główne źródła zmienności na trzech wykresach dwuwymiarowych.

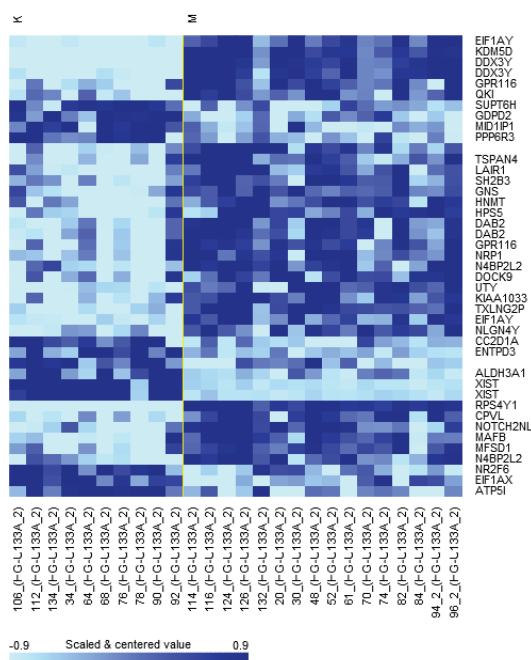
Fig. 36. Unattended analysis of multidimensional scaling method. Green dots indicated patients over 65 years old, red patients under 65 years of age. Figure shows the dependence of the first three components (PC1, PC2, PC3) capture the three main sources of variation in the three-dimensional graphs.

Tabela 16. Podsumowanie różnic w ekspresji genów w grupie 1 (chorzy do 65 roku życia) oraz grupie 2 (chorzy powyżej 65 roku życia). Przedstawiono istotność statystyczną różnicy (p), oszacowanie tej istotności po korekcji na porównania wielokrotne (odsetek wyników fałszywie dodatnich, FDR – *False Discovery Rate*), a także krotność różnicy pomiędzy grupą próbek raka a próbkami normalnej śluzówki. W pierwszych kolumnach przedstawiono symbol i nazwę genu oraz identyfikator zestawu sond na mikromacierzy Affymetrix (ProbeSet).

Table 16. Summary of differences in gene expression in group 1 (patients up to 65 years) and group 2 (patients above 65 years of age). Presents the statistical significance of the difference (p), to estimate the significance after correction for multiple comparisons (false-positive rate, FDR, called False Discovery Rate), and times the difference between the group of cancer samples and normal mucosa samples. The first column shows the symbol and the name of the gene and the identification of a set of probes on Affymetrix (ProbeSet).

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności (nieskorygowany)	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna grupa 1	Średnia geometryczna grupa 2
<u>LANCL2</u>	LanC lantibiotic synthetase component C-like 2 (bacterial)	<u>218219_s_at</u>	1	0,0001295	0,61	0,56	30,58	54,65
<u>ITGB3BP</u>	integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)	<u>205176_s_at</u>	2	0,0001407	0,61	0,54	57,37	106,08
<u>GRB10</u>	growth factor receptor-bound protein 10	<u>209410_s_at</u>	3	0,0001913	0,61	0,6	20,75	34,58
<u>IGF2BP3</u>	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	<u>203820_s_at</u>	4	0,0002103	0,61	0,29	8,73	30,02
<u>HEATR2</u>	HEAT repeat containing 2	<u>218460_at</u>	5	0,000256	0,61	0,6	109,81	182,79
<u>GRB10</u>	growth factor receptor-bound protein 10	<u>210999_s_at</u>	6	0,0003512	0,61	0,53	26,5	50,24
<u>APOBEC3B</u>	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	<u>206632_s_at</u>	7	0,0003894	0,61	0,38	14,37	37,38
		<u>208310_s_at</u>	8	0,0004241	0,61	0,53	29,62	56,14
		<u>201973_s_at</u>	9	0,0004443	0,61	0,74	570,66	769,54
<u>CELSR3</u>	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	<u>205165_at</u>	10	0,0004623	0,61	0,57	9,05	15,9
<u>PDSS1</u>	prenyl (decaprenyl) diphosphate synthase, subunit 1	<u>220865_s_at</u>	11	0,0006815	0,78	0,47	17,72	37,88

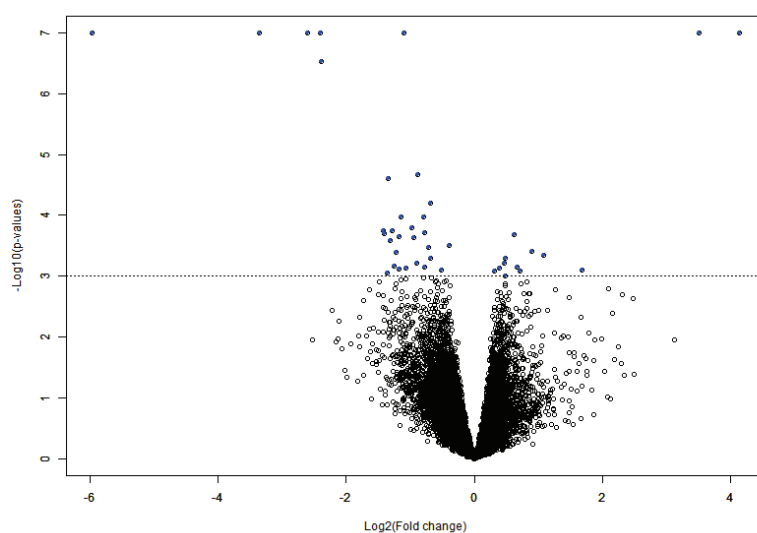
Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności (nieskorygowany)	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna grupa 1	Średnia geometryczna grupa 2
IARS2	isoleucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	217900_at	12	0,0008502	0,78	0,65	234,41	360,2
MTX2	metaxin 2	203517_at	13	0,0009142	0,78	0,64	70,46	109,63
ILF3	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	208931_s_at	14	0,000927	0,78	0,59	32,2	54,4



Ryc. 37. Wykres typu mapy termicznej (ang. heatmap) dla różnic w ekspresji genów w badanych próbkach raka żołądka między kobietami (K) a mężczyznami (M). Ekspresję genów zakodowaną graficznie (wg skali poniżej wykresu, natężenie koloru niebieskiego odpowiada ekspresji genów) przedstawiono w wierszach, wszystkie zestawy sond wykazują istotną statystycznie różnicę ($p < 0,001$). Ekspresja genów przedstawiona na wykresie została poddana normalizacji (centrowanie i skalowanie).

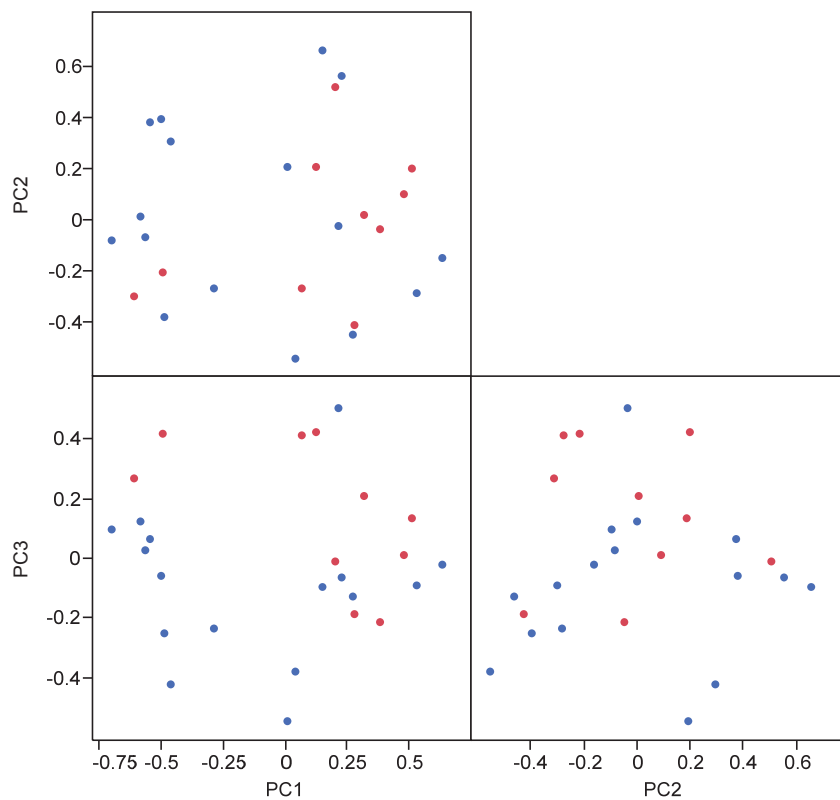
Fig. 37. Chart thermal map type (called heatmap) for differences in gene expression in the test samples of gastric cancer among women (F) and males (M). The expression of genes encoded graphically (according to the scale below the graph, the intensity of the blue color corresponds to the expression of genes) are shown in rows, all probe sets exhibit a statistically significant difference ($p < 0,001$). Expression of genes represented on the record-August has been subjected to standardization (centering and scaling).

W kolejnym kroku badania dokonano analizy związku ekspresji genów z płcią chorych. Stwierdzono, że 43 zestawy sond wykazują różnice między grupami przy poziomie odcięcia $p < 0,001$ (kryterium odcięcia bez korekcji na krotność porównań). Odsetek wyników fałszywie dodatnich (FDR, *False Discovery Rate*) dla całej grupy genów oceniono na około 30%. Jednak, dla pierwszych 10 genów na tej liście różnice są silnie istotne statystycznie, szacowana wartość FDR jest poniżej progu 5%. Wśród genów tych są znane geny o ekspresji zależnej od płci (np. XIST), co potwierdza metodyczną poprawność eksperymentu. Wyniki analiz przedstawiono na wykresie typu mapy termicznej (ryc. 37), wykresie punktowym (ryc. 38) oraz w tab. 17. Przedstawiono także wyniki nienadzorowanej analizy zbioru metodą skalowania wielowymiarowego pod kątem płci, nie stwierdzano ewidentnego wpływu tego czynnika na wyniki badania.



Ryc. 38. Wykres zależności krotności różnicy ($\text{Log}_2(\text{Fold change})$) przedstawionej na osi X od znamienności statystycznej tej różnicy ($-\text{Log}_{10}(\text{p-value})$) w zależności od płci chorych. Zestawy sond wykazujące istotną statystycznie różnicę zaznaczono kolorem niebieskim ($p < 0,001$).

Fig. 38. A plot of the difference times ($\log_2(\text{Fold change})$) shown on the X axis of the statistical significance of the difference ($-\log_{10}(\text{p-value})$) based on the sex of patients. Probe sets showing a statistically significant difference shaded in non-bieskim ($p < 0.001$).



Ryc. 39. Analiza nienadzorowana metodą skalowania wielowymiarowego. Kropkami koloru czerwonego oznaczono kobiety, kolorem niebieskim mężczyzn. Rycina pokazuje zależność trzech pierwszych składowych (PC1, PC2, PC3) oddających trzy główne źródła zmienności na trzech wykresach dwuwymiarowych.

Fig. 39. Unattended analysis of multidimensional scaling method. Red dots marked woman in blue men. Figure shows the dependence of the first three components (PC1, PC2, PC3) capture the three main sources of variation in the three-dimensional graphs.

Tabela 17. Podsumowanie różnic w ekspresji genów w grupie kobiet (K) oraz mężczyzn (M). Przedstawiono istotność statystyczną różnicy (p), oszacowanie tej istotności po korekcji na porównania wielokrotne (odsetek wyników fałszywie dodatnich, FDR, *False Discovery Rate*), a także krotność różnicy pomiędzy grupą próbek raka a próbkami normalnej śluzówki. W pierwszych kolumnach przedstawiono symbol i nazwę genu oraz identyfikator zestawu sond na mikro-macierzy Affymetrix (ProbeSet).

Table 17. Summary of differences in gene expression in female (F) and male (M). Presents the statistical significance of the difference (p), to estimate the significance after correction for multiple comparisons (false-positive rate, FDR, called *False Discovery Rate*), and times the difference between the group of cancer samples and normal mucosa samples. The first column shows the symbol and the name of the gene and the identification of a set of probes on Affymetrix (ProbeSet).

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności (nieskorygowany)	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna grupa K	Średnia geometryczna grupa M
RPS4Y1	ribosomal protein S4, Y-linked 1	201909_at	1	< 1e-07	< 1e-07	0,016	10,09	632,93
KDM5D	lysine (K)-specific demethylase 5D	206700_s_at	2	< 1e-07	< 1e-07	0,16	7,85	47,7
DDX3Y	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	205000_at	3	< 1e-07	< 1e-07	0,097	6,68	68,53
XIST	X inactive specific transcript (non-protein coding)	221728_x_at	4	< 1e-07	< 1e-07	17,56	129,13	7,35
XIST	X inactive specific transcript (non-protein coding)	214218_s_at	5	< 1e-07	< 1e-07	11,37	73,81	6,49
DDX3Y	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	205001_s_at	6	< 1e-07	< 1e-07	0,19	11,47	61,12
TXLNG2P	taxilin gamma 2, pseudogene	214131_at	7	1,00e-07	0	0,47	7,15	15,36
EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	204409_s_at	8	3,00E-07	0	0,19	6,35	33,23
UTY	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, Y-linked	208067_x_at	9	2,12e-05	0,03	0,54	10,44	19,27
CPVL	carboxypeptidase, vitellogenic-like	208146_s_at	10	2,45e-05	0,03	0,39	79,69	202,42

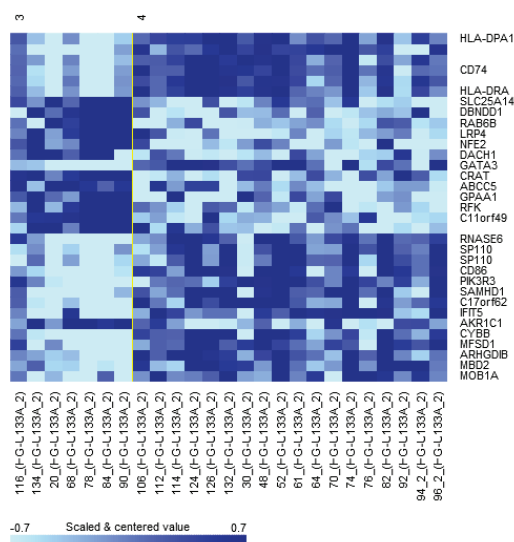
Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności (nieskorygowany)	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna grupa K	Średnia geometryczna grupa M
KIAA1033	KIAA1033	215936_s_at	11	6,21e-05	0,07	0,62	11,7	18,77
NOTCH2NL	notch 2 N-terminal like	214722_at	12	0,0001052	0,11	0,45	151,69	335,07
HNMT	histamine N-methyltransferase	211732_x_at	13	0,0001066	0,11	0,58	36,85	63,97
		217164_at	14	0,0001586	0,14	0,51	33,51	66,09
MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	218559_s_at	15	0,0001766	0,14	0,37	122,68	328,63
DAB2	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	201279_s_at	16	0,0001784	0,14	0,41	48,18	117,65
HPS5	Hermansky-Pudlak syndrome 5	204544_at	17	0,0001954	0,14	0,58	38	65,03
GPR116	G protein-coupled receptor 116	212950_at	18	0,0001972	0,14	0,38	33,71	89,74
GDPD2	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 2	220291_at	19	0,0002056	0,14	1,53	32,06	20,96
EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	204410_at	20	0,0002205	0,15	0,44	6,2	14,03
GPR116	G protein-coupled receptor 116	212951_at	21	0,0002304	0,15	0,52	22,52	43,51
N4BP2L2	NEDD4 binding protein 2-like 2	214753_at	22	0,0002571	0,15	0,4	46,62	115,99
NLGN4Y	neuroligin 4, Y-linked	207703_at	23	0,0003129	0,18	0,76	6,89	9,08
GNS	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase	212335_at	24	0,0003429	0,19	0,61	43,19	70,67
NR2F6	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	209262_s_at	25	0,0003914	0,21	1,85	291,48	157,22
DAB2	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	210757_x_at	26	0,0004072	0,21	0,43	66,59	155,64

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności (nieskorygowany)	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna grupa K	Średnia geometryczna grupa M
<u>ENTPD3</u>	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3	<u>206191_at</u>	27	0,000453	0,22	2,11	19,48	9,22
<u>SUPT6H</u>	suppressor of Ty 6 homolog (S, cerevisiae)	<u>208831_x_at</u>	28	0,0004981	0,23	1,4	54,21	38,71
<u>MFSD1</u>	major facilitator superfamily domain containing 1	<u>218109_s_at</u>	29	0,0005143	0,23	0,62	354,94	572,47
		<u>218702_at</u>	30	0,0006066	0,26	1,38	15,82	11,49
<u>N4BP2L2</u>	NEDD4 binding protein 2-like 2	<u>221899_at</u>	31	0,0006117	0,26	0,54	299,56	558,96
<u>NRP1</u>	neuropilin 1	<u>212298_at</u>	32	0,0006819	0,27	0,42	40,61	96,42
<u>EIF1AX</u>	eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked	<u>201019_s_at</u>	33	0,0007032	0,27	1,59	409,74	257,97
<u>SH2B3</u>	SH2B adaptor protein 3	<u>203320_at</u>	34	0,0007108	0,27	0,58	46,11	79,41
<u>TSPAN4</u>	tetraspanin 4	<u>209264_s_at</u>	35	0,0007312	0,27	0,47	26,26	55,33
<u>ATP5I</u>	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit E	<u>207335_x_at</u>	36	0,0007313	0,27	1,3	406,8	312,02
<u>LAIR1</u>	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1	<u>210644_s_at</u>	37	0,0007684	0,27	0,44	28,72	65,07
<u>QKI</u>	QKI, KH domain containing, RNA binding	<u>214543_x_at</u>	38	0,0007986	0,27	0,7	19,65	28
<u>ALDH3A1</u>	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	<u>205623_at</u>	39	0,0008048	0,27	3,22	44,81	13,93
<u>CC2D1A</u>	coiled-coil and C2 domain containing 1A	<u>207083_s_at</u>	40	0,0008091	0,27	1,24	9,27	7,45
<u>MID1IP1</u>	MID1 interacting protein 1	<u>218251_at</u>	41	0,0008364	0,27	1,64	41,32	25,27
<u>DOCK9</u>	dedicator of cytokinesis 9	<u>212538_at</u>	42	0,0009012	0,28	0,39	35,27	90,76
<u>PPP6R3</u>	protein phosphatase 6, regulatory subunit 3	<u>217928_s_at</u>	43	0,0009925	0,3	1,4	105,08	75,24

Podstawową cechą kliniczną chorych poddaną ocenie w ramach badania były różnice w wyjściowym zaawansowaniu choroby, które wysoce rzutują na wyniki leczenia operacyjnego raka żołądka. Poddano analizie związek z ekspresją genów zaawansowania guza pierwotnego oraz zaawansowania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.

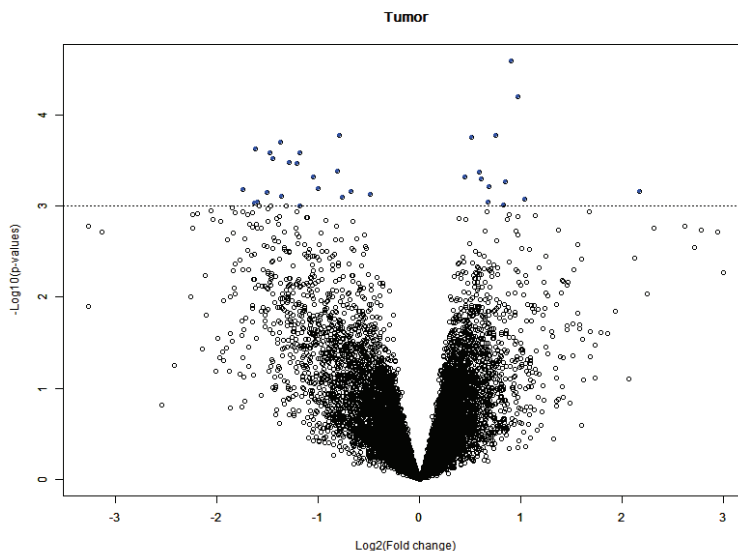
Porównano profil ekspresji genów u chorych w bardzo wysokim zaawansowaniu guza pierwotnego (T4) w stosunku do chorych mniej zaawansowanych (T2-3, tylko dwóch chorych w tej grupie w zaawansowaniu T2).

Stwierdzono, że przy poziomie odcięcia $p < 0,001$ (kryterium odcięcia bez korekcji na krotność porównań) 33 zestawy sond wykazują różnice między grupami. Odsetek wyników fałszywie dodatnich (FDR, *False Discovery Rate*) dla tej grupy szacowany jest na około 30%, co wskazuje na najwyższą średnią istotność statystyczną obserwowanych różnic.



Ryc. 40. Wykres typu mapy termicznej (ang. heatmap) dla różnic w ekspresji genów powiązanych z zaawansowaniem guza pierwotnego (jako „3” oznaczono grupę T2-T3, jako „4” grupę T4). Ekspresję genów zakodowaną graficznie (wg skali poniżej wykresu, natężenie koloru niebieskiego odpowiada ekspresji genów) przedstawiono w wierszach, wszystkie zestawy sond wykazują istotną statystycznie różnicę ($p < 0,001$). Ekspresja genów przedstawiona na wykresie została poddana normalizacji (centrowanie i skalowanie).

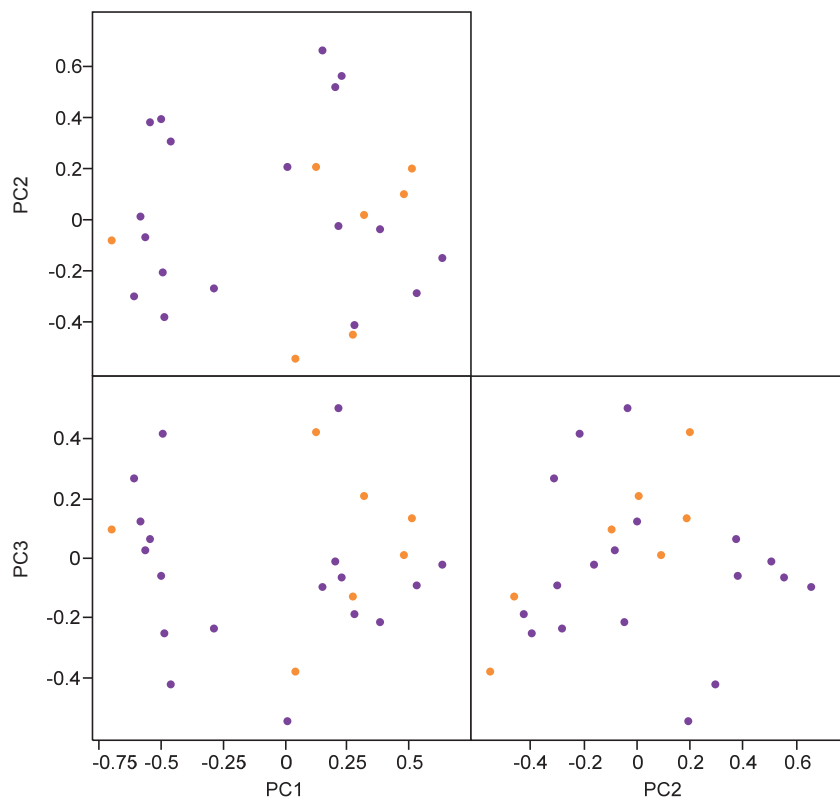
Fig. 40. Figure thermal map type (called heatmap) for the differences in the expression of genes associated with the primary tumor (as a "3" indicates a T2-T3, as "4" a T4). Graphically encoded gene expression (according to the scale below the graph, the intensity of blue color corresponds to the expression of genes) are shown in the rows, all probe sets show a statistically significant difference ($p < 0.001$). gene expression shown in the graph has been subjected to normalization (centering and scaling).



Ryc. 41. Wykres zależności krotności różnicy ($\text{Log}_2(\text{Fold change})$) przedstawionej na osi X od znamienności statystycznej tej różnicy ($-\text{Log}_{10}(\text{p-value})$) w zależności od zaawansowania guza pierwotnego. Zestawy sond wykazujące istotną statystycznie różnicę zaznaczono kolorem niebieskim ($p < 0,001$).

Fig. 41. A plot of the difference times ($\log_2(\text{Fold change})$) shown on the X axis of the statistical significance of the difference ($-\log_{10}(\text{p-value})$) based on the primary tumor. Probe sets showing a statistically significant difference was noted in blue ($p < 0.001$).

Wyniki analiz przedstawiono na wykresie typu mapy termicznej (ryc. 40), wykresie punktowym (ryc. 42) oraz w tab.18. Przedstawiono także wyniki nienadzorowanej analizy zbioru metodą skalowania wielowymiarowego pod kątem zaawansowania guza pierwotnego, które wskazują iż cecha ta może rzutować na główne źródła zmienności w badanym zbiorze – w obrębie pierwszej głównej składowej (PC1) wyodrębniają się dwa klastry, w tym klaster po stronie lewej wykresu zawiera praktycznie jedynie guzy bardziej zaawansowane.



Ryc. 42. Analiza nienadzorowana metodą skalowania wielowymiarowego. Kropkami koloru pomarańczowego oznaczono chorych T2-T3, kolorem fioletowym chorych T4. Rycina pokazuje zależność trzech pierwszych składowych (PC1, PC2, PC3) oddających trzy główne źródła zmienności na trzech wykresach dwuwymiarowych.

Fig. 42. Unattended analysis of multidimensional scaling method. Orange dots indicates patients T2-T3, T4 patients in purple. Figure shows the dependence of the first three components (PC1, PC2, PC3) capture the three main sources of variation in the three-dimensional graphs.

Tabela 18. Podsumowanie różnic w ekspresji genów w grupie T2-3 oraz grupie T4. Przedstawiono istotność statystyczną różnicy (p), oszacowanie tej istotności po korekcji na porównania wielokrotne (odsetek wyników fałszywie dodatnich, FDR, *False Discovery Rate*), a także krotność różnicy pomiędzy grupą próbek raka a próbkami normalnej śluzówki. W pierwszych kolumnach przedstawiono symbol i nazwę genu oraz identyfikator zestawu sond na mikromacierzy Affymetrix (ProbeSet).

Table 18. Summary of differences in gene expression in group 3, and T2-T4 group. Presents the statistical significance of the difference (p), to estimate the significance after correction for multiple comparisons (false-positive rate, FDR, called *False Discovery Rate*), and times the difference between the group of cancer samples and normal mucosa samples. The first column shows the symbol and the name of the gene and the identification of a set of probes on Affymetrix (ProbeSet).

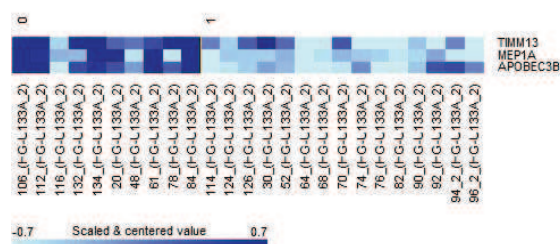
Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności (nieskorygowany)	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna grupa T2-T3	Średnia geometryczna grupa T4
C11orf49	chromosome 11 open reading frame 49	203257_s_at	1	2,55E-05	0,31	1,87	124,01	66,24
LRP4	low density lipoprotein receptor-related protein 4	212850_s_at	2	6,26E-05	0,31	1,96	20,29	10,33
MFSD1	major facilitator superfamily domain containing 1	218109_s_at	3	0,0001694	0,31	0,58	326,26	566,15
NFE2	nuclear factor (erythroid-derived 2), 45kDa	209930_s_at	4	0,0001697	0,31	1,69	13,89	8,24
SLC25A14	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, brain), member 14	211855_s_at	5	0,0001766	0,31	1,43	22,78	15,98
GATA3	GATA binding protein 3	209604_s_at	6	0,000198	0,31	0,39	15,13	39,09
RNASE6	ribonuclease, RNase A family, k6	213566_at	7	0,0002365	0,31	0,32	46,26	142,49
SAMHD1	SAM domain and HD domain 1	204502_at	8	0,0002609	0,31	0,44	30,48	69,3
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	209619_at	9	0,0002631	0,31	0,36	892,15	2485,84
CD86	CD86 molecule	210895_s_at	10	0,0003021	0,31	0,37	21,72	59,47
ARHGDI3	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	201288_at	11	0,0003336	0,31	0,41	172,03	420,48
		201601_x_at	12	0,0003407	0,31	0,43	544,69	1262,73
C17orf62	chromosome 17 open reading frame 62	218130_at	13	0,0004163	0,31	0,57	44,07	77,33
		33132_at	14	0,00042	0,31	1,51	98,55	65,27
SP110	SP110 nuclear body protein	208012_x_at	15	0,0004785	0,31	0,48	65,96	136,15
DBNDD1	dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 1	222234_s_at	16	0,0004839	0,31	1,36	23,21	17,03
DACH1	dachshund homolog 1 (Drosophila)	205471_s_at	17	0,0005065	0,31	1,52	13,61	8,93
RAB6B	RAB6B, member RAS oncogene family	210127_at	18	0,0005408	0,31	1,8	12,93	7,17

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności (nieskorygowany)	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna grupa T2-T3	Średnia geometryczna grupa T4
<u>CRAT</u>	carnitine O-acetyltransferase	<u>209522_s_at</u>	19	0,0006079	0,31	1,61	54,98	34,22
<u>SP110</u>	SP110 nuclear body protein	<u>209762_x_at</u>	20	0,0006436	0,31	0,5	56,72	113,75
<u>CYBB</u>	cytochrome b-245, beta polypeptide	<u>203923_s_at</u>	21	0,0006567	0,31	0,3	91,36	306,03
<u>MBD2</u>	methyl-CpG binding domain protein 2	<u>202484_s_at</u>	22	0,0006874	0,31	0,62	176,75	283,3
<u>AKR1C1</u>	aldo-keto reductase family 1, member C1	<u>216594_x_at</u>	23	0,0006887	0,31	4,5	912,03	202,55
		<u>204670_x_at</u>	24	0,0007082	0,31	0,35	702,69	2003,03
<u>MOB1A</u>	MOB kinase activator 1A	<u>214812_s_at</u>	25	0,0007432	0,31	0,71	248,62	348,79
<u>HLA-DPA1</u>	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	<u>211990_at</u>	26	0,0007768	0,31	0,39	1385,49	3563,15
<u>IFIT5</u>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	<u>203596_s_at</u>	27	0,0008075	0,31	0,59	42,43	72,17
<u>RFK</u>	riboflavin kinase	<u>203225_s_at</u>	28	0,0008371	0,31	2,05	170,93	83,26
<u>GPAA1</u>	glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1	<u>215690_x_at</u>	29	0,0009034	0,31	1,6	206,81	129,36
		<u>215193_x_at</u>	30	0,0009152	0,31	0,33	468,65	1423,2
<u>HLA-DRA</u>	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	<u>208894_at</u>	31	0,0009215	0,31	0,32	642,42	1989,21
<u>ABCC5</u>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	<u>209380_s_at</u>	32	0,0009652	0,31	1,77	65,4	36,89
<u>PIK3R3</u>	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)	<u>202743_at</u>	33	0,0009992	0,31	0,44	28,71	65,13

Drugim elementem wyjściowego zaawansowania choroby poddanym analizie był stopień zaawansowania lokoregionalnych przerzutów węzłowych. Dokonano zarówno analizy chorych bez przerzutów do węzłów (N0) w stosunku do chorych z przerzutami (N1-3) jak i porównania chorych o niższym i wyższym zaawansowaniu (różnica N0-1 vs N2-3).

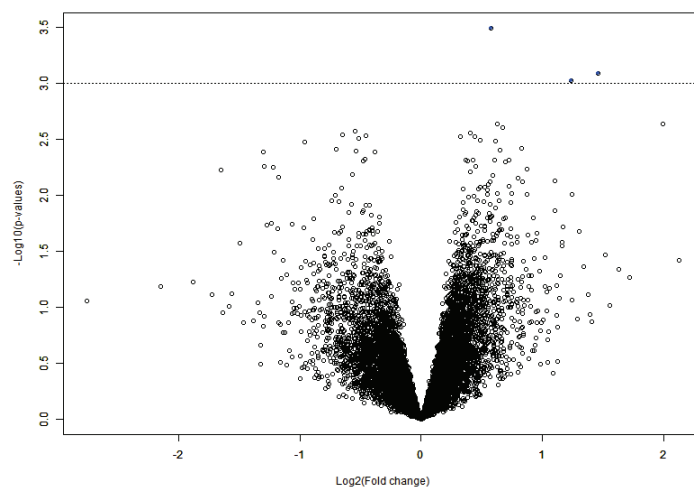
Dokonano porównania ekspresji genów w grupie chorych bez przerzutów węzłowych (N0) w stosunku do chorych z przerzutami (N1-3). Nie ujawniono żadnych genów istotnie statystycznie różnicujących między oboma grupami – na wynik tego porównania znacząco może wpływać fakt, że grupa N0 badana za pomocą mikromacierzy liczyła tylko 4 chorych, co istotnie osłabia statystyczną moc porównania.

Biorąc powyższy wynik pod uwagę, jako główne porównanie przeprowadzono analizę między grupą N0-1 i grupą N2-3. Stwierdzono, że dla różnicy N0-1 vs N2-3 tylko 3 geny (TIMM13, MEP1A i APOBEC3B) spełniają minimalne kryterium ($p < 0,001$, bez korekcji na krotność porównań), a analiza odsetka wyników fałszywie dodatnich (FDR) wskazuje na bardzo duże ryzyko przypadkowości uzyskanych wyników.



Ryc. 43. Wykres typu mapy termicznej (*heatmap*) dla różnic w ekspresji genów powiązanych z zaawansowaniem węzłowym (grupa N0-1, oznaczona „0”, oraz grupa N2-3, oznaczona „1”). Ekspresję genów zakodowaną graficznie (wg skali poniżej wykresu, natężenie koloru niebieskiego odpowiada ekspresji genów) przedstawiono w wierszach, wszystkie zestawy sond wykazują istotną statystycznie różnicę ($p < 0.001$). Ekspresja genów przedstawiona na wykresie została poddana normalizacji (centrowanie i skalowanie).

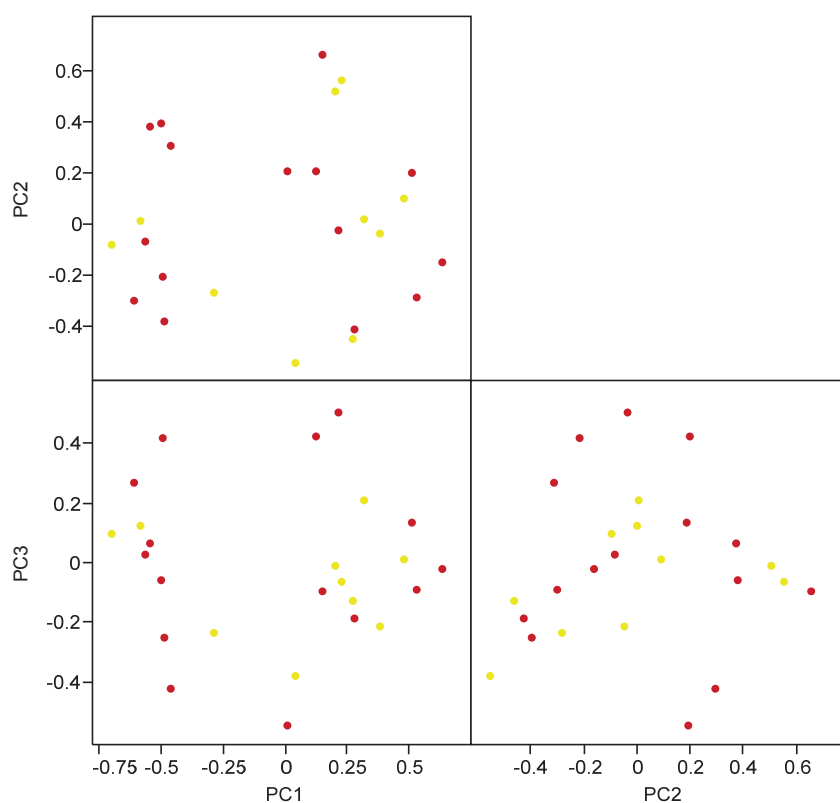
Fig. 43. Figure thermal map type (called *heatmap*) for the differences in the expression of genes associated with advancing node (N0-one group, designated "0", and a group of N2-3, labeled "1"). The expression of genes encoded graphically (according to the scale below the graph, the intensity of the blue color corresponds to the expression of genes) are shown in rows, all probe sets show a statistically significant difference ($p < 0.001$). Expression of genes represented on the graph has been subjected to standardization (centering and scaling).



Ryc. 44. Wykres zależności krotności różnicy ($\text{Log}_2(\text{Fold change})$) przedstawionej na osi X od znamienności statystycznej tej różnicy ($-\text{Log}_{10}(\text{p-value})$) w zależności od zaawansowania węzłowego. Zestawy sond wykazujące istotną statystycznie różnicę zaznaczono kolorem niebieskim ($p < 0.001$).

Fig. 44. A plot of the difference times ($\text{log}_2(\text{Fold change})$) shown on the X axis of the statistical significance of the difference ($-\text{log}_{10}(\text{p-value})$) based on the node's advancement. Probe sets showing a statistically significant difference was noted in blue ($p < 0.001$).

Wyniki analiz przedstawiono na wykresie typu mapy termicznej (ryc. 43), wykresie punktowym (ryc. 45) oraz w tab. 19. Przedstawiono także wyniki nienadzorowanej analizy zbioru metodą skalowania wielowymiarowego pod kątem zaawansowania węzłowego, które wskazują iż ta cecha potencjalnie może nakładać się na dwa główne klastry próbek wyodrębniane przez 1 główną składową (lewy klaster grupuje znacznie więcej chorych o wyższym zaawansowaniu węzłowym).



Ryc. 45. Analiza nienadzorowana metodą skalowania wielowymiarowego. Kropkami koloru żółtego oznaczono chorych N0-1, a chorych N2-3 kolorem czerwonym. Rycina pokazuje zależność trzech pierwszych składowych (PC1, PC2, PC3) oddających trzy główne źródła zmienności na trzech wykresach dwuwymiarowych.

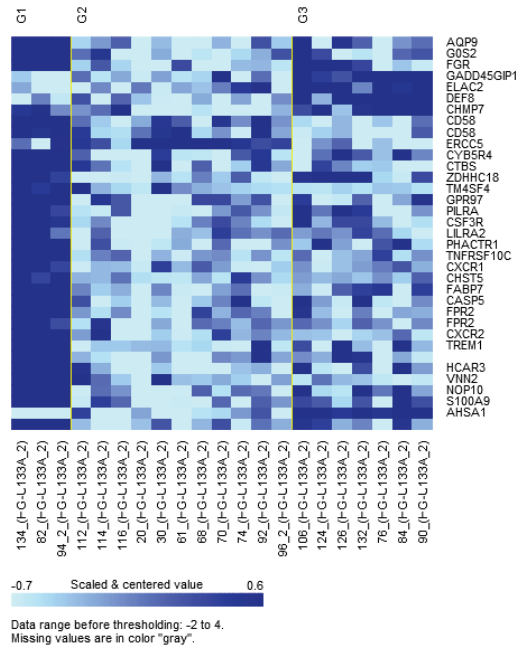
Fig. 45. Unattended analysis of multidimensional scaling method. The yellow dots determined N0-1 patients, and three patients N2-red. Figure shows the dependence of the first three components (PC1, PC2, PC3) capture the three main sources of variation in the three-dimensional graphs.

Tabela 19. Podsumowanie różnic w ekspresji genów w zależności od zaawansowania węzłowego. Przedstawiono istotność statystyczną różnicy (p), oszacowanie tej istotności po korekcji na porównania wielokrotne (odsetek wyników fałszywie dodatnich, FDR, *False Discovery Rate*), a także krotność różnicy pomiędzy grupą próbek raka a próbkami normalnej śluzówki. W pierwszych kolumnach przedstawiono symbol i nazwę genu oraz identyfikator zestawu sond na mikro-macierzy Affymetrix (ProbeSet).

Table 19. Summary of differences in gene expression depending on the level node. Presents the statistical significance of the difference (p), to estimate the significance after correction for multiple comparisons (false-positive rate, FDR, called *False Discovery Rate*), and times the difference between the group of cancer samples and normal mucosa samples. The first column shows the symbol and the name of the gene and the identification of a set of probes on Affymetrix (ProbeSet).

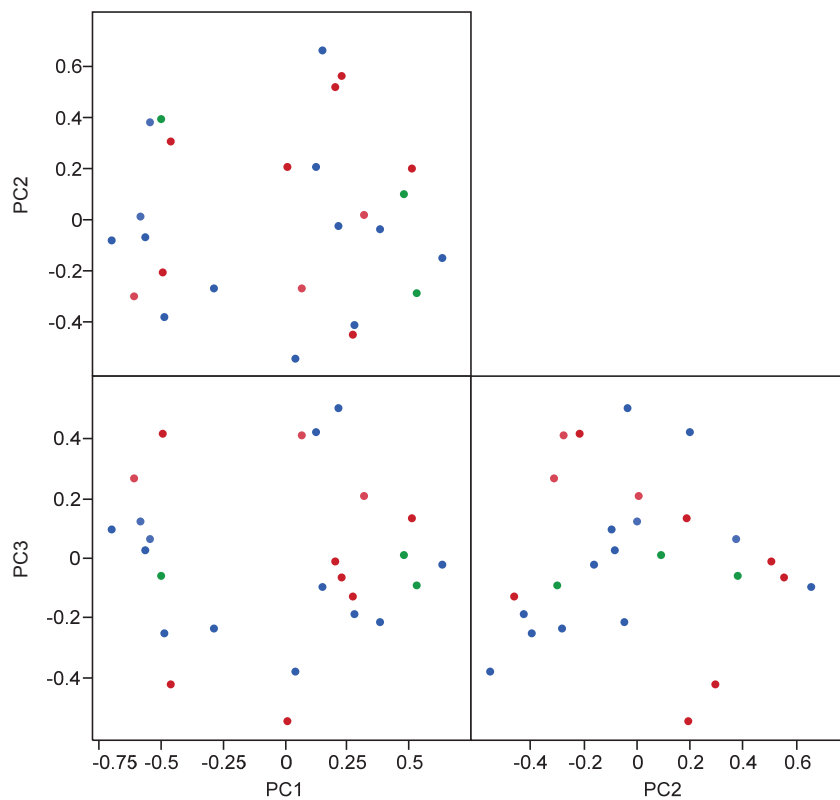
Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności (nie-skorygowany)	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna grupa N0-1	Średnia geometryczna grupa N2-3
<u>TIMM13</u>	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)	<u>218188_s_at</u>	1	0,0003232	1	1,49	137,53	92,05
<u>MEP1A</u>	mepirin A, alpha (PABA peptide hydrolase)	<u>206000_at</u>	2	0,000815	1	2,75	20,93	7,61
<u>APOBEC3B</u>	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	<u>206632_s_at</u>	3	0,0009467	1	2,36	39,06	16,55

Analizie poddano także stopień zróżnicowania badanych raków żołądka oceniany w pooperacyjnym badaniu histopatologicznym (*grading*). 35 genów (zestawów sond) wykazywało różnice powiązane ze stopniem zróżnicowania. Dla całej tej listy odsetek wyników fałszywie dodatnich (FDR, *False Discovery Rate*) oszacowano na 37%, jednak kilka genów o najwyższej istotności wykazywało wartości FDR wskazujące na wysokie prawdopodobieństwo różnicy, w tym cztery geny $FDR < 5\%$. Wyniki analiz przedstawiono na wykresie typu mapy termicznej (ryc. 46) oraz w tab. 20. W analizie nienadzorowanej stopień zróżnicowania nie wydawał się mieć związku z głównymi wzorcami zmienności w badanej grupie.



Ryc. 46. Wykres typu mapy termicznej (*heatmap*) dla różnic w ekspresji genów powiązanych ze stopniem zróżnicowania. Ekspresję genów zakodowaną graficznie (wg skali poniżej wykresu, natężenie koloru niebieskiego odpowiada ekspresji genów) przedstawiono w wierszach, wszystkie zestawy sond wykazują istotną statystycznie różnicę ($p < 0,001$). Ekspresja genów przedstawiona na wykresie została poddana normalizacji (centrowanie i skalowanie). Wyraźnie widać że główne różnice dotyczą odrębności grupy G1 od dwóch pozostałych podgrup.

Fig. 46. Chart thermal map type (called *heatmap*) for differences in gene expression associated with the degree of differentiation. The expression of genes encoded graphically (according to the scale below the graph, the intensity of the blue color corresponds to the expression of genes) are shown in rows, all probe sets show a statistically significant difference ($p < 0.001$). Expression of genes represented on the graph has been subjected to standardization (centering and scaling). It is evident that the main differences are distinct groups G1 from the other two subgroups.



Ryc. 47. Analiza nienadzorowana metodą skalowania wielowymiarowego. Kropkami koloru zielonego oznaczono próbki G1, niebieskiego G2 a czerwonego G3. Rycina pokazuje zależność trzech pierwszych składowych (PC1, PC2, PC3) oddających trzy główne źródła zmienności na trzech wykresach dwuwymiarowych.

Fig. 47. Unattended analysis of multidimensional scaling method. Green dots marked samples G1, G2 blue and red G3. Figure shows the dependence of the first three components (PC1, PC2, PC3) capture the three main sources of variation in the three-dimensional graphs.

Tabela 20. Podsumowanie różnic w ekspresji genów w zależności od stopnia zróżnicowania histologicznego guza. Przedstawiono istotność statystyczną różnicy (p), oszacowanie tej istotności po korekcji na porównania wielokrotne (odsetek wyników fałszywie dodatnich, FDR, *False Discovery Rate*), a także krotność różnicy pomiędzy grupą próbek raka a próbkami normalnej śluzówki. W pierwszych kolumnach przedstawiono symbol i nazwę genu oraz identyfikator zestawu sond na mikromacierzy Affymetrix (ProbeSet).

Table 20. Summary of differences in gene expression, depending on the degree of histological differentiation of the tumor. Presents the statistical significance of the difference (p), to estimate the significance after correction for multiple comparisons (the percentage of false positives, FDR, called *False Discovery Rate*), and times the difference between the group of cancer samples and normal mucosa samples. The first column shows the symbol and the name of the gene and the identification of a set of probes on Affymetrix (ProbeSet).

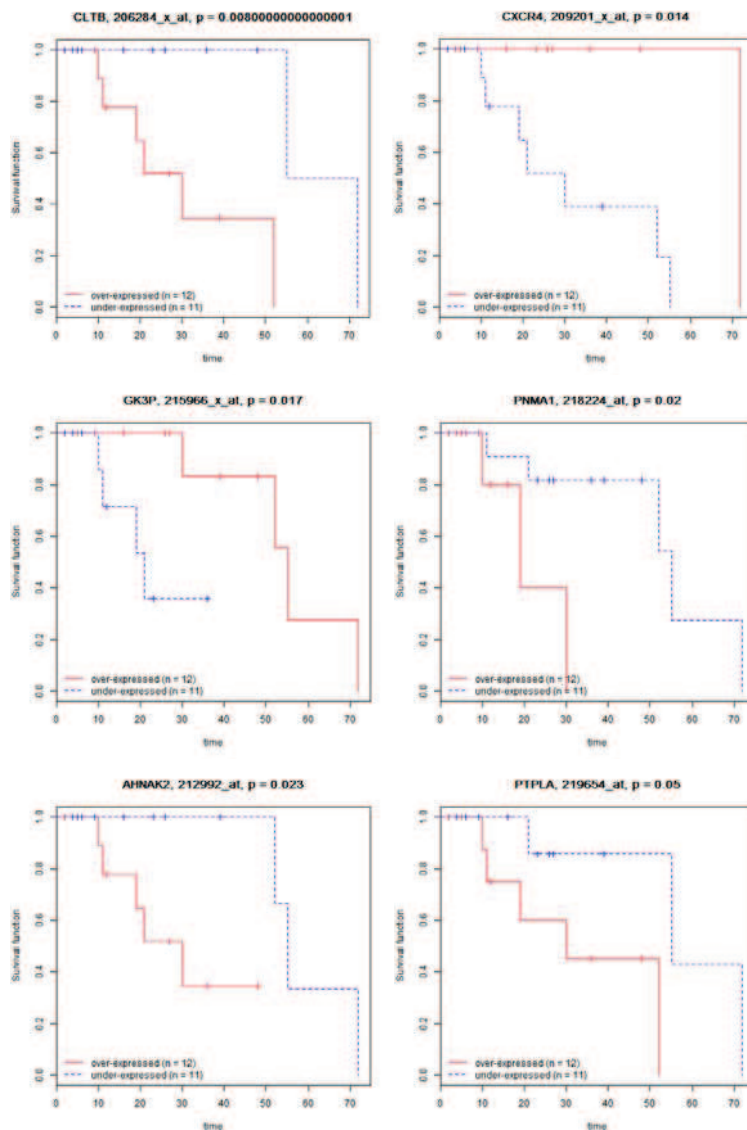
Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności (nieskorygowany)	FDR	Średnia geometryczna grupa G1	Średnia geometryczna grupa G2	Średnia geometryczna grupa G3
<u>AHSA1</u>	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)	<u>201491_at</u>	1	1,50e-06	0,02	162,02	198,41	359,65
<u>CXCR2</u>	chemokine (C-X-C motif) receptor 2	<u>207008_at</u>	2	3,50e-06	0,02	205,84	20,72	18,05
<u>FPR2</u>	formyl peptide receptor 2	<u>210772_at</u>	3	3,60e-06	0,02	22,5	8,76	9,01
<u>HCAR3</u>	hydroxycarboxylic acid receptor 3	<u>205220_at</u>	4	7,10e-06	0,02	152,08	11,4	18,05
<u>AQP9</u>	aquaporin 9	<u>205568_at</u>	5	3,15e-05	0,08	498,89	43,87	72,1
<u>CTBS</u>	chitobiase, di-N-acetyl-	<u>218923_at</u>	6	4,51e-05	0,09	64,36	33,67	29,73
<u>TNFRSF10C</u>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain	<u>211163_s_at</u>	7	4,72e-05	0,09	28,81	8,09	8,78
<u>PHACTR1</u>	phosphatase and actin regulator 1	<u>213638_at</u>	8	8,17e-05	0,11	30,47	9,7	12,72
<u>CXCR1</u>	chemokine (C-X-C motif) receptor 1	<u>207094_at</u>	9	8,32e-05	0,11	22,7	10,8	11,33
<u>CSF3R</u>	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	<u>203591_s_at</u>	10	9,69e-05	0,11	57,07	12,95	16,03
		<u>208785_s_at</u>	11	9,85e-05	0,11	313,18	142,22	162,1

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności (nieskorygowany)	FDR	Średnia geometryczna grupa G1	Średnia geometryczna grupa G2	Średnia geometryczna grupa G3
FABP7	fatty acid binding protein 7, brain	205030_at	12	9,93e-05	0,11	13,14	7,32	8
ZDHHC18	zinc finger, DHHC-type containing 18	212860_at	13	0,0001116	0,11	63,79	33,36	44,06
GADD45GIP1	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma interacting protein 1	212891_s_at	14	0,0001446	0,13	45,39	57,25	85,23
TM4SF4	transmembrane 4 L six family member 4	209937_at	15	0,0001509	0,13	348,27	13,14	7,23
CD58	CD58 molecule	211744_s_at	16	0,0001735	0,14	160,92	60,66	45,63
TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	219434_at	17	0,0001747	0,14	108,45	16,87	22,12
NOP10	NOP10 ribonucleo-protein	217962_at	18	0,0001898	0,14	1219,09	778,75	911,34
ELAC2	elaC homolog 2 (E. coli)	201767_s_at	19	0,0002305	0,16	48,88	57,33	83,18
CD58	CD58 molecule	216942_s_at	20	0,0002553	0,17	106,5	44,72	30,74
DEF8	differentially expressed in FDCP 8 homolog (mouse)	219646_at	21	0,0003352	0,21	42,25	41,81	70,58
FPR2	formyl peptide receptor 2	210773_s_at	22	0,0003992	0,24	18,33	9,24	9,66
CASP5	caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase	207500_at	23	0,0004158	0,24	12,87	7,53	8,23
S100A9	S100 calcium binding protein A9	203535_at	24	0,0004335	0,24	1231,3	143,29	270,05
G0S2	G0/G1switch 2	213524_s_at	25	0,0004519	0,24	427,17	78,82	92,51
CHST5	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 5	221164_x_at	26	0,0004696	0,24	27,83	10,32	10,67
CHMP7	charged multivesicular body protein 7	212313_at	27	0,0005884	0,29	63,55	47,67	74,32

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności (nieskorygowany)	FDR	Średnia geometryczna grupa G1	Średnia geometryczna grupa G2	Średnia geometryczna grupa G3
<u>FGR</u>	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog	<u>208438_s_at</u>	28	0,0006321	0,3	124,47	26,29	44,3
<u>GPR97</u>	G protein-coupled receptor 97	<u>220404_at</u>	29	0,0006605	0,3	35,86	15,94	17,1
<u>LILRA2</u>	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 2	<u>207857_at</u>	30	0,0008129	0,35	34,64	13,08	14,13
		<u>204006_s_at</u>	31	0,0008312	0,35	138,14	18,88	25,81
<u>CYB5R4</u>	cytochrome b5 reductase 4	<u>219079_at</u>	32	0,0009022	0,37	94,15	40,98	53,36
<u>ERCC5</u>	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5	<u>202414_at</u>	33	0,0009215	0,37	36,29	46,68	29,76
<u>VNN2</u>	vanin 2	<u>205922_at</u>	34	0,0009506	0,37	78,18	16,66	12,87
<u>PILRA</u>	paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha	<u>219788_at</u>	35	0,0009848	0,37	41,01	14,99	19,22

4.4. Analiza ekspresji genów na podstawie badania metodą mikromacierzy w próbkach raka żołądka w zależności od czasu przeżycia chorych i głównych źródeł zmienności w ekspresji genów

W kolejnym kroku dokonano analizy związku ekspresji genów z całkowitym czasem przeżycia chorych. Nie zidentyfikowano żadnych genów, dla których związek byłby statystycznie istotny przy $p < 0,001$. Podobnie, znalezione różnice w ekspresji kiedy przeanalizowano je po korekcji na krotkość porównań metodą FDR nie były zupełnie istotne ($FDR > 10\%$). Na ryc. 48 przedstawiono krzywe przeżycia całkowitego dla 6 genów wykazujących największą skalę różnic – wynik ten należy jednak interpretować z ostrożnością.

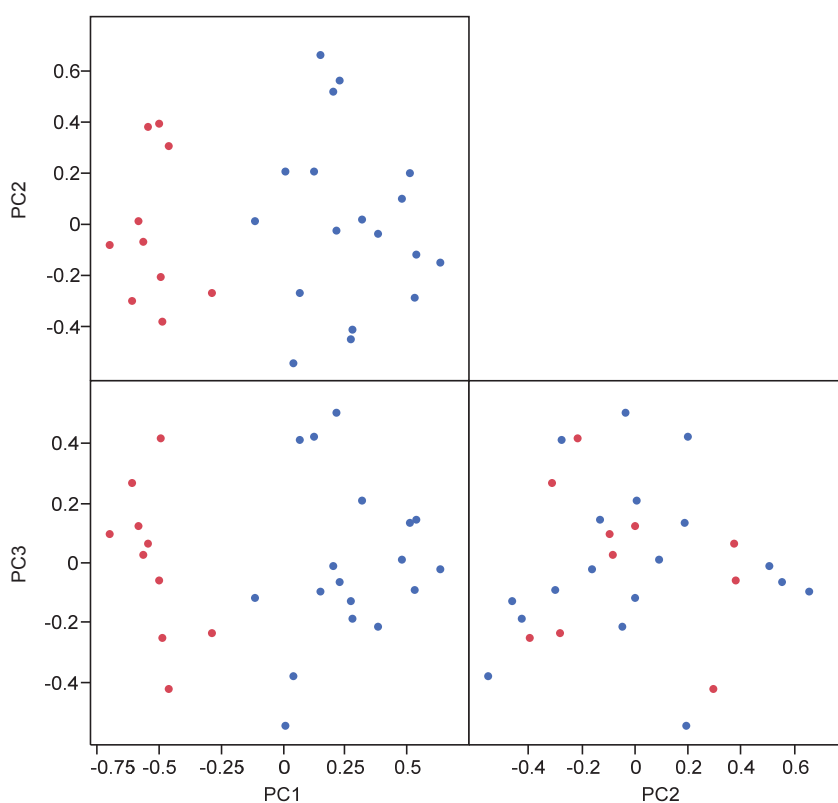


Ryc. 48. Różnice w ekspresji genów związane potencjalnie z czasem przeżycia całkowitego chorych. Na każdej z rycin przedstawiono dwie krzywe, dla chorych z ekspresją genu powyżej mediany (czerwona) oraz poniżej mediany (niebieska). Nad wykresem podano nieskorygowaną istotność statystyczną obserwowanej różnicy.

Fig. 48. Differences in gene expression associated with the possible overall survival of patients. On each of the figures shows two curves for patients with above median gene expression (red) and below the median (blue). Above the graph are given uncorrected statistical significance of the observed difference.

Biorąc pod uwagę że wyniki wcześniej przeprowadzonych analiz wskazywały że zaawansowanie lokoregionalne choroby (cecha T i cecha N) mogą być powiązane z

głównymi źródłami zmienności w badanej grupie chorych, zdecydowano się przeanalizować różnice między dwoma głównymi klastrami w analizie nienadzorowanej (ryc. 49).



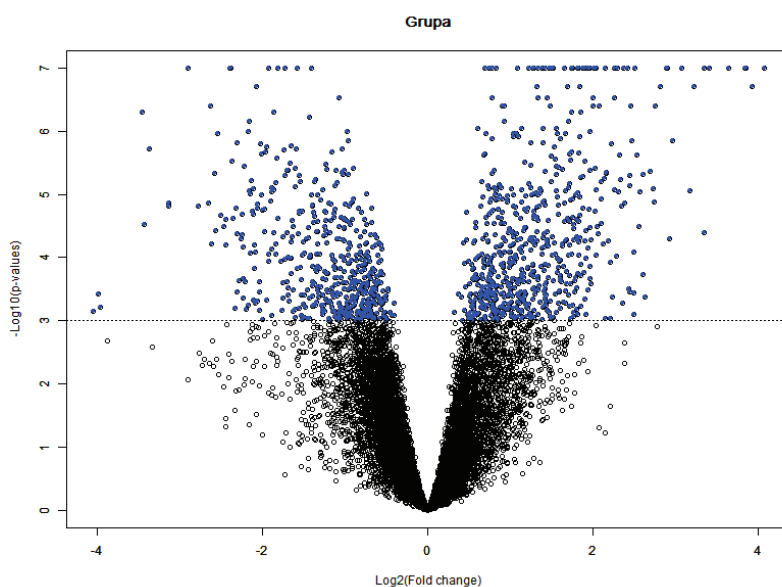
Ryc. 49. Analiza nienadzorowana metodą skalowania wielowymiarowego. Rycina pokazuje zależność trzech pierwszych składowych (PC1, PC2, PC3) oddających trzy główne źródła zmienności na trzech wykresach dwuwymiarowych. Kropkami koloru czerwonego oznaczono lewy klaster, nazwany „grupa 1”, kropkami niebieskimi prawy klaster nazwany „grupa 2”.

Fig. 49. Unattended analysis of multidimensional scaling method. Figure shows the dependence of the first three components (PC1, PC2, PC3) capture the three main sources of variation in the three graphs dwuwymiarowych. Kropkami red color indicates the left cluster, named "Group 1", dotted blue right cluster called "group 2".

Lewy klaster, potencjalnie związany z większym wyjściowym zaawansowaniem nowotworu, opisano jako „grupa 1” (na rycinie kolor czerwony), klaster prawy jako grupa 2 (na rycinie kolor niebieski).

Potwierdzono, że różnica między dwoma badanymi klastrami w zakresie ekspresji genów jest duża. Przy poziomie odcięcia $p < 0,001$ (kryterium odcięcia bez korekcji na krotność porównań) 1175 zestawów sond wykazuje różnice między grupami. Odsetek wyników fałszywie dodatnich (FDR, *False Discovery Rate*) w tak wyselekcjonowanej grupie można szacować na około 0,01%. Wskazuje to na dużą istotność statystyczną różnic powiązanych z wiekiem i przemawia za udziałem tej cechy w kształtowaniu pro-

filu ekspresji genów badanych próbek raka żołądka. Wyniki analiz przedstawiono na wykresie typu mapy termicznej (ryc. 50), wykresie punktowym (ryc. 51) oraz w tab. 21. Przedstawiono także wyniki nienadzorowanej analizy zbioru metodą skalowania wielowymiarowego pod kątem wieku, które wskazują iż ta cecha rzutuje na główne źródła zmienności w badanym zbiorze.



Ryc. 50. Wykres zależności krotności różnicy ($\text{Log}_2(\text{Fold change})$) przedstawionej na osi X od znamienności statystycznej tej różnicy ($-\text{Log}_{10}(\text{p-value})$) między grupą 1 i grupą 2 chorych. Zestawy sond wykazujące istotną statystycznie różnicę zaznaczono kolorem niebieskim ($p < 0,001$).

Fig. 50. A plot of the difference times ($\log_2(\text{Fold change})$) shown on the X axis of the statistical significance of the difference ($-\log_{10}(\text{p-value})$) between group 1 and group 2 patients. Probe sets showing a statistically significant difference was noted in blue ($p < 0.001$).



Ryc. 51. Wykres typu mapy termicznej (*heatmap*) dla różnic w ekspresji genów powiązanych z różnicą między dwoma głównymi klastrami w analizie nienadzorowanej. Ekspresję genów zakodowaną graficznie (wg skali poniżej wykresu, natężenie koloru niebieskiego odpowiada ekspresji genów) przedstawiono w wierszach, wszystkie zestawy sond wykazują istotną statystycznie różnicę ($p < 0,001$). Ekspresja genów przedstawiona na wykresie została poddana normalizacji (centrowanie i skalowanie).

Fig. 51. Chart thermal map type (called *heatmap*) for differences in gene expression associated with the difference between the two main clusters in the analysis unattended. Graphically encoded gene expression (according to the scale below the graph, the intensity of blue color corresponding to the expression of genes) are shown in the rows, all probe sets show a statistically significant difference ($p < 0.001$). Expression of genes represented on the graph has been subjected to standardization (centering and scaling).

Tabela 21. Podsumowanie różnic w ekspresji genów w grupie 1 oraz grupie 2. Przedstawiono istotność statystyczną różnicy (p), oszacowanie tej istotności po korekcji na porównania wielokrotne (odsetek wyników fałszywie dodatnich, FDR, *False Discovery Rate*), a także krotność różnicy pomiędzy grupą próbek raka a próbkami normalnej śluzówki. W pierwszych kolumnach przedstawiono symbol i nazwę genu oraz identyfikator zestawu sond na mikromacierzy Affymetrix (ProbeSet). Z całej grupy 1175 zestawów sond przedstawiono tylko 100 pierwszych.

Table 21. Summary of differences in gene expression in group 1 and group 2. Presents the statistical significance of the difference (p), to estimate the significance after correction for multiple comparisons (false-positive rate, FDR, called *False Discovery Rate*), and times the difference between the group of cancer samples and normal mucosa samples. The first column shows the symbol and the name of the gene and the identification of a set of probes on Affymetrix (ProbeSet). In the entire group of 1175 probe sets are shown only the first 100.

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie 1	Średnia geometryczna w grupie 2
<u>MEOX1</u>	mesenchyme homeobox 1	<u>205619_s_at</u>	1	< 1e-07	< 1e-07	2,78	32,72	11,78
<u>MAN1C1</u>	mannosidase, alpha, class 1C, member 1	<u>214180_at</u>	2	< 1e-07	< 1e-07	2,88	51,8	18,01
<u>JAM2</u>	junctional adhesion molecule 2	<u>219213_at</u>	3	< 1e-07	< 1e-07	5,34	111,9	20,94
<u>FMO1</u>	flavin containing monooxygenase 1	<u>205666_at</u>	4	< 1e-07	< 1e-07	5,38	62,19	11,56
<u>DCLK1</u>	doublecortin-like kinase 1	<u>205399_at</u>	5	< 1e-07	< 1e-07	4,43	57,77	13,05
<u>SMAGP</u>	small cell adhesion glycoprotein	<u>209679_s_at</u>	6	< 1e-07	< 1e-07	0,26	47,46	181,07
<u>RGL1</u>	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	<u>209568_s_at</u>	7	< 1e-07	< 1e-07	3,84	219,35	57,08
<u>LPAR1</u>	lysophosphatidic acid receptor 1	<u>204036_at</u>	8	< 1e-07	< 1e-07	4,05	118,4	29,23
<u>S1PR1</u>	sphingosine-1-phosphate receptor 1	<u>204642_at</u>	9	< 1e-07	< 1e-07	2,79	72,53	25,95
<u>CDO1</u>	cysteine dioxygenase, type I	<u>204154_at</u>	10	< 1e-07	< 1e-07	3,34	33,21	9,94
<u>SFRP1</u>	secreted frizzled-related protein 1	<u>202037_s_at</u>	11	< 1e-07	< 1e-07	10,22	168,03	16,44
<u>ITIH5</u>	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 5	<u>219064_at</u>	12	< 1e-07	< 1e-07	4,1	115,13	28,05
<u>GHR</u>	growth hormone receptor	<u>205498_at</u>	13	< 1e-07	< 1e-07	3,85	35,8	9,31
<u>FZD4</u>	frizzled family receptor 4	<u>218665_at</u>	14	< 1e-07	< 1e-07	2,34	132,48	56,65

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie 1	Średnia geometryczna w grupie 2
<u>SVEP1</u>	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1	<u>213247_at</u>	15	< 1e-07	< 1e-07	5,18	147,31	28,46
<u>ZNF423</u>	zinc finger protein 423	<u>214761_at</u>	16	< 1e-07	< 1e-07	3,76	40,29	10,72
<u>THBD</u>	thrombomodulin	<u>203888_at</u>	17	< 1e-07	< 1e-07	2,85	60,07	21,08
<u>GJA4</u>	gap junction protein, alpha 4, 37kDa	<u>40687_at</u>	18	< 1e-07	< 1e-07	1,77	36,68	20,7
<u>PKP3</u>	plakophilin 3	<u>209873_s_at</u>	19	< 1e-07	< 1e-07	0,28	31,85	112,34
<u>OMD</u>	osteomodulin	<u>205907_s_at</u>	20	< 1e-07	< 1e-07	4,09	45,33	11,07
<u>COL14A1</u>	collagen, type XIV, alpha 1	<u>212865_s_at</u>	21	< 1e-07	< 1e-07	7,52	237,77	31,63
<u>ELF3</u>	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)	<u>210827_s_at</u>	22	< 1e-07	< 1e-07	0,13	44,8	333,77
<u>AOX1</u>	aldehyde oxidase 1	<u>205083_at</u>	23	< 1e-07	< 1e-07	4,8	40,84	8,5
<u>SPINT1</u>	serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1	<u>202826_at</u>	24	< 1e-07	< 1e-07	0,19	34,69	180,65
<u>SH3BP5</u>	SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)	<u>201811_x_at</u>	25	< 1e-07	< 1e-07	2,84	267,32	94,25
<u>OLFM1</u>	olfactomedin 1	<u>205591_at</u>	26	< 1e-07	< 1e-07	2,44	24,15	9,92
<u>AP1M2</u>	adaptor-related protein complex 1, mu 2 subunit	<u>65517_at</u>	27	< 1e-07	< 1e-07	0,38	20,57	54,43
<u>CH25H</u>	cholesterol 25-hydroxylase	<u>206932_at</u>	28	< 1e-07	< 1e-07	3,87	72,22	18,68
<u>ERG</u>	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)	<u>211626_x_at</u>	29	< 1e-07	< 1e-07	1,68	14,52	8,63
<u>ELF3</u>	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)	<u>201510_at</u>	30	< 1e-07	< 1e-07	0,19	33,07	174,26
<u>SEPT6</u>	septin 6	<u>214298_x_at</u>	31	1,00e-07	1e-07	3,15	111,43	35,33
<u>BCL2</u>	B-cell CLL/lymphoma 2	<u>203685_at</u>	32	1,00e-07	1e-07	3,57	57,61	16,14

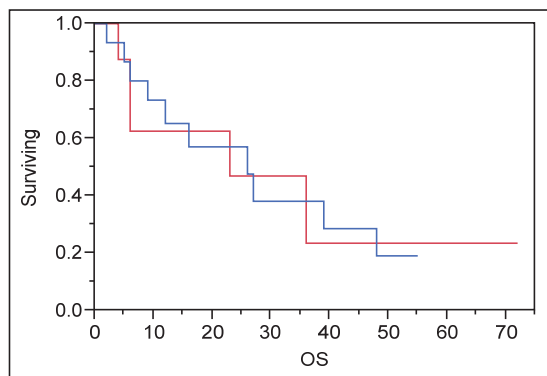
Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie 1	Średnia geometryczna w grupie 2
<u>DCLK1</u>	doublecortin-like kinase 1	<u>215303</u> <u>_at</u>	33	1,00e-07	1e-07	1,72	10,65	6,19
<u>PDE1A</u>	phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	<u>208396</u> <u>_s_at</u>	34	1,00e-07	1e-07	3,69	71,91	19,48
<u>IGF1</u>	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	<u>209540</u> <u>_at</u>	35	1,00e-07	1e-07	14,38	327,91	22,81
<u>BMX</u>	BMX non-receptor tyrosine kinase	<u>206464</u> <u>_at</u>	36	1,00e-07	1e-07	1,68	14,77	8,8
<u>ADH1B</u>	alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide	<u>209612</u> <u>_s_at</u>	37	1,00e-07	1e-07	10,65	157,47	14,79
<u>NFIB</u>	nuclear factor I/B	<u>213029</u> <u>_at</u>	38	1,00e-07	1e-07	3,38	556,81	164,91
<u>IL33</u>	interleukin 33	<u>209821</u> <u>_at</u>	39	1,00e-07	1e-07	3,9	43,66	11,18
<u>CELF2</u>	CUGBP, Elav-like family member 2	<u>202158</u> <u>_s_at</u>	40	1,00e-07	1e-07	2,52	36,55	14,52
<u>LHFP</u>	lipoma HMGIC fusion partner	<u>218656</u> <u>_s_at</u>	41	1,00e-07	1e-07	4,94	274,98	55,62
<u>LINC00341</u>	long intergenic non-protein coding RNA 341	<u>219563</u> <u>_at</u>	42	1,00e-07	1e-07	3,53	121,68	34,49
		<u>201810</u> <u>_s_at</u>	43	1,00e-07	1e-07	2,6	158,16	60,74
<u>DPT</u>	dermatopontin	<u>213068</u> <u>_at</u>	44	1,00e-07	1e-07	5,67	87,93	15,49
<u>CORO2B</u>	coronin, actin binding protein, 2B	<u>209789</u> <u>_at</u>	45	1,00e-07	1e-07	1,62	10,99	6,81
<u>AP1M2</u>	adaptor-related protein complex 1, mu 2 subunit	<u>218261</u> <u>_at</u>	46	1,00e-07	1e-07	0,33	20,46	61,28
<u>LPAR1</u>	lysophosphatidic acid receptor 1	<u>204037</u> <u>_at</u>	47	1,00e-07	1e-07	2,69	66,84	24,83
<u>DARC</u>	Duffy blood group, chemokine receptor	<u>208335</u> <u>_s_at</u>	48	1,00e-07	1e-07	8,42	267,82	31,81
<u>LEPR</u>	leptin receptor	<u>209894</u> <u>_at</u>	49	1,00e-07	1e-07	7,42	79,85	10,76
<u>LDOC1</u>	leucine zipper, down-regulated in cancer 1	<u>204454</u> <u>_at</u>	50	1,00e-07	1e-07	2,69	66,49	24,73
<u>FABP4</u>	fatty acid binding protein 4, adipocyte	<u>203980</u> <u>_at</u>	51	1,00e-07	1e-07	16,9	527,21	31,19
<u>SDPR</u>	serum deprivation response	<u>218711</u> <u>_s_at</u>	52	1,00e-07	1e-07	2,13	22,37	10,5

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie 1	Średnia geometryczna w grupie 2
<u>C7</u>	complement component 7	<u>202992</u> _at	53	1,00e-07	1e-07	14,45	510,05	35,29
<u>ADH1B</u>	alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide	<u>209613</u> _s_at	54	1,00e-07	1e-07	12,51	183,05	14,63
<u>PDE2A</u>	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	<u>204134</u> _at	55	1,00e-07	1e-07	2,41	37,7	15,62
<u>CDCP1</u>	CUB domain containing protein 1	<u>218451</u> _at	56	1,00e-07	1e-07	0,3	28,63	95,05
<u>SRPX</u>	sushi-repeat containing protein, X-linked	<u>204955</u> _at	57	2,00e-07	1e-07	9,39	318,68	33,92
<u>CHRD1</u>	chordin-like 1	<u>209763</u> _at	58	2,00e-07	1e-07	7,07	221,55	31,33
<u>TEK</u>	TEK tyrosine kinase, endothelial	<u>206702</u> _at	59	2,00e-07	1e-07	2,51	29,49	11,76
<u>SORD</u>	sorbitol dehydrogenase	<u>201563</u> _at	60	2,00e-07	1e-07	0,24	36,16	152,8
<u>PECAM1</u>	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	<u>208982</u> _at	61	2,00e-07	1e-07	3,58	1111,6	310,77
<u>MAN1C1</u>	mannosidase, alpha, class 1C, member 1	<u>218918</u> _at	62	2,00e-07	1e-07	3,24	64,16	19,81
<u>IGF1</u>	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	<u>209541</u> _at	63	2,00e-07	1e-07	15,28	407,62	26,67
<u>MEOX2</u>	mesenchyme homeobox 2	<u>206201</u> _s_at	64	3,00e-07	1e-07	4,79	44,5	9,29
<u>SEMA3G</u>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3G	<u>219689</u> _at	65	3,00e-07	1e-07	2,73	42,41	15,55
		<u>212414</u> _s_at	66	3,00e-07	1e-07	4,01	171,8	42,82
<u>CRBN</u>	cereblon	<u>218142</u> _s_at	67	3,00e-07	1e-07	1,72	78,71	45,72
<u>TOMM34</u>	translocase of outer mitochondrial membrane 34	<u>201870</u> _at	68	3,00e-07	1e-07	0,48	47,01	98,77
<u>SLIT3</u>	slit homolog 3 (Drosophila)	<u>203812</u> _at	69	3,00e-07	1e-07	2,53	50,4	19,93
<u>RBMS3</u>	RNA binding motif, single stranded interacting protein 3	<u>206767</u> _at	70	4,00e-07	1e-07	1,91	22,83	11,97

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie 1	Średnia geometryczna w grupie 2
<u>SELP</u>	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)	<u>206049_at</u>	71	4,00e-07	1e-07	4,22	68,96	16,34
<u>SSBP2</u>	single-stranded DNA binding protein 2	<u>210829_s_at</u>	72	4,00e-07	1e-07	1,88	34,27	18,26
		<u>204359_at</u>	73	4,00e-07	1e-07	6,74	222,7	33,04
<u>ANK2</u>	ankyrin 2, neuronal	<u>202920_at</u>	74	4,00e-07	1e-07	5,5	89,62	16,3
		<u>215039_at</u>	75	4,00e-07	1e-07	2,81	31,8	11,33
<u>GPR183</u>	G protein-coupled receptor 183	<u>205419_at</u>	76	4,00e-07	1e-07	4,01	125,81	31,36
<u>RAB25</u>	RAB25, member RAS oncogene family	<u>218186_at</u>	77	4,00e-07	1e-07	0,16	37,56	231,74
<u>S100P</u>	S100 calcium binding protein P	<u>204351_at</u>	78	5,00e-07	1e-07	0,091	206,48	2273,11
<u>MEF2C</u>	myocyte enhancer factor 2C	<u>209200_at</u>	79	5,00e-07	1e-07	3,62	170,79	47,15
		<u>210749_x_at</u>	80	5,00e-07	1e-07	0,28	101,81	370,12
		<u>203799_at</u>	81	5,00e-07	1e-07	3,34	225,13	67,46
<u>TTL12</u>	tubulin tyrosine ligase-like family, member 12	<u>216251_s_at</u>	82	6,00e-07	1e-07	0,37	27,95	75,63
<u>NPR1</u>	natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A (atrionatriuretic peptide receptor A)	<u>32625_at</u>	83	7,00e-07	0,00011	1,91	31,27	16,39
<u>TMEM97</u>	transmembrane protein 97	<u>212282_at</u>	84	7,00e-07	0,00011	0,22	83,73	373,5
<u>NRN1</u>	neuritin 1	<u>218625_at</u>	85	7,00e-07	0,00011	3,28	44,23	13,5
<u>MAGEH1</u>	melanoma antigen family H, 1	<u>218573_at</u>	86	9,00e-07	0,00013	2,63	113,51	43,16
<u>TCF4</u>	transcription factor 4	<u>212385_at</u>	87	9,00e-07	0,00013	2,94	95,83	32,62
<u>SOX17</u>	SRY (sex determining region Y)-box 17	<u>219993_at</u>	88	9,00e-07	0,00013	1,53	16,92	11,08
<u>HSPB2</u>	heat shock 27kDa protein 2	<u>205824_at</u>	89	9,00e-07	0,00013	2,2	40,67	18,52
<u>ESRP1</u>	epithelial splicing regulatory protein 1	<u>219121_s_at</u>	90	1,00e-06	0,00014	0,22	20,35	91,81

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie 1	Średnia geometryczna w grupie 2
<u>THBD</u>	thrombomodulin	<u>203887</u> <u>_s_at</u>	91	1,00e-06	0,00014	3,9	132,84	34,1
<u>SPR</u>	sepiapterin reductase (7,8-dihydrobiopterin:NADP+ oxidoreductase)	<u>203458</u> <u>_at</u>	92	1,00e-06	0,00014	0,51	64,09	126,42
<u>NOVA1</u>	neuro-oncological ventral antigen 1	<u>205794</u> <u>_s_at</u>	93	1,10e-06	0,00015	1,64	14,38	8,79
<u>SYNE1</u>	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	<u>209447</u> <u>_at</u>	94	1,10e-06	0,00015	2,96	127,98	43,19
<u>FAM107A</u>	family with sequence similarity 107, member A	<u>209074</u> <u>_s_at</u>	95	1,10e-06	0,00015	2,06	34,27	16,62
<u>PERP</u>	PERP, TP53 apoptosis effector	<u>217744</u> <u>_s_at</u>	96	1,10e-06	0,00015	0,17	47,41	276,37
<u>MEF2C</u>	myocyte enhancer factor 2C	<u>209199</u> <u>_s_at</u>	97	1,10e-06	0,00015	3,18	219,05	68,91
		<u>206042</u> <u>_x_at</u>	98	1,10e-06	0,00015	2,1	53,5	25,46
<u>FBXL5</u>	F-box and leucine-rich repeat protein 5	<u>209005</u> <u>_at</u>	99	1,20e-06	0,00016	2,14	75,76	35,44
<u>PAK3</u>	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 3	<u>214607</u> <u>_at</u>	100	1,20e-06	0,00016	2,06	21,89	10,61

Dokonano także analizy, czy dwa główne klastry wyodrębnione w analizie nienadzorowanej różnią się przeżyciem całkowitym (ryc. 52). Nie stwierdzono takich różnic ($p=0,8$)



Ryc. 52. Krzywe przeżycia całkowitego badanych chorych w grupie 1 (krzywa czerwona) oraz w grupie 2 (krzywa niebieska). Na osi X przedstawiono czas przeżycia całkowitego w miesiącach, na osi Y odsetek chorych przeżywających bez zdarzenia (zgonu).

Fig. 52. Overall survival curves of the patients in group 1 (red curve) and group 2 (blue curve). The X-axis shows the overall survival time in months, the Y-axis the percentage of patients surviving without an event (death).

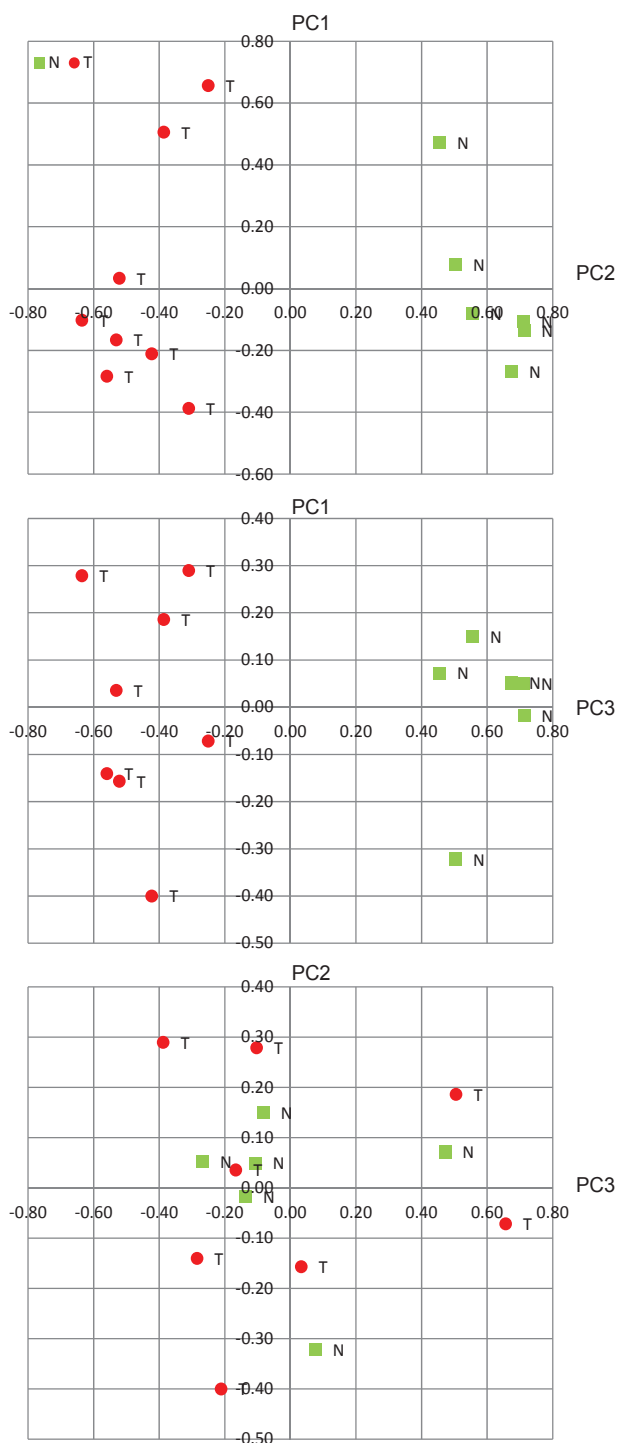
4.5. Porównanie ekspresji genów w raku żołądka i sąsiadującej niezmięnionej nowotworowo śluzówce żołądka metodą mikromacierzy

Kolejnym krokiem analizy było badanie, wykonanie w niezależnej grupie próbek ocenianych metodą mikromacierzy, jaka jest skala różnic między utkaniem raka żołądka i utkaniem śluzówki niezmięnionej nowotworowo.

Dokonano porównania profilu ekspresji w 14 próbkach – ośmiu próbkach raka żołądka i 6 próbkach pobranych ze ściany żołądka z okolicy guza. W pierwszym etapie porównanie wykonano nienadzorowaną metodą skalowania wielowymiarowego (MDS, *multidimensional scaling*). Wyraźnie zauważalne jest, że różnica rak – zdrowe tkanki jest dominującym źródłem zróżnicowania w analizowanym zbiorze danych, widocznym w pierwszej składowej (PC1, ryc. 53). Druga i trzecia składowa (PC2 i PC3) nie wiązały się z różnicami między dwiema badanymi grupami (na wykresie pokazującym równocześnie PC2 i PC3 nie widać żadnego rozgraniczenia tych dwóch grup).

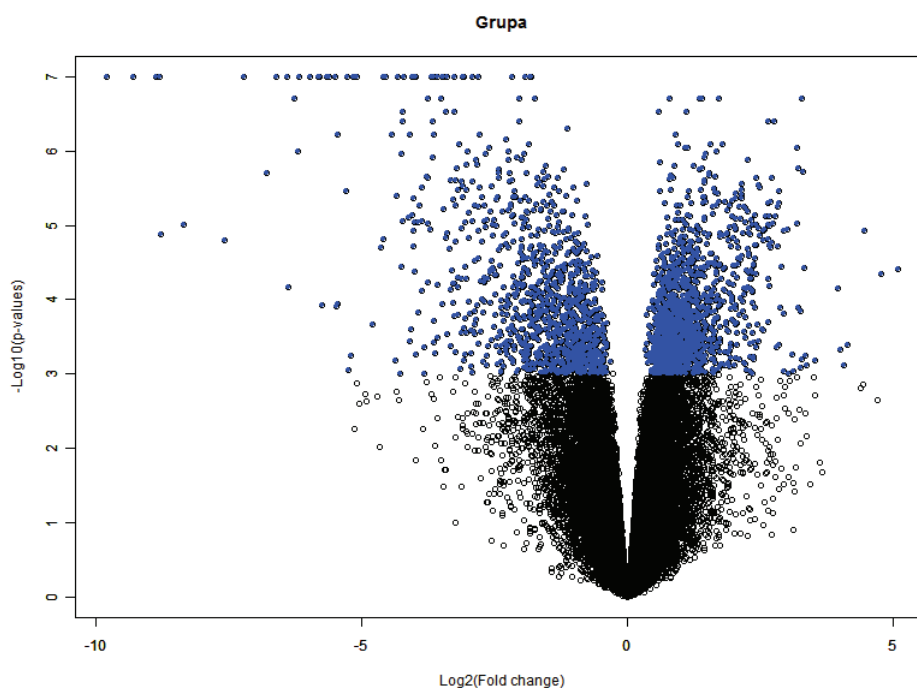
W następnym kroku przeprowadzono nadzorowaną analizę danych. Z 54675 zestawów sond na mikromacierzy HG-U133 Plus 2.0 wyselekcjonowano te które spełniają kryterium różnicy między grupami $p < 0,001$, bez korekcji na krotność porównań (w takiej analizie oczekuje się około 55 cech fałszywie dodatnich). Stwierdzono że różnica dotyczy 2546 zestawów sond – jest znacząco większa niż liczba potencjalnych wyników fałszywie dodatnich. Wynik ten potwierdza oczekiwaną, dużą skalę różnic między utkaniem raka i zdrowej błony śluzowej żołądka.

Wyniki wizualnie przedstawiono na wykresie (ryc. 53) zależności krotności zmiany od jej istotności statystycznej (kolorem niebieskim zaznaczono wyniki istotne, $p < 0,001$).



Ryc. 53. Analiza metodą skalowania wielowymiarowego wyników analizy mikromacierzowej w 14 próbkach (8 próbek raka żołądka – oznaczone czerwonymi kropkami, T, 6 próbek śluzówki, zielone kwadraty, N). Rycina pokazuje zależność trzech pierwszych składowych (PC1, PC2, PC3) na trzech wykresach dwuwymiarowych.

Fig. 53. Multidimensional scaling analysis of the results of a microarray analysis in 14 samples (8 gastric cancer samples – marked with red dots, T, 6 mucosa samples, green squares, N). Relation between the first three elements (PC1, PC2, PC3) on three two-dimensional diagrams is shown.



Ryc. 54. Wykres zależności krotności różnicy ($\text{Log}_2(\text{Fold change})$) przedstawionej na osi X od znamienności statystycznej tej różnicy ($-\text{Log}_{10}(\text{p-value})$). Zestawy sond wykazujące istotną statystycznie różnicę zaznaczono kolorem niebieskim ($p < 0,001$). Krotność różnicy poniżej 0 oznacza zmniejszoną ekspresję w próbkach raka, powyżej 0 zwiększenie tej ekspresji w stosunku do próbek nienowotworowych.

Fig. 54. Relationship between the logarithm of fold change ($\text{Log}_2(\text{Fold change})$) shown on the X axis and of the statistical significance of the difference ($-\text{Log}_{10}(\text{p-value})$). Probe sets showing a statistically significant difference are marked in blue ($p < 0.001$). Negative values indicate a decreased expression in cancer samples, while positive values reflect an increased expression, as compared to non-cancerous samples.

We wcześniejszych badaniach wyodrębniliśmy grupę genów, którą ocenialiśmy pod kątem różnic w ekspresji genów (Stojcev Z, Kędzior K i wsp. Comparison of gene expression changes of cell adhesion and angiogenesis-related genes in gastric cancer. Manuskrtypt w przygotowaniu). Ten sam zestaw genów wybrany na podstawie wcześniejszego przeglądu piśmiennictwa, poddano analizie pod kątem różnic w zbiorze badanym techniką mikromacierzy. Spośród tych genów 8 spełniało założone wyżej kryterium nieskorygowanej różnicy $p < 0,001$. Dwa z tych genów wykazywał silnie istotne obniżenie ekspresji w utkaniu raka, w tym jeden (RNASE1) o dużej skali (ponad siedmiokrotne); różnica dla genu PDGFD była około dwukrotna. Pozostałe sześć genów (SPP1, THBS2, RRM2, CCL18, COL6A3 i TIMP1) wykazywało zwiększoną ekspresję w utkaniu raka w stosunku do otaczających tkanek zdrowych. Największą skalę różnic obserwowano dla genu SPP1 (34-krotne zwiększenie ekspresji) oraz genu CCL18 (szesnastokrotne zwiększenie ekspresji). Geny THBS2 i RRM2 wykazywały około 6-7 razy zwiększoną ekspresję w raku, a COL6A3 i TIMP1 czterokrotne zwiększenie ekspresji.

Dla sześciu genów w porównaniu badanych 14 próbek nie obserwowano żadnych istotnych różnic – były to: YES1, ACK1, PIM1, LAMC2, OPCML, SLAMF1.

Z kolei, dla 9 genów obserwowano „pośrednie” wartości różnicy między utkaniem raka a niezmienną nowotworowo śluzówką. Geny te wykazywały różnice które uznane byłyby za statystycznie istotne w analizie statystycznej, jednak o granicznej istotności przy interpretacji masowych danych genomicznych. Dla części z nich (w tym COL1A2, CD36 czy SPARC) obserwowana duża krotność różnic oraz szacowane ryzyko wyniku fałszywie dodatniego (mierzone wartością FDR, ang. false discovery rate) poniżej 5% uzasadniają interpretację obserwowanych różnic jako istotnych. Dla innych jak COL4A2, TFF1, SLC2A1, FN1 uzyskane wyniki analizy genomowej należy traktować ostrożnie, biorąc pod uwagę około 10% ryzyko wyniku fałszywie dodatniego. Szczególną sytuację obserwowano dla genu MAPK1, dla którego jedna z sond na macierzy U133 Plus 2.0 wykazywała trend w kierunku zwiększonej ekspresji w raku żołądka, zaś inna sonda wskazywała na wynik przeciwny – obniżenie ekspresji.

Tabela 22. Podsumowanie różnic w ekspresji genów pomiędzy grupą próbek śluzówki żołądka (N) oraz raka żołądka (T). Przedstawiono istotność statystyczną różnicy (p), oszacowanie tej istotności po korekcji na porównania wielokrotne (odsetek wyników fałszywie dodatnich, FDR, *False Discovery Rate*), a także krotność różnicy pomiędzy grupą próbek raka a próbkami normalnej śluzówki. W pierwszej kolumnie przedstawiono nazwę genu, a w drugiej jego symbol wg HUGO, nr wg bazy Entrez oraz identyfikator zestawu sond na mikromacierzy Affymetrix (ProbeSet).

Table 22. Summary of differences in the expression of genes between stomach mucosa samples (N) and gastric cancer samples (T). Statistical significance of the difference (p), evaluation of the significance after multiple comparison correction (FDR, i.e. *False Discovery Rate*), and the logarithm of fold change between the cancer samples and normal mucosa samples are shown. Column one specifies the gene name, while column two its symbol according to HUGO, number according to the Entrez system and identifier of the probe set on the Affymetrix microarray (ProbeSet).

Nazwa genu	Symbol Entrez ID ProbeSet	p	Ranga	FDR	N	T	Krotność różnicy
ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	RNASE1 6035 201785_at	1,50e-06	98	0,000828	5024,02	707,12	0,14
platelet derived growth factor D	PDGFD 80310 222860_s_at	1,08e-05	302	0,00196	57,37	26,76	0,47
secreted phospho-protein 1	SPP1 6696 209875_s_at	3,88e-05	564	0,00376	28,48	969,6	34,04
thrombospondin 2	THBS2 7058 203083_at	0,0001554	1102	0,00771	57,8	440,71	7,62
ribonucleotide reductase M2	RRM2 6241 209773_s_at	0,0001981	1238	0,00875	173,69	1088,32	6,27

Nazwa genu	Symbol Entrez ID ProbeSet	p	Ranga	FDR	N	T	Krot- ność różnicy
chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	CCL18 6362 32128_at	0,0004763	1840	0,0142	69,6	1112,13	15,98
collagen, type VI, alpha 3	COL6A3 1293 201438_at	0,0007043	2217	0,0174	631,83	2364,83	3,74
TIMP metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1 7076 201666_at	0,0007655	2291	0,0183	773,58	3128,66	4,04
mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1 5594 1552264_a_at	0,0015418	3029	0,0278	72,03	132,87	1,84
mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1 5594 224621_at	0,0283545	9961	0,156	1212,15	901,82	0,74
collagen, type I, alpha 2	COL1A2 1278 202404_s_at	0,0021518	3460	0,034	978,18	4520,9	4,62
CD36 molecule (thrombospondin receptor)	CD36 948 228766_at	0,0031206	4013	0,0425	299,02	69,43	0,23
topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	TOP2A 7153 237469_at	0,00368	4330	0,0465	6,89	10,09	1,46
secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC 6678 200665_s_at	0,0041943	4587	0,05	978,09	3028,1	3,1
collagen, type IV, alpha 2	COL4A2 1284 211966_at	0,0086762	6243	0,076	66,45	134,3	2,02
trefoil factor 1	TFF1 7031 205009_at	0,0144172	7600	0,104	14986,69	949,66	0,063
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	SLC2A1 6513 201250_s_at	0,0292921	10090	0,159	111,24	230,71	2,07
fibronectin 1	FN1 2335 216442_x_at	0,0315221	10412	0,165	857,17	2650,67	3,09

Nazwa genu	Symbol Entrez ID ProbeSet	p	Ranga	FDR	N	T	Krot- ność różnicy
v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1	YES1 7525 210917_at	0,0613999	13820	0,243	7,19	7,99	1,11
tyrosine kinase, non-receptor, 2	TNK2 (ACK1) 10188 203839_s_at	0,0716667	14753	0,266	164,48	214,14	1,3
pim-1 oncogene	PIM1 5292 209193_at	0,0904746	16292	0,304	149,1	202,93	1,36
laminin, gamma 2	LAMC2 3918 207517_at	0,093632	16560	0,309	13,94	28,53	2,05
opioid binding protein/cell adhesion molecule-like	OPCML 4978 206215_at	0,1323819	19291	0,375	17,08	14,63	0,86
signaling lymphocytic activation molecule family member 1	SLAMF1 6504 206181_at	0,5791206	39833	0,795	55,77	44,65	0,8

4.6. Analiza wpływu degradacji RNA na profil ekspresji genów w badaniu techniką mikromacierzy

Porównano próbki które nie wykazywały żadnych cech degradacji RNA w ocenie jakościowej mikromacierzy w stosunku do próbek z cechami pewnej degradacji, poszukując genów wykazujących różnice w ekspresji między tymi grupami. Stwierdzono istotne statystycznie różnice dla 563 zestawów sond (FDR<5%), w tab. 23 przedstawiono 88 najbaardziej istotnych, o FDR<0,5%. Z jednej strony liczba ponad 500 transkryptów wykazujących różnice jest niewątpliwie istotna, z drugiej strony, stanowią one tylko 4,3% z wszystkich 13190 transkryptów poddawanych analizie. Jak pokazała szczegółowa analiza, w badanej grupie genów wykazujących różnicę poziomu ekspresji związaną z degradacją była względna równowaga transkryptów których ekspresja w próbkach zdegradowanych była niższa oraz takich, w których ekspresja ta była wyższa. Większość transkryptów na które degradacja wykazywała znaczący wpływ charakteryzowała się niskim albo co najwyżej średnim poziomem ekspresji.

Należy zwrócić uwagę że wśród sond wykazujących istotne różnice są obecne sondy kontrolne, a także liczne geny rybosomalne które potwierdzają rzetelność przeprowadzonego porównania. Z drugiej strony, dla większości z listy badanych genów wykazujących różnice zależne od degradacji ich skala nie przekraczała dwukrotnej zmiany.

Tabela 23. Podsumowanie różnic w ekspresji genów pomiędzy grupą próbek badanych na mikromacierzach bez żadnych cech degradacji w stosunku do próbek wykazujących cechy degradacji. Przedstawiono istotność statystyczną różnicy (p), oszacowanie tej istotności po korekcji na porównania wielokrotne (odsetek wyników fałszywie dodatnich, FDR, *False Discovery Rate*), a także krotność różnicy pomiędzy grupą próbek raka a próbkami normalnej śluzówki. W pierwszej kolumnie przedstawiono nazwę genu, a w drugiej jego symbol wg HUGO, a w trzeciej identyfikator zestawu sond na mikromacierzy Affymetrix (ProbeSet).

Table 23. Summary of differences in gene expression between the group of samples tested on the microarray without any degradation in characteristics relative to the sample exhibiting the characteristics degradation. Presents the statistical significance of the difference (p), to estimate the significance after correction for multiple comparisons (false-positive rate, FDR, called False Discovery Rate), and times the difference between the group of cancer samples and normal mucosa samples. The first column shows the name of the gene, and in the second the symbol for HUGO, and in the third set identifier probes on Affymetrix (ProbeSet).

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	Poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie bez cech degradacji	Średnia geometryczna w grupie z cechami degradacji
C6orf62	chromosome 6 open reading frame 62	213872_at	1	3,00e-07	0,00132	6,27	128,72	20,53
HDAC7	histone deacetylase 7	217937_s_at	2	4,00e-07	0,00132	0,56	34,79	62,68
NGF	nerve growth factor (beta polypeptide)	206814_at	3	4,00e-07	0,00132	0,55	9,26	16,72
TRPV6	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6	206827_s_at	4	4,00e-07	0,00132	0,51	14,08	27,55
TAOK2	TAO kinase 2	204878_s_at	5	6,00e-07	0,00158	0,53	32,32	61,07
SUN1	Sad1 and UNC84 domain containing 1	206487_at	6	1,40e-06	0,00264	2,55	35,94	14,11
GATC	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit C	214711_at	7	1,40e-06	0,00264	1,7	16,87	9,93
DUX1	double homeobox 1	208176_at	8	2,00e-06	0,00287	0,52	17,91	34,7
MBD3	methyl-CpG binding domain protein 3	202463_s_at	9	2,30e-06	0,00287	0,55	29,8	54,24

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	Poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie bez cech degradacji	Średnia geometryczna w grupie z cechami degradacji
SIRT2	sirtuin 2	220605_s_at	10	2,30e-06	0,00287	0,55	48,97	88,81
GSN	gelsolin	214040_s_at	11	2,60e-06	0,00287	1,9	30,45	15,98
LAMP1	lysosomal-associated membrane protein 1	201551_s_at	12	3,30e-06	0,00287	3,11	70,31	22,63
---	---	216694_at	13	3,60e-06	0,00287	0,53	17,13	32,1
SLC6A2	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2	216611_s_at	14	3,80e-06	0,00287	0,42	20,81	50,03
---	---	217476_at	15	4,00e-06	0,00287	0,61	8,79	14,36
PDLIM7	PDZ and LIM domain 7 (enigma)	214122_at	16	4,10e-06	0,00287	0,53	14,45	27,32
C1D	C1D nuclear receptor corepressor	200056_s_at	17	4,30e-06	0,00287	1,65	123,95	74,9
FUZ	fuzzy homolog (Drosophila)	221187_s_at	18	4,80e-06	0,00287	0,58	19,16	33,26
CIZ1	CDKN1A interacting zinc finger protein 1	213976_at	19	5,20e-06	0,00287	0,67	10,06	14,97
---	---	AFFX-BioDn-3_at	20	5,20e-06	0,00287	0,47	1046,15	2211,6
CLCN7	chloride channel, voltage-sensitive 7	209235_at	21	5,40e-06	0,00287	0,65	47,65	73,04
SLC22A7	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7	220554_at	22	5,60e-06	0,00287	0,69	12,88	18,71
GRIK5	glutamate receptor, ionotropic, kainate 5	217509_x_at	23	5,60e-06	0,00287	0,51	33,36	65,81
CPNE7	copine VII	219707_at	24	5,80e-06	0,00287	0,56	21,97	39,39
FOXO4	forkhead box O4	205451_at	25	5,80e-06	0,00287	0,49	22,61	46,2

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	Poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie bez cech degradacji	Średnia geometryczna w grupie z cechami degradacji
---	---	203670_at	26	5,90e-06	0,00287	0,46	12,62	27,7
---	---	AFFX-r2-Ec-bioD-5_at	27	6,10e-06	0,00287	0,48	961,55	1991,08
CDC5L	cell division cycle 5-like	209055_s_at	28	6,20e-06	0,00287	1,84	17,09	9,26
CFB	complement factor B	211920_at	29	6,30e-06	0,00287	0,6	20,72	34,25
TRPM8	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8	220226_at	30	6,80e-06	0,00299	0,67	10,69	15,85
MAGT1	magnesium transporter 1	210596_at	31	7,50e-06	0,00313	1,77	55,71	31,48
H3F3A	H3 histone, family 3A	213826_s_at	32	7,60e-06	0,00313	0,31	33,21	107,75
OSGIN1	oxidative stress induced growth inhibitor 1	219475_at	33	8,30e-06	0,00324	0,47	20,06	42,59
LARP4B	La ribonucleoprotein domain family, member 4B	208953_at	34	8,50e-06	0,00324	2,49	51,89	20,88
TMCO3	transmembrane and coiled-coil domains 3	220240_s_at	35	8,60e-06	0,00324	2,01	25,55	12,7
---	---	AFFX-r2-Ec-bioD-3_at	36	8,90e-06	0,00324	0,48	1426,91	2946,31
PNPLA2	patatin-like phospholipase domain containing 2	212705_x_at	37	9,10e-06	0,00324	0,47	23,67	50,43
---	---	210425_x_at	38	9,40e-06	0,00325	2,68	39,8	14,84
---	---	AFFX-BioC-5_at	39	9,70e-06	0,00325	0,39	156,46	402,21
C21orf2	chromosome 21 open reading frame 2	203996_s_at	40	9,90e-06	0,00325	0,59	17,46	29,65

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	Poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie bez cech degradacji	Średnia geometryczna w grupie z cechami degradacji
PROSC	proline synthetase co-transcribed homolog (bacterial)	214545_s_at	41	1,01e-05	0,00325	2,15	48,24	22,46
RPL27A	ribosomal protein L27a	212044_s_at	42	1,11e-05	0,00345	0,34	50,71	148,51
---	---	AFFX-BioDn-5_at	43	1,13e-05	0,00345	0,47	450,84	956,25
CIAO1	cytosolic iron-sulfur protein assembly 1	217501_at	44	1,19e-05	0,00345	1,51	98,47	65,19
SPN	sialoporphin	216980_s_at	45	1,21e-05	0,00345	0,59	13,22	22,31
PTAFR	platelet-activating factor receptor	206278_at	46	1,22e-05	0,00345	0,45	15,71	35,08
HRH3	histamine receptor H3	221663_x_at	47	1,25e-05	0,00345	0,6	11,65	19,27
PEX11B	peroxisomal biogenesis factor 11 beta	202658_at	48	1,29e-05	0,00345	1,76	99,74	56,58
MPHOS PH8	M-phase phosphoprotein 8	221771_s_at	49	1,35e-05	0,00345	2,2	34,53	15,7
ARPC4	actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20kDa	211672_s_at	50	1,40e-05	0,00345	2,76	92,5	33,54
ARSF	arylsulfatase F	214490_at	51	1,41e-05	0,00345	0,66	9,99	15,15
VRTN	vertebrae development associated	220536_at	52	1,41e-05	0,00345	0,53	15,86	29,85
RPLP2	ribosomal protein, large, P2	200908_s_at	53	1,43e-05	0,00345	0,34	20,32	59,21
---	---	AFFX-BioC-3_at	54	1,46e-05	0,00345	0,44	188,18	428,47
---	---	AFFX-r2-Ec-bioC-5_at	55	1,48e-05	0,00345	0,41	234,03	571,86
---	---	213690_s_at	56	1,49e-05	0,00345	0,51	19,66	38,68

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	Poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie bez cech degradacji	Średnia geometryczna w grupie z cechami degradacji
LRCH4	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 4	221956_at	57	1,55e-05	0,00345	0,56	31,57	55,95
NOX5	NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5	220641_at	58	1,56e-05	0,00345	0,55	18,87	34,08
RARB	retinoic acid receptor, beta	208412_s_at	59	1,57e-05	0,00345	0,71	7,85	11,01
---	---	209768_s_at	60	1,57e-05	0,00345	0,52	9,09	17,51
---	---	AFFX-BioB-M_at	61	1,71e-05	0,00351	0,4	104,2	262,58
CPNE3	copine III	202118_s_at	62	1,73e-05	0,00351	1,69	19,02	11,26
---	---	AFFX-CreX-5_at	63	1,79e-05	0,00351	0,56	2556,39	4570,56
---	---	AFFX-r2-Ec-bioB-3_at	64	1,80e-05	0,00351	0,41	88,44	214,29
TAB2	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2	210284_s_at	65	1,80e-05	0,00351	1,56	35,21	22,6
DNAJC8	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 8	212491_s_at	66	1,80e-05	0,00351	0,63	76,03	119,97
DICER1	dicer 1, ribonuclease type III	206061_s_at	67	1,83e-05	0,00351	1,63	17,31	10,59
DLG4	discs, large homolog 4 (Drosophila)	210684_s_at	68	1,85e-05	0,00351	0,52	17,92	34,15
---	---	220956_s_at	69	1,85e-05	0,00351	0,66	51	77,38
---	---	213642_at	70	1,89e-05	0,00351	0,34	78,5	233,72
AP1S1	adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit	205196_s_at	71	1,89e-05	0,00351	2,07	47,05	22,76

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	Poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie bez cech degradacji	Średnia geometryczna w grupie z cechami degradacji
---	---	220096_at	72	1,95e-05	0,00357	0,55	12,3	22,43
---	---	AFFX-r2-Ec-bioC-3_at	73	2,04e-05	0,00369	0,46	272,96	597,87
GPR144	G protein-coupled receptor 144	216289_at	74	2,13e-05	0,0038	0,47	16,63	35,51
RABEP2	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 2	219057_at	75	2,17e-05	0,00382	0,56	19,1	34,02
HIP1R	huntingtin interacting protein 1 related	209559_at	76	2,29e-05	0,00394	0,63	29,07	45,9
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	205301_s_at	77	2,30e-05	0,00394	0,58	19,18	32,81
---	---	AFFX-CreX-3_at	78	2,38e-05	0,00402	0,61	3240,47	5315,07
ING4	inhibitor of growth family, member 4	218234_at	79	2,42e-05	0,00404	0,67	25,43	37,78
FUT7	fucosyltransferase 7 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	217696_at	80	2,49e-05	0,00405	0,49	24,69	50,68
CELF3	CUGBP, Elav-like family member 3	215045_at	81	2,49e-05	0,00405	0,46	21,55	46,36
UBE3A	ubiquitin protein ligase E3A	213291_s_at	82	2,54e-05	0,00409	1,49	121,86	81,87
MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	201668_x_at	83	2,59e-05	0,00412	1,87	25,68	13,7
---	---	AFFX-BioB-5_at	84	2,86e-05	0,00448	0,42	58,64	138,07

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	Poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie bez cech degradacji	Średnia geometryczna w grupie z cechami degradacji
NFATC2 IP	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 interacting protein	217526_at	85	2,89e-05	0,00448	2,33	63,67	27,29
SEPT5-GP1BB	SEPT5-GP1BB readthrough	209769_s_at	86	3,16e-05	0,00485	0,53	17,14	32,42
HSD17B14	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14	219113_x_at	87	3,28e-05	0,00495	0,6	16,23	26,88
MED18	mediator complex subunit 18	219730_at	88	3,30e-05	0,00495	1,45	9,27	6,41

4.7. Analiza wpływu różnic między utkaniem raka i niezmięionej śluzówki oraz różnic związanych z degradacją RNA na ekspresję badanych genów istotnych dla raka żołądka

We wcześniejszej części pracy zidentyfikowano szereg genów, które powiązane są z różnicami w istotnych czynnikach histoklinicznych raka żołądka czy znaczących globalnych różnic w profilu ekspresji genów. Postawiono pytanie czy na ekspresję tych genów wpływają różnice pomiędzy utkaniem raka żołądka i otaczającej go niezmięionej nowotworowo śluzówki oraz czy wpływ ma ewentualna degradacja RNA. Oba te czynniki mogą mieć istotne znaczenie dla ewentualnego diagnostycznego wykorzystania badanych genów.

W pierwszym kroku przeanalizowano różnice pośród 187 transkryptów wcześniej zidentyfikowanych w pracy jako potencjalnie istotnych dla różnych cech histoklinicznych lub genetycznych raka żołądka pomiędzy badanymi próbkami raka i niezmięionej nowotworowo śluzówki. Zidentyfikowano 14 transkryptów wykazujących takie różnice ($p < 0,001$, wszystkie z $FDR < 5\%$). Część z tych genów wykazywało znacząco wyższą ekspresję w utkaniu raka (na te geny zanieczyszczenie otaczającą śluzówką będzie miało relatywnie niewielki wpływ), jednak w części badanych genów stwierdzono sytuację odwrotną – ekspresja genu w zdrowej śluzówce jest wyższa niż w utkaniu raka (np. gen receptora leptyny LEPR, z 10-krotnie niższą ekspresją w raku). Dla tych genów nawet niewielkie zanieczyszczenie próbki raka otaczającymi tkankami niezmięionymi nowotworowo będzie znacząco wpływało na wynik badania genomowego, nie są to więc dobrzy kandydaci jeśli rozważać potencjalne wykorzystanie jako biomarker.

Tabela 24. Podsumowanie różnic w ekspresji 187 genów wcześniej wymienionych w pracy pomiędzy grupą próbek raka i próbek otaczającej śluzówki. Przedstawiono istotność statystyczną różnicy (p), oszacowanie tej istotności po korekcji na porównania wielokrotne (odsetek wyników fałszywie dodatnich, FDR, *False Discovery Rate*), a także krotność różnicy pomiędzy grupą próbek raka a próbkami normalnej śluzówki. W pierwszej kolumnie przedstawiono nazwę genu, a w drugiej jego symbol wg HUGO, a w trzeciej identyfikator zestawu sond na mikromacierzy Affymetrix (ProbeSet).

Table 24. Summary of differences in the expression of 187 genes in the previously mentioned work between the group of cancer samples and samples of the surrounding mucous membranes. Presents the statistical significance of the difference (p), to estimate the significance after correction for multiple comparisons (false-positive rate, FDR, called *False Discovery Rate*), and times the difference between the group of cancer samples and normal mucosa samples. The first column shows the name of the gene, and in the second the symbol for HUGO, and in the third set identifier probes on Affymetrix (ProbeSet).

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie próbek raka	Średnia geometryczna w grupie normalnej śluzówki
ALDH3 A1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	205623_at	1	5,50e-06	0,00103	0,067	54,42	815,7
PDSS1	prenyl (decaprenyl) diphosphate synthase, subunit 1	220865_s_at	2	6,16e-05	0,00385	3,11	211,26	67,88
LEPR	leptin receptor	209894_at	3	6,18e-05	0,00385	0,1	62,7	613,58
NOVA1	neuro-oncological ventral antigen 1	205794_s_at	4	0,0001049	0,0049	0,47	27,17	58
IL33	interleukin 33	209821_at	5	0,000291	0,00867	0,22	92,99	428,32
GADD4 5GIP1	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma interacting protein 1	212891_s_at	6	0,0003021	0,00867	1,86	276,37	148,28
ILF3	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	208931_s_at	7	0,0003463	0,00867	1,85	322	174,42
GPR109 B	G protein-coupled receptor 109B	205220_at	8	0,0003707	0,00867	5,19	86,97	16,74
NA	NA	208785_s_at	9	0,0007048	0,0123	1,77	715,96	404,73

Symbol genu	Nazwa genu	Zestaw sond	Lp.	poziom istotności	FDR	Krotność różnicy	Średnia geometryczna w grupie próbek raka	Średnia geometryczna w grupie normalnej śluzówki
NA	NA	204006_s_at	10	0,0007265	0,0123	4,65	113,86	24,47
LDOC1	leucine zipper, down-regulated in cancer 1	204454_at	11	0,0008078	0,0123	0,44	86,27	195,5
PAK3	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 3	214607_at	12	0,0008958	0,0123	0,41	62,83	152,62
FZD4	frizzled homolog 4 (Drosophila)	218665_at	13	0,0009641	0,0123	0,52	120,97	230,82
ADH1B	alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide	209613_s_at	14	0,0009757	0,0123	0,071	44,75	631,37

4.8. Analiza związku z czasem przeżycia dla panelu genów badanego techniką QPCR

We wcześniejszych etapach pracy zidentyfikowano wiele genów powiązanych z biologicznym charakterem raka żołądka, w tym histopatologicznym stopniem zróżnicowania i zaawansowaniem guza pierwotnego. Mimo to, nie zidentyfikowano genów wiążących się z rokowaniem chorego ani bezpośrednio (oceniając całkowity czas przeżycia) ani pośrednio (oceniając tendencję do przerzutowania w postaci zaawansowania przerzutów węzłowych). Na uzyskane wyniki nie miały bezpośredniego wpływu ani różnice między utkaniem raka i niezmięnionej nowotworowo śluzówki, ani różnice związane ze stopniem degradacji próbek.

Wysunięto hipotezę, że zwiększenie liczebności próby może wpłynąć na identyfikację potencjalnych markerów. Stąd, poddano re-analizie wcześniej uzyskane metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (QPCR) wyniki pomiaru ekspresji wybranych genów w utkaniu raka żołądka (szerszy opis w rozdziale Metody). Wyniki analizowano zarówno w samej próbce raka, jak i po odniesieniu ekspresji w raku w stosunku do niezmięnionej nowotworowo śluzówki. Analizowano ekspresję 23 genów: ACK, CCL18, CD36, COL1A, COL4A2, COL6A3, FN1, LAMC2, MAPK1, OPCML, PDGFD, PIM1, RNASE1, RRM2, SLAM, SLC2A1, SPARC, SPP1, TFF1, THBS2, TIMP1, TOP2A, YES1. Większość z badanych genów nie wykazywała różnic powiązanych z czasem całkowitego przeżycia. Brak ewidentnie istotnych różnic potwierdzono dla 20 z 23 badanych genów – danych tych nie prezentowano szczegółowo.

Dla dwóch z badanych genów (RRM2 i TIMP1) wykazano istotne statystycznie lub graniczne różnice powiązane z rokowaniem. Wszystkie trzy geny równocześnie różniły się ekspresją pomiędzy utkaniem raka a zdrową śluzówką. Stąd ich ekspresję analizowano zarówno bez uwzględnienia ekspresji w tkance zdrowej, jak i jako stosunek wartości w obu próbkach.

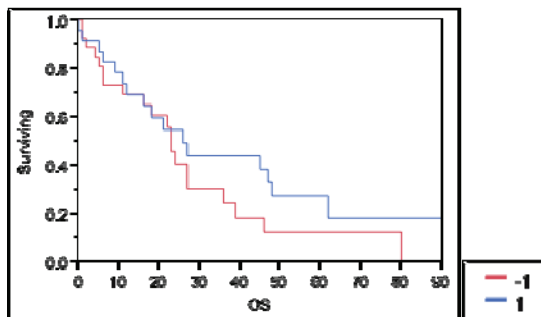
Dla genu RRM2 nie obserwowano istotnej statystycznie różnicy między próbkami raka pod kątem związku z rokowaniem jeśli porównywano je bezpośrednio (tab. 25, $p=0,28$). Kiedy jednak analizy dokonano korygując wartości w stosunku do próbek normalnej śluzówki żołądka, stwierdzono znamiennej różnicę związaną z gorszym rokowaniem u chorych o wyższych wartościach ekspresji RRM2 ($p=0,048$). W drugim ze stosowanych testów (test Wilcoxon) wartość ta była granicznie istotna ($p=0,073$).

Drugi z genów, TIMP1, podobnie jak RRM2 nie wykazywał różnic w ekspresji związanych z czasem całkowitego przeżycia w porównaniu bezpośrednim (tab. 26, $p=0,78$). Po uwzględnieniu ekspresji genów w utkaniu śluzówki nowotworowo niezmięnionej stwierdzono trend w kierunku różnic w ekspresji ($p=0,12$ w teście log-rank, istotna statystycznie różnica w teście Wilcoxon $p=0,028$). Na różnice między oboma testami statystycznymi wpływa przebieg krzywych przeżycia, które wyraźnie zbliżają się do siebie (brak różnic w odsetku przeżyjących po 5 latach obserwacji).

Tabela 25. Wyniki analizy ekspresji dla genu RRM2.

Table 25. Results of gene RRM2 expression analysis.

A. Analiza przeżycia metodą Kaplana-Meiera w grupach niskiej i wysokiej ekspresji genu – dane dla guza (T)



Analiza całkowitego czasu przeżycia (OS) w grupach ekspresji poniżej mediany (-1) oraz powyżej lub równej medianie (1) dla pomiaru RRM2_T

Podsumowanie analizy przeżycia

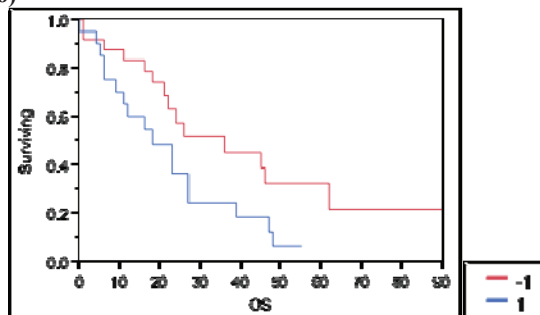
Grupa	Liczba zgonów	Liczba obs. cenzurowanych	Średnia	Błąd standardowy średniej
-1	20	6	27,2481	5,19951
1	16	7	32,0729(!)	5,11858
Razem	36	13	31,1866(!)	4,05821

Podsumowanie wartości kwantylowych

Grupa	Mediana czasu przeżycia	5 centyl	95 centyl	25% zgonów	75% zgonów
-1	23	11	27	6	36
1	26	12	48	11	62
Razem	23	16	36	11	47

Porównanie czasu przeżycia między grupami

Test	chi2	Stopnie swobody	p
Log-Rank	1,1584	1	0,2818
Wilcoxon	0,3865	1	0,5341

B. Analiza przeżycia metodą Kaplana-Meiera w grupach niskiej i wysokiej ekspresji genu – stosunek T/N (Ratio)

Analiza całkowitego czasu przeżycia (OS) w grupach ekspresji poniżej mediany (-1) oraz powyżej lub równej medianie (1) dla pomiaru RRM2_Ratio

Podsumowanie analizy przeżycia

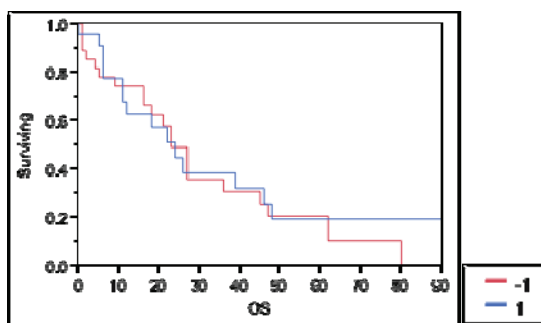
Grupa	Liczba zgonów	Liczba obs. cenzurowanych	Średnia	Błąd standardowy średniej
-1	14	10	35,7188(!)	4,9984
1	17	3	21,7045(!)	3,71494
Razem	31	13	29,4864(!)	3,37664

Podsumowanie wartości kwantylowych

Grupa	Mediana czasu przeżycia	5 centyl	95 centyl	25% zgonów	75% zgonów
-1	36	21	62	18	62
1	18	6	27	7,5	27
Razem	24	18	39	11	47

Porównanie czasu przeżycia między grupami

Test	chi2	Stopnie swobody	p
Log-Rank	3,9078	1	0,0481*
Wilcoxon	3,2226	1	0,0726

Tabela 26. Wyniki analizy ekspresji dla genu TIMP1.*Table 26. Results of gene TIMP1 expression analysis.***A, Analiza przeżycia metodą Kaplana-Meiera w grupach niskiej i wysokiej ekspresji genu – dane dla guza (T)**

Analiza całkowitego czasu przeżycia (OS) w grupach ekspresji poniżej mediany (-1) oraz powyżej lub równej medianie (1) dla pomiaru TIMP1_T

Podsumowanie analizy przeżycia

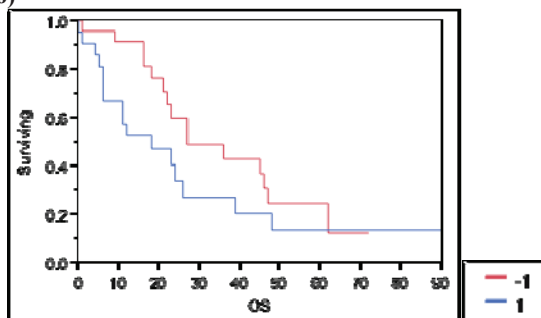
Grupa	Liczba zgonów	Liczba obs. cenzurowanych	Średnia	Błąd standardowy średniej
-1	21	6	30,311	5,21627
1	15	7	25,8536(!)	4,05835
Razem	36	13	31,1866(!)	4,05821

Podsumowanie wartości kwantylowych

Grupa	Mediana czasu przeżycia	5 centyl	95 centyl	25% zgonów	75% zgonów
-1	23	16	36	9	47
1	24	11	46	11	48
Razem	23	16	36	11	47

Porównanie czasu przeżycia między grupami

Test	chi2	Stopnie swobody	p
Log-Rank	0,0794	1	0,7782
Wilcoxon	0,0011	1	0,9738

B, Analiza przeżycia metodą Kaplana-Meiera w grupach niskiej i wysokiej ekspresji genu – stosunek T/N (Ratio)


Analiza całkowitego czasu przeżycia (OS) w grupach ekspresji poniżej mediany (-1) oraz powyżej lub równej medianie (1) dla pomiaru TIMP1_Ratio

Podsumowanie analizy przeżycia

Grupa	Liczba zgonów	Liczba obs. cenzurowanych	Średnia	Błąd standardowy średniej -1 15
	8	35,2944	(!)	4,50511
1	16	5	21,1361	(!) 3,96194
Razem	31	13	29,4864	(!) 3,37664

Podsumowanie wartości kwantylowych

Grupa	Mediana czasu przeżycia	5 centyl	95 centyl	25% zgonów	75% zgonów
-1	27	21	47	21	47
1	18	6	26	6	39
Razem	24	18	39	11	47

Porównanie czasu przeżycia między grupami

Test	chi2	Stopnie swobody	p
Log-Rank	2,4078	1	0,1207
Wilcoxon	4,8187	1	0,0282*

5. DYSKUSJA

5.1. Podsumowanie uzyskanych wyników i ich potencjalnego znaczenia dla dalszych badań

W ramach wykonanych przeze mnie badań przeprowadziłem profilu ekspresji genów pod kątem poszukiwania ich potencjalnego znaczenia rokowniczego oraz identyfikacji czynników mogących wpływać na pomiar tej ekspresji. Analizowałem zarówno czynniki histokliniczne, bezpośrednio lub pośrednio związane z rokowaniem chorego, jak i zmienne mogące potencjalnie zaburzać prowadzony pomiar.

Szczególnie istotnym wnioskiem jest zidentyfikowanie listy 35 transkryptów potencjalnie wiążących się ze stopniem zróżnicowania nowotworu, z tego cztery o FDR<5%. Wśród genów tych były takie, które w jednoznaczny sposób powiązane są z kinetyką proliferacji komórki nowotworowej (np. G0/G1 switch 2), potencjalne geny markerowe (np. S100A9) oraz wiele innych transkryptów, w tym związanych potencjalnie z reakcją immunologiczną. Spostrzeżenie że geny oddające stopień zróżnicowania nowotworu – jak podkreślono w Rozdziale „Wstęp” – było jednym z istotnych czynników który wprowadził genomiczne czynniki prognostyczne i predykcyjne do zastosowania klinicznego w raku piersi. Stąd różnice w ekspresji genów które zaobserwowałem w raku żołądka winny być dalej analizowane pod kątem ich znaczenia biologicznego i klinicznego.

Podobną liczbę genów (33) różnicujących otrzymano analizując porównanie grupy nowotworów o dużym zaawansowaniu guza pierwotnego (T4) w stosunku do mniej zaawansowanych. Jednak, nawet najsilniej różnicujące transkrypty w tej analizie charakteryzowały się dużą niepewnością (FDR około 30%), stąd należy uzyskać wynik traktować z ostrożnością. Podobnie, praktycznie żadnych genów nie zidentyfikowano porównując chorych o różnym zaawansowaniu przerzutów węzłowych. Należy jednak podkreślić, że w analizie tej porównywano głównie chorych z mniejszym i większym zaawansowaniem tych przerzutów, nie włączając większej liczby chorych w ogóle bez przerzutów węzłowych (do analiz włączono tylko 2 chorych N0). Analizę zaprojektowano celowo by włączać chorych o względnie wysokim zaawansowaniu wyjściowym, gdyż podstawowym celem było identyfikowanie genów powiązanych z całkowitym czasem przeżycia, a analiza wczesnego raka żołądka zmuszałaby do znacznego zwiększenia zarówno liczebności grupy jak i czasu obserwacji by uzyskać konieczną liczbę zdarzeń. Niemniej, nie można wykluczyć że ten projekt badania utrudnia identyfikację genów powiązanych z samą tendencją do przerzutowania nowotworu do regionalnych węzłów chłonnych.

Poprzez nienadzorowaną analizę wyników badania mikromacierzowego wyodrębniono spośród badanych próbek dwie duże grupy, zasadniczo różniące się profilem ekspresji. Ponad 1100 genów wykazywało silnie istotne różnice między tymi grupami (przy poziomie istotności $p=0,001$, szacowany metodą FDR odsetek genów fałszywie dodatnich nie przekracza 1%). Różnice między tak wyodrębnionymi dwoma grupami raków żołądka dotyczyły wielu klas ontologii genów, ale szczególnie transkryptów powiązanych z adhezją komórkową. Mimo tak znaczących różnic, dwie badane grupy raków żołądka nie różniły się przeżyciem całkowitym, a próba zidentyfikowania genów powiązanych z czasem do zgonu w sposób nadzorowany była obarczona sporym błędem statystycznym.

Biorąc powyższe wyniki pod uwagę i próbując zwiększyć statystyczną moc porównań, analizie poddano większą grupę próbek badanych wcześniej techniką ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym pod kątem różnic między utkaniem raka i tkanki zdrowej. Korelowano ekspresję badanych 23 genów z czasem do zgonu. Stwierdzono, że spośród trzech genów które wykazywały pewien trend w kierunku różnic (RRM2, SLC2A1 i TIMP1) po uwzględnieniu niezbędnych poprawek na krotkość porównań istotną różnicę potwierdzono dla RRM2. Wszystkie trzy geny wykazywały negatywne znaczenie prognostyczne związane z wyższą ekspresją. Należy zwrócić uwagę, że różnice w ekspresji udało się potwierdzić po uwzględnieniu zmienności sygnału genu w utkaniu otaczającym nowotwór (ekspresja w raku korygowana względem ekspresji w otaczających tkankach genów zdrowych).

Ponieważ skala różnic pomiędzy badanymi próbkami raka żołądka a otaczającą niezmienną nowotworowo śluzówką była jednoznacznie największą z obserwowanych różnic (ponad 2,5 tys. transkryptów z analizowanych 50 tys., analiza bez wstępnego filtrowania), zdecydowano się uwzględnić te różnice w ocenie ekspresji genów zależnych od badanych cech histoklinicznych i oszacować, jaki wpływ może mieć „zanieczyszczenie” utkania nowotworu przez tkanki nienowotworowe – biorąc pod uwagę naciekający charakter wzrostu raka zanieczyszczenie takie w próbkach pobieranych bez procedur mikrodyssekcji jest nieuniknione. Różnice takie stwierdzono dla kilkunastu ze zidentyfikowanych prawie 200 genów związanych z różnymi cechami chorych, zarówno osobniczymi jak i histoklinicznymi – jednak nie dotyczyło to żadnego z kluczowych genów. Należy jednak podkreślić, że w części dotyczącej analizy QPCR zarówno dla genu RRM2, genu TIMP1 jak i 6 innych genów w naszych wcześniejszych badaniach identyfikowaliśmy istotne różnice (RNASE1, PDGFD – znamienne obniżenie ekspresji w tkance raka, SPP1, THBS2, RRM2, CCL18, COL6A3, TIMP1 – znamienne zwiększona ekspresja w tkance raka). Stąd, wydaje się konieczne by w dalszych badaniach uwzględniać zmienność ekspresji genów obserwowaną w błonie śluzowej żołądka i wpływ tej osobniczej zmienności na potencjalne pomiary stężenia biomarkerów w raku. Stąd, w dalszej części rozdziału podsumowano dotychczasowe badania analizujących utkanie raka żołądka w stosunku do otaczających guz tkanek.

5.2. Różnice w ekspresji genów między utkaniem raka i otaczającymi niezmiennymi nowotworowo komórkami błony śluzowej

Etapem wyjściowym do badań które rozpocząłem w 2006 roku była analiza wszystkich potencjalnych molekularnych markerów raka żołądka. Systematyczny przegląd literatury który wtedy dokonałem zaktualizowałem obecnie, identyfikując 20 publikacji, w których głównym celem było porównanie rak – tkanki zdrowe. Geny różnicujące te dwie grupy, przedstawione w tych pracach, zestawiono w tab. 27 i 28.

Tabela 27. Geny różnicujące, porównanie pomiędzy próbkami raka i prawidłowej śluzówki żołądka.

Table 27. The differentially expressed genes, the comparison between samples of cancer and normal gastric mucosa.

ACK1	Activated p21cdc42Hs kinase
CA2	Carbonic anhydrase II
CCNC	Cyclin C
CD55 (DAF)	Decay accelerating factor for complement (CD55,Cromer blood group system)
CDC20	CDC20 cell division cycle 20 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
CDC6	CDC6 cell division cycle 6 homologue
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
CDH17	Cadherin 17, LI cadherin (liver-intestine)
COL1A1	Collagen, type I, alfa 1
COL1A2	Collagen, type I, alpha 2
COL4A1	Collagen, type IV, alfa 1
COL4A2	Collagen, type IV, alfa 2
COL6A3	Collagen, type VI, alfa 3
CLDN3	Claudin 3
CTSB	Cathepsin B
CTSF	Cathepsin F
CTSE	Cathepsin E
DTYMK	Thymidylate kinase
ERBB2	v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
FN1	Fibronectin 1
FOXM1	Forkhead box M1
INHBA	inhibin, beta A
KRT7	Keratin 7

LAMC2	Laminin, gamma 2
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1
MDK	Midkine (neurite growth-promoting factor 2)
MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
MMP14	Matrix metalloproteinase 14
MUC1	Mucin 1, cell surface associated
OPCML	opioid binding protein/cell adhesion molecule-like
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDGFD	Platelet derived growth factor D
RNASE1	Ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)
RRM1	Ribonucleotide reductase M1 polypeptide
RRM2	Ribonucleotide reductase M2 polypeptide
SLC2A1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
SPP1 (OPN)	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)
TFF1	Trefoil factor 1
TFF3	Trefoil factor 3 (intestinal)
THBS2	Thrombospondin 2
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
TOP2A	DNA topoisomerase II
YES1	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1

Symbol genu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Liczba wystąpień
MAPK1									1	1						1					3
MDK			1			1										1			1		4
MMP3		1						1								1	1				4
MMP14		1								1									1		3
MUC1											1					1					2
OPCML							-1														1
PCNA		1		1															1		3
PDGFD										-1											1
RNASE1	-1			1(a)		1											-1			-1	5
RRM1		1	1													1					3
RRM2			1			1													1		3
SLC2A1	1		1																1		3
SPARC		1						1	1						1		1		1	1	7
SPP1=OPN		1		1											1						3
TFF1	-1								-1	-1							-1	-1	-1	-1	7
TFF3				1			1	1					1						1		5
THBS2		1					1	1						1						1	5
TIMP1				1			1		1										1	1	5
																					0
TOP2A		1	1					1								1					4
YES1							-1														1

1 – ekspresja genu podwyższona w utkaniu raka, w porównaniu do próbek referencyjnych (zdrowych)

-1 – ekspresja genu obniżona w utkaniu raka, w porównaniu do próbek referencyjnych (zdrowych)

a – ekspresja podwyższona w przerzutach

Wśród genów o obniżonej ekspresji w raku żołądka zidentyfikowaliśmy gen CCL18 - ligand 18 chemokiny (chemokine, C-C motif, ligand 18), kodujący białko należące do

rodziny chemokin. Geny te skupione są na długim ramieniu chromosomu 17. Chemokina ta wykazuje aktywność chemotaktyczną wobec dziewiczych limfocytów T, kierując je w stronę komórek dendrytycznych i aktywowanych w węzłach chłonnych makrofagów, co sugeruje jej ważną rolę w procesach odporności komórkowej i humoralnej [1].

Innym genem, dla którego stwierdzono ewidentne podwyższenie ekspresji w tkaniu raka była podjednostka M2 reduktazy rybonukleotydów (RRM2 – *Ribonucleotide reductase M2 polypeptide*) katalizuje reakcję tworzenia deoksyrybonukleotydów z rybonukleotydów poprzedzając syntezę DNA w fazie S cyklu komórkowego [162]. Gen RRM2 zlokalizowany jest w krótkim ramieniu chromosomu 2 (2p25-p24)

Rybonukleaza 1 rodziny RNaz A, o ekspresji niższej w tkaniu raka żołądka w stosunku do tkanek otaczających (*ribonuclease, RNase A family, 1 pancreatic-type, RNASE1*) koduje endonukleazę przecinającą wewnętrzne wiązanie fosfodiesterowe dwuniciowych cząsteczek RNA znajdujące się po stronie 3' zasad pirymidynowych. Gen RNASE1 zlokalizowany jest w chromosomie 14q11.2 [167].

Gen TIMP1 (*Tissue inhibitor of metalloproteinase 1*) koduje inhibitor 1 metaloproteazy. Gen ten, leżący w chromosomie X (Xp11.3-p11.23) należy do rodziny metaloproteaz TIMP. Białka kodowane przez tę rodzinę są to naturalne inhibitory metaloproteinaz (MMP), które biorą udział w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej. Oprócz roli hamującej aktywność białek MMP, białko kodowane przez gen TIM1 może regulować proliferację komórek, a także wykazuje działanie antyapoptotyczne, a jego ranskrypcja jest indukowana w odpowiedzi na wiele cytokin i hormonów [135]. Ekspresja tego genu w moich badaniach była zwiększona w tkaniu raka żołądka w stosunku do tkanek otaczających.

Gen COL6A3 (*Collagen, type VI, alfa 3*), zlokalizowany w chromosomie 2 (2q37), koduje łańcuch $\alpha 3$ kolagenu 6 [100]. Również to białko strukturalne wykazywało wyraźnie podwyższoną ekspresję w raku żołądka. Do grupy transkryptów o podwyższonej ekspresji należał także gen SPP1 (*secreted phosphoprotein 1*), którego produkt bierze udział w wiązaniu osteoklastów do mineralizowanej macierzy kości. Gen SPP1 zlokalizowany w chromosomie (4q22.1) posiada również funkcję cytokiny zwiększającej ekspresję interferonu gamma oraz interleukiny 12 [174].

Białko THBS2 (*Thrombospondin 2*) kodowane przez gen zlokalizowany w chromosomie 6 (6q27) należy do rodziny trombospondyn i jest glikoproteiną, która pośredniczy w oddziaływaniach międzykomórkowych oraz komórka-macierz zewnątrzkomórkowa. Ekspresja w raku żołądka tego transkryptu była podwyższona. Białko to funkcjonuje jako inhibitor wzrostu nowotworu i angiogenezy. THBS2 może również modulować właściwości powierzchni komórek mezenchymalnych biorących udział w adhezji i migracji komórek [30].

Trombocytowy czynnik wzrostu D (PDGFD – *Platelet derived growth factor D*) koduje białko indukujące syntezę DNA i wzrost komórek w liniach komórkowych. Gen ten zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 11 [113], a ekspresja transkryptu obserwowana przeze mnie była niższa w raku żołądka niż w otaczających tkankach niezmiennych nowotworowo.

W części genów w badaniu QPCR nie identyfikowano istotnych różnic, mimo wcześniejszych doniesień literaturowych. Dotyczyło to m.in. cząsteczki CD36. Gen CD36, kodujący jedną z głównych glikoprotein powierzchniowych trombocytów zlokalizowany jest w chromosomie 7 (7q11.2) i jest receptorem trombospondyny 1 (TSB1). Białko TSB1 odgrywa ważną rolę w procesach adhezji komórkowej [66]. Białko CD36 może

też brać udział w wiązaniu utlenionej formy cząsteczek LDL [156] oraz pośredniczyć w apoptozie starzejących się wielojądrowych makrofagów [184].

Łańcuch $\alpha 2$ kolagenu 1 (COL1A2 – *Collagen, type I, alpha 2*) jest kodowany przez gen leżący w długim ramieniu chromosomu 7. Kolagen typu pierwszego jest kolagenem włókninowym i wchodzi w skład tkanki łącznej występującej w ścięgnach, kościach, rogówce i skórze [128].

Podjednostka 2 białka kolagenowego typu 4 (COL4A2- *Collagen, type IV, alpha 2*) kodowana jest przez gen zlokalizowany w chromosomie 13. Jest głównym składnikiem strukturalnym błony podstawnej. C-końcowa część białka jest inhibitorem angiogenezy i wzrostu guza [21].

Fibronektyna 1 (*FNI-Fibronectin 1*, 2q34) koduje glikoproteinę obecną w postaci rozpuszczonej w osoczu w formie dimerów i w multimerów lub na powierzchni komórek i w macierzy zewnątrzkomórkowej. Fibronektyna bierze udział w procesach adhezji i migracji komórkowej, w tym embriogenezy, gojenia ran, krzepnięcia krwi, odpowiedzi immunologicznej oraz powstawaniu przerzutów komórek nowotworowych [145].

Gen kodujący białko Laminina $\gamma 2$ (LAMC2 – *Laminin, gamma 2*) zlokalizowany jest w chromosomie 1q25-q31. LAMC2 to należy do rodziny glikoprotein macierzy zewnątrzkomórkowej będących głównym, niekolagenowym składnikiem błony podstawnej, biorącym udział w wielu ważnych procesach: adhezji komórkowej, różnicowania, migracji, sygnałowych oraz przerzutowania [2].

Kinaza Proteinowa 1 aktywowana mioginem (MAPK1 – *Mitogen-activated protein kinase 1*) zlokalizowana jest w chromosomie 22 na jego długim ramieniu (22q11.21-q11.22). Gen ten należy do rodziny zewnątrzkomórkowych kinaz regulujących sygnały komórkowe i odgrywających istotną rolę w procesach komórkowych takich jak proliferacja, różnicowanie i regulacja transkrypcji [92].

Gen OPCML (*opioid binding protein/cell adhesion molecule-like*) położony w chromosomie 11 (11q25) koduje podrodzinę białek przeciwciał IGLON, zlokalizowanych w błonie komórkowej i pełniących funkcję receptora opioidowego. Białko OPCML wykazuje dużą homologie do innych przeciwciał, zwłaszcza do komórkowych cząsteczek adhezyjnych [192].

Gen PIM1 koduje białko należące do rodziny kinaz serynowo-treoninowych. Gen PIM1 ulega ekspresji głównie w komórkach limfocytów B oraz w liniach komórek szpiku. Jego nadekspresja, prowadząca do zwiększonej proliferacji komórek) została wykryta w nowotworach krwiopochodnych [5] i raku prostaty [42].

Gen SLAMF1 (*signaling lymphocytic activation molecule family member 1*) położony jest w chromosomie 1 na jego długim ramieniu (1q23.3). Białko będące produktem genu SLAMF1 ulega ekspresji w limfocytach T krwi obwodowej, klonach komórek T, w niedojrzałych tymocytach i w części limfocytów B. Ekspresja SLAMF1 ulega szybkiej aktywacji w aktywowanych naiwnych komórkach limfocytów T [33].

Zlokalizowany w chromosomie 1 (1p34.2) gen SLC2A1 (*solute carrier family 2 member 1, facilitated glucose transporter*) koduje białko będące głównym transporterem glukozy [11].

Zlokalizowany w długim ramieniu chromosomu 5 (5q31.3-q32) gen SPARC (*secreted protein, acidic, cysteine-rich*) koduje białko związane z macierzą zewnątrzkomórkową. Bierze udział w procesach zwapniania kości, syntezy macierzy zewnątrzkomórkowej, w zmianach kształtu komórki, jak również hamuje postęp cyklu komórkowego [19].

Czynnik TFF1 (*Trefoil factor 1*) jest białkiem wydzielniczym, które ulega ekspresji w śluzówce żołądka. Jego rola nie do końca jasna. Najprawdopodobniej chroni śluzówkę

żołądka poprzez stabilizowanie warstwy śluzu i wpływając na odnawianie się nabłonka. Gen kodujący czynnik TFF1 zlokalizowany jest w chromosomie 21 na jego długim ramieniu [68].

Topoizomeraza II alfa (*TOP2A*, topoisomerase (DNA) II alpha) położona jest w chromosomie 17 (17q21-q22). Topoizomeraza II w komórkach eukariotycznych kontroluje topologię DNA oraz procesy transkrypcji, replikacji DNA, rekombinacji i organizacji chromatyny poprzez rozdzielanie topologicznych kompleksów, które pozostają w DNA po replikacji. Izofорма alfa topoizomerazy II jest ważna dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Oprócz funkcji enzymatycznej, może pełnić rolę strukturalną w organizacji chromatyny pośrednicząc w związaniu pętli chromatyny do białkopodobnych struktur podczas interfazy i mitozy [197].

Gen YES1 (*v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1*; 18p11.31-p11.21) jest homologiczny do genu *v-yes* wirusa mięsaka Yamaguchii koduje białko o aktywności kinazy tyrozynowej [189].

Analizując funkcję genów badanych pod kątem ich związku z biologią żołądka pogrupowano badane geny na kilka klas funkcjonalnych. Kluczową z nich była grupa kinaz tyrozynowych, będących kluczowymi białkami regulującymi wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnałów, a ich aktywność jest ściśle kontrolowana. Mutacje aktywujące oraz nadekspresja kinaz powoduje deregulację sygnalizacji i może prowadzić do transformacji nowotworowej [98].

Gen ACK1, którego koduje białko o aktywności kinazy tyrozynowej, bierze udział w procesach transformacji nowotworowej, przeżycia komórek, i tworzenia przerzutów. Gen ACK1 najczęściej jest amplifikowany i ulega nadekspresji w wielu typach nowotworów, a zmiana liczby kopii koreluje z bardziej agresywnym zachowaniem guza [169].

Aktywowany gen ACK1 przyspiesza proces nowotworzenia komórek raka prostaty *in vivo*, częściowo przez pobudzenie degradacji białka genu supresorowego Wwox. Zmieniona ekspresja genu ACK1 wiąże się z większą agresywnością guzów i jest kandydatem na genetyczny marker procesu przerzutowania [127].

Innym mechanizmem, poprzez który gen ACK1 może prowadzić do transformacji nowotworowej, jest aktywacja genu AKT. Mechanizm ten badano w liniach komórkowych raka trzustki i innych liniach komórkowych nowotworów. Fosforylacja białka AKT promuje przeżycie komórek. Ponadto traktowanie linii komórkowych inhibitorem AIM-100, nie tylko hamowało białko ACK1, ale również fosforylację białka AKT, prowadząc do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1, znacznie zmniejszając proliferację komórek raka trzustki i aktywowało proces apoptozy [126].

Również w raku żołądka obserwowany jest znaczny wzrost ekspresji genu ACK1, który hamował aktywność białka GAP (GTPazy) i CDC42Hs [230]. Amplifikacja genu ACK1 wykazała związek z występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych u pacjentów chorych na raka żołądka [98].

Kinazy serynowo-treoninowe MAPK regulują procesy transkrypcji, proliferacji oraz różnicowania komórek w odpowiedzi na różne czynniki wzrostu oraz warunki hipoksji tkanek. Aktywacja genu MAPK1, powoduje transdukcję sygnału do jądra komórkowego i zwiększa poziom ekspresji genów związanych z proliferacją komórek. Wykazano, że angiotensyna II i receptor AT1 indukują sygnały mitogenne powodujące ekspresję genu MAPK1 w raku żołądka [97].

W badaniu przeprowadzonym przez Baek i wsp. [8] stwierdzono, że czynnik wzrostu EGF indukuje gen uPAR, poprzez aktywację ścieżek sygnałowych genów MAPK1, AP1 oraz NF- κ B, stymulując inwazyjność komórek w linii komórkowej ludzkiego raka żołądka AGS. Podwyższona ekspresja genu MAPK1 w raku żołądka wiąże się również ze zjawiskiem niedotlenienia (hipoksji) w raku żołądka, gdzie zapobiega apoptozie indukowanej hipoksją oraz zmniejsza przyczepność komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych do białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz powoduje oporność na chemoterapię. Mechanizm ten nie jest do końca poznany, jednak wydaje się być związany z czynnikiem HIF1 [121].

Płytkowe czynniki wzrostu (PDGFs) regulują wiele procesów komórkowych, takich jak proliferację, transformację, migrację i przetrwanie komórek, w warunkach prawidłowego rozwoju i patogenezy. Oddziałują poprzez aktywację dwóch strukturalnie powiązanych receptorów kinaz tyrozynowych – α -PDGF (PDGFR) oraz β -PDGFR. Izofornie genów PDGF, wykazują podwyższony poziom ekspresji w różnych typach nowotworów i odgrywają ważną rolę w rozwoju guza, angiogenezie i tworzeniu przerzutów [233].

Czynnik PDGF-D oddziałuje głównie z receptorem β -PDGFR i aktywuje dalsze kaskady sygnałowe, m.in. β -kateniny, Notch-1 i czynnik jądrowy NF- κ B przyczyniając się do transformacji nowotworowej. Gen PDGF-D ulega nadekspresji w wielu typach nowotworów, w tym trzustki, nerek, prostaty, płuc, jajnika i mózgu [233].

Wykazano również, że gen PDGF-D odgrywa ważną rolę w rozwoju raka żołądka, poprzez zwiększenie wzrostu, inwazji i angiogenezy. Wyniki badań Zhao i wsp. [263] potwierdzają, że aktywacja PDGF-D oraz β -kateniny pobudzają wzrost komórek nowotworowych żołądka, inwazji i angiogenezę przez regulację ekspresji różnych genów, takich jak cyklina D1, metaloproteinaz oraz VEGF.

Kinaza serynowo-treoninowa PIM1 również odgrywa istotną rolę w procesie transformacji nowotworowej regulując cykl komórkowy, hamując procesy apoptozy oraz wywołując lekooporność w komórkach guza. Nadekspresja genu PIM1 powoduje także niestabilność genomową (brak punktu kontrolnego wrzeciona kinetycznego w trakcie podziału komórki) i poliploidalność genomu, poprzez deregulację Cykliny D1, co prowadzi do opóźnienia cytokinezy. Aktywacja genu PIM1 wiąże się z rozwojem wielu nowotworów m.in. białaczki szpikowej, chłoniaków, prostaty oraz nowotworów głowy i szyi [242].

Wykazano również, że nadekspresja genu PIM1 jest związana z gorszym rokowaniem chorych na raka żołądka. Ponadto, podwyższony poziom białka PIM-1 koreluje z tworzeniem przerzutów do węzłów chłonnych, stopniem zaawansowania i klasyfikacją Laurena [235].

Gen YES1 należy do rodziny kinaz tyrozynowych SRC, które regulują ścieżki sygnałowe zaangażowane w regulację proliferacji, przeżycia, różnicowania, adhezji i migracji komórek. Oprócz aktywności kinazy białko YES1 może posłużyć jako podłoże do oddziaływań białko-białko. Nieprawidłowy poziom ekspresji genu YES1 stwierdzono w wielu typach nowotworach, w tym płuc, piersi, jajnika, jelita grubego.

Barraclough i wsp. [12] wykazali, że podwyższona ekspresja genu YES1 zwiększa ruchliwość komórek raka jelita grubego, ale nie wpływa na proliferację tych komórek. bardziej zaawansowanych stadiach raka jelita grubego, zwiększenie poziomu białek SRC może być udział w rozprzestrzenianiu komórek guza i tworzeniu przerzutów. Oddziaływanie genów YES1 i PI3K prowadzi do inaktywacji syntetazy glikogenu GSK3b oraz

indukcji metaloproteinaz, które degradują macierz zewnątrzkomórkową ułatwiając ruchliwość komórek i powstawania przerzutów.

Inwazja guza i przerzuty są odpowiedzialne za progresję choroby nowotworowej. W normalnej tkance, oddziaływanie komórek i składników macierzy zewnątrzkomórkowej utrzymują strukturę tkanki nabłonkowej. Degradacja sił adhezyjnych pomiędzy komórkami lub komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową, skutkują naciekaniem otaczających guz tkanek i naczyń limfatycznych tworząc przerzuty do odległych miejsc [47].

Wśród kolagenów – białek macierzy zewnątrzkomórkowej, najwięcej jest kolagenu typu I (COL1), składnika strukturalnego tkanki łącznej, składającego się z dwóch łańcuchów A1 (COL1A1) i jednego A2 (COL1A2). Strukturalna integralności i biosynteza kolagenu typu I są niezwykle ważne dla morfogenezy tkanki, wzrost, homeostaza i naprawy [168].

Hipermetylacja genu COL1A2 opisana została w przypadku wielu nowotworów, głównie jelita grubego, czerniaka, raka pęcherza moczowego, nerwiaka (neuroblastoma), rdzeniaka oraz raka piersi. Mori i wsp. [142] wykazali, że ekspresja genu COL1A2 ulega zahamowaniu przez metylację wysp CpG i przyczynia się do proliferacji i migracji komórek guza w raku pęcherza. Ponadto hipermetylacja genu COL1A2 jest bezpośrednio związana z wielkością guza i przerzutami w rakach głowy i szyi. Sugeruje się również, że hipermetylacja genu z COL1A2 guza pierwotnego jest niezależnym czynnikiem predykcijnym przeżycia u chorych na raka głowy i szyi [139].

Typ IV kolagenu (COL4) jest składnikiem błony podstawnej, fizycznej bariery, która zapobiega inwazji komórek raka poza podścielisko [120]. Wykazano zwiększoną ilość kolagenu typu IV w różnych nowotworach, gdzie przynajmniej częściowo z związana jest z procesem transformacji poprzez indukowanie angiogenezy, ponieważ tworzenie nowych naczyń krwionośnych wymaga syntezy błony podstawnej [72]. Podczas transformacji nowotworowej prawidłowa budowa tkanki jest niszczone przez czynniki wytwarzane i wydzielane przez komórki nowotworowe. Struktura błony podstawnej i stopień jej zaburzenia są związane z etapem inwazji guza. Kolagen Typ IV jest degradowany w trakcie inwazji nowotworu i produkty rozkładu odgrywają ważną rolę w angiogenezie, remodelingu tkanki i progresji raka [213]. Znaczny stopień degradacji kolagenu typu IV, lub całkowita utrata błony podstawnej jest związane z krótszym czasem przeżycia, większą agresywnością nowotworu oraz wysokim wskaźnikiem nawrotów choroby [132].

Oprócz degradacji kolagenu typu IV w błonie podstawnej i wysokim poziomem ekspresji kolagenu typu IV w podścielisku guza, chorzy na raka mają również znacząco podwyższone stężenie COL4 krążącego w surowicy krwi, a nawet w otrzewnej obserwowano podwyższony poziom tego białka u chorych na raka żołądka i jelita grubego. Poziom kolagenu typu IV w płynach ciała był skorelowane z czasem przeżycia [104].

Ruan i wsp. [177] wykazali, że w raku żołądka, kolagen typu IV ulega degradacji, a poziom kwasu hialuronowego (HA) i COL4 znacznie wzrasta w soku żołądkowym i surowicy krwi. U chorych na raka żołądka z przerzutami do węzłów chłonnych, poziom kolagenu typu IV i HA w soku żołądkowym były znacznie wyższe niż u chorych bez przerzutów, podczas gdy w surowicy krwi nie stwierdzono znaczącej różnicy. To może wskazywać, że wykrywanie kolagenu typu IV i HA w soku żołądkowym jest bardziej czułe niż w surowicy. Wyniki te wykazały, że kolagen typu IV i HA mogą być uznawane za użyteczne markery w diagnostyce i ocenie progresji raka żołądka.

Typ VI kolagenu (COL6) tworzy sieć mikrofibryl i jest często związany z typem I włókien kolagenowych. Może wiązać je ze sobą, tworząc grubsze włókna kolagenu.

Zaobserwowano zwiększony poziom kolagen VI w mikrośrodowisku guza co jest istotne dla oddziaływań macierzy zewnątrzkomórkowej i komórek nowotworowych [191]. Ponadto, obecność składników macierzy zewnątrzkomórkowej i związanych z nimi sygnałów może zmniejszyć podatność komórek guza na apoptozę i może powodować zwiększenie oporności chemioterapeutycznej w raka płuca [176]. Kolagen VI uczestniczy w wiązaniu kilku rodzajów białek macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym dekorinu [236]. Sugeruje się, że to oddziaływanie zwiększa odporność na chemioterapię raka [193].

Alternatywny *splicing*, jest mechanizmem zwiększania różnorodności białek. Zaobserwowano również, że proces alternatywnego *splicing* genu COL6A3 jest związany z transformacją nowotworową trzustki. Włączenie eksonów 3, 4 i 6 koreluje z większą ilością mRNA i białka COL6A3. obecność i wysoki poziom białka COL6A3 wydaje się korelować z etapem rozwoju guza [7].

Fibronektyna 1 (FN1) jest glikoproteiną, która również jest zaangażowana w procesy adhezji i migracji komórek oraz embriogenezy, gojenia ran, krzepnięcia krwi, odporności i przerzutowania komórek nowotworowych. Cząsteczka ta najczęściej występuje w blaszce właściwej, nerwach i warstwach komórek mięśni gładkich [238]. Niewiele badań opisuje potencjalną rolę fibronektyny w powstawaniu nowotworów. Na przykład w raku wątroby stwierdzono nadekspresję białka FN1. Podwyższony poziom fibronektyny obserwowano również w osoczu u pacjentów z rozpoznany nowotworem przewodu pokarmowego oraz głowy i szyi [234]. Udział w procesach migracji komórek nabłonka oraz hamowania apoptozy sugeruje, że nadekspresja genu FN1 jest związana z rozwojem różnych rodzajów nowotworów [211].

Waalkes i wsp., [228] sugerują, że nadekspresja fibronektyny może służyć jako marker agresywności, wskazując wczesną ogólnoustrojową progresję pacjentów chorych na raka brodawkowatego nerki.

Wykazano, że FN1 razem z innymi genami takimi jak COL1, POSTN i VCAN-TGF β ulega nadekspresji w guzach przerzutujących raka piersi oraz czerniaka (w wyniku oddziaływania pomiędzy komórkami nowotworowymi i fibroblastami), tworząc skomplikowane sieci fibrylarne w okolicy komórek guza. Podobne interakcje zaobserwowano w przerzutach raka wątroby i płuc. Ponadto, białko FN1 jest niezbędne dla wzrostu komórek guza i podścieliska [198].

Lamininy są dużymi glikoproteinami zewnątrzkomórkowymi, które również stanowią ważny składnik błony podstawnej i są zaangażowane m.in. w rozwój tkanek, gojenie się ran, a także transformację nowotworową. Laminina-5, składająca się z łańcuchów α 3, β 3 i γ 2, które są kodowane przez trzy różne geny (LAMA3, LAMB3 i LAMC2), ulega ekspresji w tkance nabłonkowej oraz mikrośrodowisku guza wielu typów nowotworów [133]. Laminina-5 bierze udział w procesach adhezji, migracji i rozpraszania komórek silniej niż inne znane białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Ekspresja genu LAMC2 i LAMB3, w połączeniu z MMP7, odgrywają kluczową rolę w rozwoju raka dróg żółciowych, a koekspresja LAMB3 i LAMC2 obserwowana jest w raku płaskonabłonkowym języka, raka jelita grubego oraz raka podstawnokomórkowego skóry [3, 158].

Wykazano, że nadekspresja genów LAMB3 i LAMC2 często występuje w nowotworach żołądka, a demetylacja promotora oraz modyfikacje histonów były związane z nadekspresją obu genów, powodując zwiększenie proliferacji, migracji komórek guza i inwazji raka żołądka. Koekspresja w komórkach nowotworowych żołądka tkanek nowotworowych, i oba z nich były Wyniki sugerują, że koekspresji łańcuchów lamininy β 3 i γ 2 jest charakterystyczna dla agresywnego fenotypu komórek raka żołądka, związanego

z głębokością inwazji i zaawansowanym stadium nowotworu, co prowadzi do rozwoju choroby [111, 79].

Obserwowano również, że monomer lamininy $\gamma 2$ ulega nadekspresji w inwazyjnym raku jelita, co przypisuje się aktywacji genu LAMC2 przez czynniki TGF $\beta 1$ i HGF. Odkładanie zewnątrzkomórkowe lub cytoplazmatyczne monomeru lamininy $\gamma 2$ odnotowano w gruczolakoraku żołądka. Wyniki sugerują, że cytoplazmatyczne łańcuch lamininy $\gamma 2$ odgrywa istotną rolę w żołądku ruchliwości komórek nowotworowych [106].

Kolejnym białkiem adhezji komórkowej jest OPCML, które ulegają wysokiej ekspresji w układzie nerwowym [52]. Gen OPCML został rozpoznany jako gen supresorowy, a jego inaktywacja, przez utratę heterozygotyczności lub metylzację promotora, po raz pierwszy została opisana w raku jajnika. Nowsze badania wykazały również, że OPCML jest silnie metylowany w gruczolakoraku płuc [210] i nowotworach mózgu [172].

Gen OPCML jest genem stresu regulowanym przez p53, jednakże jego odpowiedź stresu ulega zakłóceniu przez metylzację promotora. Ekspresja OPCML w linii komórek nowotworowych prowadzi do silnego hamowania tworzenia kolonii komórek wykazując działanie supresorowe. Białko OPCML może wiązać bezpośrednio stymulatory wzrostu lub cząsteczki hamujące proliferację i modulować ich funkcje w komórkach nowotworowych. OPCML może funkcjonować jako kinaza tyrozynowa i jest często inaktywowany epigenetycznie w wielu nowotworów, a utrata ekspresji tego genu zmniejsza przyczepność międzykomórkową oraz tworzenie kompleksów heterodimerycznych, przez co utrudnia odpowiednią sygnalizację w ścieżkach komórkowych, przyczyniając się do transformacji nowotworowej [34].

Produkt genu SPARC jest niestrukturalnym składnikiem macierzy pozakomórkowej, który moduluje oddziaływanie komórek i macierzy, szczególnie podczas rozwoju tkanek, przebudowy i naprawy [18]. Wiele typów nowotworów charakteryzuje podwyższona ekspresja genu SPARC, takich jak rak sutka, prostaty, czerniak oraz glejaki [243]. Obniżony poziom białka SPARC stwierdzono w rakach jajnika, jelita grubego, trzustki i ostrej białaczce szpikowej. Obserwacje te sugerują, że efekt nowotworowy genu SPARC jest specyficzny dla różnych typów komórek i może być zależna od otoczenia komórki nowotworowej [44].

W raku żołądka stwierdzono nadekspresję genu SPARC. Podwyższony poziom białka SPARC jest związany z agresywnym stadium raka żołądka i jest skorelowany ze złym rokowaniem. Wyższa ekspresja SPARC był znacząco związana z progresją nowotworu i zaawansowanych stadium raka żołądka. SPARC może odgrywać kluczową rolę w początkowych etapach inwazji guza i przerzutowaniu. Ponadto białko SPARC może wywołać ekspresję metaloproteinaz lub innych enzymów, które biorą udział w degradacji błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej [252].

Ostatnie badania wykazały, że SPARC chroni komórki przed apoptozą wywołaną stresem, w warunkach przez oddziaływania z integryną $\beta 1$, która zwiększa aktywność genu ILK oraz innych czynników przeżyciowych [195]. Horie i wsp. [75] wykazali, że obniżenie ekspresji genu SPARC hamuje wzrost przez zatrzymanie cyklu komórki w fazie G1 w komórkach ludzkiego czerniaka. Zaobserwowano również, że SPARC promuje przeżycie komórek glejaka przez aktywację genu Akt poprzez ścieżki sygnalizacji integryn [194]. Wyniki te sugerują, że SPARC jest również czynnikiem antystresowym. Gen SPARC odgrywa ważną rolę w apoptozie i przerzutowaniu raka żołądka, a podwyższony poziom białka SPARC jest związany ze zmniejszeniem przeżywalności u pacjentów chorych na raka żołądka [229].

W ostatnim czasie pojawiły się również dane, sugerujące udział genu SPARC w procesie angiogenezy. Zhang i wsp. [259] wykazali, że nadekspresja SPARC hamuje angiogenezę w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* w połączeniu ze spadkiem ekspresji metaloproteinazy MMP-7 i czynnika VEGF, jak również fosforylacji białka ERK1/2. Natomiast obniżenie poziomu SPARC pobudzało tworzenie nowych naczyń w guzie.

Białko SPP1 jest składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej i bierze udział w szeregu fizjologicznych i patofizjologicznych procesów obejmujących migrację komórek, proliferację, remodeling tkanek, tworzenie kości. Gen SPP1 jest często ulega nadekspresji w różnych typach nowotworów [54].

Ekspresja genu SPP1 jest znacznie podwyższona w większości przypadków raka żołądka. Podwyższony poziom białka SPP1 występuje zarówno w guzie jak i zmianach przerzutowych. Niski poziom SPP1 obserwuje się w komórkach nabłonkowych w przewlekłym zanikowym zapaleniu błony śluzowej żołądka, które jest przedrakową zmianą chorobową, a normalną błonę śluzową żołądka cechuje brak ekspresji genu SPP1. Wyniki te sugerują, że OPN może odgrywać istotną rolę i służyć jako potencjalny marker powstawania i progresji raka żołądka [87]. Ponadto Wu i wsp. [240] stwierdzili wyższy poziom białka SPP1 w osoczu pacjentów chorych na raka żołądka, sugerując że stężenie SPP1 może być markerem raka żołądka.

Nadekspresja genu SPP1 jest skorelowana z parametrami klinicznymi w raku żołądka, takie jak niski wskaźnik apoptozy, wysoki wskaźnik proliferacji, niskiej stopień zróżnicowania, wysoki stopień zaawansowania, inwazja naczyniowa oraz przerzuty odległe. Ponadto nadekspresja SPP1 jest niezależnym predyktorem złego rokowania i nawrotu choroby u pacjentów chorych na raka żołądka [35].

Sugeruje się, że kinazy PIK, Akt oraz czynnik HIF1 współdziałają z genem SPP1, który indukuje sygnały przeżyciowe i antyapoptotyczne w nowotworach żołądka i wątroby [116, 262]. Ścieżka sygnałowa kinaz MEK/ERK1 i 2, może również być aktywowana przez białko SPP1 pobudzając wzrost guza i tworzenie przerzutów [207]. Funkcje genu SPP1 wiążą się również z aktywacją genu NF- κ B, który inicjuje ekspresję genów antyapoptycznych oraz często wywołuje oporności na chemioterapię. SPP1 indukuje powstawanie przerzutów nowotworów przez aktywację metaloproteinaz takich jak MMP-2, MMP-9, MMP-7 i innych białek związanych z inwazją, takich jak czynnik VEGF i uPA [45].

Inhibitory metaloproteinaz (TIMP) hamując aktywność katalityczną przez wiązanie aktywowanych MMP, chronią macierz zewnątrzkomórkową przed niekontrolowaną degradacją [223]. Białka TIMP mogą również hamować proliferację, inwazję, i przerzutowanie komórek nowotworowych. Zaburzenia równowagi metaloproteinaz i ich inhibitorów przyczyniają się do rozwoju nowotworów [112].

Białko TIMP1 jest głównym inhibitorem aktywności metaloproteinazy 9 (MMP9) i zmniejsza potencjał metastatyczny różnych nowotworów, w tym raka żołądka. Czynniki transkrypcyjne STAT3 oraz RUNX3 zwiększają ekspresję genu TIMP1, zmniejszając inwazyjność raka piersi [43]. W liniach komórkowych raka prostaty, ekspresja genu TIMP1 była indukowana przez IL10 [202]. Chen i wsp. [26] oraz Wang i wsp. [232] wykazali, że zwiększony poziom białka TIMP1 w liniach komórkowych raka żołądka zmniejszają migrację komórek.

Trombospondyny to glikoproteiny, które pośredniczą w oddziaływaniach międzykomórkowych oraz komórka-macierz zewnątrzkomórkowa. Funkcjonują jako inhibitory wzrostu i angiogenezy w nowotworach. Gen THBS2 może również modulować właści-

wości powierzchni komórek mezenchymalnych biorących udział w adhezji i migracji komórek [114].

Wprowadzenie do linii komórkowych raka płaskonabłonkowego genu TSP-2 hamowało wzrost i angiogenezę [204]. Wykazano również, że wprowadzenie cDNA genu TSP-2 do linii komórkowej ludzkiego raka okrężnicy oraz trzustki znacząco obniżało aktywność metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 mRNA [148]. Wyniki te sugerują, że TSP-2, jak również gen TSP-1 mogą odgrywać ważną rolę jako inhibitor przerzutowania. Również w niedrobnokomórkowym raku płuc stwierdzono, że ekspresja genu THBS2 znacząco zmniejsza unaczynienie guza, skutkując lepszym rokowaniem [28].

Ekspresja genu CD36 w komórkach nowotworowych również odgrywa ważną rolę w angiogenezie, progresji i przerzutowaniu [25]. Białko CD36 oddziałuje z trzema anty-angiogennymi białkami – trombospondyna 1 i 2 oraz waskulostatyną, inicjując wewnątrzkomórkowe kaskady sygnalizacji z udziałem rodziny kinaz tyrozynowych Src p59 i p38 (MAPK). W wyniku bezpośredniego uruchomienia kaspazy 3 prowadzi do apoptozy [83, 99]. Za pośrednictwem CD36 aktywność antyangiogenna obejmuje również indukcję czynników proapoptotyczne, w tym receptorów TNFR-1 i Fas. Sygnały te przerywają reakcje wywołane przez pro-angiogenne czynniki wzrostu, takie jak bFGF i VEGF [173, 227]. Nadekspresja genu CD36, które zmniejsza unaczynienie podścieliska, przez indukcję apoptozy naczyń komórek śródbłonna, jest skorelowana z lepszym rokowaniem u chorych na raka okrężnicy [217].

Gen CCL18 jest chemokiną ulegającą ekspresji m.in. w monocytach [101] podwyższony poziom białka CCL18 obserwowano w makrofagach przenikających raka jajnika, raka żołądka i glejaka [24]. Sugeruje się udział genu CCL18 w immunosupresji raka jajnika [50].

Wykazano, że CCL18 specyficznie wiąże się z receptorem błonowym P1TPNM3 komórek rakowych, skutkując inwazją raka i tworzeniem przerzutów, wywołując ekspresję integrzyn oraz pobudzając sygnalizację Ca^{2+} wywołuje ukierunkowaną migrację komórek. Również aktywacja kinazy tyrozynowej Pyk2, kluczowe kompleksu adhezyjnego FAC pobudza migrację komórek nowotworowych [266].

Białko SLAMF1 jest receptorem powierzchniowym aktywowanych limfocytów T i B oraz komórek dendrytycznych. Ekspresja genu SLAMF1 zwiększa liczbę i zdolności cytotoksyczne limfocytów $CD8^+$, które skierowane są przeciw komórkom nowotworowym [71, 149].

Enzym reduktaza rybonukleotydów (RR) katalizuje przekształcenie rybonukleotydów do deoksyrybonukleotydów wymaganych do syntezy DNA i składa się z dwóch podjednostek, M1 oraz M2. Aktywność enzymatyczna RR jest modulowana przez poziom podjednostki M2 (RRM2) [162]. W niektórych typach raka, wysoki poziom mRNA RRM2 koreluje z chemioopornością, inwazyjnością komórek oraz gorszym rokowaniem, co sugeruje, że przyczynia się do złośliwej transformacji i stanowi potencjalny cel terapeutyczny [51, 200]. Wykazano, że gen RRM2 często ulega nadekspresji w raku żołądka. Morikawa i wsp. [143] zaobserwowali, że nadekspresja RRM2 była związana z obecnością inwazji blaszki mięśniowej i wyższym indeksem Ki-67, który markerem komórek proliferujących różnych typów nowotworów, w tym raka żołądka. Sugeruje to, że podwyższony poziom białka RRM2 może być związany z progresją raka żołądka.

Białko RNASE1 bierze udział w degradacji RNA [167]. Wang i wsp. [230] sugerują, że wzór ekspresji genu RNASE1 jest podobna do ekspresji genów supresorowych

i jest najwyższa w prawidłowej śluzówce żołądka, zmniejsza się w guzie pierwotnym, a w przerzutach do węzłów chłonnych ekspresja genu RNASE1 jest najniższa.

Komórki nowotworowe wykazują zwiększony wychwyt glukozy, który odbywa się za pośrednictwem transporterów glukozy (Gluts), których ekspresja i aktywność jest regulowana przez onkogeny i czynniki wzrostu. Zaobserwowano znaczny wzrost ekspresji głównego transportera glukozy SLC2A1 w nowotworach przełyku, okrężnicy, trzustki, płuc oraz mózgu [90].

Wysoki poziom białka SLC2A1 jest związany ze zwiększonym metabolizmem i wykorzystaniem glukozy w komórkach nowotworowych. Zwiększoną ekspresję genu SLC2A1

obserwuje się także w warunkach, które indukują większe zapotrzebowanie na glukozę, takie jak niedokrwienie i niedotlenienie [261]. Dane te sugerują, że nadekspresja transportera glukozy może odgrywać ważną rolę w przeżyciu komórek nowotworowych poprzez dostarczenie odpowiedniego zapasu energii, która pokrywa wysokie tempo metabolizmu i szybki wzrost [152].

Sugeruje się także, że cytokiny oraz onkogeny indukowane podwyższonym poziomem transportu glukozy przez SLC2A1 mogą odgrywać rolę anty-apoptotyczną. Ekspresja genu SLC2A1 wydaje się być związana z rozwojem raka żołądka, ponieważ gruczolak żołądka, który jest stanem przedrakowym nie zaobserwowano ekspresji transportera glukozy, a jego ekspresja rzadko jest wykrywana we wczesnych nieinwazyjnych rakach. Natomiast stopniowy wzrost poziomu białka SLC2A1 Glut1 obserwuje się w przypadku głębszej inwazji i wyższego stadium choroby, co wskazuje na ścisły związek z progresją raka żołądka. Ponadto, ekspresja transportera SLC2A1 jest ściśle związana z parametrami agresywności komórek nowotworowych, takich jak przenikanie do naczyń limfatyczne, inwazja naczyń krwionośnych oraz przerzutowanie do węzłów chłonnych i wątroby [90].

Gen TFF1 koduje białko wydzielnicze, ulegające ekspresji w komórkach nabłonkowych, odpowiadające za utrzymanie integralności śluzówki żołądka. Ponadto, gen TFF1 hamuje proliferację komórek poprzez opóźnienie przejścia cyklu komórkowego z fazy G1 do S [131]. W raku żołądka obserwuje się spadek ekspresji czynnika TFF1 spowodowany metylacją promotora lub utratą heterozygotyczności [201].

Gen topoiizomerazy IIa (TOP2A), koduje enzym zaangażowany w replikacji DNA [85]. Enzym TOP2A jest celem dla leków przeciwnowotworowych – antracykliny, epipodofilotoksyny, aktynomiksiny (actinomycin) i mitoksantronu [118]. Nadekspresja genu TOP2A jest silnie związana z amplifikacją onkogenu HER2, a ostatnie badania wykazały, że koamplifikacja HER2 i TOP2A jest związana ze skutecznością leczenia antracyklinami w kilku typach nowotworów, w tym raku piersi [257]. Równoczesną nadekspresję genów TOP2A i HER2 zaobserwowano również w raku żołądka [119].

5.3. Znaczenie degradacji RNA dla badania markerów molekularnych w raku żołądka

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach uwzględniłem niewielką grupę próbek raka żołądka z wyraźną degradacją RNA. Pozwoliło mi to ocenę wpływu tej degradacji (w szerokim dość zakresie współczynnika degradacji RIN 2-8) na wyniki pomiaru ekspresji genów. Pomimo iż skala degradacji RNA istotnie wpływa na wynik badania mi-

kromacierzowego, to nie jest to różnica w skali „globalnej” – dotyczy ona maks. 5% badanych transkryptów, a część badanych genów markerowych jest na degradację bardziej odporna. Może to sugerować, że część transkryptów jest potencjalnie lepszymi kandydatami do badań opartych o RNA w materiale pooperacyjnym (czy to zabezpieczonym świeżo czy też utrwalanym w parafinie), gdyż stopień degradacji związany z czasem do zabezpieczenia materiału mniej wpływa na ich ekspresję. Z kolei transkrypty wrażliwe na degradację należy badać wyłącznie w sytuacji natychmiastowego zabezpieczenia świeżej tkanki guza bez okresu przedłużonego braku perfuzji krwi, a jeśli to niemożliwe – zamiast na poziomie transkryptu badać te cząsteczki poprzez ocenę immunohistochemiczną na poziomie białka.

W części nowotworów (np. w raku piersi) metody genomiczne oparte o analizę ekspresji genów w materiale zdegradowanym (błoczki parafinowe, test Oncotype DX) stały się narzędziem uwzględnianym w diagnostyce klinicznej. Rodzi to nadzieję, że wykorzystanie podobnych metod dla innych nowotworów, np. właśnie raka żołądka przyniesie nowe markery molekularne które pozwolą lepiej dobrać sposób leczenia operacyjnego i dalszej terapii uzupełniającej u tych chorych.

6. WNIOSKI

- W badaniu mikromacierzowym zidentyfikowano geny potencjalnie powiązane ze stopniem zaawansowania nowotworu. Obserwowano niewielki i graniczny statystycznie związek ekspresji genów z zaawansowaniem guza pierwotnego. W szczególności, gen LRP4 wykazywał niższą ekspresję u chorych z wyższym zaawansowaniem choroby ($p < 0,001$, FDR 31%). Nie obserwowano związku ekspresji genów z zaawansowaniem przerzutów węzłowych
- Potwierdzono związek ekspresji wybranych genów (w tym AHSA1, CXCR2, FPR2 i HCAR3, FDR < 5%) ze stopniem zróżnicowania nowotworu. Na wyselekcjonowanej liście genów jest wiele transkryptów które mimo że nie przekroczyły oczekiwanego poziomu istotności statystycznej, to ich związek ze stopniem zróżnicowania jest wysoce prawdopodobny (np. G0S2), a także wiele genów istotnych z punktu widzenia biologii nowotworów (np. S100A9).
- Dwie główne grupy próbek, wyodrębnione na podstawie analizy nienadzorowanej badania genomowego i wykazujące duże różnice w ekspresji genów, mimo że różnią się wyjściowym zaawansowaniem nowotworu, nie wykazują różnic w ostatecznym rokowaniu chorych.
- Stopień degradacji RNA w mierzonym zakresie RIN 2-8, mimo iż znacząco wpływa na wynik badania mikromacierzowego, nie jest powiązany z różnicami w części badanych genów markerowych – te transkrypty potencjalnie mogą być bardziej odporne na degradację i są lepszymi kandydatami do zastosowań diagnostycznych
- W badaniu mikromacierzowym nie obserwowano w badanej grupie związku ekspresji genów z całkowitym czasem przeżycia chorych. Może to być związane z heterogennością badanej grupy bądź ograniczeniem liczebności zbioru.
- Jeden z genów analizowanych techniką QPCR w całej populacji badanych (RRM2) wykazuje różnice związane z czasem przeżycia chorych – po uwzględnieniu ekspresji w tkanku otaczającym nowotwór. Dla drugiego potencjalnie różnicującego genu (TIMP1) potwierdzenie wymaga dalszych badań. Podwyższona ekspresja tych genów może wiązać się z niekorzystnym rokowaniem. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność poszukiwania markerów o znaczeniu rokowniczym w dużych grupach, uwzględniając osobniczą zmienność ekspresji genów w tkankach nienowotworowych.

7. PIŚMIENICTWO

1. Adema G.J., Hartgers F., Verstraten R., de Vries E., Marland G., Menon S., Foster J., Xu Y., Nooyen P., McClanahan T., Bacon K.B., Figdor C.G.: A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 1997, 387, 713-717.
2. Airene T., Haakana H., Sainio K., Kallunki T., Kallunki P., Sariola H., Tryggvason K.: Structure of the human laminin gamma-2 chain gene (LAMC2): alternative splicing with different tissue distribution of two transcripts. *Genomics* 1996, 32, 54-64.
3. Akimoto S., Nakanishi Y., Sakamoto M., Kanai Y., Hirohashi S.: Laminin 5 beta3 and gamma2 chains are frequently coexpressed in cancer cells. *Pathol. Int.* 2004, 54, 688-692.
4. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F.: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2003, 100, 3983-3988.
5. Amson R., Sigaux F., Przedborski S., Flandrin G., Givol D., Telerman A.: The human protooncogene product p33pim is expressed during fetal hematopoiesis and in diverse leukemias. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1989, 86, 8857-8861.
6. Ando T., Yoshida T., Enomoto S., Asada K., Tatematsu M., Ichinose M., Sugiyama T., Ushijima T.: DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosa of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int. J. Cancer* 2009, 124, 2367-2374.
7. Arafat H., Lazar M., Salem K., Chipitsyna G., Gong Q., Pan T.C., Zhang R.Z., Yeo C.J., Chu M.L.: Tumor-specific expression and alternative splicing of the COL6A3 gene in pancreatic cancer. *Surgery*. 2011, 150 (2), 306-331.
8. Baek M.K., Kim M.H., Jang H.J., Park J.S., Chung I.J., Shin B.A., Ahn B.W., Jung Y.D.: EGF stimulates uPAR expression and cell invasiveness through ERK, AP-1, and NF- κ B signaling in human gastric carcinoma cells. *Oncol Rep* 2008, 20, 1569-1575.
9. Bagnoli F., Buti L., Tompkins L., Covacci A., Amieva M.R.: Helicobacter pylori CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, 102, 16339-16344.
10. Bamias A.T., Bai M.C., Agnantis N.J., Michael M.C., Alamanos Y.P., Stefanaki S.V., Razi E.D., Skarlos D.V., Kappas A.M., Pavlidis N.A.: Prognostic significance of the deleted in colorectal cancer gene protein expression in high-risk resected gastric carcinoma. *Cancer Invest* 2003, 21, 333-340.
11. Baroni M.G., Oelbaum R.S., Pozzilli P., Stocks J., Li S.R., Fiore V., Galton D.J.: Polymorphisms at the GLUT1 (HepG2) and GLUT4 (muscle/adipocyte) glucose transporter genes and non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Hum. Genet* 1992, 88, 557-561.
12. Barraclough J., Hodgkinson C., Hogg A., Dive C., Welman A.: Increases in c-Yes Expression Level and Activity Promote Motility But Not Proliferation of Human Colorectal Carcinoma Cells. *Neoplasia*. 2007, 9, 745-754.
13. Becker K.F., Keller G., Hoefler H.: The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol* 2000, 9 (1), 5-11.

14. Bessette D.C., Qiu D., Pallen C.J.: PRL PTPs: mediators and markers of cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2008, 27, 231-252.
15. Beyer B.C., Heiss M.M., Simon E.H., Gruetzner K.U., Babic R., Jauch K.W., Schildberg F.W., Allgayer H.: Urokinase system expression in gastric carcinoma: prognostic impact in an independent patient series and first evidence of predictive value in preoperative biopsy and intestinal metaplasia specimens. *Cancer* 2006, 106, 1026-1035.
16. Bheemanaik S., Reddy Y.V., Rao D.N.: Structure, function and mechanism of exocyclic DNA methyltransferases. *Biochem J.* 2006, 399, 177-190.
17. Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R., Sidransky D., Eshleman J.R., Burt R.W., Meltzer S.J., Rodriguez-Bigas M.A., Fodde R., Ranzani G.N., Srivastava S.: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998, 58, 5248-5257.
18. Bradshaw A.D., Sage E.H.: SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest.* 2001, 107, 1049-1054.
19. Bradshaw A.D., Graves D.C., Motamed K., Sage E.H.: SPARC-null mice exhibit increased adiposity without significant differences in overall body weight. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2003, 100, 6045-6050.
20. Brandt S., Kwok T., Hartig R., Konig W., Backert S.: NFkappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, 102, 9300-9305.
21. Brazel D., Pollner R., Oberbaumer I., Kuhn K., Human basement membrane collagen (type IV): the amino acid sequence of the alpha-2(IV) chain and its comparison with the alpha-1(IV) chain reveals deletions in the alpha-1(IV) chain. *Europ J. Biochem* 1988, 172, 35-42.
22. Buffart T.E., van Grieken N.C., Tijssen M., Coffa J., Ylstra B., Grabsch H.I., van de Velde C.J., Carvalho B., Meijer G.A.: High resolution analysis of DNA copy-number aberrations of chromosomes 8, 13, and 20 in gastric cancers. *Virchows Arch* 2009, 455, 213-223.
23. Calin G.A., Croce C.M.: MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale, *Cancer Res* 2006, 66, 7390-7394.
24. Chang C.Y., Lee Y.H., Leu S.J., Wang C.Y., Wei C.P., Hung K.S., Pai M.H., Tsai M.D., Wu C.H.: CCchemokine igand 18/pulmonary activation-regulated chemokine expression in the CNS with special eference to traumatic brain injuries and neoplastic disorders. *Neuroscience* 2010, 165, 1233-1243.
25. Chen M., Pych E., Corpron C., Harmon C.M.: Regulation of CD36 expression in human melanoma cells. *Adv Exp Med Biol* 2002, 507, 337-342.
26. Chen Y., Wei X., Guo C., Jin H., Han Z., Han Y., Qiao T., Wu K., Fan D.: Runx3 suppresses gastric cancer metastasis through inactivation of MMP9 by upregulation of TIMP-1. *Int. J. Cancer* 2011, 129, 1586-1598.
27. Cheng L., Yang S., Yang Y., Zhang W., Xiao H., Gao H., Deng X., Zhang Q.: Global gene expression and functional network analysis of gastric cancer identify extended pathway maps and GPRC5A as a potential biomarker. *Cancer Lett* 2012, 326 (1), 105-113.

28. Chijiwa T., Abe Y., Inoue Y., Matsumoto H., Kawai K., Matsuyama M., Miyazaki N., Inoue H., Mukai M., Ueyama Y., Nakamura M.: Cancerous, but not stromal, thrombospondin-2 contributes prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2009, 22, 279-283.
29. Chomczynski P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction *Anal Biochem* 1987, 162 (1), 156-159.
30. Christopherson K.S., Ullian E.M., Stokes C.C., Mallowney C.E., Hell J.W., Agah A., Lawler J., Mosher D.F., Bornstein P., Barres B.A.: Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 2005, 120, 421-433.
31. Clarke M.F., Fuller M.: Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* 2006, 124, 1111-1115.
32. Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B., Eaves C.J., Jamieson C.H., Jones D.L., Visvader J., Weissman I.L., Wahl G.M.: Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006, 66, 9339-9344.
33. Cocks B.G., Chang C.C., Carballido J.M., Yssel H., de Vries J.E., Aversa G.: A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 1995, 376, 260-263.
34. Cui Y., Ying Y., van Hasselt A., Ng K.M., Yu J., Zhang Q., Jin J., Liu D., Rhim J.S., Rha S.Y., Loyo M., Chan A.T., Srivastava G., Tsao G.S., Sellar G.C., Sung J.J., Sidransky D., Tao Q.: OPCML Is a Broad Tumor Suppressor for Multiple Carcinomas and Lymphomas with Frequently Epigenetic Inactivation. *PLoS ONE* 2008, 3 (8), e2990.
35. Dai N., Bao Q., Lu A., Li J.: Protein expression of osteopontin in tumor tissues is an independent prognostic indicator in gastric cancer. *Oncology* 2007; 72, 89-96.
36. Dantzig A.H., Hoskins J.A., Tabas L.B., Bright S., Shepard R.L., Jenkins I.L., Duckworth D.C., Sportsman J.R., Mackensen D., Rosteck P.R. Jr, Skatrud P.L.: Association of intestinal peptide transport with a protein related to the cadherin superfamily. *Science* 1994, 264, 430-433.
37. de Kok J.B., Roelofs R.W., Giesendorf B.A., Pennings J.L., Waas E.T., Feuth T., Swinkels D.W., Span P.N.: Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab. Invest.* 2005, 85, 154-159.
38. de Maat M.F., van de Velde C.J., Umetani N., de Heer P., Putter H., van Hoesel A.Q., Meijer G.A., van Grieken N.C., Kuppen P.J., Bilchik A.J., Tolenaar R.A., Hoon D.S.: Epigenetic silencing of cyclooxygenase-2 affects clinical outcome in gastric cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007, 25, 4887-4894.
39. D'Errico M., de Rinaldis E., Blasi M.F., Viti V., Falchetti M., Calcagnile A., Sera F., Saieva C., Ottini L., Palli D., Palombo F., Giuliani A., Dogliotti E.: Genome-wide expression profile of sporadic gastric cancers with microsatellite instability. *Eur J Cancer* 2009, 45, 461-469.
40. Derynck R., Zhang Y., Feng X.H.: Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 1998, 95, 737-740.
41. Devy L., Blacher S., Grignet-Debrus C., Bajou K., Masson V., Gerard R.D., et al.: The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J* 2002, 16, 147-154.

42. Dhanasekaran S.M., Barrette T.R., Ghosh D., Shah R., Varambally S., Kurchi K., Pienta K.J., Rubin M.A., Chinnaiyan A. M.: Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001, 412, 822-826.
43. Dien J., Amin H.M., Chiu N., Wong W., Frantz C., Chiu B., Mackey J.R., Lai R.: Signal transducers and activators of transcription-3 up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression and decreases invasiveness of breast cancer. *Am J Pathol* 2006, 169, 633-642.
44. DiMartino J.F., Lacayo N.J., Varadi M., Li L., Saraiya C., Ravindranath Y., Yu R., Sikic B.I., Raimondi S.C., Dahl G.V.: Low or absent SPARC expression in acute myeloid leukemia with MLL rearrangements is associated with sensitivity to growth inhibition by exogenous SPARC protein. *Leukemia* 2006, 20, 426-432.
45. Dong-Xing C., Li Z.J., Jiang X.O., Lum Y.L., Khin E., Lee N.P., Wu G.H., Luk J.M.: Osteopontin as potential biomarker and therapeutic target in gastric and liver cancers *World J Gastroenterol* 2012, 18, 3923-3930.
46. Douraghi M., Talebkhan Y., Zeraati H., Ebrahimzadeh F., Nahvijoo A., Morakabati A., Ghafarpour M., Esmaili M., Bababeik M., Oghalaie A., Rakhshani N., Hosseini M.E., Mohagheghi M.A., Mohammadi M. 2009. Multiple gene status in *Helicobacter pylori* strains and risk of gastric cancer development. *Digestion*; 80:200-207.
47. Dragutinovic V., Izrael-Zivkovic L, Radovanovic N.: Relation of matrix metalloproteinase-9 to different stages of tumors in the serum of gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2009, 54, 1203-1207.
48. Drebbler U., Baldus S.E., Nolden B., Grass G., Bollschweiler E., Dienes H.P., Hölscher A.H., Mönig S.P.: The overexpression of c-met as a prognostic indicator for gastric carcinoma compared to p53 and p21 nuclear accumulation. *Oncol Rep* 2008, 19, 1477-1483.
49. Duff S.E., Li C., Jeziorska M., Kumar S., Saunders M.P., Sherlock D., O'Dwyer S.T., Jayson G.C.: Vascular endothelial growth factors C and D and lymphangiogenesis in gastrointestinal tract malignancy. *Br J Cancer* 2003, 89 (3), 426-430.
50. Duluc D., Corvaisier M., Blanchard S., Catala L., Descamps P., Gamelin E., Ponsoda S., Delneste Y., Hebbar M., Jeannin P.: Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *Int. J. Cancer* 2009, 25, 367-373.
51. Duxbury M.S., Whang E.E.: RRM2 induces NF-kappaB-dependent MMP-9 activation and enhances cellular invasiveness. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 354, 190-196.
52. Eagleson K.L., Pimenta A.F., Burns M.M., Fairfull L.D., Cornuet P.K., Zhang L., Levitt P.: Distinct domains of the limbic system-associated membrane protein (LAMP) mediate discrete effects on neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 2003, 24, 725-740.
53. El-Omar E.M., Carrington M., Chow W.H., McColl K.E., Bream J.H., Young H.A., Herrera J., Lissowska J., Yuan C.C., Rothman N., Lanyon G., Martin M., Fraumeni J.F. Jr, Rabkin C.S.: Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. 2000, 404, 398-402.

54. El-Tanani M.K. Role of osteopontin in cellular signaling and metastatic phenotype. *Front Biosci* 2008, 13, 4276-4284.
55. Emuss V.: *The Molecular Biology of Cancer*. *British Journal of Cancer* 95 2006, 1128.
56. Enarsson K., Lundgren A., Kindlund B., Hermansson M., Roncador G., Banham A.H., Lundin B.S., Quiding-Jarbrink M.: Function and recruitment of mucosal regulatory T cells in human chronic *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. *Clin Immunol* 2006, 121, 358-368.
57. Enroth H., Kraaz W., Engstrand L., Nyren O., Rohan T.: *Helicobacter pylori* strain types and risk of gastric cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2000, 9, 981-985.
58. Fang J.Y., Xiao S.D.: Alteration of DNA methylation in gastrointestinal carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001, 16, 960-968.
59. Feakins R.M., Nickols C.D., Bidd H., Walton S.J.: Abnormal expression of pRb, p16, and cyclin D1 in gastric adenocarcinoma and its lymph node metastases: relationship with pathological features and survival. *Hum Pathol* 2003, 34, 1276-1282.
60. Fujimoto J., Yasui W., Tahara H. Tahara E., Kudo Y., Yokozaki H., Tahara E.: DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of carcinogenesis. *Cancer Lett* 2000, 149, 125-134.
61. Fukuda K., Saikawa Y., Ohashi M., Kumagai K., Kitajima M., Okano H., Matsuzaki Y., Kitagawa Y.: Tumor initiating potential of side population cells in human gastric cancer. *Int. J. Oncol* 2009, 34, 1201-1207.
62. Gologan A., Krasinskas A., Hunt J., Thull D.L., Farkas L., Sepulveda A.R.: Performance of the revised Bethesda guidelines for identification of colorectal carcinomas with a high level of microsatellite instability. *Arch Pathol Lab Med* 2005, 129, 1390-1397.
63. González C.A., Sala N., Capella G.: Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer* 2002, 100, 249-260.
64. Gravalos C., Jimeno A.: HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 2008, 19, 1523-1529.
65. Graziano F., Arduini F., Ruzzo A., Bearzi I., Humar B., More H., Silva R., Muretto P., Guilford P., Testa E., Mari D., Magnani M., Cascinu S.: Prognostic analysis of E-cadherin gene promoter hypermethylation in patients with surgically resected, node-positive, diffuse gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10, 2784-2789.
66. Greenwalt D.E., Lipsky R.H., Ockenhouse C.F., Ikeda H., Tandon N.N., Jamieson G.A.: Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 1992, 80, 1105-1115.
67. Griffiths E.A., Pritchard S.A., Valentine H.R., Whitchelo N., Bishop P.W., Ebert M.P., Price P.M., Welch I.M., West C.M.: Hypoxia-inducible factor-1 α expression in the gastric carcinogenesis sequence and its prognostic role in gastric and gastro-oesophageal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 2007, 96, 95-103.
68. Hanby A.M., Poulson R., Singh S., Elia G., Jeffery R.E., Wright N.A.: Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: distribution of the trefoil

- peptides human spasmodic polypeptide and pS2 in the stomach. *Gastroenterology* 1993, 105, 1110-1116.
69. Haraguchi N., Utsunomiya T., Inoue H., Tanaka F., Mimori K., Barnard G.F., Mori M.: Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* 2006, 24, 506-513.
 70. Hasegawa S., Furukawa Y., Li M., Satoh S., Kato T., Watanabe T., Katagiri T., Tsunoda T., Yamaoka Y., Nakamura Y.: Genome-Wide Analysis of Gene Expression in Intestinal-Type Gastric Cancers Using a Complementary DNA Microarray Representing 23,040 Genes. *Cancer Res* 2002, 62, 7012-7017.
 71. Henning G., Kraft M.S., Derfuss T., Pirzer R., de Saint-Basile G., Aversa G., Fleckenstein B., Meinel E.: Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) regulates T cellular cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2001, 31, 2741-2750.
 72. Hewitt R.E., Powe D.G., Carter G.I., Turner D.R., Price J.E.: Basement membrane collagen-IV synthesis in colorectal tumors. *Int J Cancer* 1992, 51, 530-536.
 73. Hippo Y., Taniguchi H., Tsutsumi S., Machida N., Chong J.M., Fukayama M., Kodama T., Aburatani H.: Global Gene Expression Analysis of Gastric Cancer by Oligonucleotide Microarrays. *Cancer Res* 2002, 62, 233-240.
 74. Hiyama T., Tanaka S., Yoshihara M., Sasao S., Kose K., Shima H., Tuncel H., Ueno Y., Ito M., Kitadai Y., Yasui W., Haruma K., Chayama K.: Chromosomal and microsatellite instability in sporadic gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2004, 19, 756-760.
 75. Horie K., Tsuchihara M., Nakatsura T.: Silencing of secreted protein acidic and rich in cysteine inhibits the growth of human melanoma cells with G arrest induction. *Cancer Sci* 2009, 101, 913-919.
 76. Hsu P.I., Hsieh H.L., Lee J., Lin L.F., Chen H.C., Lu P.J., Hsiao M.: Loss of RUNX3 expression correlates with differentiation, nodal metastasis, and poor prognosis of gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2009, 16, 1686-1694.
 77. Hu J., Fan H., Liu D., Zhang S., Zhang F., Xy H.: DNMT3B promoter polymorphism and risk of gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2010, 55, 1011-1016.
 78. Iacopetta B.J., Soong R., House A.K., Hamelin R.: Gastric carcinomas with microsatellite instability: clinical features and mutations to the TGF-beta type II receptor, IGFII receptor, and BAX genes. *J Pathol* 1999, 187, 428-432.
 79. Ii M., Yamamoto H., Taniguchi H., Adachi Y., Nakazawa M., Ohashi H., Tanuma T., Sukawa Y., Suzuki H., Sasaki S., Imai K., Shinomura Y.: Co-expression of laminin β 3 and γ 2 chains and epigenetic inactivation of laminin α 3 chain in gastric cancer. *Int J Oncol.* 2011, Sep, 39 (3), 593-599.
 80. Innocenti F., Undevia S.D., Iyer L., Chen P.X., Das S., Kocherginsky M., Karrison T., Janisch L., Ramírez J., Rudin C.M., Vokes E.E., Ratain M.J.: Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J. Clin. Oncol* 2004, 22, 1382-1388.
 81. Jang T.J.: The number of Foxp3-positive regulatory T cells is increased in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *Pathol Res Pract* 2010, 15, 34-38.

82. Jee C.D., Kim M.A., Jung E.J., Kim J., Kim W.H.: Identification of genes epigenetically silenced by CpG methylation in human gastric carcinoma. *Eur J Cancer* 2009, 45, 1282-1293.
83. Jiménez B., Volpert O.V., Crawford S.E., Febbraio M., Silverstein R.L., Bouck N.: Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 2000, 6, 41-48.
84. Jordan C.T., Guzman M.L., Noble M.: Cancer stem cells. *N. Engl. J. Med* 2006, 355, 1253-1261.
85. Ju B.G., Lunyak V.V., Perissi V., Garcia-Bassets I., Rose D.W., Glass C.K., Rosenfeld M.G.: A topoisomeraseIIa-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* 2006, 312, 1798-1802.
86. Ju H., Lim B., Kim M., Noh S.M., Kim W.H., Ihm C., Choi B.Y., Kim Y.S., Kang C.: SERPINE1 intron polymorphisms affecting gene expression are associated with diffuse-type gastric cancer susceptibility. *Cancer* 2010, 116, 4248-4255.
87. Junnila S., Kokkola A., Mizuguchi T., Hirata K., Karjalainen-Lindsberg M.L., Puolakkainen P., Monni O.: Gene expression analysis identifies overexpression of CXCL1, SPARC, SPP1, and SULF1 in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2010, 49, 28-39.
88. Kandulski A., Wex T., Kuester D., Peitz U., Gebert I., Roessner A., Malfertheiner P.: Naturally occurring regulatory T cells (CD4+, CD25high, FOXP3+) in the antrum and cardia are associated with higher *H. pylori* colonization and increased gene expression of TGF-beta1. *Helicobacter* 2008, 13, 295-303.
89. Kang H.C., Kim I.J., Park J.H., Shin Y., Ku J.L., Jung M.S., Yoo B.C., Kim H.K., Park J.G.: Identification of Genes with Differential Expression in Acquired Drug-Resistant Gastric Cancer Cells Using High-Density Oligonucleotide Microarrays. *Clin Cancer Res* 2004, 10, 272-284.
90. Kawamura T., Kusakabe T., Sugino T., Watanabe K., Fukuda T., Nashimoto A., Honma K., Suzuki T.: Expression of Glucose Transporter-1 in Human Gastric Carcinoma Association with Tumor Aggressiveness, Metastasis, and Patient Survival. *Cancer* 2001, 92, 634-641.
91. Khanna A., Böckelman C., Hemmes A., Junttila M.R., Wiksten J.P., Lundin M., Junnila S., Murphy D.J., Evan G.I., Haglund C., Westermarck J., Ristimäki A.: MYC-dependent regulation and prognostic role of CIP2A in gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009, 101, 793-805.
92. Khokhlatchev A.V., Canagarajah B., Wilsbacher J., Robinson M., Atkinson M., Goldsmith E., Cobb M.H.: Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 1998, 93, 605-615.
93. Kim H., Eun J.W., Lee H., Nam S.W., Rhee H., Koh K.H., Kim H.: Gene expression changes in patient-matched gastric normal mucosa, adenomas, and carcinomas. *Exp Mol Pathol* 2011, 90, 201-209.
94. Kim K.R., Oh S.Y., Park U.C., Wang J.H., Lee J.D., Kweon H.J., Kim S.Y., Park S.H., Choi D.K., Kim C.G., Choi S.H.: Gene expression profiling using oligonucleotide microarray in atrophic gastritis and intestinal metaplasia. *Korean J Gastroenterol* 2007, 49, 209-224.

95. Kim M.S., Kim S.S., Ahn C.H., Yoo N.J., Lee S.H.: Frameshift mutations of Wnt pathway genes AXIN2 and TCF7L2 in gastric carcinomas with high microsatellite instability. *Hum Pathol* 2009, 40, 58-64.
96. Kim S.Y., Kim J.H., Lee H.S., Noh S.M., Song K.S., Cho J.S., Jeong H.Y., Kim W.H., Yeom Y.I., Kim N.S., Kim S., Yoo H.S., Kim Y.S.: Meta- and gene set analysis of stomach cancer gene expression data. *Mol Cells* 2007, 24, 200-209.
97. Kinoshita J., Fushida S., Harada S., Yagi Y., Fujita H., Kinami S., Ninomiya I., Fujimura T., Kayahara M., Yashiro M., Hirakawa K., Ohta T.: Local angiotensin II-generation in human gastric cancer: Correlation with tumor progression through the activation of ERK1/2, NF- κ B and surviving. *Int J of Oncol* 2009, 34, 1573-1582.
98. Kiyose S., Nagura K., Tao H., Igarashi H., Yamada H., Goto M., Maeda M., Kurabe N., Suzuki M., Tsuboi M., Kahyo T., Shinmura K., Hattori N., Sugimura H.: Detection of kinase amplifications in gastric cancer archives using fluorescence in situ hybridization. *Pathology International* 2012, 62, 477-484.
99. Klenotic P.A., Huang P., Palomo J., Kaur B., Van Meir E.G., Vogelbaum M.A., Febbraio M., Gladson C.L., Silverstein R.L.: Histidine-rich glycoprotein modulates the anti-angiogenic effects of vasculostatin. *Am J Pathol* 2010, 176, 2039-2050.
100. Klewer S.E., Krob S.L., Kolker S.J., Kitten G.T.: Expression of type VI collagen in the developing mouse heart. *Dev. Dyn* 1998, 211, 248-255.
101. Kodolja V., Muller C., Politz O., Hakij N., Orfanos C.E., Goerdts S.: Alternative macrophage activation associated C-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 α with a Th2-associated expression pattern. *J. Immunol* 1998, 160, 1411-1418.
102. Koder Y., Isobe K., Yamauchi M., Kondoh K., Kimura N., Akiyama S., Itoh K., Nakashima I., Takagi H.: Expression of nm23 H-1 RNA levels in human gastric cancer tissues. A negative correlation with nodal metastasis. *Cancer* 1994, 73, 259-265.
103. Kondo T., Oue N., Yoshida K., Mitani Y., Naka K., Nakayama H., Yasui W.: Expression of *POT1* is Associated with Tumor Stage and Telomere Length in Gastric Carcinoma Cancer. *Research* 2004, 4, 523-529.
104. Korenaga D., Orita H., Maekawa S., Itasaka H., Ikeda T., Sugimachi K.: Peritoneal collagen type IV concentration in adenocarcinoma of the gastrointestinal tract and its relationship to histological differentiation, metastasis, and survival. *Surg Today* 1998, 28, 780-786.
105. Korpál M., Lee E.S., Hu G., Kang Y.: The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J. Biol. Chem* 2008, 283, 14910-14914.
106. Koshikawa N., Moriyama K., Takamura H., Mizushima H., Nagashima Y., Yanoma S., Miyazaki K.: Overexpression of Laminin γ 2 Chain Monomer in Invading Gastric Carcinoma Cells. *Cancer Res* 1999, 59, 5596-5601.
107. Koskensalo S., Mrena J., Wiksten J.P., Nordling S., Kokkola A., Hagstrom J., et al.: MMP-7 overexpression is an independent prognostic marker in gastric cancer. *Tumor Biol* 2010, 31, 149-155.

108. Kouraklis G., Katsoulis I.E., Theocharis S., Tsourouflis G., Xipolitas N., Glinavou A., Sioka C., Kostakis A.: Does the expression of cyclin E, pRb, and p21 correlate with prognosis in gastric adenocarcinoma? *Dig Dis Sci* 2009, 54, 1015-1020.
109. Ksiaa F., Ziadi S., Amara K., Korbi S., Trimeche M.: Biological significance of promoter hypermethylation of tumor-related genes in patients with gastric carcinoma. *Clin Chim Acta* 2009, 404, 128-133.
110. Kuzuhara T., Suganuma M., Kurusu M., Fujiki H.: Helicobacter pylori-secreting protein Tipalpha is a potent inducer of chemokine gene expressions in stomach cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007, 133, 287-296.
111. Kwon O.H., Park J.L., Kim M., Kim J.H., Lee H.C., Kim H.J., Noh S.M., Song K.S., Yoo H.S., Paik S.G., Kim S.Y., Kim Y.S.: Aberrant up-regulation of LAMB3 and LAMC2 by promoter demethylation in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 406, 539-545.
112. Lambert E., Dasse E., Haye B., Petitfrere E.: TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004, 49, 187-198.
113. LaRochelle W.J., Jeffers M., McDonald W.F., Chillakuru R.A., Giese N.A., Lokker N.A., Sullivan C., Boldog F.L., Yang M., Vernet C., Burgess C.E., Fernandes E., Deegler L. L., Rittman B., Shimkets J., Shimkets R.A., Rothberg J.M., Lichenstein H.S.: PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nature Cell Biol.* 2001, 3, 517-521.
114. Lawler J.: The functions of thrombospondin-1 and -2. *Curr Opin Cell Biol* 2000, 12, 634-640.
115. Lee H.K., Lee H.S., Yang H.K., Kim W.H., Lee K.U., Choe K.J., Kim J.P.: Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in gastric cancer. *Int J Colorectal Dis* 2003, 18, 518-525.
116. Lee J.L., Wang M.J., Sudhir P.R., Chen G.D., Chi C.W., Chen J.Y.: Osteopontin promotes integrin activation through outside-in and inside-out mechanisms: OPN-CD44V interaction enhances survival in gastrointestinal cancer cells. *Cancer Res* 2007, 67, 2089-2097.
117. Li L., Neaves W.B.: Normal stem cells and cancer stem cells; the niche matters. *Cancer Res* 2006, 66, 4553-4557.
118. Li T.K., Liu L.F.: Tumor cell death induced by topoisomerase-target drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001, 41, 53-77.
119. Liang Z., Zeng X., Gao J., Wu S., Wang P., Shi X., Zhang J., Liu T.: Analysis of EGFR, HER2, and TOP2A gene status and chromosomal polysomy in gastric adenocarcinoma from Chinese patients. *BMC Cancer* 2008, 8, 363.
120. Liotta L.A.: Tumor invasion and metastases – role of the extracellular matrix. *Cancer Res* 1986; 46:1-7.
121. Liu L., Zhang H., Sun L., Gao Y., Jin H., Liang S., Wang Y., Dong M., Shi Y., Li Z., Fan D.: ERK/MAPK activation involves hypoxia-induced MGr1-Ag/ 37LRP expression and contributes to apoptosis resistance in gastric cancer. *Int. J. Cancer* 2010, 127, 820-829.
122. Lo Nigro C., Monteverde M., Riba M., Lattanzio L., Tonissi F., Garrone O., Heouaine A., Gallo F., Ceppi M., Borghi F., Comino A., Merlano M.: Expression profiling and long lasting responses to chemotherapy in metastatic gastric cancer. *Int J Oncol* 2010, 37, 1219-1228.

123. Loh J.T., Torres V.J., Cover T.L.: Regulation of *Helicobacter pylori* cagA expression in response to salt. *Cancer Res* 2007, 67, 4709-4715.
124. Lowy A.M., Clements W.M., Bishop J., Kong L., Bonney T., Sisco K., Arow B., Fenoglio-Preiser C., Groden J.: β -Catenin/Wnt Signaling Regulates Expression of the Membrane Type 3 Matrix Metalloproteinase in Gastric Cancer. *Cancer Res* 2006, 66, 4734-4741.
125. Lü M.H., Deng J.Q., Cao Y.L., Fang D.C., Zhang Y., Yang S.M.: Prognostic role of telomerase activity in gastric adenocarcinoma: A meta-analysis. *Exp Ther Med* 2012, 3 (4), 728-734.
126. Mahajan K., Coppola D., Chen Y.A., Zhu W., Lawrence H.R., Lawrence N.J., Mahajan N.P.: Ack1 Tyrosine Kinase Activation Correlates with Pancreatic Cancer Progression. *Am J Pathol* 2012, 180, 1386-1393.
127. Mahajan N.P., Whang Y.E., Mohler J.L., Earp H.S.: Activated Tyrosine Kinase Ack1 Promotes Prostate Tumorigenesis: Role of Ack1 in Polyubiquitination of Tumor Suppressor Wwox. *Cancer Res* 2005, 65, 10514-10523.
128. Makareeva E., Mertz E.L., Kuznetsova N.V., Sutter M.B., DeRidder A.M., Cabral W.A., Barnes A.M., McBride D.J., Marini J.C., Leikin S.: Structural heterogeneity of type I collagen triple helix and its role in osteogenesis imperfecta. *J. Biol. Chem* 2008, 283, 4787-4798.
129. Manente L., Perna A., Buommino E., Altucci L., Lucariello A., Citro G., Baldi A., Iaquinto G., Tufano M.A., De L.A.: The *Helicobacter pylori*'s protein VacA has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells. *J Cell Physiol* 2008, 214, 582-587.
130. Manser E., Leung T., Salihuddin H., Tan L., Lim L.: A non-receptor tyrosine kinase that inhibits the GTPase activity of p21cdc42. *Nature* 1993, 363, 364-367.
131. Mao W., Chen J., Peng T.L., Yin X.F., Chen L.Z., Chen M.H.: Role of trefoil factor 1 in gastric cancer and relationship between trefoil factor 1 and gastrokine 1. *Oncol Rep* 2012, 28, 1257-1262.
132. Marasa L., Marasa S., Sciancalepore G.: Collagen IV, laminin, fibronectin, vitronectin. Comparative study in basal cell carcinoma. Correlation between basement membrane molecules expression and invasive potential. *G Ital Dermatol Venereol* 2008, 143, 169-173.
133. Marinkovich M.P.: Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat. Rev. Cancer* 2007, 7, 370-380.
134. Matsumura S., Oue N., Nakayama H., Kitadai Y., Yoshida K., Yamaguchi Y., Imai K., Nakachi K., Matsusaki K., Chayama K., Yasui W.: A single nucleotide polymorphism of the MMP9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol* 2005, 131:19-25.
135. Matthews F.J., Cook S.D., Majid M.A., Dick A.D., Smith V.A.: Changes in the balance of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)-1 and -3 may promote keratocyte apoptosis in keratoconus. *Exp. Eye Dis* 2007, 84, 1125-1134.
136. McDonald S.A., Greaves L.C., Gutierrez-Gonzalez L., Rodriguez-Justo M., Deheragoda M., Leedham S.J., Taylor R.W., Lee C.Y., Preston S.L., Lovell M., Hunt T., Elia G., Oukrif D., Harrison R., Novelli M.R., Mitchell I., Stoker D.L., Turnbull D.M., Jankowski J.A., Wright N.A.: Mechanisms of field

- cancerization in the human stomach: the expansion and spread of mutated gastric stem cells. *Gastroenterology* 2008, 134, 500-510.
137. Meireles S.I., Cristo E.B., Carvalho A.F., Hirata R. Jr, Pelosof A., Gomes L.I., Martins W.K., Begnami M.D., Zitron C., Montagnini A.L., Soares F.A., Neves E.J., Reis L.F.: Molecular Classifiers for Gastric Cancer and Nonmalignant Diseases of the Gastric Mucosa. *Cancer Res* 2004, 64, 1255-1265.
138. Milne A.N., Carneiro F., O'Morain C., Offerhaus G.J.: Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. *Hum Genet* 2009, 126, 615-628.
139. Misawa K., Kanazawa T., Misawa Y., Imai A., Endo S., Hakamada K., Mineta H.: Hypermethylation of collagen $\alpha 2$ (I) gene (COL1A2) is an independent predictor of survival in head and neck cancer. *Cancer Biomarkers* 2012, 10, 135-144.
140. Mitani Y., Oue N., Hamai Y., Aung P.P., Matsumura S. Nakayama H., Kamata N., Yasui W.: Histone H3 acetylation is associated with reduced p21WAF1/CIP1 expression in gastric carcinoma. *J Pathol* 2005, 205, 65-73.
141. Mitani Y., Oue N., Matsumura S., Yoshida K., Noguchi T., Ito M., Tanaka S., Kuniyasu H., Kamata N., Yasui W.: Reg IV is a serum biomarker for gastric cancer patients and predicts response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Oncogene* 2007, 26, 4383-4393.
142. Mori K., Enokida H., Kagara I., Kawakami K., Chiyomaru T., Tatarano S., Kawahara K., Nishiyama K., Seki N., Nakagawa M.: CpG hypermethylation of collagen type I alpha 2 contributes to proliferation and migration activity of human bladder cancer. *Int J Oncol* 2009, 34, 1593-1602.
143. Morikawa T., Hino R., Uozaki H., Maeda D., Ushiku T., Shinozaki A., Sakatani T., Fukayama M.: Expression of ribonucleotide reductase M2 subunit in gastric cancer and effects of RRM2 inhibition in vitro. *Hum Pathol* 2010, 41, 1742-1748.
144. Murakami T.: Early cancer of the stomach. *World J Surg.* 1979, 3, 685-692.
145. Muro A.F., Chauhan A.K., Gajovic S., Iaconcig A., Porro F., Stanta G., Baralle F.E.: Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *J. Cell. Biol* 2003, 162, 149-160.
146. Myllykangas S., Junnila S., Kokkola A., Autio R., Scheinin I., Kiviluoto T., Karjalainen-Lindsberg M.L., Hollmén J., Knuutila S., Puolakkainen P., Monni O.: Integrated gene copy number and expression microarray analysis of gastric cancer highlights potential target genes. *Int J Cancer* 2008, 123, 817-825.
147. Naito M., Yamazaki T., Tsutsumi R., Higashi H., Onoe K., Yamazaki S., Azuma T., Hatakeyama M.: Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology* 2006, 130, 1181-1190.
148. Nakamura M., Oida Y., Abe Y., Yamazaki H., Mukai M., Matsuyama M., Chijiwa T., Matsumoto H., Ueyama Y.: Thrombospondin-2 inhibits tumor cell invasion through the modulation of MMP-9 and uPA in pancreatic cancer cells. *Mol Med Report* 2008, 1, 423-427.
149. Nakayama H., Kitayama J., Muto T., Nagawa H.: Characterization of intracellular cytokine profile of CD4(+) T cells in peripheral blood and tu-

- mordraining lymph nodes of patients with gastrointestinal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2000, 30, 301-305.
150. Nesi G., Bruno L., Saieva C., Caldini A., Girardi L.R., Zanna I., Rapi S., Bechi P., Cortesini C., Palli D.: DNA ploidy and S-phase fraction as prognostic factors in surgically resected gastric carcinoma: a 7-year prospective study. *Anticancer Res* 2007, 27, 4435-4441.
151. Nesi G., Palli D., Pernice L.M., Saieva C., Paglierani M., Kroning K.C., Catarzi S., Rubio C.A., Amorosi A.: Expression of nm23 gene in gastric cancer is associated with a poor 5-year survival. *Anticancer Res* 2001, 21, 3643-3649.
152. Newsholme E.A., Board M.: Application of metabolic-control logic to fuel utilization and its significance in tumor cells. *Adv Enzym Regul* 1991, 31, 225-246.
153. Niimi T., Nagashima K., Ward J.M., Mino P., Zimonjic D.B., Popescu N.C., Kimura S.: claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. *Mol. Cell. Biol* 2001, 21, 7380-7390.
154. Nishii T., Yashiro M., Shinto O., Sawada T., Ohira M., Hirakawa K.: Cancer stem cell-like SP cells have a high adhesion ability to the peritoneum in gastric carcinoma. *Cancer Sci* 2009, 100, 1397-1402.
155. Nobili S., Bruno L., Landini I., Napoli C., Bechi P., Tonelli F., Rubio C.A., Mini E., Nesi G.: Genomic and genetic alterations influence the progression of gastric cancer *World J Gastroenterol* 2011, 17 (3), 290-299.
156. Nozaki S., Kashiwagi H., Yamashita S., Nakagawa T., Kostner B., Tomiyama Y., Nakata A., Ishigami M., Miyagawa J., Kameda-Takemura K., Kurata Y., Matsuzawa Y.: Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J Clin Invest* 1995, 96, 1859-1865.
157. Ohno T., Aihara R., Kamiyama Y., Mochiki E., Asao T., Kuwano H.: Prognostic significance of combined expression of MUC1 and adhesion molecules in advanced gastric cancer. *Eur J Cancer* 2006, 42, 256-263.
158. Oka T., Yamamoto H., Sasaki S., Ii M., Hizaki K., Taniguchi H., Adachi Y., Imai K., Shinomura Y.: Overexpression of beta3/gamma2 chains of laminin-5 and MMP7 in biliary cancer. *World J. Gastroenterol* 2009, 15, 3865-3873.
159. Oue N., Hamai Y., Mitani Y., Matsumura S., Oshimo Y., Aung P.P., Kuraoka K., Nakayama H., Yasui W.: Gene Expression Profile of Gastric Carcinoma: Identification of Genes and Tags Potentially Involved in Invasion, Metastasis, and Carcinogenesis by Serial Analysis of Gene Expression. *Cancer Res* 2004, 64, 2397-2405.
160. Oue N., Mitani Y., Motoshita J., Matsumura S., Yoshida K., Kuniyasu H., Nakayama H., Yasui W.: Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. *Cancer* 2006, 106, 1250-1259.
161. Panani A.D.: Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications. *Cancer Lett* 2008, 266, 99-115.
162. Parker N.J., Begley C.G., Fox R.M.: Human R1 subunit of ribonucleotide reductase (RRM1): 5-prime flanking region of the gene. *Genomics* 1994, 19, 91-96.

163. Perou Ch.M.: Molecular portraits of human breast cancer. *Nature*. 2000, 406, 747-752.
164. Perrone G., Ruffini P.A., Catalano V., Spino C., Santini D., Mureto P., Spoto C., Zingaretti C., Sisti V., Alessandrini P., Giordani P., Cicetti A., D'Emidio S., Morini S., Ruzzo A., Magnani M., Tonini G., Rabitti C., Graziano F.: Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur J Cancer* 2008, 44, 1875-1882.
165. Persson C., Canedo P., Machado J.C., El-Omar E.M., Forman D.: Polymorphisms in inflammatory response genes and their association with gastric cancer: a HuGE systematic review and meta-analyses. *Am J Epidemiol* 2011, 173, 259-270.
166. Petrocca F., Visone R., Onelli M.R., Shah M.H., Nicoloso M.S., de Martino I., Iliopoulos D., Pilozi E., Liu C.G., Negrini M., Cavazzini L., Volinia S., Alder H., Rucio L.P., Baldassarre G., Croce C.M., Vecchione A.: E2F1-regulated microRNAs impair TGF-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 2008, 13, 272-286.
167. Piccoli R., Di Gaetano S., De Lorenzo C., Grauso M., Monaco C., Spalletti-Cernia D., Laccetti P., Cinátl J., Matousek J., D'Alessio G.: A dimeric mutant of human pancreatic ribonuclease with selective cytotoxicity toward malignant cells. *Proc. Nat. Acad. Sci* 1999, 96, 7768-7773.
168. Ponticos M., Abraham D., Alexakis C., Lu Q.L., Black C., Partridge T., Bou-Gharios G.: Col1a2 enhancer regulates collagen activity during development and in adult tissue repair. *Matrix Biol* 2004, 22, 619-628.
169. Prieto-Echagüe V., Gucwa A., Craddock B.P., Brown D.A., Miller W.T.: Cancer-associated Mutations Activate the Nonreceptor Tyrosine Kinase Ack1. *The J of Biol Chem* 2010, 285, 10605-10615.
170. Rad R., Gerhard M., Lang R., Schoniger M., Rosch T., Schepp W., Becker I., Wagner H., Prinz C.: The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol* 2002, 168, 3033-3041.
171. Rajkumar T., Vijayalakshmi N., Gopal G., Sabitha K., Shirley S., Raja U.M., Ramakrishnan S.A.: Identification and validation of genes involved in gastric tumorigenesis. *Cancer Cell Int* 2010, 10, 45.
172. Reed J.E., Dunn J.R., du Plessis D.G., Shaw E.J., Reeves P., Gee A.L., Warnke P.C., Sellar G.C., Moss D.J., Walker C.: Expression of cellular adhesion molecule 'OPCML' is down-regulated in gliomas and other brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007, 33, 77-85.
173. Rege T.A., Stewart J. Jr, Dranka B., Benveniste E.N., Silverstein R.L., Gladson C.L.: Thrombospondin-1-induced apoptosis of brain microvascular endothelial cells can be mediated by TNF-R1. *J Cell Physiol* 2009, 218, 94-103.
174. Reinholt F.P., Hultenby K., Oldberg A., Heinegård D.: Osteopontin – a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc. Nat. Acad. Sci* 1990, 87, 4473-4475.
175. Resende C., Thiel A., Machado J.C., Ristimäki A.: Gastric Cancer: Basic Aspects. *Helicobacter* 2011, 16 (Suppl. 1), 38-44.

176. Rintoul R.C., Sethi T.: The role of extracellular matrix in small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2001, 2, 437-442.
177. Ruan H.L., Hong R.T., Xie H.J., Hu N.Z., Xu J.M., Zhang W.: Significance of Elevated Levels of Collagen Type IV and Hyaluronic Acid in Gastric Juice and Serum in Gastric Cancer and Precancerous Lesion. *Dig Dis Sci* 2011, 56, 2001-2008.
178. Rugge M., Shiao Y.H., Busatto G., Cassaro M., Strobbe C., Russo V.M., Leo G., Parenti A.R., Scapinello A., Arslan P., Egarter-Vigl E.: The p53 gene in patients under the age of 40 with gastric cancer: mutation rates are low but are associated with a cardiac location. *Mol Pathol* 2000, 53, 207-210.
179. Saadat I., Higashi H., Obuse C., Umeda M., Murata-Kamiya N., Saito Y., Lu H., Ohnishi N., Azuma T., Suzuki A., Ohno S., Hatakeyama M.: Helicobacter pylori CagA targets PAR1/ MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* 2007, 447, 330-333.
180. Saeki N., Saito A., Choi I.J., Matsuo K., Ohnami S., Totsuka H., Chiku S., Kuchiba A., Lee Y.S., Yoon K.A., Kook M.C., Park S.R., Kim Y.W., Tanaka H., Tajima K., Hirose H., Tanioka F., Matsuno Y., Sugimura H., Kato S., Nakamura T., Nishina T., Yasui W., Aoyagi K., Sasaki H., Yanagihara K., Katai H., Shimoda T., Yoshida T., Nakamura Y., Hirohashi S., Sakamoto H.: A functional single nucleotide polymorphism in mucin 1, at chromosome 1q22, determines susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Gastroenterology* 2011, 140, 892-902.
181. Sanada Y., Oue N., Mitani Y., Yoshida K., Nakayama H., Yasui W.: Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype. *J. Pathol* 2006, 208, 633-642.
182. Sánchez-Pérez I., García Alonso P., Belda Iniesta C.: Clinical impact of aneuploidy on gastric cancer patients. *Clin Transl Oncol* 2009, 11, 493-498.
183. Sanz-Ortega J., Steinberg S.M., Moro E., Saez M., Lopez J.A., Sierra E., Sanz-Espouza J., Merino M.J.: Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-ErbB2, c-myc and EGFR as prognostic factors in gastric cancer. *Histol Histopathol* 2000, 15, 455-462.
184. Savill J., Hogg N., Ren Y., Haslett C.: Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J. Clin. Invest* 1992, 90, 1513-1522.
185. Saviozzi S., Cordero F., Lo Iacono M., Novello S., Scagliotti G.V., Calogero R.A.: Selection of suitable reference genes for accurate normalization of gene expression profile studies in non-small cell lung cancer. *BMC Cance* 2006, 6, 200.
186. Schepers G.E., Teasdale R.D., Koopman P.: Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev. Cell* 2002, 3, 167-170.
187. Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., Ragg T.: The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 2006, 7, 3.

188. Scott G.K., Mattie M.D., Berger C.E., Benz S.C., Benz C.C.: Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition, *Cancer Res* 2006, 66, 1277-1281.
189. Semba K., Yamanashi Y., Nishizawa M., Sukegawa J., Yoshida M., Sasaki M., Yamamoto T., Toyoshima K.: Location of the c-yes gene on the human chromosome and its expression in various tissues. *Science* 1985, 227, 1038-1040.
190. Seo Y.H., Joo Y.E., Choi S.K., Rew J.S., Park C.S., Kim S.J.: Prognostic significance of p21 and p53 expression in gastric cancer. *Korean J Intern Med* 2003, 18, 98-103.
191. Sethi T., Rintoul R.C., Moore S.M., MacKinnon A.C., Salter D., Choo C., Chilvers E.R., Dransfield I., Donnelly S.C., Strieter R., Haslett C.: Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med* 1999, 5, 662-668.
192. Shark K.B., Lee N.M.: Cloning, sequencing and localization to chromosome 11 of a cDNA encoding a human opioid-binding cell adhesion molecule (OBCAM). *Gene* 1995, 155, 213-217.
193. Sherman-Baust C.A., Weeraratna A.T., Rangel L.B., Pizer E.S., Cho K.R., Schwartz D.R., Shock T., Morin P.J.: Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* 2001, 3, 377-386.
194. Shi Q., Bao S., Maxwell J.A., Reese E.D., Friedman H.S., Bigner D.D., Wang X.F., Rich J.N.: Secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC), mediates cellular survival of gliomas through AKT activation. *J Biol Chem* 2004, 279, 52200-52209.
195. Shi Q., Bao S., Song L., Wu Q., Bigner D.D., Hjelmeland A.B., Rich J.N.: Targeting SPARC expression decreases glioma cellular survival and invasion associated with reduced activities of FAK and ILK kinases. *Oncogene* 2007, 26, 4084-4094.
196. Simpson A.J., Caballero O.L., Pena S.D.: Microsatellite instability as a tool for the classification of gastric cancer. *Trends Mol Med* 2001, 7, 76-80.
197. Sng J.H., Heaton V.J., Bell M., Maini P., Austin C.A., Fisher L.M.: Molecular cloning and characterization of the human topoisomerase IIalpha and IIbeta genes: evidence for isoform evolution through gene duplication. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1444, 395-406.
198. Soikkeli J., Podlasz P., Yin M., Nummela P., Jahkola T., Virolainen S., Krogerus L., Heikkilä P., von Smitten K., Saksela O., Hölttä E.: Metastatic Outgrowth Encompasses COL-1, FN1, and POSTN Up-Regulation and Assembly to Fibrillar Networks Regulating Cell Adhesion, Migration, and Growth. *Am J Pathol* 2010, 177, 387-403.
199. Sorlie Th.: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*. 2001, 98 (19), 10869-10874.
200. Souglakos J., Boukovinas I., Taron M., Mendez P., Mavroudis D., Tripaki M., Hatzidaki D., Koutsopoulos A., Stathopoulos E., Georgoulas V., Rosell R.: Ribonucleotide reductase subunits M1 and M2 mRNA expression levels and clinical outcome of lung adenocarcinoma patients treated with docetaxel/gemcitabine. *Br J Cancer* 2008, 98, 1710-1715.

201. Soutto M., Belkhir A., Piazuelo M.B., Schneider B.G., Peng D., Jiang A., Washington M.K., Kokoye Y., Crowe S.E., Zaika A., Correa P., Peek R.M. Jr, El-Rifai W.: Loss of TFF1 is associated with activation of NF- κ B-mediated inflammation and gastric neoplasia in mice and humans. *J Clin Invest* 2011, 121 (5), 1753-1767.
202. Stearns M.E., Rhim J., Wang M.: Interleukin 10 (IL-10) inhibition of primary human prostate cell-induced angiogenesis: IL-10 stimulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP)-2/MMP-9 secretion. *Clin Cancer Res* 1999, 5, 189-196.
203. Stock M., Otto F.: Gene deregulation in gastric cancer. *Gene* 2005, 360, 1-19.
204. Streit M., Riccardi L., Velasco P., Brown L.F., Hawighorst T., Bornstein P., Detmar M.: Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, 96, 14888-14893.
205. Study Group of Millennium Genome Project for Cancer, Sakamoto H., Yoshimura K., Saeki N., Katai H., Shimoda T., Matsuno Y., Saito D., Sugimura H., Tanioka F., Kato S., Matsukura N., Matsuda N., Nakamura T., Hyodo I., Nishina T., Yasui W., Hirose H., Hayashi M., Toshiro E., Ohnami S., Sekine A., Sato Y., Totsuka H., Ando M., Takemura R., Takahashi Y., Ohdaira M., Aoki K., Honmyo I., Chiku S., Aoyagi K., Sasaki H., Ohnami S., Yanagihara K., Yoon K.A., Kook M.C., Lee Y.S., Park S.R., Kim C.G., Choi I.J., Yoshida T., Nakamura Y., Hirohashi S.: Genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Nat. Genet* 2008, 40, 730-740.
206. Summy J.M., Gallick G.E.: Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2003, 22, 337-358.
207. Sun B.S., Dong Q.Z., Ye Q.H., Sun H.J., Jia H.L., Zhu X.Q., Liu D.Y., Chen J., Xue Q., Zhou H.J., Ren N., Qin L.X.: Lentiviral-mediated miRNA against osteopontin suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008, 48, 1834-1842.
208. Suzuki T., Matsuo K., Sawaki A., Wakai K., Hirose K., Ito H., Saito T., Nakamura T., Yamao K., Hamajima N., Tajima K.: Influence of smoking and CYP2C19 genotype on *H. pylori* eradication success. *Epidemiol. Infect* 2007, 135, 171-176.
209. Tajima Y., Shimoda T., Nakanishi Y., Yokoyama N., Tanaka T., Shimizu K., Saito T., Kawamura M., Kusano M., Kumagai K.: Gastric and intestinal phenotypic marker expression in gastric carcinomas and its prognostic significance: immunohistochemical analysis of 136 lesions. *Oncology* 2001, 61:212-220.
210. Takaishi S., Okumura T., Tu S., Wang S.S., Shibata W., Vigneshwaran R., Gordon S.A., Shimada Y., Wang T.C.: Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 2009, 27, 1006-1020.
211. Takayasu H., Horie H., Hiyama E., Matsunaga T., Hayashi Y., Watanabe Y., Suita S., Kaneko M., Sasaki F., Hashizume K., Ozaki T., Furuuchi K., Tada M., Ohnuma N., Nakagawara A.: Frequent deletions and mutations of the beta-catenin gene are associated with overexpression of cyclin D1 and fibron-

- ectin and poorly differentiated histology in childhood hepatoblastoma. *Clin Cancer Res* 2001, 7, 901-908.
212. Tang H., Wang J., Bai F., Zhai H., Gao J., Hong L., Xie H., Zhang F., Lan M., Yao W., Liu J., Wu K., Fan D.: Positive correlation of osteopontin, cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in gastric cancer. *Cancer Invest* 2008, 26 (1), 60-67.
213. Tanjore H., Kalluri R.: The role of type IV collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis. *Am J Pathol* 2006, 168, 715-717.
214. Tatematsu M., Tsukamoto T., Mizoshita T.: History of gastric carcinoma research in Japan: basic aspects, in: Kaminishi M., Takubo K., Mafune K., (Eds.): *The Diversity of Gastric Carcinoma*. Springer-Verlag, 2005, s. 3-28.
215. Toyokawa T., Yashiro M., Hirakawa K.: Co-expression of keratinocyte growth factor and K-sam is an independent prognostic factor in gastric carcinoma. *Oncol Rep* 2009, 21, 875-880.
216. Tsou J.A., Galler J.S., Siegmund K.D., Laird P.W., Turla S., Cozen W., Hagen J.A., Koss M.N., Laird-Offringa I.A.: Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma. *Mol Cancer* 2007, 6, 70-82.
217. Tsuchida T., Kijima H., Tokunaga T., Oshika Y., Hatanaka H., Fukushima Y., Abe Y., Kawai K., Yoshida Y., Miura S., Yamazaki H., Tamaoki N., Ueyama Y., Nakamura M.: Expression of the thrombospondin 1 receptor CD36 is correlated with decreased stromal vascularisation in colon cancer. *Int J Oncol* 1999, 14, 47-51.
218. Tsukamoto T., Mizoshita T., Mihara M., Tanaka H., Takenaka Y., Yamamura Y., Nakamura S., Ushijima T., Tatematsu M.: Sox2 expression in human stomach adenocarcinomas with gastric and gastric-and-intestinal-mixed phenotypes. *Histopathology* 2005, 46, 649-658.
219. Tsukamoto Y., Uchida T., Karnan S., Noguchi T., Nguyen L.T., Tanigawa M., Takeuchi I., Matsuura K., Hijiya N., Nakada C., Kishida T., Kawahara K., Ito H., Murakami K., Fujioka T., Seto M., Moriyama M.: Genome-wide analysis of DNA copy number alterations and gene expression in gastric cancer. *J Pathol* 2008, 216, 471-482.
220. Tsukita S., Furuse M., Itoh M.: Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* 2001, 2, 285-293.
221. Ueda T., Volinia S., Okumura H., Shimizu M., Taccioli C., Rossi S., Alder H., Liu C.G., Oue N., Yasui W., Yoshida K., Sasaki H., Nomura S., Seto Y., Kaminishi M., Calin G.A., Croce C.M.: Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 2010, 11, 136-146.
222. Ustach C.V., Taube M.E., Hurst N.J. Jr, Bhagat S., Bonfil R.D., Cher M.L., Schuger L., Kim H.R.: A potential oncogenic activity of platelet-derived growth factor d in prostate cancer progression. *Cancer Res* 2004, 64, 1722-1729.
223. Uzui H., Harpf A., Liu M., Doherty T.M., Shukla A., Chai N.: Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation* 2002, 106, 3024-3030.

224. Vermeulen L., Todaro M., de Sousa Mello F., Sprick M.R., Kemper K., Perez Alea M., Richel D.J., Stassi G., Medema J.P.: Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008, 105, 13427-13432.
225. Vidal O., Metges J.P., Elizalde I., Valentini M., Volant A., Molina R., Castells A., Pera M.: High preoperative serum vascular endothelial growth factor levels predict poor clinical outcome after curative resection of gastric cancer. *Br J Surg* 2009, 96, 1443-1451.
226. Vignali D.A., Collison L.W., Workman C.J.: How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008, 8, 523-532.
227. Volpert O.V., Zaichuk T., Zhou W., Reiher F., Ferguson T.A., Stuart P.M., Amin M., Bouck N.P.: Inducerstimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* 2002, 8, 349-357.
228. Waalkes S., Atschekzei F., Kramer M.W., Hennenlotter J., Vetter G., Becker J.U., Stenzl A., Merseburger A.S., Schrader A.J., Kuczyk M.A., Serth J.: Fibronectin 1 mRNA expression correlates with advanced disease in renal cancer *BMC Cancer* 2010, 10, 503.
229. Wang C.S., Lin K.H., Chen S.L., Chan Y.F., Hsueh S.: Overexpression of SPARC gene in human gastric carcinoma and its clinic-pathologic significance. *Brit J Cancer* 2004, 91, 1924-1930.
230. Wang L., Zhu J.S., Song M.Q., Chen G.Q., Chen J.L.: Comparison of gene expression profiles between primary tumor and metastatic lesions in gastric cancer patients using laser microdissection and cDNA microarray. *World J Gastroenterol* 2006, 12, 6949-6954.
231. Wang S.K., Zhu H.F., He B.S., Zhang Z.Y., Chen Z.T., Wang Z.Z., Wu G.L.: CagA+ H pylori infection is associated with polarization of T helper cell immune responses in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2007, 13, 2923-2931.
232. Wang X.C., Li Y., Fan L.Q., Tan B.B., Li Z., Liu Y., Zhang Z.D.: Integrase interactor 1 regulates proliferation, apoptosis and invasion in gastric cancer cells. *Chinese Medical Journal* 2012.; 125:527-532.
233. Wang Z., Kong D., Banerjee S., Li Y., Adsay N.V., Abbruzzese J., Sarkar F.H.: Downregulation of platelet derived growth factor-D inhibits cell growth and angiogenesis through inactivation of Notch-1 and Nuclear Factor- κ B Signaling. *Cancer Res* 2007, 67, 11377-11385.
234. Warawdekar U.M., Zingde S.M., Iyer K.S., Jagannath P., Mehta A.R., Mehta N.G.: Elevated levels and fragmented nature of cellular fibronectin in the plasma of gastrointestinal and head and neck cancer patients. *Clin Chim Acta* 2006, 372, 83-93.
235. Warnecke-Eberz U., Bollschweiler E., Drebber U., Metzger R., Baldus S.E., Hölscher A.H., Mönig S.: Prognostic Impact of Protein Overexpression of the Proto-oncogene *PIM-1* in Gastric Cancer. *Anticancer Res* 2009, 29, 4451-4456.
236. Wiberg C., Hedbom E., Khairullina A., Lamande S.R., Oldberg A., Timpl R., Morgelin M., Heinegard D.: Biglycan and decorin bind close to the n-terminal region of the collagen VI triple helix. *J Biol Chem.* 2001, 276, 18947-18952.

237. Wiksten J.P., Lundin J., Nordling S., Kokkola A., von Bogusławski K., Haglund C.: The prognostic value of p27 in gastric cancer. *Oncology*. 2002, 63, 180-184.
238. Wilson C.B., Leopard J., Cheresch D.A., Nakamura R.M.: Extracellular matrix and integrin composition of the normal bladder wall. *World J Urol* 1996, 14 (Suppl 1), 30-37.
239. Won H.H., Kim J.W., Kim M.J., Kim S., Park J.H., Lee K.A.: Interleukin 10 polymorphisms differentially influence the risk of gastric cancer in East Asians and Caucasians. *Cytokine* 2010, 51, 73-77.
240. Wu C.Y., Wu M.S., Chiang E.P., Wu C.C., Chen Y.J., Chen C.J., Chi N.H., Chen G.H., Lin J.T.: Elevated plasma osteopontin associated with gastric cancer development, invasion and survival. *Gut* 2007, 56, 782-789.
241. Wu D.M., Zhu H.X., Zhao Q.H., Zhang Z.Z., Wang S.Z., Wang M.L., Gong W.D., Tan M., Zhang Z.D.: Genetic variations in the SMAD4 gene and gastric cancer susceptibility. *World J Gastroenterol* 2010, 16, 5635-6341.
242. Yan B., Yau E.X., Samanta S., Ong C.W., Yong K.J., Ng L.K., Bhattacharya B., Lim K.H., Soong R., Yeoh K.G., Deng N., Tan P., Lam Y., Salto-Tellez M.: Clinical and therapeutic relevance of PIM1 kinase in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2012, 15, 188-197.
243. Yang E.N., Kang H.J., Koh K.H., Rhee H., Kim N.K., Kim H.G.: Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers. *Int J Cancer* 2007, 121, 567-575.
244. Yang S., Shin J., Park K.H., Jeung H.C., Rha S.Y., Noh S.H., Yang W.I., Chung H.C.: Molecular basis of the differences between normal and tumor tissues of gastric cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007, 1772, 1033-1040.
245. Yap Y.L., Zhang X.W., Smith D., Soong R., Hill J.: Molecular gene expression signature patterns for gastric cancer diagnosis. *Comput Biol Chem* 2007, 31, 275-287.
246. Yasui W., Oue N., Ito R., Kuraoka K., Nakayama H.: Search for new biomarkers of gastric cancer through serial analysis of gene expression and its clinical implications. *Cancer Sci*. 2004, 95, 385-392.
247. Yasui W., Oue N., Kitadai Y., Nakayama H.: Recent advances in molecular pathobiology of gastric carcinoma. In: *The diversity of gastric carcinoma*. Eds M. Kaminishi, K. Takubo and K. Mafune. Tokyo: Springer-Verlag, 2005, pp. 51-71.
248. Yasui W., Oue N., Ono S., Mitani Y., Ito R., Nakayama H.: Histone acetylation and gastrointestinal carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2003, 983, 220-231.
249. Yasui W., Oue N., Sentani K., Sakamoto N., Motoshita J.: Transcriptome dissection of gastric cancer: identification of novel diagnostic and therapeutic targets from pathology specimens. *Pathol. Int* 2009, 59, 121-136.
250. Yasui W., Sentani K., Motoshita J., Nakayama H.: Molecular pathobiology of gastric cancer *Scandinavian Journal of Surgery* 2006, 95, 225-231.
251. Yasui W., Sentani K., Sakamoto N., Anami K., Naito Y., Oue N.: Molecular pathology of gastric cancer: Research and practice. *Pathology Pathol Res Pract* 2011, 207, 608-612.

252. Yin J., Chen G., Liu Y., Liu S., Wang P., Wan Y., Wang X., Zhu J., Gao H.: Downregulation of SPARC expression decreases gastric cancer cellular invasion and survival. *J Exp Clin Cancer Res* 2010, 29, 59.
253. Yin M., Hu Z., Tan D., Ajani J.A., Wei Q.: Molecular epidemiology of genetic susceptibility to gastric cancer: focus on single nucleotide polymorphisms in gastric carcinogenesis. *Am J Transl Res* 2009, 1, 44-54.
254. Yokozaki H., Yasui W., Tahara E.: Genetic and epigenetic changes in stomach cancer. *Int Rev Cytol* 2001, 204, 49-95.
255. Yu C.D., Xu S.H., Mou H.Z., Jiang Z.M., Zhu C.H., Liu X.L.: Gene expression profile differences in gastric cancer, pericancerous epithelium and normal gastric mucosa by gene chip. *World J Gastroenterol* 2005, 11, 2390-2397.
256. Yu J., Tao Q., Cheng Y.Y., Lee K.Y., Ng S.S., Cheung K.F., Tian L, Rha S.Y., Neumann U., Röcken C., Ebert M.P., Chan F.K., Sung J.J.: Promoter methylation of the Wnt/beta-catenin signaling antagonist Dkk-3 is associated with poor survival in gastric cancer. *Cancer* 2001, 115, 49-60.
257. Zaczek A., Markiewicz A., Supernat A., Bednarz-Knoll N., Brandt B., Seroczyńska B., Skokowski J., Szade J., Czapiewski P., Biernat W., Welmicka-Jaśkiewicz M., Jassem J.: Prognostic Value of TOP2A Gene Amplification and Chromosome 17 Polysomy in Early Breast Cancer. *Pathol Oncol Res* 2012, 18, 885-894.
258. Zhang H.K., Zhang Q.M., Zhao T.H, Li Y.Y., Yi Y.F.: Expression of mucins and E-cadherin in gastric carcinoma and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2004, 10, 3044-3047.
259. Zhang J.L., Chen G.W., Liu Y.C., Wang P.Y., Wang X., Wan Y.L., Zhu J., Gao H.Q., Yin J., Wang W., Tian M.L.: Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Suppresses Angiogenesis by Down-Regulating the Expression of VEGF and MMP-7 in Gastric Cancer *PLoS ONE* 2012, 7, e44618.
260. Zhang S.N., Sun H.H., Jin Y.M., Piao L.Z., Jin D.H., Lin Z.H., Shen X.H.: Identification of differentially expressed genes in gastric cancer by high density cDNA microarray. *Cancer Genet* 2012, 205, 147-155.
261. Zhao F.Q., Keating A.F.: Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr. Genomics* 2007, 8, 113-128.
262. Zhao J., Dong L., Lu B., Wu G., Xu D., Chen J., Li K., Tong X., Dai J., Yao S., Wu M., Guo Y.: Down-regulation of osteopontin suppresses growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via induction of apoptosis. *Gastroenterology* 2008, 135, 956-968.
263. Zhao L., Zhang C., Liao G., Long J.: RNAi-mediated inhibition of PDGF-D leads to decreased cell growth, invasion and angiogenesis in the SGC-7901 gastric cancer xenograft model. *Cancer Biology & Therapy* 2010, 9, 42-48.
264. Zhao P., Liu W., Lu Y.L.: Clinicopathological significance of FHIT protein expression in gastric adenocarcinoma patients. *World J Gastroenterol* 2005, 11, 5735-5738.
265. Zhuang W., Wu X.T., Zhou Y., Liu L., Liu G.J., Wu T.X., Yao X., Du L., Wei M.L.: Interleukin 10-592 promoter polymorphism associated with gastric cancer among Asians: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Dig Dis Sci.* 2010, 55, 1525-1532.

266. Zohny S.F., Fayed S.T.: Clinical utility of circulating matrix metalloproteinase-7 (MMP-7), CC hemokine ligand 18 (CCL18) and CC chemokine ligand 11 (CCL11) as markers for diagnosis of epithelial ovarian cancer. *Med. Oncol* 2010, 27, 1246-1253.
267. Zatoński W.: Krajowy Rejestr Nowotworów (2010 r.)
268. Didkowska J., Wojciechowska U., Zatoński W. „Prognozy zachorowań i zgonów na wybrane nowotwory złośliwe w Polsce do 2025 roku”, Wyd. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, 2009
269. A. Szawłowski A.: Wykład: „Leczenie skojarzone nowotworów przewodu pokarmowego”, IX Polska Szkoła Onkologii, 1998.
270. Klasyfikacja topograficzna raka połączenia przełykowo-żołądkowego według Międzynarodowego Stowarzyszenia do Badań Raka Żołądka – IGCA (J.R. Siewert), 1997.
271. Szawłowski A.: Nowotwory górnego odcinka układu pokarmowego, W: A. Kułakowski, E. Towpik (red.). *Zasady rozpoznawania i leczenia nowotworów*. Wyd. PFESO, Warszawa 1997).

8. STRESZCZENIE

Założenia i cel pracy

Rak żołądka (carcinoma ventriculi) należy do nowotworu górnego odcinka przewodu pokarmowego i jak wszystkie nowotwory tej grupy charakteryzuje się dużą złośliwością. Nadal mimo agresywnego leczenia chirurgicznego w oparciu o wprowadzone międzynarodowe standardy (tzw. resekcja D2) oraz wprowadzenie metod skojarzonego leczenia (głównie colikwantowe chemio-radioterapia) dla poprawy 5- i 10-letnich przeżyć wyniki leczenia są niezadowolające. Zachorowalność na raka żołądka wykazuje tendencję spadkową ale niestety ten trend nie towarzyszy również spadkowi umieralności. Wytłumaczeniem tego stanu rzeczy są nadal uwarunkowania epidemiologiczne (w krajach europejskich i USA większość chorych zgłaszających się do leczenia prezentuje zaawansowaną fazę nowotworu a w Japonii większość chorych dzięki badaniom przesiewowym diagnozuje się we wczesnej fazie co rzutuje na wynik leczenia) i biologiczne (wysoki potencjał proliferacyjny, niska chemiowrażliwość).

Dlatego poszukując dróg do poprawy wyników leczenia raka żołądka, obok promocji wczesnej diagnostyki trwają poszukiwania nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych co być może stworzy nowe możliwości poprawy skuteczności leczenia.

Badania nad kancerogenezą raka żołądka pozwoliły dotychczas stwierdzić, że w procesie tym dochodzi do aktywacji ontogenów i oraz metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, wyciszenia genów supresorowych, inaktywacji genów naprawy DNA i cząsteczek adhezji komórkowej. Zmiany te definiują biologiczne cechy komórek raka i mogą stanowić potencjalny cel terapii przeciwnowotworowej. Dlatego w pracy za cel postawiłem sobie poszukiwanie molekularnych różnic pomiędzy rakiem a zdrową błoną śluzową żołądka. W przypadku wykrycia zmienionej ekspresji genów w tkance raka żołądka zaplanowałem ocenę ich znaczenia prognostycznego.

Material i metody

Materiał kliniczny obejmuje grupę 57 chorych operowanych z powodu zweryfikowanego histopatologicznie gruczolakoraka żołądka (adenocarcinoma) w okresie od 1 stycznia 2003 r. do 31 grudnia 2008 r.

Badaniu poddano całkowity RNA wyizolowany z materiału pobranego śródoperacyjnie: wycinek z guza oraz wycinek z makroskopowo niezmienionej ściany żołądka (głównie błona śluzowa). Pobrany materiał umieszczono w roztworze stabilizującym RNAlater (Qiagen) i następnie przechowywano w zamknięciu w temperaturze -80°C . Do izolacji całkowitego RNA stosowano metodę Chomeczyńskiego i Sacchi. Pomiar stężenia RNA wykonano metodą spektrofotometryczną a dla oceny jakości RNA zastosowano technologię opartą na elektroforezie mikrokapilarnej fragmentów cząsteczek RNA na podstawie ich wielkości. Do zbadania różnic w ekspresji genów pomiędzy rakiem i niezmienną nowotworowo błoną śluzową żołądka wykorzystano oligonukleotydowe macierze wysokiej gęstości firmy Affymetrix (typ HG_U1332.0).

W pierwszym etapie porównanie wykonano nienadzorowaną metodą skalowania wielowymiarowego (MDS, *multidimensional scaling*).

W następnym kroku przeprowadzono nadzorowaną analizę danych. Z 54675 zestawów sond na mikromacierzy HG-U133 Plus 2.0 wyselekcjonowano te które spełniają kryterium różnicy między grupami $p < 0,001$, bez korekcji na krotność porównań (w takiej analizie oczekuje się około 55 cech fałszywie dodatnich). Stwierdzono że róż-

nica dotyczy 2546 zestawów sond – jest znacząco większa niż liczba potencjalnych wyników fałszywie dodatnich. Wynik ten potwierdza oczekiwaną, dużą skalę różnic między utkaniem raka i zdrowej błony śluzowej żołądka. W następnym kroku analizie poddano geny wybrane w pracy do oceny na podstawie przeglądu piśmiennictwa i analizowane w dalszej części metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (ACK, CCL18, CD36, COL1A, COL4A2, COL6A3, FN1LAMC2, MAPK1, OPCML, PDGFD, PIM1RNASE1, RRM2, SLAM, SLC2A1, SPARC, SPP1, TFF1, THBS2, TIMP1, TOP2A, YES).

Wyniki

W wyniku przeprowadzonej analizy ekspresji genów w tkance nowotworowej i sąsiadującej niezmięnionej nowotworowo błonie śluzowej metodą mikromacierzy tylko 8 genów spełniało założone wyżej kryterium nieskorygowanej różnicy $p < 0,001$.

Dwa z tych genów wykazywał istotne obniżenie ekspresji w utkaniu raka, w tym jeden (RNASE1) o dużej skali (ponad siedmiokrotne); różnica dla genu PDGFD była około dwukrotna. Pozostałe sześć genów (SPP1, THBS2, RRM2, CCL18, COL6A3 i TIMP1) wykazywało zwiększoną ekspresję w utkaniu raka w stosunku do otaczających tkanek zdrowych żołądka.

Dla sześciu genów w porównaniu badanych 14 próbek nie obserwowano żadnych istotnych różnic – były to: YES1, ACK1, PIM1, LAMC2, OPCML, SLAMF1.

Z kolei, dla 9 genów obserwowano „pośrednie” wartości różnicy między utkaniem raka a niezmięzioną nowotworowo śluzówką. Geny te wykazywały różnice które uznane byłyby za statystycznie istotne w analizie statystycznej, jednak o granicznej istotności przy interpretacji masowych danych genomycznych. Dla części z nich (w tym COL1A2, CD36 czy SPARC) obserwowana duża krotność różnic oraz szacowane ryzyko wyniku fałszywie dodatniego (mierzone wartością FDR, false discovery rate) poniżej 5% uzasadniały interpretację obserwowanych różnic jako istotnych. Dla innych jak COL4A2, TFF1, SLC2A1, FN1 uzyskane wyniki analizy genomicznej należy traktować ostrożnie, biorąc pod uwagę około 10% ryzyko wyniku fałszywie dodatniego. Szczególną sytuację obserwowano dla genu MAPK1, dla którego jedna z sond na macierzy U133 Plus 2.0 wykazywała trend w kierunku zwiększonej ekspresji w raku żołądka, zaś inna sonda wskazywała na wynik przeciwny – obniżenie ekspresji

Wnioski

1. W badaniu mikromacierzowym zidentyfikowano geny potencjalnie powiązane ze stopniem zaawansowania nowotworu. Obserwowano niewielki i graniczny statystycznie związek ekspresji genów z zaawansowaniem guza pierwotnego. W szczególności, gen LRP4 wykazywał niższą ekspresję u chorych z wyższym zaawansowaniem choroby ($p < 0,001$, FDR 31%). Nie obserwowano związku ekspresji genów z zaawansowaniem przerzutów węzłowych
2. Potwierdzono związek ekspresji wybranych genów (w tym AHSA1, CXCR2, FPR2 i HCAR3, FDR < 5%) ze stopniem zróżnicowania nowotworu. Na wyselekcjonowanej liście genów jest wiele transkryptów które mimo że nie przekroczyły oczekiwanego poziomu istotności statystycznej, to ich związek ze stopniem zróżnicowania jest wysoce prawdopodobny (np. G0S2), a także wiele genów istotnych z punktu widzenia biologii nowotworów (np. S100A9).

3. Dwie główne grupy próbek, wyodrębnione na podstawie analizy nienadzorowanej badania genomowego i wykazujące duże różnice w ekspresji genów, mimo że różnią się wyjściowym zaawansowaniem nowotworu, nie wykazują różnic w ostatecznym rokowaniu chorych.
4. Stopień degradacji RNA w mierzonym zakresie RIN 2-8, mimo iż znacząco wpływa na wynik badania mikromacierzowego, nie jest powiązany z różnicami w części badanych genów markerowych – te transkrypty potencjalnie mogą być bardziej odporne na degradację i są lepszymi kandydatami do zastosowań diagnostycznych
5. W badaniu mikromacierzowym nie obserwowano w badanej grupie związku ekspresji genów z całkowitym czasem przeżycia chorych. Może to być związane z heterogennością badanej grupy bądź ograniczeniem liczebności zbioru.
6. Jeden z genów analizowanych techniką QPCR w całej populacji badanych (RRM2) wykazuje różnice związane z czasem przeżycia chorych – po uwzględnieniu ekspresji w utkaniu otaczającym nowotwór. Dla drugiego potencjalnie różnicującego genu (TIMP1) potwierdzenie wymaga dalszych badań. Podwyższona ekspresja tych genów może wiązać się z niekorzystnym rokowaniem. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność poszukiwania markerów o znaczeniu rokowniczym w dużych grupach, uwzględniając osobniczą zmienność ekspresji genów w tkankach nienowotworowych.

9. SUMMARY

Assumptions and aim of the dissertation

Gastric cancer (carcinoma ventriculi) belongs to upper gastrointestinal neoplasms and, similarly to all other cancers from the group, is marked by a high malignancy. Despite aggressive surgical treatment based on international standards (the so-called D2 resection) as well as the introduction of combination therapy methods (mainly chemo-radiotherapy) aimed at an improvement of the 5- and 10-year survival rates, the treatment results are still unsatisfying. The incidence of gastric cancer is decreasing, but unfortunately mortality is not. This still results from epidemiological factors (in both Europe and the USA the majority of patients reporting for treatment present an advanced stage of cancer, while in Japan, owing to screening, most patients are diagnosed at an early stage, which has an impact on treatment results) as well as biological conditions (high proliferation potential, low chemosensitivity).

For the above reasons, in an attempt to improve gastric cancer treatment results, the promotion of early diagnostics is accompanied by a search for new prognostic and predictive factors which will perhaps create new possibilities to improve treatment effectiveness.

Owing to research into the carcinogenesis of gastric cancer, we know that the process involves an activation of oncogenes and matrix metalloproteinases, a suppression of tumour suppressor genes, and an inactivation of DNA repair genes and cell adhesion molecules. These changes define the biological characteristics of cancer cells and may constitute a potential aim of cancer therapy. For the above reasons, I have decided to aim my dissertation at a search for molecular differences between cancer and healthy gastric mucosa. I have also planned an evaluation of the prognostic significance of the changed gene expression discovered in gastric cancer tissue.

Material and methods

The clinical material is based on a group of 57 patients operated on for a histopathologically verified gastric adenocarcinoma between 1 January 2003 and 31 December 2008.

The analysis covered the total RNA isolated from intraoperatively collected material: a tumour specimen and a specimen of the macroscopically unchanged stomach wall (mainly mucous membrane). The collected material was placed in a RNeasy (Qiagen) storage solution and stored under cover in -80°C . The Chomczynski and Sacchi method was used for the isolation of the total RNA. RNA concentration was measured spectrophotometrically, while to evaluate the RNA quality, technology based on a microcapillary electrophoresis of fragments of RNA molecules on the basis of their size was used. High-density oligonucleotide arrays Affymetrix (HG_U1332.0) were used for the determination of differences in gene expression between cancer and normal gastric mucosa.

Initially, the comparison was performed with the help of unsupervised multidimensional scaling (MDS).

Supervised data analysis was then applied. Out of 54 675 probe sets on the HG-U133 Plus 2.0 microarray, those meeting the criterion of a $p < 0.001$ difference between groups, without adjustment for fold-change comparisons, were selected (in such an analysis, approximately 55 false positive characteristics are expected). It was established that the difference applied to 2 546 probe sets – which was significantly higher than the

number of the potential false positives. The result confirms the expected high scale of differences between cancer tissue and the healthy gastric mucosa. As a next step, genes selected for evaluation on the basis of literature research (ACK, CCL18, CD36, COL1A, COL4A2, COL6A3, FN1LAMC2, MAPK1, OPCML, PDGFD, PIM1RNASE1, RRM2, SLAM, SLC2A1, SPARC, SPP1, TFF1, THBS2, TIMP1, TOP2A, YES) were analysed with the help of a quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR).

Results

As a result of a microarray analysis of gene expression in the cancer tissue and the adjacent normal mucous membrane, only 8 genes met the unadjusted difference criterion ($p < 0.001$) specified above.

Two of the genes showed a significantly decreased expression in the cancer tissue, with an over seven-fold large-scale difference for RNASE1; the difference for the PDGFD gene was approximately two-fold. The other six genes (SPP1, THBS2, RRM2, CCL18, COL6A3 and TIMP1) showed an increased expression in the cancer tissue in relation to the adjacent normal stomach tissue.

No significant differences were discovered for six genes in the comparison of the 14 samples analysed – these were: YES1, ACK1, PIM1, LAMC2, OPCML, and SLAMF1.

For nine genes “in-between” values of the difference between the cancer tissue and normal mucosa were discovered. The genes showed differences which would be recognised as statistically significant in statistical analysis, but as having borderline significance in the interpretation of massive genomic data. For some of them (including COL1A2, CD36 and SPARC) the discovered large fold-change differences and the estimated less than 5% risk of a false positive (measured with the false discovery rate - FDR) justified the interpretation of the differences discovered as significant. For others, such as COL4A2, TFF1, SLC2A1, and FN1, the obtained genomic analysis results should be treated with caution, taking into account the approximate 10% risk of a false positive result. A special situation was discovered for the MAPK1 gene, for which one of the probes on the U133 Plus 2.0 array showed a trend towards an increased expression in gastric cancer, while another probe showed a contrasting result – a decreased expression.

Conclusions

1. Genes potentially related to cancer staging were identified in microarray analysis. Some small relationship (of borderline statistical significance) between gene expression levels and primary tumour staging was detected. In particular, gene LRP4 had a smaller expression level in patients with more advanced cancer ($p < 0.001$, FDR 31%). No relationship between gene expression levels and staging of lymph node metastases was detected.
2. Relationship between the expression of selected genes (including AHSA1, CXCR2, FPR2, and HCAR3, FDR < 5%) and tumour differentiation grade was confirmed. The list of selected genes includes many transcripts which did not achieve the expected statistical significance level, but nevertheless have a highly probable relationship with differentiation grade (e.g. GOS2), as well as many genes which are significant from the point of view of cancer biology (e.g. S100A9).

3. The two main sample groups identified on the basis of unsupervised analysis carried out as a part of our genomic study, and showing big differences in gene expression levels, do not show differences in ultimate patient prognosis, although they differ in the initial cancer staging.
4. Despite having a significant impact on microarray analysis, RNA degradation level in the range measured (RIN 2-8) is not related to differences in some of the analysed marker genes – the transcripts may potentially be more resistant to degradation and are better candidates for use in diagnostics.
5. Microarray analysis of the group under study did not reveal a relationship between gene expression levels and total survival time, which may be related to heterogeneity of the group or the limited set size.
6. One of the genes analysed with the help of QPCR in the entire population under study (RRM2) shows differences related to patient survival time – after taking into account expression in the cancer-surrounding tissue. Further research is necessary to confirm the results for the second potentially differentiating gene (TIMP1). The increased expression of the genes may be related to poor prognosis. The results generated indicate the need for the search for prognostic markers in large groups, taking into account the inter-individual variability in gene expression in non-cancer tissues.