

Lek. Łukasz Kruszyna

**ANALIZA EKSPRESJI GENÓW KODUJĄCYCH BIAŁKA
UCZESTNICZĄCE W PROCESIE ANGIOGENEZY
I ODPOWIEDZIALNE ZA PROGRESJĘ RAKA ŻOŁĄDKA**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor

Prof. dr hab. Grzegorz Oszkinis

**KLINIKA CHIRURGII OGÓLNEJ I NACZYŃ UNIwersytetu
MEDYCZNEGO im. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU**

Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. Grzegorz Oszkinis

Praca wykonana w ramach grantu promotorskiego nr NN403 1696 37:
„Analiza ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w procesie angiogenezy
i odpowiedzialne za progresję raka żołądka”,
przyznanego na mocy decyzji Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego
1696/B/P01/2009/37 z dnia 10-08-2009.

Kierownik grantu: Prof. dr hab. Grzegorz Oszkinis

Poznań 2011

PODZIĘKOWANIA

*Składam serdeczne podziękowania
Panu Prof. dr hab. Grzegorzowi Oszkinisowi
za systematyczną motywację, entuzjazm oraz
cenne uwagi i wszelką pomoc
w trakcie realizacji niniejszej pracy.*

*Dziękuję wszystkim osobom
zaangażowanym w powstawanie mojej
pracy doktorskiej
na wszystkich etapach jej realizacji.*

*Szczególnie dziękuję
Mojej Żonie, Córce oraz Rodzicom
za cierpliwość, wyrozumiałość,
wiarę w moje możliwości
i nieustające wsparcie.*

Bardzo serdecznie dziękuję

Łukasz Kruszyna

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	9
1.1. Epidemiologia raka żołądka.....	9
1.2. Etiopatogeneza raka żołądka.....	9
1.2.1. Stany przedrakowe.....	10
1.3. Podłoże genetyczne raka żołądka.....	10
1.4. Patomorfologia raka żołądka.....	11
1.4.1. Nowotwory złośliwe żołądka.....	11
1.4.2. Klasyfikacja histologiczna raka żołądka.....	12
1.4.3. Klasyfikacja Laurena	12
1.4.4. Klasyfikacja TNM	13
1.5. Rak wczesny i zaawansowany	15
1.6. Lokalizacja raka żołądka.....	16
1.6.1. Klasyfikacja Siewerta raka połączenia przelykowo-żołądkowego.....	17
1.7. Drogi szerzenia się raka żołądka.....	17
1.8. Leczenie raka żołądka	18
1.8.1. Rys historyczny.....	18
1.8.2. Współczesne metody leczenia raka żołądka.....	19
1.8.2.1. Wczesny rak żołądka ograniczony do błony śluzowej.....	20
1.8.2.2. Rak zaawansowany regionalnie	21
1.8.2.3. Nowotwór rozsiany	22
1.8.3. Rokowanie w raku żołądka.....	22
1.8.4. Współczesne metody terapeutyczne w leczeniu raka żołądka.....	23
1.8.4.1. Chemioradioterapia	23
1.8.4.2. Chemioterapia okołooperacyjna.....	23
1.8.4.3. Terapia celowana.....	24
1.9. Hipoksja w nowotworach litych.....	26

1.10.	Czynnik indukowany hipoksją HIF-1	27
1.10.1.	Budowa czynnika HIF-1	28
2.10.1.	Regulacja podjednostki HIF-1 α w zależności od dostępu tlenu w komórce	28
1.10.3.	Procesy regulowane przez HIF-1	31
1.10.4.	Rola czynnika HIF-1 w nowotworach litych	32
1.11.	Regulacja aktywności czynnika HIF-1 poprzez hydroksylację.....	33
1.11.1.	Budowa i znaczenie hydroksylaz prolinowych (PHDs)	33
1.11.2.	Znaczenie FIH w regulacji HIF-1 α	35
1.12.	Czynnik VHL	35
1.12.1.	Rola VHL w regulacji HIF-1 α	35
1.12.2.	Występowanie zaburzeń VHL w nowotworach i ich znaczenie.....	35
1.12.3.	Choroba von Hippel-Lindau	36
1.13.	Angiogeneza	36
1.13.1.	Rys historyczny.....	36
1.13.2.	Współczesna definicja angiogenezy	37
1.13.3.	Neoangiogeneza.....	38
1.13.4.	Rodzina białek VEGF	38
1.13.5.	Receptory białek rodziny VEGF.....	41
1.13.6.	Znaczenie neoangiogenezy w progresji nowotworów	42
1.13.6.1.	Mechanizmy powstawania naczyń w nowotworze	42
1.13.6.2.	Ekspresja VEGF-A w nowotworach	45
1.14.	Rola CXCR4.....	45
2.	CEL	46
3.	MATERIAŁ I METODY	47
3.1.	Grupa badana	47
3.2.	Metody	48

3.2.1.	Analiza ekspresji mRNA	48
3.2.1.1.	Izolacja RNA	48
3.2.1.2.	Oznaczanie stężenia RNA	49
3.2.1.3.	Odwrotna transkrypcja	49
3.2.1.4.	Amplifikacja cDNA w czasie rzeczywistym (RT-PCR).....	50
3.2.1.5.	Elektroforeza produktów reakcji RT-PCR	53
3.2.2.	Analiza Western blot	53
3.2.2.1.	Izolacja białka.....	53
3.2.2.2.	Oznaczanie stężenia białka.....	53
3.2.2.3.	Rozdział elektroforetyczny białek i analiza Western blot.....	54
3.2.3.	Badania immunohistochemiczne	55
3.2.3.1.	Przygotowanie histopatologiczne materiału do badań	55
3.2.3.2.	Metody immunoperoksydazowe	56
3.2.3.3.	Rodzaje zastosowanych przeciwciał pierwszorzędowych	56
3.2.3.4.	Odczynniki i reagenty stosowane do barwień	56
3.2.3.5.	Metodyka badań	57
3.2.3.6.	Interpretacja wyników	57
3.2.3.7.	Metoda oceny reakcji przeciwciał	58
3.2.3.8.	Półilościowa ocena ekspresji białka CD34 i VEGF	58
3.3.	Analizy statystyczne.....	58
3.4.	Zagadnienia etyczne.....	59
4.	WYNIKI	59
4.1.	Dane kliniczne i histopatologiczne	59
4.2.	Analiza poziomu ekspresji mRNA genów <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> w tkance nowotworowej, marginesie operacyjnym i kontroli	62
4.2.1.	Ekspresja mRNA genu <i>HIF-1α</i>	62
4.2.2.	Ekspresja mRNA genu <i>EGLN1</i>	63

4.2.3.	Ekspresja mRNA genu <i>VHL</i>	64
4.2.4.	Ekspresja mRNA genu <i>VEGF</i>	65
4.2.5.	Ekspresja mRNA genu <i>CXCR4</i>	66
4.3.	Zależność pomiędzy ekspresją mRNA genów: <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> w tkance nowotworowej a danymi klinicznymi i histopatologicznymi	67
4.4.	Analiza poziomu ekspresji mRNA genów: <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu (cecha T).....	69
4.5.	Analiza poziomu ekspresji mRNA genów: <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> w zależności od obecności przerzutów do węzłów chłonnych (cecha N).....	71
4.6.	Analiza poziomu ekspresji mRNA genów: <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu	73
4.7.	Analiza poziomu ekspresji mRNA genów <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> w zależności od stopnia złośliwości histologicznej nowotworu (cecha G).....	75
4.8.	Analiza poziomu ekspresji mRNA genów <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> w zależności od typu raka żołądka w klasyfikacji Laurena.....	76
4.9.	Analiza zależności pomiędzy poziomem ekspresji mRNA poszczególnych genów: <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i>	78
4.9.1.	Analiza związku pomiędzy poziomem ekspresji mRNA genu <i>EGLN1</i> i <i>VHL</i>	79
4.10.	Analiza immunohistochemiczna	80
4.10.1.	Ekspresja białka VEGF w tkance nowotworowej raka żołądka.....	80
4.10.2.	Ekspresja białka CD34 w tkance nowotworowej raka żołądka.....	80
4.11.	Zależność pomiędzy poziomem ekspresji białek VEGF i CD34 w tkance nowotworowej a danymi klinicznymi i histopatologicznymi.....	83
4.12.	Analiza związku pomiędzy ekspresją białka VEGF a gęstością naczyń (MVD), ocenioną za pomocą markera CD34.....	85

4.13.	Zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA genu <i>VEGF</i> a ekspresją białka VEGF ocenioną za pomocą badania immunohistochemicznego.....	86
4.14.	Analiza Western blot ekspresji białka EGLN1	87
4.15.	Zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA genu <i>EGLN1</i> a ekspresją białka EGLN1 ocenioną za pomocą analizy Western blot.....	88
4.16.	Analiza przeżywalności pooperacyjnej	89
4.16.1.	Przeżywalność całkowita.....	89
4.16.2.	Analiza przeżywalności pooperacyjnej w zależności od poziomu ekspresji mRNA genów: <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i>	90
5.	DYSKUSJA	93
6.	WNIOSKI	106
	STRESZCZENIE.....	108
	SUMMARY	110
	WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	112
	PIŚMIENNICTWO	118
	SPIS TABEL I RYCIN.....	143

1. WSTĘP

1.1. Epidemiologia raka żołądka

Zapadalność i śmiertelność z powodu raka żołądka wykazują tendencję spadkową w ciągu ostatnich 40 lat, zwłaszcza w Stanach Zjednoczonych i Europie Zachodniej. Pomimo tego rak żołądka jest ciągle na czwartym miejscu wśród nowotworów złośliwych pod względem zapadalności i stanowi on drugą najczęstszą przyczynę zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi na świecie [1, 2].

Zapadalność na raka żołądka jest znacznie zróżnicowana w różnych rejonach świata. Stosunkowo rzadko rozpoznaje się raka żołądka w USA i Europie Zachodniej, natomiast największą zachorowalność odnotowuje się w krajach Dalekiego Wschodu (Japonia, Chiny) oraz w Ameryce Południowej. Polska stanowi rejon o średniej zachorowalności. Rocznie w naszym kraju rejestruje się około 5500 zachorowań. Według danych epidemiologicznych z 2006 roku, rak żołądka zajmuje szóste miejsce pod względem zapadalności u mężczyzn i jedenaste u kobiet [3].

1.2. Etiopatogeneza raka żołądka

Zapadalność na raka żołądka zależy od czynników środowiskowych, głównie przyzwyczajęń żywieniowych. W patogenezie raka żołądka podkreśla się rolę zakażenia *Helicobacter Pylori*, którego epidemiologia zależy od statusu socjoekonomicznego. Infekcja *Helicobacter Pylori* zwiększa ryzyko zapadalności na raka żołądka poprzez uszkodzanie komórek i wywołanie stanu zapalnego błony śluzowej żołądka. Daje to ciąg patologicznych zmian prowadzących do przewlekłego zapalenia i zmian zanikowych, a następnie poprzez metaplastję i dysplastję do rozwoju raka. Wydaje się, że do znacznego spadku zapadalności na raka żołądka przyczyniła się poprawa standardu życia, zwłaszcza odżywiania. Rak ten częściej rozwija się u osób z rejonów o niższym poziomie higieny, gdzie spożywa się produkty niewłaściwie konserwowane.

W patogenezie raka żołądka podkreśla się kluczową rolę metaplastji, zwłaszcza typu jelitowego. Proces ten polega na zastąpieniu normalnej błony śluzowej żołądka przez komórki jelitowe. Jest to zaburzenie różnicowania komórek strefy rozrodczej. Częstość metaplastji jelitowej żołądka wzrasta z wiekiem. Metaplastja jelitowa pojawia się zazwyczaj ogniskowo w błonie śluzowej z zanikowym zapaleniem. Z czasem

w ogniskach zmienionych metaplastycznie pojawiają się zmiany dysplastyczne. Jednakże ta sekwencja zmian dotyczy patogenezy postaci jelitowej raka żołądka. Rozlana postać raka żołądka prawdopodobnie nie jest związana z metaplazją jelitową.

Wiadomo, że dieta bogata w witaminy (owoce, jarzyny) zmniejsza ryzyko zapadalności na raka żołądka. Natomiast pokarmy niewłaściwie konserwowane, solone, wędzone i marynowane zwiększają ryzyko raka żołądka z uwagi na znaczne ilości azotanów. Z zawartych w diecie azotanów powstają toksyczne azotyny i N-nitrozoaminy. Ważną rolę w patogenezie raka żołądka odgrywa także palenie tytoniu.

Rakowi żołądka towarzyszy w 90% przypadków *hipochlorhydria*. Niedokwasota może poprzedzać raka żołądka o wiele lat. Prawdopodobnie bardziej neutralne pH żołądka sprzyja rozwojowi bakterii redukujących azotany do azotynów, dalej metabolizowanych do N-nitrozoamin wykazujących działanie rakotwórcze.

1.2.1. Stany przedrakowe

W raku żołądka wyróżnia się szereg stanów chorobowych uznawanych za stany przedrakowe [3]. Należą do nich:

- przewlekłe zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka z metaplazją jelitową,
- dysplazja błony śluzowej żołądka,
- niezłośliwy rozrost nabłonkowy (polipy błony śluzowej żołądka),
- stan po częściowej resekcji żołądka,
- choroba Ménétriera (gastropatia przerostowa).

1.3. Podłoże genetyczne raka żołądka

Zaburzenia genetyczne występujące w raku żołądka nie zostały dotychczas poznane tak dokładnie jak w raku piersi czy jelita grubego. Większość raków żołądka występuje sporadycznie. Tylko w około 10% przypadków o wystąpieniu raka żołądka decydują predyspozycje rodzinne [4].

Zwiększone ryzyko wystąpienia raka żołądka opisano w takich zespołach jak:

- dziedziczny niezwiązany z polipowatością rak jelita grubego (ang. *hereditary non-polyposis colon cancer* – HNPCC, zespół Lyncha) – mutacja jednego z genów: *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*;

- rodzinna polipowatość gruczolakowa (ang. *familial adenomatous polyposis* – FAP) – mutacja genu *APC*;
- zespół Peutz-Jeghers – mutacja genu *STK11*;
- dziedziczny rozlany rak żołądka (ang. *hereditary diffuse gastric cancer* - HDGC) – germinalna mutacja genu *CDH1* kodującego białko adhezyjne E-kadheryna. Zespół ten dotyczy 1-3% raków żołądka i charakteryzuje się występowaniem raka żołądka typu rozlanego w bardzo wczesnym wieku [5];
- zespół BRCA2;
- zespół Li-Fraumeni – mutacja genu *P53*.

W badaniach molekularnych raka żołądka stwierdzono utratę heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity* - LOH) wielu genów supresorowych. Obserwuje się często niestabilność DNA (ang. *microsatellite instability* - MI) będącą skutkiem zaburzeń naprawy DNA. W raku żołądka dochodzi do mutacji genu *P53* i utraty jego funkcji jako genu supresorowego. Dotyczy to zwłaszcza guzów zaawansowanych. Wśród sporadycznych raków żołądka, zwłaszcza typu rozlanego występuje zmniejszona ekspresja białka E-kadheryny. W raku żołądka występuje amplifikacja i nadekspresja genu *c-met* oraz onkogenu *c-erbB2*. Wśród genów odpowiedzialnych za progresję raka żołądka wymienia się również: *EGF*, *TGF- α* , *IL-1*, *PDGF*, *K-sam*.

W zdecydowanej większości przypadków dziedzicznego raka żołądka wciąż jeszcze nie zdefiniowano jego podłoża genetycznego.

1.4. Patomorfologia raka żołądka

1.4.1. Nowotwory złośliwe żołądka

Wśród nowotworów złośliwych żołądka aż 95% stanowią nowotwory pochodzenia nabłonkowego (raki), a tylko pozostałe 5% stanowią nowotwory złośliwe wywodzące się z tkanki mezenchymalnej. Do grupy tej zalicza się chłoniaki złośliwe (łac. *lymphoma malignum*), nowotwory stromalne pochodzące z komórek Cajala (ang. *GIST-gastrointestinal stromal tumor*), mięsaki wywodzące się z tkanki mięśniowej (łac. *leiomyosarcoma*, *leiomyoblastoma*) oraz rzadko występujące nowotwory neuroendokrynne np. rakowiak (łac. *carcinoid*).

1.4.2. Klasyfikacja histologiczna raka żołądka

Obraz mikroskopowy raka żołądka jest bardzo różnorodny. Do określenia histopatologii raka żołądka służy obecnie klasyfikacja WHO (ang. *World Health Organization*) (tabela 1).

Tabela 1. Klasyfikacja histologiczna WHO złośliwych nowotworów nabłonkowych żołądka [6].

Gruzołakorak (ang. <i>adenocarcinoma</i>) - brodawkowy (ang. <i>papillary adenocarcinoma</i>) - cewkowy (ang. <i>tubular adenocarcinoma</i>) - śluzotwórczy (ang. <i>mucinous adenocarcinoma</i>)
Rak śluzowokomórkowy [sygnetowatokomórkowy] (ang. <i>sygnet-ring cell carcinoma</i>)
Rak gruczołowopłaskonabłonkowy (ang. <i>adenosquamous carcinoma</i>)
Rak płaskonabłonkowy (ang. <i>squamous cell carcinoma</i>)
Rak drobnokomórkowy (ang. <i>small cell carcinoma</i>)
Rak niezróżnicowany (ang. <i>undifferentiated carcinoma</i>)

1.4.3. Klasyfikacja Laurena

Z punktu widzenia klinicznego przydatna jest również klasyfikacja Laurena, coraz powszechniej używana w Europie i Japonii przy ocenie histopatologicznej raka żołądka. Zgodnie z tą klasyfikacją wyróżnia się trzy typy raka żołądka: jelitowy (łac. *intestinalis*), rozlany (łac. *diffusum*) i dodatkowo typ mieszany (łac. *mixtus*). Podział ten oparty jest na strukturze komórkowej, sposobie wzrastania i różnicy w wydzielaniu śluzu. Występujące różnice histologiczne implikują ważne wnioski praktyczne:

I Typ jelitowy jest zazwyczaj zróżnicowany i dobrze ograniczony. Jego struktura jest morfologicznie podobna do nabłonka jelitowego. Rozwija się on zazwyczaj na podłożu jelitowej metaplazji błony śluzowej żołądka. Zalicza się do typu epidemicznego, tj. pojawia się u ludzi starszych (zwłaszcza mężczyzn), związany jest z czynnikami środowiskowymi, częściej występuje u chorych z rejonów o wysokiej zapadalności na raka żołądka. Częściej guzy tego typu umiejscowione są w obwodowej części żołądka.

- II Typ rozlany charakteryzuje się niską dojrzałością, zatartymi granicami, naciekającym wzrostem w śluzówce i głębszych warstwach ściany żołądka. Występuje niezależnie od wieku chorego. Jego rozwój w wielu przypadkach nie jest poprzedzony zmianami przednowotworowymi. Wydaje się, że rak rozlany jest bardziej związany z czynnikami genetycznymi, często stwierdza się go u osób z grupą krwi A. Ten typ nowotworu określa się mianem raka endemicznego, ponieważ częściej występuje u chorych z rejonów o niskiej zapadalności na raka żołądka. Z reguły rozwija się w bliższej części żołądka.
- III Typ mieszany łączy cechy obu wyżej wymienionych form.

Z punktu widzenia chirurgicznego bardzo istotny jest fakt, że granice makroskopowe raka rozlanego znacznie różnią się od mikroskopowych. W typie jelitowym granice makroskopowe niewiele odbiegają od mikroskopowych, ale z powodu coraz częstszego występowania postaci mieszanej, margines operacyjny nie powinien być mniejszy niż 5-6 cm.

1.4.4. Klasyfikacja TNM

W ocenie stopnia zaawansowania klinicznego raka żołądka posługujemy się najbardziej popularną klasyfikacją TNM, która opiera się na ocenie trzech cech:

- T (*tumor*) – określającej głębokość naciekania guza pierwotnego,
- N (*noduli*) – określającej stan regionalnych węzłów chłonnych,
- M (*metastases*) – potwierdzającej lub wykluczającej występowanie przerzutów w narządach odległych.

Od stycznia 2010 roku obowiązuje nowa klasyfikacja TNM raka żołądka (tabela 2).

Tabela 2. Klasyfikacja TNM raka żołądka wg AJCC (ang. American Joint Committee on Cancer) [7].

Cecha T	
Tx	Nie można ocenić guza pierwotnego
T0	Nie stwierdza się guza pierwotnego
Tis	Rak śródnabłonkowy bez zajęcia blaszki właściwej błony śluzowej (<i>in situ</i>)
T1	Guz nacieka blaszkę właściwą bądź warstwę mięśniową błony śluzowej lub warstwę podśluzową
T1a	Guz nacieka blaszkę właściwą lub warstwę mięśniową błony śluzowej
T1b	Guz nacieka warstwę podśluzową
T2	Guz nacieka błonę śluzową
T3	Guz nacieka podsukowiczą tkankę łączną bez naciekania otrzewnej trzewnej i sąsiadujących narządów
T4	Guz nacieka błonę surowiczą (otrzewną trzewną) lub sąsiadujące narządy
T4a	Guz nacieka błonę surowiczą (otrzewną trzewną)
T4b	Guz nacieka narządy sąsiadujące
Cecha N	
Nx	Nie można ocenić regionalnych węzłów chłonnych
N0	Nie stwierdza się przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych
N1	Przerzuty w 1-2 regionalnych węzłach chłonnych
N2	Przerzuty w 3-6 regionalnych węzłach chłonnych
N3	Przerzuty w ≥ 7 regionalnych węzłach chłonnych
N3a	Przerzuty w 7-15 regionalnych węzłach chłonnych
N3b	Przerzuty w ≥ 16 regionalnych węzłach chłonnych
Cecha M	
M0	Nie stwierdza się przerzutów odległych
M1	Przerzuty odległe

W oparciu o patologiczną ocenę TNM (pTNM) preparatu pooperacyjnego ocenia się stopień zaawansowania klinicznego nowotworu (tabela 3).

Tabela 3. Klasyfikacja zaawansowania raka żołądka wg AJCC [7].

Stopień zaawansowania	Cecha T	Cecha N	Cecha M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIA	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
IIIB	T4b	N0	M0
	T4b	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
IIIC	T4b	N2	M0
	T4b	N3	M0
	T4a	N3	M0
IV	Dowolne T	Dowolne N	M1

1.5. Rak wczesny i zaawansowany

Z klinicznego punktu widzenia niezwykle istotny jest podział raka żołądka na rak wczesny i zaawansowany z uwagi na olbrzymie różnice w rokowaniu.

Mianem wczesnego raka żołądka określa się zmianę złośliwą ograniczoną do błony śluzowej i podśluzowej, bez względu na obecność lub brak przerzutów w węzłach chłonnych. Zajęcie regionalnych węzłów chłonnych stwierdza się w przypadku postaci wczesnej w 5-20% przypadków. Wczesny rak żołądka najczęściej jest bezobjawowy, rzadziej daje objawy choroby wrzodowej żołądka, rozwija się zazwyczaj powoli, nawet

w ciągu kilku lat. Większość wczesnych raków z czasem ulega progresji do raka zaawansowanego.

W klasyfikacji morfologicznej raka wczesnego wyróżniono trzy rodzaje w zależności od typu wzrostu:

- I rak wypukły,
- II rak powierzchniowy,
- III rak wrzodziejący.

Zaawansowany rak żołądka to zmiana złośliwa przekraczająca błonę podśluzową, zazwyczaj naciekająca błonę mięśniową, a często także błonę surowiczą.

Do morfologicznej oceny zaawansowanego raka żołądka stosuje się klasyfikację Bormanna:

- I egzofityczny, ograniczony, pojedynczy polipowaty guz bez owrzodzenia, wzniesiony do światła żołądka;
- II owrzodziały rak o uniesionych brzegach, ostro odgraniczony;
- III owrzodziały rak słabiej odgraniczony;
- IV rak rozlany (łac. *linitis plastica*), jednolicie naciekający ścianę żołądka, często na dużej powierzchni.

1.6. Lokalizacja raka żołądka

O ile widoczny jest spadek ilości zachorowań na raka dystalnej części narządu, o tyle w ciągu ostatnich 10-15 lat zanotowano wzrost liczby zachorowań na raka części proksymalnej żołądka oraz dystalnej części przełyku. Gruczolakoraki rosnące w dnie i trzonie szybciej naciekają głębsze warstwy ściany żołądka niż zmiany w części antralnej. Zmiany we wpuście i części proksymalnej cechują się gorszym rokowaniem niż nowotwory części obwodowej żołądka i wymagają zawsze różnicowania z rakiem przełyku wtórnie naciekającym żołądek. Rak połączenia żołądkowo-przełykowego stanowi wyzwanie współczesnej chirurgii górnego odcinka przewodu pokarmowego z uwagi na występowanie na pograniczu klatki piersiowej i jamy brzusznej. Do kategorii raka połączenia przełykowo-żołądkowego zalicza się wszystkie nowotwory obejmujące wpust, niezależnie od umiejscowienia głównej masy guza w przełyku, czy też w żołądku.

1.6.1. Klasyfikacja Siewerta raka połączenia przełykowo-żołądkowego

W klasyfikacji Siewerta wyróżnia się trzy typy raka połączenia przełykowo-żołądkowego [8]:

- Typ I -zmiana nowotworowa dotycząca pierwotnie przełyku,
- Typ II -zmiana nowotworowa wywodząca się z obszaru wpustu o cechach pośrednich między typem I i III,
- Typ III -zmiana nowotworowa bliższej części żołądka naciekająca wpust.

1.7. Drogi szerzenia się raka żołądka

Rak żołądka rozwija się przez ciągłość (naciekanie bezpośrednie) a także poprzez przerzuty drogą układu chłonnego i naczyń krwionośnych. Szerzenie się raka żołądka dokonuje się poprzez naciekanie błony śluzowej i głębszych warstw ściany żołądka (błonę mięśniową i surowicówkę). Naciekanie śródścienne jest szczególnie charakterystyczne dla raków niskozróżnicowanych. Ogniska komórek nowotworowych mogą występować również w pewnej odległości od guza pierwotnego, co znacznie utrudnia śródoperacyjną (makroskopową) ocenę doszczętności wycięcia zmiany. Wobec tego margines zdrowych tkanek otaczających guz musi być uzależniony od dojrzałości histologicznej nowotworu i musi być większy w przypadku nowotworów typu rozlanego. Szczególną formą wzrostu cechuje się postać raka określana mianem *linitis plastica*. Mamy tu do czynienia z rozległym naciekiem śródściennym, niekiedy całego żołądka. Rak żołądka może się szerzyć poza jego ścianę naciekając sąsiednie narządy (trzustkę, wątrobę, poprzecznicę).

Żołądek należy do narządów o bardzo złożonym i skomplikowanym układzie naczyń chłonnych. Przerzuty raka żołądka szerzą się przede wszystkim drogę tych naczyń. Wystąpienie przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych jest nieraz nieprzewidywalne, co wynika między innymi z faktu obecności dobrze rozwiniętego układu naczyń chłonnych w warstwie podśluzowej żołądka.

Przerzuty raka żołądka drogą krwionośną szerzą się raczej rzadko we wczesnych fazach rozwoju. Rozwijają się głównie w wątrobie, płucach, kościach. Dotyczy to zwłaszcza typu rozlanego, który charakteryzuje się większym potencjałem powstawania przerzutów odległych. Szczególną formą szerzenia się raka żołądka są wszczepy w obrębie jamy otrzewnowej. W przypadku zaawansowanych postaci raka stwierdza się

przerzuty w jajniku (guz Klukenberga) i w okolicy okołorektalnej (próg Blumera) oraz rozsiew do otrzewnej (łac. *peritonitis carcinomatosa*).

1.8. Leczenie raka żołądka

1.8.1. Rys historyczny

Historia leczenia raka żołądka rozpoczęła się pod koniec XIX wieku [9]. Przyczynił się do tego znaczny rozwój endoskopii przewodu pokarmowego, której pionierem był Jan Mikulicz Radecki. Skonstruował on pierwszy endoskop i podał pierwszy na świecie endoskopowy obraz raka żołądka. 9 kwietnia 1879 roku francuski chirurg Jules Emile Pean wykonał pierwszą resekcję żołądka z powodu raka, jednak pacjent zmarł w piątą dobę po zabiegu [10]. Rok później, 6 listopada 1880 roku, jako drugi na świecie resekcję żołądka przeprowadził Ludwig R. von Rydygier, profesor Uniwersytetu Medycznego w Krakowie, tym razem chory zmarł w I-iej dobę po zabiegu. Pierwszą skuteczną operację raka żołądka, a była to subtotalna resekcja żołądka z zespoleniem żołądkowo-dwunastniczym, przeprowadził 22 lutego 1881 roku w Wiedniu Theodor Billroth [11]. Jego pacjentka opuściła szpital 26 dni po zabiegu, jednak zmarła z powodu wznowy nowotworu 4 miesiące później. Podobnych operacji wiedeński chirurg wykonał w swojej karierze jeszcze 257. Natomiast pierwszej całkowitej resekcji żołądka z powodu raka dokonał Karl Schlatter w 1897 roku w Zurychu wykonując zespolenie przetykowo-jelitowe w rekonstrukcji przewodu pokarmowego. Od tego czasu opracowano i opisano w światowej literaturze wiele różnych technik operacyjnych związanych z całkowitym usunięciem żołądka.

Całkowite wycięcie żołądka przez długi czas miało wielu przeciwników z uwagi na wysoką śmiertelność pacjentów sięgającą nawet 90%. Dzięki postępowi medycyny, zwłaszcza w dziedzinie anestezjologii i aseptyki, w latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku ponownie wzrosło zainteresowanie całkowitą resekcją żołądka. Śmiertelność okołoperacyjna obniżyła się wówczas do 10-50%. W Polsce propagatorem i zwolennikiem tych operacji był doc. Jerzy Borszewski, kierownik III Kliniki Chirurgii w Szpitalu Miejskim im. J. Strusia w Poznaniu. Uzyskał on w 1956 r. śmiertelność pooperacyjną na poziomie 33% [12].

Niemniej jednak ze względu na ciągle wysokie wskaźniki śmiertelności chorych i zaburzenia funkcjonalne, aż do lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku chirurdzy unikali

całkowitych resekcji żołądka. W Polsce na szerszą skalę zaczęto stosować całkowitą resekcję żołądka z powodu raka, i to z dobrymi wynikami dopiero w drugiej połowie lat 80-tych. Dużą rolę w rozwoju chirurgii żołądka odegrali prof. Tadeusz Popiela z Krakowa oraz prof. Paweł Murawa z Poznania.

Obecnie dzięki ogromnym postępom we wszystkich dziedzinach medycyny, umożliwiających prawidłowe wykonanie zabiegu, totalna resekcja żołądka jest operacją bezpieczną i wykonywaną powszechnie na całym świecie.

1.8.2. Współczesne metody leczenia raka żołądka

Jedyną skuteczną formą leczenia raka żołądka z intencją wyleczenia jest zabieg chirurgiczny. Warunkiem skuteczności leczenia chirurgicznego jest miejscowe lub regionalne zaawansowanie nowotworu, gdyż tylko w takim przypadku operacja może prowadzić do usunięcia wszystkich komórek nowotworowych. Głównym celem leczenia chirurgicznego raka żołądka jest tzw. kompletna resekcja R0. W odniesieniu do ogniska pierwotnego (guza) o radykalnym jego usunięciu mówimy wówczas, gdy zachowane są odpowiednie marginesy operacyjne zdrowych tkanek, potwierdzone w badaniu mikroskopowym. Drugim warunkiem uzyskania radykalności zabiegu jest wykonanie odpowiedniego zakresu limfadenektomii z potwierdzonym histopatologicznie brakiem obecności komórek nowotworowych w obwodowych węzłach chłonnych.

Wybór odpowiedniej procedury operacyjnej dla pacjentów z resekcyjnym rakiem żołądka powinien w pierwszej kolejności uwzględniać lokalizację guza. W związku z tym żołądek dzieli się na trzy części - piętra. Mimo, że granice dla tego podziału są umowne to ułatwiają one umiejscowienie guza i tym samym określenie zasięgu operacji. W przypadku guzów zlokalizowanych we wpuszcie wykonuje się poszerzoną całkowitą resekcję żołądka (żołądek i dystalna część przełyku). W leczeniu guzów części środkowej dokonuje się całkowitej resekcji żołądka. Natomiast w przypadku guzów części odźwiernikowej w określonych warunkach można wykonać częściową dystalną resekcję żołądka.

Drugim czynnikiem determinującym zasięg resekcji jest typ raka według klasyfikacji Laurena. Typ rozlany wymaga, jak już wcześniej wspomniano, większych marginesów operacyjnych niż ma to miejsce w przypadku guza typu jelitowego.

Bezpieczne marginesy powinny być także zachowane w zakresie dróg chłonnych. Oznacza to, że liczba usuniętych węzłów chłonnych powinna przewyższać liczbę węzłów zajętych przez proces nowotworowy (określone w rutynowym badaniu histopatologicznym), o ile leczenie chirurgiczne ma wpłynąć na poprawę wyników. Stwierdzono, że tzw. wskaźnik węzłowy mniejszy od 0.2, tzn. obecność przerzutów w mniej niż 20% spośród wszystkich usuniętych węzłów chłonnych, jest niezbędny by polepszyć rokowanie u pacjenta z rakiem żołądka. Potrzebę takiego zakresu resekcji węzłów chłonnych uzasadnia się wysoką częstotliwością występowania mikroprzerzutów w węzłach chłonnych, określanych w rutynowych badaniach histopatologicznych, jako N0.

Podstawową zasadą leczenia raka żołądka jest indywidualny dobór metody leczenia w zależności od zaawansowania choroby. Opierając się na klinicznej ocenie stopnia zaawansowania procesu nowotworowego należy rozważyć trzy różne sytuacje dotyczące wyboru postępowania terapeutycznego: wczesny rak żołądka ograniczony do błony śluzowej, rak zaawansowany regionalnie, nowotwór rozsiany.

1.8.2.1. Wczesny rak żołądka ograniczony do błony śluzowej

Chorzy w tej grupie mogą być leczeni miejscowym wycięciem chorej tkanki. Można w tym wypadku dokonać mniej rozległej resekcji z uwagi na małą głębokość nacieku i ograniczone zmiany w regionalnych węzłach chłonnych, gdyż prawdopodobieństwo przerzutów do węzłów chłonnych jest mniejsze niż 5%. Niektóre ośrodki onkologiczne na świecie wykonują w powyższych przypadkach zabieg miejscowego wycięcia endoskopowego ogniska raka (endoskopia luminalna). Kwalifikacja do takiego zabiegu musi być niezwykle precyzyjna. Endoskopię luminalną stosuje się wyłącznie w przypadku zmian ograniczonych do błony śluzowej (bez naciekania blaszki mięśniowej śluzówki), które zostały zakwalifikowane, jako typ I (zmiany polipowate) z wyłączeniem zmian typu wrzodziejącego. Metoda ta jest o tyle dyskusyjna, gdyż nawet w przypadku tak wczesnego raka w około 5% przypadków występują już przerzuty w regionalnych węzłach chłonnych. Metodę tę stosują głównie chirurdzy japońscy ze względu na duże doświadczenie i znaczną liczbę wczesnych raków żołądka. Znacznym zagrożeniem dla stosowania takiego postępowania jest fakt, że nie można określić ostatecznie (łącznie z użyciem endoskopowej ultrasonografii), czy zmiana nowotworowa dotyczy tylko błony śluzowej, czy też obejmuje pozostałe

warstwy. W Polsce grupa chorych z wykrytym rakiem żołądka w stopniu Ia stanowi grupę marginalną. Standardowe leczenie chorych na wczesnego raka żołądka obejmuje wykonanie radykalnej, otwartej resekcji żołądka i węzłów chłonnych. Zakres wycięcia węzłów chłonnych w tym wypadku może być mniejszy niż wymagany w operacji raka zaawansowanego. Wystarczające bywa wycięcie w zakresie D1 (grupa I, czyli węzły wzdłuż krzywizny mniejszej i większej w tym węzły okołopustowe i okołodźwiernikowe). Często udaje się wykonać zabieg częściowej resekcji żołądka, zwłaszcza, gdy mamy do czynienia z typem jelitowym.

1.8.2.2. Rak zaawansowany regionalnie

U większości chorych raka żołądka rozpoznaje się właśnie w tym stadium. W tej grupie należy się liczyć z wysokim odsetkiem przerzutów do węzłów chłonnych. Zazwyczaj możliwe jest wykonanie resekcji R0 w odniesieniu zarówno do pierwotnego guza jak i splotu chłonnego, jeśli zastosuje się odpowiednie techniki operacyjne. W szczególnych przypadkach możliwe jest przeprowadzenie resekcji subtotalnej (ograniczony rak typu jelitowego zlokalizowany w dystalnej części żołądka), jednakże obowiązującą metodą chirurgiczną w leczeniu zaawansowanego raka żołądka powinna być totalna gastrektomia, a w przypadku raków bliższej części żołądka i wpustu poszerzona o dystalny odcinek przełyku. Jeżeli chodzi o marginesy operacyjne to najmniejszy wymagany zakres wycięcia zdrowych tkanek (5cm) dotyczy najbardziej dojrzałej postaci raka gruczołowego typu jelitowego. W przypadku raka typu rozlanego margines ten powinien wynosić 7-10cm, gdyż w tym przypadku ryzyko naciekania śródściennego jest wysokie. U wszystkich chorych z rakiem żołądka o zaawansowaniu regionalnym standardem postępowania powinna być limfadenektomia w zakresie D2 (wycięcie węzłów grupy I oraz grupy II, czyli węzłów okolicy pnia trzewnego i jego gałęzi: tętnicy żołądkowej lewej, wątrobowej wspólnej i śledzionowej). U wybranych chorych wykonuje się tzw. poszerzoną limfadenektomię (D3) usuwając dodatkowo węzły zatrzustkowe, krezkowe i okołoaortalne.

Po całkowitym wycięciu żołądka ciągłość przewodu pokarmowego odtwarza się wykonując zespolenie przełyku z wyizolowaną pętlą jelita cienkiego sposobem Roux-Y.

1.8.2.3. Nowotwór rozsiały

W zaawansowanym stadium raka żołądka kompletne usunięcie guza z reguły jest niemożliwe. Zabieg operacyjny spełnia funkcję leczenia paliatywnego. Chociaż w tym przypadku resekcja nie prowadzi do wyleczenia choroby, to jednak pozostaje metodą z wyboru w leczeniu paliatywnym. Wykonuje się częściowe lub całkowite paliatywne wycięcie żołądka. Pojęciem resekcji paliatywnych określa się wszystkie przypadki nieradykalnego wycięcia żołądka. Definicja ta obejmuje dwa rodzaje resekcji: R1 i R2. W przypadku resekcji typu R1 o braku radykalności decyduje ocena mikroskopowa marginesów operacyjnych i stan regionalnych węzłów chłonnych. Natomiast o resekcji typu R2 mówimy wówczas, gdy zakłada się brak radykalności operacji już w momencie jej przeprowadzania.

U chorych, u których ze względu na zaawansowanie nowotworu nie można wykonać resekcji żołądka, przeprowadza się zabiegi paliatywne, takie jak zespolenia omijające żołądkowo-jelitowe, wytwarzanie przetoki odżywczej (gastrostomii), zabiegi udrażniające światło przewodu pokarmowego z użyciem protez samorozprężalnych, laseroterapii czy koagulacji argonowej. Procedury chirurgiczne, które nie prowadzą do kompletnej resekcji żołądka (R0) nie mają wpływu na poprawę wyników leczenia i należy określać, jako paliatywne.

1.8.3. Rokowanie w raku żołądka

Resekcja chirurgiczna pozostaje „złotym standardem” leczenia tego nowotworu zwłaszcza we wczesnym stadium rozwoju, kiedy guz ograniczony jest do błony śluzowej i podśluzowej, a poziom przeżyć 5-letnich wynosi 70-95%. Z powodu skrytego przebiegu wczesnej fazy choroby raka żołądka rozpoznaje się w większości w stadiach bardziej zaawansowanych (T3-T4). W takiej sytuacji przeżywalność 5-letnia jest niezmiennie niska i wynosi 20-30%, nawet jeśli mamy do czynienia z guzem zlokalizowanym, a operację chirurgiczną uznaje się za radykalną.

Wyniki leczenia raka żołądka zależą przede wszystkim od stopnia zaawansowania nowotworu. W grupie chorych z wczesnym rakiem przeżywalność 5-letnia przekracza najczęściej 90%. Pamiętać jednak musimy, że wczesny rak żołądka występuje w warunkach europejskich dość rzadko, a w Polsce jeszcze rzadziej. Poza

optymistycznymi doniesieniami z wybranych, specjalistycznych ośrodków leczenia nowotworów, średnia przeżywalność 5-letnia chorych na raka żołądka wynosi 15-20%.

W zależności od stopnia zaawansowania nowotworu odsetek 5-letnich przeżyć dla raka żołądka wynosi średnio: stopień I 90%, stopień II 60-70%, stopień III 30%, stopień IV 5%.

Chociaż podejmuje się próby stosowania nowych chemioterapeutyków, rokowanie w raku żołądka pozostaje złe. Z uwagi na ograniczone możliwości terapeutyczne i złe rokowanie rak żołądka stanowi ogromne wyzwanie dla współczesnej onkologii.

1.8.4. Współczesne metody terapeutyczne w leczeniu raka żołądka

Resekcja chirurgiczna wciąż pozostaje „złotym standardem” w leczeniu raka żołądka, jednakże pomimo znaczącego postępu medycyny przeżywalność 5-letnia po zabiegu jest w porównaniu z innymi nowotworami niezmiennie niska, nawet, jeśli operację chirurgiczną uznaje się za radykalną. Istnieje silna potrzeba odkrycia alternatywnych strategii i nowych metod leczenia, jak również indywidualizacji metod terapeutycznych.

1.8.4.1. Chemioradioterapia

W 2003 roku opublikowano wyniki badania randomizowanego (INT-0116), w którym wykazano skuteczność pooperacyjnej chemioradioterapii po resekcji całkowitej z powodu raka żołądka [13]. W oparciu o rezultaty badania INT-0116 adjuwantowa chemioradioterapia uznana została za standard w leczeniu chorych na raka żołądka po leczeniu chirurgicznym w Ameryce Północnej.

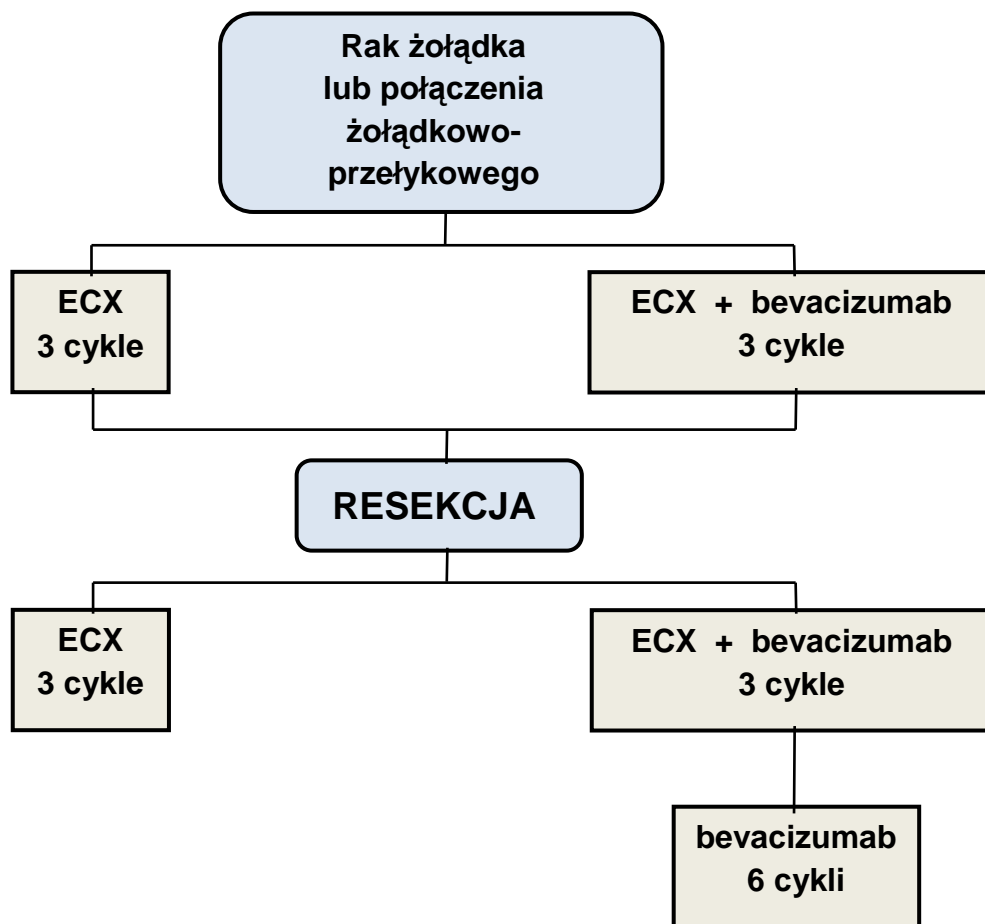
1.8.4.2. Chemioterapia okołoperacyjna

W 2005 roku ujawniono wyniki badania III fazy MAGIC (MCR Adjuvant Gastric Cancer Infusional Chemotherapy) prowadzonego przez UK Medical Research Council oceniającego skuteczność chemioterapii okołoperacyjnej w raku żołądka [14]. W badaniu MAGIC po raz pierwszy wykazano, że u pacjentów leczonych chemioterapią okołoperacyjną (schemat ECF: Epirubicyna, Cisplatylna,

5-Fluorouracyl) przeżywalność całkowita była istotnie wyższa niż w grupie chorych leczonych wyłącznie chirurgicznie (36% vs. 23%). Chemioterapia okołoperacyjna z zastosowaniem schematu ECF uznana została za standard leczenia resekcyjnego raka żołądka w Wielkiej Brytanii i innych krajach Europy Zachodniej.

1.8.4.3. Terapia celowana

Obecnie trwają badania nad zastosowaniem terapii celowanej w raku żołądka z wykorzystaniem leków antyangiogennych i nowych chemioterapeutyków. Optymistyczne wyniki badania MAGIC stały się podstawą do rozpoczęcia nowego badania wieloośrodkowego MRC STO3 (MAGIC-B) (ryc. 1). Celem tego badania jest ocena bezpieczeństwa i skuteczności stosowania przeciwciała monoklonalnego bevacizumab jako dodatek do schematu okołoperacyjnej chemioterapii ECX (Epirubicyna, Cisplatylna, Kapecytabina) u pacjentów z operacyjnym rakiem żołądka i połączenia żołądkowo-przełykowego.



ECX = Epirubicyna, Cisplatyna, Kapecytabina

Rycina 1. Schemat badania randomizowanego III fazy (UK MRC STO3) nad zastosowaniem bevacizumabu w terapii systemowej u pacjentów z resekcyjnym rakiem żołądka [15].

Dotychczas oceniono skuteczność bevacizumabu w badaniach wieloośrodkowych III fazy w kilku różnych typach nowotworów. Dodawanie bevacizumabu do standardowego leczenia wiązało się z istotnym statystycznie polepszeniem przeżyć całkowitych w przypadku raka piersi, jelita grubego i niedrobnokomórkowego raka płuc [16-18].

1.9. Hipoksja w nowotworach litych

Zdolność komórek do przystosowywania się do okresowych wahań poziomu tlenu jest ważna dla ich przeżycia, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych [19]. W większości nowotworów litych mamy do czynienia ze zjawiskiem przewlekłej hipoksji. Jest to spowodowane brakiem naczyń krwionośnych lub też niedorozwojem strukturalnym i funkcjonalnym istniejących naczyń, które nie są w stanie zaopatrzyć w tlen intensywnie proliferującej tkanki nowotworowej [20]. Hipoksja w guzach występuje na skutek wzrostu aktywności metabolicznej i zużycia tlenu przez gwałtownie proliferujące komórki guza oraz spadku pH w otaczającym środowisku [21]. Komórki zlokalizowane najbliżej naczyń są zaopatrywane w relatywnie wysokie stężenie tlenu, które spada w miarę odległości od naczynia. Ten gradient hipoksji (występujący również w fizjologicznych warunkach) w nowotworach jest bardzo nasilony i skutkuje stanem anoksji w rejonie centralnym. Tlen jest zdolny do dyfuzji 100-180 μ m od najbliższej kapilary do komórek zanim ulegnie zmetabolizowaniu [22]. Nowotworom często towarzyszą ogniska martwicy, w których komórki giną na skutek niewystarczającego zaopatrzenia w tlen [23]. Jednakże w nowotworach hipoksja powoduje również selekcję komórek o bardziej złośliwym fenotypie, zdolnych do funkcjonowania w niekorzystnym środowisku.

W warunkach hipoksji dochodzi do aktywacji szeregu procesów przystosowawczych związanych z aktywacją metabolizmu beztlenowego, nasileniem neowaskularyzacji, zmianami regulacji cyklu komórkowego, nasiloną proliferacją. Procesy te mają na celu przystosowanie komórek do przeżycia w trudnych warunkach zmniejszonej podaży tlenu [24]. Dodatkowo hipoksja wywołuje zmiany w matrix międzykomórkowym, wpływa na oddziaływania międzykomórkowe, aktywuje inwazję i migrację [25]. To zwiększa potencjał komórek do inwazji, czyniąc komórki zdolnymi do inicjowania przerzutów. Komórki, które aktywują tą odpowiedź i generują bardziej agresywny fenotyp, podlegają selekcji z populacji guza przez pojawienie się niestabilności genetycznej wywołanej hipoksją [26]. Żeby przeżyć i rosnąć w trudnych warunkach hipoksji komórki aktywują szereg mechanizmów adaptacyjnych: zmiana metabolizmu na beztlenowy, oporność na apoptozę, zdolność do niekontrolowanej replikacji, niestabilność genomowego DNA, unikanie reakcji immunologicznej, indukcja angiogenezy, migracja do regionów mniejszej hipoksji w organizmie. Hipoksja

stymuluje komórki nowotworowe do ekspresji wielu czynników wzrostu, takich jak: EGF, insulina, IGF-1, IGF-2, PDGF, które znane są z tego, że nasilają proliferację komórkową [27].

Z powodu braku efektywnego i adekwatnego rozwoju naczyń krwionośnych we wczesnych fazach rozwoju guza, w szybko rosnącym guzie dochodzi do hipoksji. Chociaż hipoksja jest toksyczna zarówno dla prawidłowych komórek jak i dla nowotworowych, to jednak komórki nowotworowe ulegają szybciej takim zmianom genetycznym i adaptacyjnym, które umożliwiają im unikanie apoptozy i przeżywanie, a nawet rozwijanie się [22, 24]. Hipoksja umożliwia selekcję w czasie wzrostu guza, eliminując komórki prawidłowe a promując komórki z mutacją *P53*, charakterystyczne dla wielu nowotworów litych [28]. Skuteczna adaptacja w zmieniających się warunkach środowiska spełnia decydującą rolę w nowotworzeniu [29].

Od dawna wiadomym jest fakt, że hipoksja powoduje oporność nowotworu na terapię, zarówno radioterapię, jak i chemioterapię [30]. Oporność na radioterapię między innymi wynika z obniżenia powstawania reaktywnych form tlenu w naświetlanej tkance. Oporność na chemioterapię może wynikać ze zmniejszonej dystrybucji leku do regionów słabo unaczynionych, z indukcji oporności wielolekowej, jaka zachodzi w hipoksji oraz faktu, że część cytostatyków wymaga tlenu do pełni działania [30, 31]. Mając na uwadze powyższe fakty nie dziwi korelacja hipoksji ze złym rokowaniem w wielu nowotworach [32]. Zaobserwowano to w nowotworach takich jak: rak piersi, HNSCC, rak płuc, rak jelita grubego, rak szyjki macicy [33-36].

1.10. Czynniki indukowane hipoksją HIF-1

Czynnik indukowany hipoksją HIF-1 (ang. *hypoxia-inducible factor-1*) został poznany w związku z badaniami nad regulacją ekspresji genu erytropoetyny (EPO) [37]. Obecnie wiadomo, że HIF-1 reguluje ekspresję wielu innych genów odpowiedzialnych za szereg procesów fizjologicznych [38]. Główną rolą czynnika transkrypcyjnego HIF-1 jest utrzymywanie homeostazy tlenowej w komórce poprzez udział w adaptacji do zredukowanego poziomu tlenu [39]. W warunkach tych dochodzi do nasilenia przez HIF-1 ekspresji genów odpowiedzialnych za fizjologiczną reakcję komórki na niedotlenienie, a jego obecność potwierdzono w wielu typach komórek [37, 40].

1.10.1. Budowa czynnika HIF-1

Aktywny transkrypcyjnie czynnik HIF-1 jest kompleksem składającym się z dwóch podjednostek: HIF-1 α i HIF-1 β . Stwierdzono występowanie trzech genów dla podjednostek HIF- α : *HIF-1 α* , *HIF-2 α* i *HIF-3 α* , spośród których główną rolę w regulacji transkrypcji spełniają *HIF-1 α* i *HIF-2 α* , natomiast rola *HIF-3 α* jest nieokreślona. HIF-1 α jest syntetyzowany w największej ilości w wielu komórkach gdzie funkcjonuje jako główny regulator homeostazy tlenowej [41].

HIF-1 jest heterodimerem zbudowanym z podjednostki HIF-1 α i podjednostki HIF-1 β , zwanej pierwotnie ARNT (ang. *aryl hydrocarbon nuclear translocator*) [37, 42] (ryc. 2). Obie podjednostki zawierają domenę helisa-pętla-helisa bHLH (ang. *basic helix-loop-helix*) oraz domenę PAS (PER-ARNT-SIM) [37]. Obie domeny odpowiadają za proces dimeryzacji i wiązanie HIF-1 z DNA. Podjednostka HIF-1 α zawiera dwie domeny transaktywacji: N-TAD i C-TAD (ang. *transactivation domains*, TAD), podczas gdy podjednostka HIF-1 β zawiera tylko jedną domenę TAD. Za stabilność podjednostki HIF-1 α odpowiada domena ODDD (ang. *oxygen-dependent degradation domain*), która zawiera dwie reszty prolinowe w pozycji 402 i 564. Dwie domeny transaktywacji (CTAD i NTAD) odpowiadają za transaktywację HIF-1 α poprzez oddziaływanie z koaktywatorami CBP/p300 (ryc. 2).

Fizjologiczna aktywność czynnika indukowanego hipoksją HIF-1 zależy od ilości i aktywności podjednostki HIF-1 α . Ilość podjednostki HIF-1 β utrzymuje się na względnie stałym poziomie i nie jest uzależniona od wahań poziomu tlenu [37, 43]. Ilość i aktywność podjednostki HIF-1 α natomiast ulega zmianom w zależności od aktualnego zaopatrzenia komórki w tlen [44]. Podjednostka HIF-1 α jest więc białkiem regulatorowym decydującym o aktywności czynnika indukowanego hipoksją HIF-1.

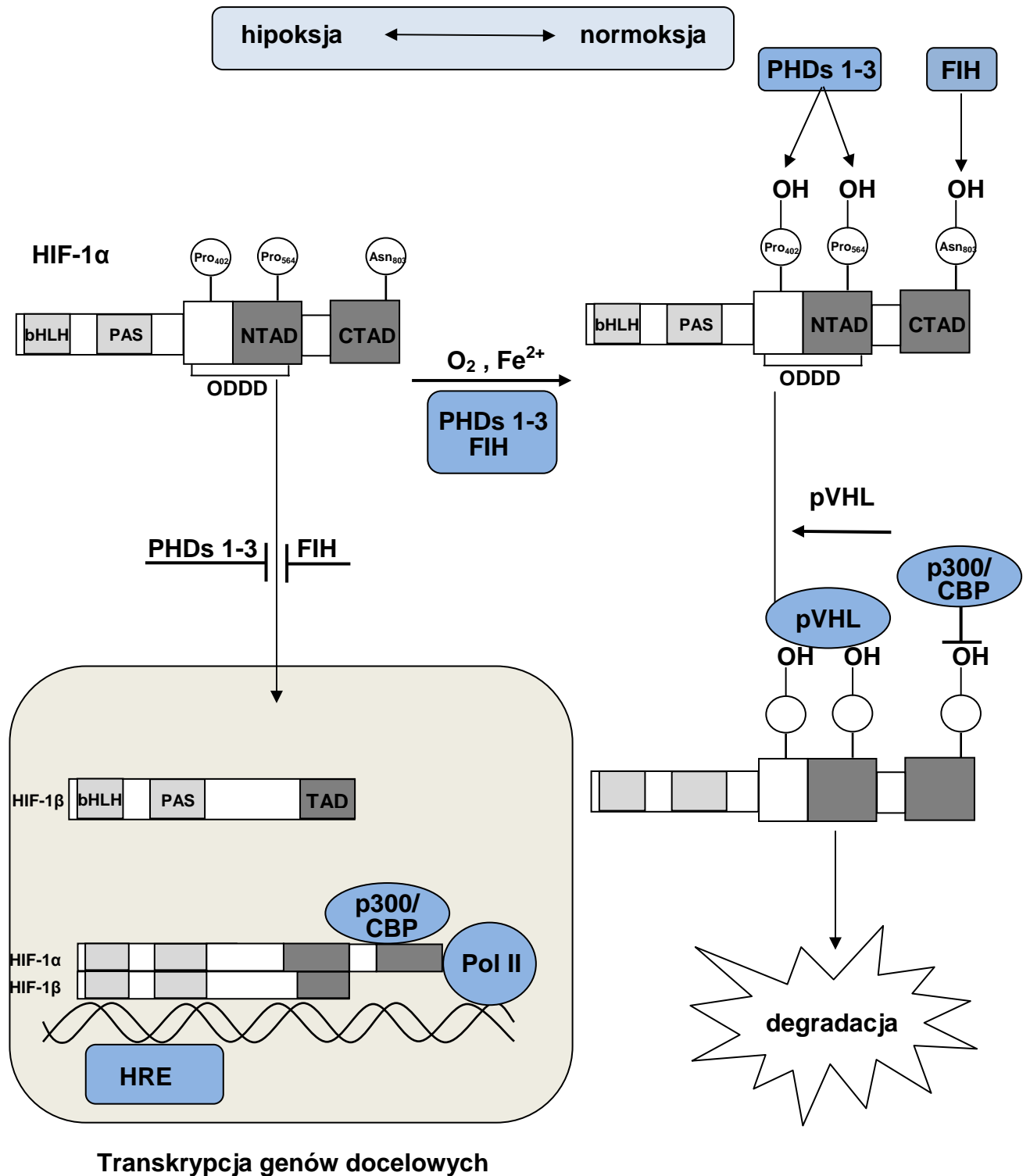
2.10.1. Regulacja podjednostki HIF-1 α w zależności od dostępu tlenu w komórce

W warunkach normoksji podjednostka HIF-1 α ma bardzo krótki okres półtrwania ($t_{1/2} = 5\text{min}$) [45]. W komórce ulega ona ciągłej syntezie i degradacji na skutek modyfikacji potranslacyjnych wpływających na jej stabilność i aktywność transkrypcyjną [46]. Modyfikacje te odbywają się z udziałem enzymów z grupy hydroksylaz i zależą ściśle od poziomu tlenu w komórce [47].

Stabilność, a zarazem ilość podjednostki HIF-1 α , jest kontrolowana poprzez *trans*-4-hydroksylację jednej lub dwóch konserwatywnych reszt prolinowych (Pro402 i Pro564) w domenie ODDD podjednostki HIF-1 α [48-50] (ryc. 2). Reakcję tą przeprowadzają enzymy z grupy hydroksylaz prolinowych (PHD1-3). O nasileniu reakcji decyduje stężenie tlenu. Hydroksylacja reszt prolinowych stwarza warunki do połączenia się podjednostki HIF-1 α z czynnikiem VHL (von Hippel-Lindau), będącym produktem genu supresorowego *VHL*. Ta interakcja umożliwia rozpoznanie i przyłączenie kompleksu ligazy ubikwitynowej E3. Prowadzi to w efekcie końcowym do ubikwitynozależnej degradacji podjednostki HIF-1 α w proteasomach [39, 46, 51-52] (ryc. 2).

Aktywność podjednostki HIF-1 α jest regulowana także poprzez hydroksylację reszty asparaginylowej (Asn803) w domenie CTAD podjednostki HIF-1 α . Reakcję tą przeprowadza czynnik FIH (ang. *factor inhibiting HIF-1*) będący hydroksylazą asparaginylową [53] (ryc. 2). Modyfikacja ta uniemożliwia przyłączenie kompleksu p300/CBP będącego koaktywatorem transkrypcyjnym oddziaływującym z domeną CTAD HIF-1 α [54]. W rezultacie w obecności tlenu w komórce nie dochodzi do transaktywacji z udziałem HIF-1 α . Reasumując, w warunkach normoksji dochodzi do degradacji podjednostki HIF-1 α oraz hamowania aktywności transkrypcyjnej HIF-1.

W warunkach hipoksji aktywność enzymów z grupy PHDs spada, co uniemożliwia degradację podjednostki HIF-1 α , a proces jego transaktywacji nie jest hamowany przez FIH. Wobec tego dochodzi do stabilizacji podjednostki HIF-1 α , która ulega kumulacji i translokacji do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do jej połączenia z podjednostką HIF-1 β . Po połączeniu się podjednostek HIF-1 α i HIF-1 β powstaje heterodimeryczne białko HIF-1 będące czynnikiem transkrypcyjnym, który oddziałuje z innymi kofaktorami transkrypcyjnymi, takimi jak p300 [37]. Kompleks ten następnie stymuluje transkrypcję genów docelowych poprzez przyłączenie się do specyficznej sekwencji DNA, tzw. rejonu odpowiedzi na hipoksję HRE (ang. *HIF Responsive Element*): 5'-RCGTG-3'(R-puryna [A lub G]) zlokalizowanej w regionach promotorów i enhancerach genów docelowych [55-57] (ryc. 2).



Rycina 2. Regulacja podjednostki HIF-1α poprzez hydroksylację w zależności od poziomu tlenu. W podjednostce HIF-1α znajdują się trzy miejsca hydroksylacji: dwie reszty prolinowe w domenie ODDD (Pro402 i Pro564) oraz reszta asparaginyłowa w domenie CTAD (Asn803). W obecności tlenu ulegają one hydroksylacji z udziałem enzymów z grupy PHDs oraz FIH (opis w tekście).

1.10.3. Procesy regulowane przez HIF-1

Badania molekularnych mechanizmów regulujących syntezę erytropoetyny (EPO), jednego z najważniejszych mechanizmów odpowiedzi na hipoksję, umożliwiło po raz pierwszy identyfikację transkrypcyjnego czynnika indukowanego hipoksją HIF-1. Gdy zawartość tlenu we krwi jest niska (np. w anemii) produkcja EPO przez fibroblasty nerkowe gwałtownie wzrasta, co stymuluje erytropoezę szpikową. Najlepiej scharakteryzowanym na podłożu molekularnym mechanizmem odpowiedzi komórki na hipoksję jest aktywacja transkrypcji szeregu genów [32, 58-59]. Okazało się, że HIF-1 jest regulatorem wielu innych niż tylko erytropoeza procesów komórkowej i systemowej odpowiedzi na hipoksję. HIF-1 jako czynnik transkrypcyjny nasila bezpośrednio lub pośrednio transkrypcję wielu genów aktywowanych w warunkach hipoksji [37]. Geny docelowe dla HIF-1 mające sekwencję HRE kodują białka umożliwiające komórce przeżycie w warunkach deficytu tlenu. Geny aktywowane przez HIF-1 uczestniczą w procesach zarówno fizjologicznych jak i patologicznych, takich jak: adaptacja metabolizmu, erytropoeza, angiogeneza, wzrost i różnicowanie się komórek, apoptoza, metabolizm glukozy [27, 60-61].

Istotne dla rozwoju nowotworu są zwłaszcza takie zjawiska jak: oporność na chemio- i radioterapię [62], niestabilność genetyczna (MSI) [63], modyfikacja układu immunologicznego [64], inwazyjność i przerzutowość [65-66], regulacja pH [67] (tabela 4). Spośród tych procesów najbardziej fundamentalne wydają się być angiogeneza i zdolność do dawania przerzutów odległych.

Produkcja czynnika indukowanego hipoksją (HIF-1) prowadzi do nasilenia transkrypcji *VEGF* [68]. VEGF powoduje wzrost przepuszczalności naczyń, migrację komórek endotelialnych i proliferację. Hipoksja spełnia kluczową rolę w regulacji ekspresji VEGF. W warunkach normoksji HIF-1 α ulega ubikwityno-zależnej degradacji przez proteasomy - proces kontrolowany przez produkt genu supresorowego *VHL* [52,69].

Hipoksja zwiększa produkcję innych czynników proangiogennych, takich jak: tlenek azotu (NO), płytkowy czynnik wzrostu (PDGF), transformujący czynnik wzrostu (TGF) alfa i beta, czynnik wzrostu dla fibroblastów (bFGF) oraz grupę białek zwanych angiopoetynami (ANG) (ang. *angiopoietin*) [70].

Tabela 4. Wybrane geny docelowe regulowane z udziałem HIF-1, których produkty biorą udział w progresji nowotworów.

Produkt genu	Rola w progresji nowotworu
VEGF, PlGF	Angiogeneza
CXCR4, SDF-1	Migracja komórek / przerzuty odległe / angiogeneza
C-MET, HGF	Inwazyjność / przerzutowość
MSH2, MSH6	Niestabilność genetyczna
CAIX, CAXII	Regulacja Ph
P53	Apoptoza
E-kadheryna	Inwazyjność / przerzutowość
LDH, GLUT-1, GLUT-3	Metabolizm beztlenowy / wychwyt glukozy
VEGF, FGF, PDGF, IGF-2, TGF- α	Proliferacja
VEGF, VEGFR-1	Przepuszczalność naczyń
NOS	Wazodylatacja
uPAR, MMP2, MMP14	Inwazyjność
Surwiwina	Przeżywalność
Telomeraza	Unieśmiertelnienie
ANG 2	Angiogeneza / limfangiogeneza
Endotelina 1, Fibronektyna 1	Inwazyjność

1.10.4. Rola czynnika HIF-1 w nowotworach litych

HIF-1 wpływa pozytywnie na wzrost guzów litych [71, 72]. HIF-1 α ulega nadekspresji w wielu nowotworach, wliczając rak piersi i HNSCC (ang. *head and neck squamous cell carcinoma*) [73]. Nadekspresja ta odpowiada za wzrost guza, koreluje ze złą prognozą, opornością na chemio- i radioterapię, zwiększoną śmiertelnością [24, 74, 75]. HIF-1 jest niezależnym czynnikiem predykcyjnym złego rokowania w niektórych nowotworach [76].

Analizy immunohistochemiczne nowotworów ujawniły zwiększoną, w porównaniu z normalną tkanką, ekspresję HIF-1 α w większości guzów pierwotnych oraz ich przerzutach [73, 77]. Ekspresja HIF-1 α koreluje ze stopniem złośliwości i rozwojem naczyń [78].

Mechanizmy regulujące aktywację HIF-1 w nowotworach są bardzo złożone. Wewnątrznowotworowa hipoksja jest głównym czynnikiem zwiększającym poziom HIF-1 α w komórkach nowotworowych. Aktywność HIF-1 α może być regulowana nie tylko w zależności od aktualnego poziomu tlenu, ale również na skutek inaktywacji wielu genów supresorowych, która prowadzi albo do wzrostu syntezy HIF-1 α albo do spadku jego degradacji. Znakomitym przykładem jest aktywacja HIF-1 α na skutek mutacji genu *VHL* i utraty funkcji przez produkt tego genu [79].

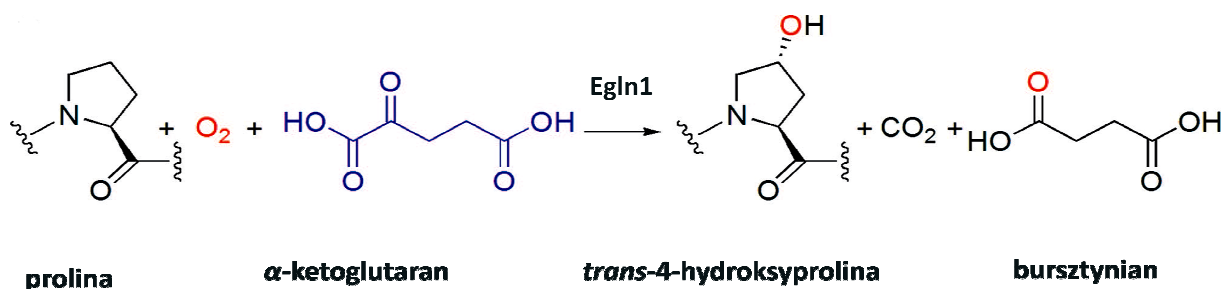
Podsumowując, HIF-1, a ściślej mówiąc jego podjednostka regulatorowa HIF-1 α , jest czynnikiem zaangażowanym w rozwój charakterystycznego fenotypu komórkowego nowotworu wpływając na jego wzrost, inwazyjność i przerzutowość.

1.11. Regulacja aktywności czynnika HIF-1 poprzez hydroksylację

Do enzymów będących hydroksylazami HIF-1 zaliczamy obecnie trzy hydroksylazy prolinowe PHDs (ang. *prolyl hydroxylase domain proteins*) [80, 81] oraz hydroksylazę asparaginylową FIH (ang. *factor inhibiting HIF-1*).

1.11.1. Budowa i znaczenie hydroksylaz prolinowych (PHDs)

PHDs należą do rodziny dioksygenaz, których aktywność enzymatyczna wymaga Fe²⁺, 2-ketoglutaranu i O₂ [80]. Wśród hydroksylaz prolinowych wyróżniono trzy izoenzymy: PHD1 (EGLN2); PHD2 (EGLN1); PHD3 (EGLN3). PHD1, PHD2 i PHD3 składają się odpowiednio z 407, 426 i 239 aminokwasów i zawierają bardzo konserwatywną domenę w końcu karboksylowym [82]. Na skutek alternatywnego splicingu powstają izoformy poszczególnych PHDs, których rola nie została dotąd ustalona. Podobnie jak w przypadku innych dioksygenaz do funkcji enzymatycznej hydroksylaz prolinowych wymagana jest obecność: Fe²⁺, 2-ketoglutaranu oraz O₂ [50, 58] (ryc. 3).



Rycina 3. Schemat reakcji hydroksylacji reszt prolinowych z udziałem enzymów z grupy hydroksylaz prolinowych.

Dioksygenazy katalizują inkorporację atomu tlenu do substratu formując grupę hydroksylową. W reakcji tej powstaje dwutlenek węgla (CO₂) oraz bursztynian jako produkty dekarboksylacji α-ketoglutaranu (ryc. 3) [50]. Poziom aktywności enzymów z grupy hydroksylaz prolinowych wzrasta niemal liniowo w zależności od stężenia tlenu w komórce [83]. Wykazano, że w warunkach *in vitro* wszystkie PHDs wykazują zdolność do hydroksylacji podjednostki HIF-1α [80]. Jednakże głównym regulatorem HIF-1α jest hydroksylaza prolinowa PHD2 (EGLN1) [84, 85].

Analiza ekspresji izoform PHDs w poszczególnych tkankach wykazała, że ekspresja mRNA *PHD2* jest obecna we wszystkich tkankach, szczególnie wysoka w tkance tłuszczowej i sercu, podczas gdy ekspresja *PHD1* i *PHD3* wykazuje większą specyficzność tkankową [86]. Ekspresja mRNA *PHD1* jest duża w tkance łożyska i jąder, podczas gdy prawie nie występuje w mózgu, wątrobie, sercu i tkance tłuszczowej. Ekspresja mRNA *PHD3* jest istotnie wyższa w sercu i łożysku [86, 87]. Hydroksylazy prolinowe różnią się również między sobą preferencją do podjednostek HIF-1α oraz HIF-2α. Mianowicie, PHD3 głównie reguluje podjednostkę HIF-2α, podczas gdy PHD2 wykazuje stosunkowo większy wpływ na regulację podjednostki HIF-1α niż HIF-2α [85]. Stwierdzono, że PHD2 jest dominującą hydroksylazą i odgrywa najważniejszą rolę w regulacji HIF-1α w większości komórek w warunkach normoksji i niewielkiej hipoksji [84, 85]. W późniejszym badaniu okazało się, że PHD2 wpływa na zmniejszenie aktywności transkrypcyjnej HIF-1α również w warunkach hipoksji [88].

1.11.2. Znaczenie FIH w regulacji HIF-1 α

Wkrótce po wyjaśnieniu mechanizmów regulujących trwałość HIF-1 α z udziałem hydroksylaz prolinowych zależnych od tlenu odkryto również mechanizm regulujący aktywność transkrypcyjną HIF-1 poprzez hydroksylację reszty asparaginowej z udziałem czynnika FIH [54]. Hydroksylacja reszty Asn803 czynnika HIF-1 α hamuje jego aktywność transkrypcyjną poprzez blokowanie interakcji pomiędzy koaktywatorami transkrypcji, takimi jak p300/BP, wiążącymi się z domeną CTAD podjednostki HIF-1 α [53] (ryc. 2). Co ciekawe dotychczas nie stwierdzono innych, poza podjednostkami HIF- α , substratów dla PHDs i FIH.

1.12. Czynniki VHL

1.12.1. Rola VHL w regulacji HIF-1 α

VHL jest genem supresorowym o lokalizacji chromosomowej 3p25-p26. Białko pVHL spełnia rolę komponentu rozpoznającego kompleks ligazy ubikwitynowej E3, który uczestniczy w procesie degradacji podjednostki α czynnika HIF-1 (ryc. 2). Proces ten ulega zaburzeniu w jednostkach chorobowych, w których dochodzi do mutacji genu *VHL*.

1.12.2. Występowanie zaburzeń VHL w nowotworach i ich znaczenie

VHL jest genem supresorowym, którego mutacja wywołuje i jest obecna w większości sporadycznych raków jasnokomórkowych nerki (ang. *renal cell carcinoma* - *RCC*). Rak nerki u pacjentów cierpiących na chorobę von Hippel-Lindau jak również większość sporadycznych raków jasnokomórkowych nerki jest związana z utratą funkcji obu alleli (mutacje, delecje, utrata heterozygotyczności, hipermetylacja wysp CpG promotora) genu *VHL*, co skutkuje stabilizacją HIF-1 α i aktywacją genów odpowiedzi na hipoksję. Występowanie zaburzeń genetycznych w obrębie *VHL* już we wczesnych etapach nowotworzenia (torbiele nerkowe) może świadczyć o tym, że do dalszego rozwoju i progresji w kierunku raka konieczne jest wystąpienie zaburzeń w innych genach [89].

Jednym z charakterystycznych elementów guzów, w których stwierdza się mutację *VHL* jest ich wybitne unaczynienie, które wynika z nadekspresji VEGF stymulowanej przez aktywny HIF-1, który nie ulega degradacji w mechanizmie zależnym od *VHL* [90]. Mutacja genu *VHL*, negatywnego regulatora HIF-1 α , występuje w guzach, w których wykazano nadekspresję HIF-1 α [91].

W raku żołądka często obserwuje się zjawisko utraty heterozygotyczności LOH (ang. *loss of heterozygosity*) w regionie 3p25-26, gdzie zlokalizowany jest gen *VHL* [92]. Białko pVHL ulega ekspresji w większości tkanek i typów komórek, wliczając w to komórki nabłonkowe przewodu pokarmowego, dlatego sugeruje się, że utrata funkcji pVHL może być powiązana z nowotworzeniem [93].

1.12.3. Choroba von Hippel-Lindau

Choroba von Hippel-Lindau jest zespołem zwiększonej genetycznej predyspozycji do nowotworów i dziedziczy się autosomalnie dominująco. Spowodowana jest mutacją germinálną genu *VHL*. Zespół ten cechuje się występowaniem charakterystycznych nowotworów i zmian narządowych: naczyniaki zarodkowe mózdzku i rdzenia kręgowego (ang. *cerebellar haemangioblastoma*); naczyniaki zarodkowe siatkówki (ang. *retinal haemangioblastoma*); rak jasnokomórkowy nerki (ang. *renal cell carcinoma*); guz chromochłonny nadnerczy (ang. *pheochromocytoma*); guzy neuroendokrynne; torbiele i torbielakogruczolaki (cystadenoma) nerek, trzustki i najądrza [94]. Nowotwory związane z chorobą *vHL* w odróżnieniu od nowotworów niedziedzicznych rozwijają się często obustronnie, wieloogniskowo i w zdecydowanie młodszym wieku.

1.13. Angiogeneza

1.13.1. Rys historyczny

Terminem „angiogeneza” po raz pierwszy posłużył się w 1787 roku brytyjski chirurg John Hunter [95]. Pionierem badań naukowych nad angiogenezą w guzach nowotworowych był Judah Folkman. W 1971 dokonał przełomowego odkrycia, że wzrost guza jest ściśle związany z rozwojem nowych naczyń, które opublikował na łamach *New England Journal of Medicine* [96]. Jest on również odkrywcą czynnika

odpowiedzialnego za angiogenezę, który nazwał „tumor angiogenic factor” (TAF) [97]. Od czasu tego przełomowego doniesienia odkryto szereg czynników odpowiedzialnych za proces tworzenia nowych naczyń oraz poznano ich rolę fizjologiczną oraz wpływ na progresję nowotworów. W 1975 roku odkryto pierwszy inhibitor angiogenezy [98]. W 1989 roku odkryto białko mitogenne tylko dla komórek endotelialnych VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) [99]. Ostatnio niezwykłą popularność w onkogenezie zyskała teoria „angiogenic switch”, w myśl której na pewnym etapie rozwoju guza dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy czynnikami proangiogennymi i antyangiogennymi na korzyść tych pierwszych. Od czasu odkrycia VEGF w 1989 roku rozpoczęto intensywne badania nad wykorzystaniem nowych metod diagnostycznych, a w ostatnich latach również terapeutycznych opartych na blokowaniu angiogenezy za pomocą przeciwciał monoklonalnych.

1.13.2. Współczesna definicja angiogenezy

Zgodnie ze współczesną definicją angiogeneza (neowaskularyzacja) to wieloetapowy proces powstawania nowych naczyń krwionośnych z naczyń już istniejących i prekursorów komórek endotelialnych. Jest to warunek konieczny prawidłowego rozwoju embrionalnego, umożliwia prawidłowy wzrost i rozwój tkanek, odpowiada za szereg procesów fizjologicznych, tj. gojenie się ran, owulacja, cykl menstruacyjny, ciąża. O nasileniu angiogenezy decyduje stan równowagi dynamicznej pomiędzy czynnikami proangiogennymi i antyangiogennymi. W zależności od tego, które czynniki dominują, ma miejsce indukcja lub zahamowanie angiogenezy. Pojęcie angiogenezy jest bardzo ogólne, obejmuje bowiem zarówno stany fizjologiczne jak również procesy patologicznego rozwoju naczyń występujące w licznych jednostkach chorobowych. Nadmierna i niejednokrotnie patologiczna neowaskularyzacja została opisana w wielu jednostkach chorobowych: retinopatia cukrzycowa; choroby o etiologii autoimmunologicznej, reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczyca. Z drugiej strony zmniejszona, czy też niewydolna angiogeneza może odpowiadać za rozwój chorób takich jak: choroba niedokrwienna serca, przewlekłe niedokrwienie kończyn dolnych, udar mózgu itp.

W nazewnictwie obowiązuje również termin ‘neoangiogeneza’, który odnosi się do wytwarzania nowych naczyń krwionośnych w środowisku guza nowotworowego [100, 101].

1.13.3. Neoangiogeneza

Neoangiogeneza to proces wytwarzania nowych naczyń w środowisku guza nowotworowego. Wzrost masy nowotworu jest zależny bezpośrednio od naczyń.

Opisano kilka mechanizmów rozwoju naczyń w nowotworach litych: „pączkowanie” (ang. *sprouting angiogenesis*), podział „naczynia matki” (ang. *splitting angiogenesis*) oraz „waskulogeneza” (ang. *vasculogenesis*) [102].

- „pączkowanie” polega na tworzeniu się i formowaniu kolumn komórek endotelialnych (ang. *endothelial spouts*), których stopniowe wydłużanie odbywa się w kierunku skupiska komórek nowotworowych prowadząc ostatecznie do powstawania zamkniętych pętli i sieci naczyń włosowatych. Ten mechanizm neoangiogenezy jest więc odpowiedzią lokalną zależną od istniejących już naczyń krwionośnych. Jest to mechanizm dominujący w przebiegu nowotworzenia i najlepiej jak dotąd poznany.

- „podział naczynia matki” poprzez wewnątrznaczyniowe przegrody śródbłonkowe generujące liczne rozgałęzienia naczyń krwionośnych jest również przykładem odpowiedzi lokalnej.

- „waskulogeneza” jest *de novo* formowaniem się nowych naczyń krwionośnych poprzez mobilizację i napływ komórek macierzystych szpiku – BMDCs (ang. *bone marrow-derived cells*) [103]. Waskulogeneza bywa często pojęciem stosowanym zamiennie z angiogenezą. Z uwagi jednak na podstawową różnicę w mechanizmie powstawania naczyń należy te pojęcia rozróżniać. Nowe naczynia w przypadku waskulogenezy powstają z wywodzących się ze szpiku kostnego prekursorowych komórek śródbłonka krążących we krwi – EPCs (ang. *endothelial progenitor cells*). Nieznane są wciąż szczegółowe mechanizmy stymulujące i mobilizujące komórki progenitorowe do opuszczania szpiku i wbudowywania się w rejony guza nowotworowego umożliwiając tworzenie nowych naczyń. W warunkach fizjologicznych waskulogeneza występuje podczas embriogenezy umożliwiając powstawanie układu naczyniowego w rozwijającym się organizmie.

1.13.4. Rodzina białek VEGF

Wieloletnie badania nad molekularnymi mechanizmami regulującymi angiogenezą przyczyniły się do poznania szeregu czynników proangiogennych, z których naczyniowy czynnik wzrostu komórek endotelialnych VEGF (ang. *vascular*

endothelial growth factor) jest najważniejszym i najlepiej poznanym [70, 104]. Do rodziny białek VEGF zalicza się następujące czynniki wzrostu: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D oraz PlGF [100, 101, 105, 106]. Na dodatek opisano kilka izoform VEGF-A, VEGF-B i PlGF powstałych na skutek alternatywnego splicingu pre-mRNA [107]. Odkryto trzy receptory wiążące ligandy VEGF, będące receptorami kinazy tyrozynowej. Należą do nich: VEGFR-1, VEGFR-2 i VEGFR-3 (ryc. 4) [105]. W interakcji białek rodziny VEGF z ich receptorami odgrywają także rolę białka ko-receptorowe zwane neuropilinami (Nrp-1 i Nrp-2) [107-109].

Gen *VEGF-A* zawiera 8 eksonów i 7 intronów [110, 111]. VEGF-A odgrywa kluczową rolę w angiogenezie, łącząc się i aktywując receptory VEGF-1 i VEGF-2, ale nie VEGF-3 [107] (ryc. 4). Na skutek alternatywnego splicingu powstaje co najmniej 9 izoform różniących się ilością aminokwasów, z czego najważniejsze są VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉, i VEGF-A₂₀₆ [99, 112, 113]. Izoforma VEGF-A₁₆₅ jest dominująca pod względem ilości oraz aktywności biologicznej, stwierdza się jej nadekspresję w wielu nowotworach. VEGF-A pierwotnie został odkryty i opisany jako tzw. czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń (ang. *vascular permeability factor-VPF*) wydzielany przez komórki nowotworowe [114].

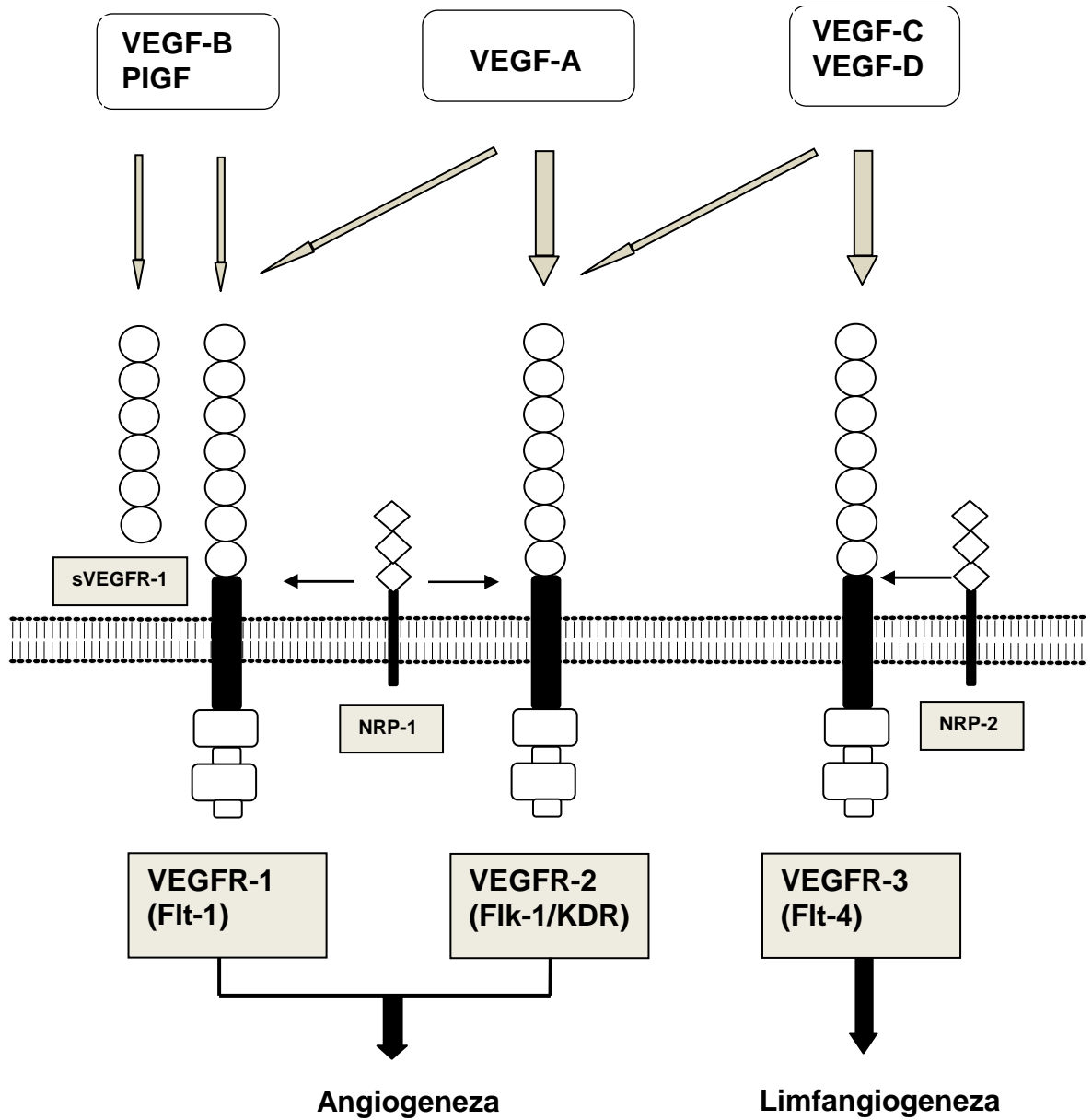
Gen *VEGF-B* zawiera 7 eksonów, na skutek alternatywnego splicingu powstają dwie izoformy VEGF-B₁₆₇ i VEGF-B₁₈₆ [115]. VEGF-B wiąże się z receptorem VEGFR-1, jednakże jego rola nie została w pełni ustalona, najprawdopodobniej nie ma on znaczenia w angiogenezie [116].

Gen *VEGF-C* zawierający 8 eksonów nie ulega alternatywnemu splicingowi. Ligand VEGF-C wiąże się z receptorem VEGFR-2 i VEGFR-3 (ryc. 4) i przede wszystkim odpowiada za rozwój naczyń limfatycznych w rozwoju embrionalnym oraz w przebudowie naczyń chłonnych w dorosłym organizmie [117]. VEGF-C nie odgrywa istotnej roli w tworzeniu naczyń krwionośnych [118].

Gen *VEGF-D* zawiera 7 eksonów i znajduje się na chromosomie X [119]. VEGF-D wiąże się z receptorami VEGFR-2 i VEGFR-3 (ryc. 4) i odgrywa podobną rolę do VEGF-C, jednakże jego brak jest skutecznie zastępowany przez VEGF-C [120, 121].

VEGF-C i VEGF-D spełniają zatem w warunkach fizjologicznych kluczową rolę w rozwoju naczyń chłonnych w okresie embriogenezy oraz u dorosłych osobników. Prawdopodobnie mogą one wpływać na proliferację naczyń krwionośnych w warunkach patologicznych, np. w nowotworach, ale ich rola wymaga dalszych badań.

Gen czynnika wzrostu łożyska *PlGF* (ang. *placental growth factor*) zawiera 7 eksonów i na skutek alternatywnego splicingu powstają 4 izoformy [122, 123]. Czynniki te ulegają ekspresji głównie w łożysku, ale znaleziono go również w sercu, siatkówce, skórze i mięśniach [107].



Rycina 4. Receptory białek rodziny VEGF oraz ich ligandy.

1.13.5. Receptory białek rodziny VEGF

Receptory VEGFR różnią się funkcją, jednak są strukturalnie bardzo podobne do siebie i zawierają 7 domen w regionie zewnątrzkomórkowym, pojedynczą domenę przezbłonową oraz wewnątrzkomórkową domenę kinazy tyrozynowej [124, 125] (ryc. 4). VEGFR-1 i VEGFR-2 wiążą VEGF-A i odgrywają kluczową rolę w regulacji angiogenezy, podczas gdy VEGFR-3 wykazuje wysokie powinowactwo do VEGF-C i VEGF-D stymulując limfangiogenezę [126, 127] (ryc. 4).

VEGFR-1, znany również jako fms-like tyrosyl kinase-1 (Flt-1) wiąże VEGF-A, VEGF-B i PlGF [128, 129]. Wykazuje on silne powinowactwo do VEGF-A, jednakże aktywność kinazy tyrozynowej tego receptora jest niska, około 10 razy niższa od receptora VEGFR-2. W rezultacie VEGFR-1 bardzo słabo stymuluje proliferację komórek endotelialnych w warunkach fizjologicznych. Sugeruje się rolę VEGFR-1 w hamowaniu angiogenezy poprzez silne wiązanie VEGF-A, co zmniejsza jego lokalne stężenie i zapobiega aktywacji innych receptorów, zwłaszcza VEGFR-2 [130]. Inny opisany mechanizm hamowania VEGF polega na jego trwałym wiązaniu przez rozpuszczalną formę receptora VEGFR-1 (sVEGFR-1), która powstaje w wyniku alternatywnego splicingu [131] (ryc. 4).

Ekspresja VEGFR-1 poza komórkami endotelialnymi jest także charakterystyczna dla komórek progenitorowych śródbłonna naczyń oraz monocytów i makrofagów, a przez to wpływa na migrację i rekrutację tych komórek do regionów o wzmożonej angiogenezie [132-135]. Makrofagi, które w efekcie oddziaływania VEGF-A/VEGFR-1 migrują do tkanki nowotworowej lub ogniska zapalenia stymulują patologiczną angiogenezę i limfangiogenezę poprzez wydzielanie VEGF-A, VEGF-C oraz innych cytokin [136-138]. Podkreśla się rolę VEGFR-1 w angiogenezie w okresie embrionalnym, jednak u dorosłych organizmów funkcja tego receptora głównie opiera się na negatywnej regulacji aktywności VEGFR-2, za pośrednictwem którego dochodzi do stymulacji angiogenezy.

VEGFR-2, znany jako fetal liver kinase-1 (Flk-1) / Kinase Domain-containing Receptor (KDR), jest kluczowym mediatorem angiogenezy indukowanej VEGF i jego ekspresja dotyczy przede wszystkim naczyń krwionośnych [139, 140]. Wykazuje on silną aktywność kinazy tyrozynowej, chociaż jego zdolność do wiązania VEGF-A jest o 1 rząd wielkości słabsza niż VEGFR-1. Aktywność VEGFR-2 jest niezbędna zarówno w rozwoju embrionalnym jak i postnatalnym. Aktywacja tego receptora prowadzi nie

tylko do nasilenia proliferacji komórek endotelialnych, ale również stymuluje migrację tych komórek, zmiany morfogenetyczne rozwijających się naczyń, np. ich przepuszczalność [141, 142]. VEGFR-2 wiąże wszystkie izoformy VEGF-A oraz VEGF-C i VEGF-D (ryc. 4). Opisano również formę rozpuszczalną VEGFR-2, powstałą w wyniku alternatywnego splicingu, której rola polega na hamowaniu limfangiogenezy [143, 144].

VEGFR-3 (Flt-4) (ang. *fms-like tyrosyl kinase-4*) preferencyjnie wiąże VEGF-C i VEGF-D i jego ekspresję wykazują przede wszystkim komórki endotelialne naczyń limfatycznych, co wskazuje na rolę VEGFR-3 w postnatalnej limfangiogenezie [145, 146] (ryc. 4). Badania wykazały również ekspresję VEGFR-3 i jego rolę w komórkach endotelialnych naczyń krwionośnych. [147].

1.13.6. Znaczenie neoangiogenezy w progresji nowotworów

1.13.6.1. Mechanizmy powstawania naczyń w nowotworze

Angiogeneza odgrywa szczególną rolę w nowotworzeniu. Wyniki badań wskazują, że dalszy rozwój nowotworu po osiągnięciu średnicy 2mm wymaga neoangiogenezy [102]. Dochodzi wówczas do kluczowego zjawiska „angiogenic switch” przez co autorzy rozumieją zaburzenie równowagi pomiędzy endogennymi aktywatorami a inhibitorami angiogenezy na korzyść tych pierwszych. W komórkach nowotworowych, na skutek szeregu mutacji i zaburzeń genetycznych, dochodzi do zwiększenia produkcji białek proangiogennych, wśród których VEGF spełnia kluczową rolę.

Neoangiogeneza jest procesem wieloetapowym. Obejmuje ona aktywację komórek śródbłonna wewnątrz istniejących naczyń, proteolizę błony podstawnej i składników macierzy międzykomórkowej, odłączenie się komórek śródbłonna od pericytów i błony podstawnej oraz ich migrację w kierunku stymulatorów angiogenezy. Aktywowane komórki śródbłonna ulegają proliferacji, dochodzi do formowania się światła i pętli nowych naczyń. Powstaje również błona podstawna i następuje rekrutacja pericytów.

W środowisku guza dochodzi do miejscowej aktywacji procesów krzepnięcia i przechodzenia fibrynogenu do przestrzeni pozanaczyniowej. Złogi fibrynowe w przestrzeni pozanaczyniowej zapewniają rusztowanie ułatwiające wzrost nowych

naczyń, a z drugiej strony stanowią barierę dla migracji komórek śródbłonka i zwiększają gradient hipoksji. Lokalne niedotlenienie nasila w komórkach mikrośrodowiska guza ekspresję genów kodujących czynniki proangiogenne, które działają mitogennie i antyapoptotycznie na komórki śródbłonka. Dochodzi również do lokalnej aktywacji plazminogenu, który przekształca się w plazminę i umożliwia rozpuszczenie złogów fibryny. Zaktywowane komórki śródbłonka produkują enzymy z grupy metaloproteinaz, które trawiąc błonę podstawną umożliwiają migrację komórek endotelialnych do przestrzeni okołonaczyniowej. Degradacja błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej jest konieczna nie tylko do migracji komórek śródbłonka. Na skutek proteolizy powstają produkty degradacji o działaniu chemotaktycznym i charakterze czynników wzrostu i mitogenów. Migracja komórek śródbłonka jest także uwarunkowana interakcjami pomiędzy molekułami adhezyjnymi na powierzchni komórek śródbłonka (integryny) a specyficznymi składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej (fibronektyna, laminina) [148]. Wreszcie następuje przebudowa nowo powstałych sznurów naczyniowych z wytworzeniem światła. Poszczególne kapilary łączą się tworząc liczne anastomozy. Czynniki regulujące neoangiogenezę pochodzą zarówno z komórek nowotworowych jak i komórek prawidłowych. Komórki śródbłonka podlegają regulacji endokrynej (z krążenia), parakrynej (z przyległych komórek nowotworowych, komórek układu immunologicznego, macierzy pozakomórkowej) i wreszcie autokrynej poprzez czynniki wydzielane przez komórki śródbłonka.

VEGF jest bardzo silnym mitogenem dla komórek endotelialnych. Efekt działania dotyczy zarówno zmian morfotycznych, jak i funkcjonalnych komórek śródbłonka. Na skutek aktywacji ścieżki VEGF-A/VEGFR-2 dochodzi do zwiększonej ekspresji następujących białek: białka układu fibrynolizy: urokinaza, tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA), metaloproteinazy (MMP), transporter glukozy typu 1 (GLUT-1), syntaza tlenku azotu (NOS), integryny oraz mitogeny.

VEGF wpływa na przeżywalność komórek śródbłonka poprzez mechanizmy hamujące apoptozę, np. aktywację ścieżki PI3K-Akt, czy zwiększanie antyapoptotycznych białek jak bcl-2 [149, 150].

Zaobserwowano, że VEGF zwiększa ekspresję składników układu fibrynolizy w komórkach śródbłonka wpływając na procesy proteolizy zachodzące podczas angiogenezy [151]. Degradacja błony podstawnej jest niezbędna do migracji i inwazji komórek endotelialnych w początkowym etapie angiogenezy. Na tym etapie istotną rolę

odgrywają metaloproteinazy degradujące matrix, kolagenaza, proteazy serynowe takie jak: aktywator plazminogenu typu urokinazy uPA (ang. *urokinase-type plasminogen activator*), tkankowy aktywator plazminogenu TPA (ang. *tissue-type plasminogen activator*) [152]. Zaobserwowano, że podczas neoangiogenezy dochodzi również do wychwytywania przez powstałe naczynia krążących we krwi komórek progenitorowych śródbłonna (EPCs), różnicujących się z komórek macierzystych szpiku kostnego [112]. Ich znaczenie w neoangiogenezie pozostaje wciąż kontrowersyjne.

W rezultacie dochodzi do wzrostu formowania nowych naczyń, które zaopatrują rosnący guz w tlen i składniki odżywcze niezbędne do ciągłego wzrostu i ekspansji [153]. Jednakże sieć powstałych naczyń w guzie zdecydowanie różni się od normalnych naczyń. Cechuje się ona brakiem organizacji, niedojrzałością strukturalną i funkcjonalną [104, 154]. Nowe naczynia powstałe w guzie nowotworowym są rozmieszczone chaotycznie, tworząc liczne rozgałęzienia, których lokalizacja i liczba nie wynikają z rzeczywistego zapotrzebowania komórek nowotworowych na składniki odżywcze [155]. Ściana naczyń jest cienka, pozbawiona mięśni gładkich, ulega ciągłej przebudowie i wykazuje zwiększoną przepuszczalność, co skutkuje wzrostem ciśnienia śródtkankowego w nowotworze [156]. Przepływ krwi w naczyniach zaopatrujących guz nowotworowy jest chaotyczny i turbulentny. Nieprawidłowy przepływ przez naczynia w guzie oraz obrzęk tkanki i ucisk na naczynia wpływa bardzo niekorzystnie na dystrybucję leków stosowanych w chemioterapii. Patologiczne naczynia są w nowotworach rozwinięte na tyle, że umożliwiają ich wzrost, a zmieniona architektonika ścian naczyń sprzyja przedostawaniu się komórek nowotworowych do krwiobiegu i powstawaniu przerzutów odległych.

Dodatkowo VEGF-A wykazuje zdolność do zwiększania przepuszczalności naczyń wielokrotnie większą niż histamina, co w znacznym stopniu odpowiada za obrzęk tkanki nowotworowej [105, 157]. Z tym efektem zwiększania przepuszczalności naczyń wiąże się również wzmożona przepuszczalność błony otrzewnowej i opłucnej, a w rezultacie stanów patologicznych takich jak: wysięk opłucnowy i otrzewnowy w przebiegu choroby nowotworowej [158].

VEGF hamuje przekształcanie się makrofagów w komórki dendrytyczne, co uniemożliwia prezentowanie antygenów specyficznych dla guza nowotworowego i obniża odpowiedź układu immunologicznego [159].

1.13.6.2. Ekspresja VEGF-A w nowotworach

W większości guzów litych, na skutek hipoksji i aktywacji onkogenów, mamy do czynienia ze zwiększoną ekspresją VEGF-A w porównaniu do zdrowej tkanki [153].

Zaobserwowano związek pomiędzy nadekspresją VEGF, a progresją nowotworu i złą prognozą w przypadku nowotworów takich jak: rak jelita grubego [160, 161], rak żołądka [162, 163], rak trzustki [164, 165], rak piersi [166, 167], rak gruczołu krokowego [168], rak płuc [169].

Zwiększona ekspresja VEGF w wielu nowotworach wiąże się z ryzykiem powstawania przerzutów odległych i zmniejszoną przeżywalnością [170]. Aktywację VEGFR-3 i zwiększenie ekspresji jego ligandów, czyli VEGF-C i VEGF-D, stwierdzono w nowotworach, takich jak rak piersi i czerniak, i skorelowano z ilością przerzutów do węzłów chłonnych [171, 172].

Z uwagi na fundamentalną rolę w angiogenezie nowotworów elementy ścieżki sygnałnej VEGF/VEGFR stały się punktem uchwytu wielu badań nad zastosowaniem leków antyangiogennych w onkologii.

1.14. Rola CXCR4

Jednym z genów regulowanych poprzez HIF-1 jest *CXCR4* (ang. *CXC chemokine receptor 4*) [173]. Chemokiny reprezentują rodzinę cytokin wykazujących zdolność do przyciągania komórek do specyficznych tkanek i regionów organizmu. Okazuje się, że proces migracji leukocytów do regionów objętych stanem zapalnym oraz migracja komórek nowotworowych wykazują duże podobieństwo [174]. Interakcja pomiędzy receptorem CXCR4 a jego ligandem CXCL12 (ang. *stromal cell-derived factor 1*, SDF-1) spełnia istotną rolę w regulacji takich procesów jak: regulacja procesu hematopoezy, migracja komórek hematopoetycznych, angiogeneza, czy wreszcie migracja komórek nowotworowych [175]. Ekspresja wielu chemokin i receptorów została wykazana na powierzchni komórek nowotworowych, ale są pewne populacje komórek nowotworowych wykazujące się charakterystyczną ekspresją określonych receptorów i chemokin. Prawdopodobnie determinuje to lokalizację przerzutów odległych do określonych tkanek i narządów [176]. Wykazano ekspresję CXCR4 w nowotworach takich jak: rak piersi, rak jelita grubego, rak jajnika. Natomiast stwierdzono wysoką ekspresję SDF-1 w tkankach będących częstymi miejscami

powstawania ognisk przerzutowych, takich jak węzły chłonne, płuca, wątroba, szpik kostny [177]. Badania wykazały, że HIF-1 nasila ekspresję zarówno CXCR4 jak i SDF-1 w wielu typach komórek [178, 179].

2. CEL

Resekcja chirurgiczna jest podstawową metodą leczenia raka żołądka. Jednak pomimo znaczącego postępu medycyny rokowanie w przypadku raka żołądka jest wciąż bardzo niekorzystne. Istnieje zatem potrzeba odkrycia skuteczniejszych metod diagnozowania i leczenia, a w szczególności zindywidualizowania metod terapeutycznych. Obecnie trwają badania nad zastosowaniem terapii celowanej w raku żołądka z wykorzystaniem leków antyangiogennych i nowych chemioterapeutyków.

Angiogeneza jest jednym z kluczowych procesów warunkujących rozwój nowotworu, dlatego też elementy ścieżki sygnałnej VEGF/VEGFR stały się punktem uchwytu wielu badań nad zastosowaniem leków antyangiogennych w onkologii. Brakuje wystarczających danych na temat mechanizmów regulujących angiogenezę w raku żołądka. Nie wiadomo również, czy i u których chorych terapia celowana oparta o przeciwciała anti-VEGF okaże się skuteczna i bezpieczna w leczeniu raka żołądka.

W większości nowotworów litych, również w raku żołądka, występuje zjawisko hipoksji. W warunkach hipoksji dochodzi do aktywacji szeregu procesów przystosowawczych związanych m.in. z nasiloną neowaskularyzacją. Odpowiedź komórkowa na zmniejszony poziom tlenu prowadzi do nasilenia ekspresji czynnika indukowanego hipoksją (HIF-1) i genów przez niego regulowanych: VEGF i CXCR4.

Aktywność czynnika HIF-1 α jest negatywnie regulowana przez enzymy z grupy hydroksylaz prolinowych, z których główną rolę odgrywa EGLN1. Hydroksylacja reszt prolinowych stwarza warunki do połączenia się podjednostki HIF-1 α z czynnikiem VHL będącym produktem genu supresorowego *VHL*, a w efekcie końcowym do degradacji podjednostki HIF-1 α w proteasomach. Brak wiedzy na temat molekularnych mechanizmów decydujących o rozwoju raka żołądka skłania do zwrócenia uwagi na potencjalną rolę genów zaangażowanych w regulację odpowiedzi komórek na hipoksję. Pogłębienie tej wiedzy może okazać się przydatne również w konkretnych sytuacjach klinicznych.

Celem pracy jest analiza ekspresji genów odpowiedzialnych za regulację odpowiedzi komórek nowotworowych na hipoksję, a w szczególności:

1. Analiza ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w procesie angiogenezy i odpowiedzialne za progresję raka żołądka zarówno w tkance nowotworowej jak i marginesie operacyjnym. Ocenie poddano następujące geny: *HIF-1α*, *EGLN1*, *VHL* uczestniczące w procesach regulujących metabolizm komórki w warunkach hipoksji oraz geny *VEGF*, *CXCR4*, odgrywające rolę w neoangiogenezie i progresji nowotworu.
2. Określenie korelacji pomiędzy wynikami ekspresji badanych genów a cechami klinicznymi, histopatologicznymi i wynikami leczenia pacjentów operowanych z powodu raka żołądka.
3. Poznanie wzajemnych zależności pomiędzy analizowanymi czynnikami w tkance nowotworowej raka żołądka.
4. Ocena potencjalnych sposobów nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej w oparciu o analizowane geny.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Grupa badana

Badaniom poddano grupę 28 chorych ze zdiagnozowanym rakiem żołądka leczonych operacyjnie w I Oddziale Chirurgii Onkologicznej i Ogólnej Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu od maja 2006r do stycznia 2008r. U chorych wykonywano zabieg radykalnej gastrektomii, zgodnie z kryteriami ustalonymi przez IUAC (ang. *International Union Against Cancer*). Czynnikiem dyskwalifikującym było jedynie przedoperacyjne lub śródoperacyjne stwierdzenie zaawansowanego procesu nowotworowego uniemożliwiającego wykonanie radykalnej resekcji żołądka. Żaden chory z badanej grupy nie otrzymał przedoperacyjnej chemioterapii ani radioterapii.

Na prowadzenie niniejszego projektu uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Chorzy zostali poinformowani o celu przeprowadzanych badań i wyrazili pisemną zgodę na ich przeprowadzenie.

W trakcie zabiegu operacyjnego od każdego chorego pobierano jednocześnie fragment tkanki nowotworowej oraz fragment makroskopowo niezmienionej błony

śluzowej żołądka pochodzącej z marginesu operacyjnego stanowiącej kontrolę. Pobrany materiał przechowywano w ciekłym azocie do czasu dalszych analiz.

3.2. Metody

Izolację RNA, DNA i białka oraz ocenę ekspresji wybranych genów przeprowadzono w Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Analizę histopatologiczną i immunohistochemiczną przeprowadzano w Zakładzie Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu. Ocenę zaawansowania klinicznego raków żołądka przeprowadzono zgodnie z klasyfikacją TNM opublikowaną przez IUAC [7].

3.2.1. Analiza ekspresji mRNA

3.2.1.1. Izolacja RNA

Izolacja całkowitego RNA została przeprowadzona według protokołu opartego na zmodyfikowanej metodzie Chomczyńskiego i Sacchi [180]. Tkanki homogenizowano na ciekłym azocie i poddawano lizie mieszaniną fenolu i izotiocyanianu guanidyny (1 ml) (TRI, Sigma-Aldrich, Deisenhofer, Niemcy). Do prób dodawano następnie chloroform w objętości równej 20% objętości odczynnika TRI (200 μ l). Przygotowane w ten sposób próby intensywnie wytrząsano i inkubowano na lodzie przez 5 minut. Po inkubacji próby wirowano (15 minut, 4°C, 15000 \times g). W wyniku wirowania próby rozdzielały się na trzy warstwy:

- (1) fazę wodną (zawierającą RNA),
- (2) fazę pośrednią (interfazę, zawierającą DNA),
- (3) fazę fenolowo-chloroformową (zawierającą białka i struktury subkomórkowe).

Do dalszej izolacji pobierano ostrożnie fazę wodną, w celu zmniejszenia ryzyka kontaminacji genomowym DNA, i przenoszono do nowych probówek. RNA wytrącano przez dodanie izopropanolu (według proporcji 1:1). Przygotowane w ten sposób próby umieszczano w temperaturze -80°C. Po upływie 24 godz. probówki wirowano (15 minut, 4°C, 15000 \times g). Po odwirowaniu usuwano supernatant, a powstały osad RNA przemywano dwukrotnie przy użyciu schłodzonego 75% etanolu, wirowano (15

minut, 4°C, 20000×g), a następnie suszono w koncentratorze (SpeedVac, Eppendorf Concentrator 5301, Eppendorf, Niemcy). Wysuszony osad RNA rozpuszczano w 20 µl wody dejonizowanej, wolnej od RNaz. Wyizolowany całkowity RNA poddawano działaniu *DNazy I* (*Fermentas*). Jedna jednostka aktywności tego enzymu degradowuje 1µg DNA w ciągu 10 minut w temperaturze 37°C. Do RNA podawano 5 µl buforu reakcyjnego zawierającego MgCl₂ oraz 1 µl *DNazy I* 1U/µl (*Fermentas*). Probówki z zawartością mieszano i krótko wirowano, a następnie poddawano inkubacji w termomikserze w temperaturze 37°C przez okres 30 minut, po czym, w celu zatrzymania aktywności *DNazy*, do probówek podawano 1 µl EDTA 25mM (*Fermentas*) dla chelatacji jonów Mg²⁺ i przenoszono do temperatury 65°C na 10 minut. Tak gotowy RNA wykorzystywano jako matrycę do syntezy cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji.

3.2.1.2. Oznaczanie stężenia RNA

Do analizy ilościowo-jakościowej prób RNA posłużono się pomiarem spektrofotometrycznym przy długości fali 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf AG, Niemcy). Preparaty RNA rozcieńczono wodą w proporcji 4 µl RNA: 96 µl H₂O. Do kalibracji spektrofotometru wykorzystano 100 µl wody, w której rozpuszczono RNA. Stopień zanieczyszczenia białkiem obliczano na podstawie stosunku absorbancji A₂₆₀ do A₂₈₀. Wartość współczynnika (*Ratio*) A₂₆₀/A₂₈₀ między 1,8-2,0 oznacza, że preparaty są wystarczająco oczyszczone.

3.2.1.3. Odwrotna transkrypcja

Całkowity RNA przepisywano na komplementarny DNA (cDNA) w reakcji odwrotnej transkrypcji przy pomocy odwrotnej transkryptazy wirusa mysiej białaczki Maloneya (M-MLV, *Maloney Murine Leukemia Virus*) wchodzącej w skład zestawu M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). W każdym przypadku do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto 2 µg RNA. Reakcje odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w 1,5 ml probówkach (*Eppendorf*) według poniższego protokołu.

Do 2 µg RNA znajdującego się w próbówce dodawano 4 µl mieszaniny dNTP (2,5 mM każdego dNTP), 1 µl oligo(dT)₂₃ (0,5 µg/µl) i uzupełniano do objętości 12 µl wodą dejonizowaną wolną od RNaz. Próby podgrzewano przez 5 minut w 65°C w celu

denaturacji RNA. Następnie próbkę umieszczano w lodzie na 2 minuty, wirowano i dodawano mieszaninę transkrypcyjną zawierającą: 4 μ l 5^x stężonego buforu First-Strand Buffer (*Invitrogen*), 2 μ l 0,1 M DTT (*Invitrogen*), 1 μ l odwrotnej transkryptazy M-MLV RT 200 U/ μ l (*Invitrogen*) oraz 1 μ l inhibitora rybonukleaz RNase OUT 40 U/ μ l (*Invitrogen*), do końcowej objętości 20 μ l. Syntezę cDNA przeprowadzano przez 60 minut w temperaturze 37°C (optymalnej dla M-MLV). Odwrotną transkryptazę inaktywowano termicznie poprzez 15 minutową inkubację w 70°C, aby nie dochodziło do syntezy produktów nieswoistych. Tak uzyskane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C i wykorzystywano następnie jako matrycę do reakcji RT-PCR.

3.2.1.4. Amplifikacja cDNA w czasie rzeczywistym (RT-PCR)

Poziom ekspresji mRNA badanych genów oznaczono techniką RT-PCR (ang. *real-time PCR*) za pomocą aparatu LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Niemcy). Dzięki tej technice możliwe jest śledzenie zmian ilości przyrastającego produktu po każdym cyklu amplifikacji oraz określenie momentu wejścia reakcji w fazę wzrostu logarytmicznego (C_p , *crossing point*). Pozwala to na określenie ilości badanych cząsteczek (w tym przypadku cDNA) obecnych na początku reakcji.

W reakcji RT-PCR wykorzystuje się polimerazę typu *hot-start*, która wykazuje brak pierwotnej aktywności poniżej temperatury 75°C. Do aktywacji enzymu dochodzi w czasie 10 minutowej inkubacji w temperaturze 95°C. Zastosowanie układu *hot-start* zapobiega powstawaniu niespecyficznych produktów w trakcie przygotowywania mieszaniny reakcyjnej.

Powstawanie produktów PCR monitorowano za pomocą pomiaru fluorescencji emitowanej przez barwnik SYBR Green. Związek ten po przyłączeniu się do dwuniciowego DNA (dsDNA) emituje światło w zakresie fluorescencji zielonej (520 nm), po wcześniejszym wzbudzeniu wiązką światła niebieskiego (497 nm). Barwnik SYBR Green, który nie jest związany z dsDNA nie wykazuje fluorescencji. Wzrost fluorescencji określany jest po każdym zakończonym cyklu elongacyjnym, po którym coraz więcej cząsteczek barwnika łączy się powstającymi produktami. Poziom fluorescencji jest wprost proporcjonalny do ilości powstającego produktu.

Dzięki pomiarom fluorescencji możliwe jest monitorowanie przebiegu reakcji RT-PCR, w której wyróżniamy 3 fazy:

- I – faza wstępna - w początkowych cyklach nie obserwuje się przyrostu ilości produktu,
- II - faza logarytmicznego wzrostu – obserwuje się bardzo szybki przyrost fluorescencji. Moment, w którym reakcja amplifikacji wchodzi w tę fazę (*Cp – crossing point*) zależy wyłącznie od początkowej ilości matrycy. Porównanie wartości *Cp* pozwala na oznaczenie ilości specyficznego cDNA w każdej z badanych prób.
- III – faza plateau – faza zahamowania przyrostu ilości produktu, a przez to również fluorescencji, spowodowana wyczerpywaniem się substratów reakcji amplifikacji.

W celu określenia wydajności reakcji oraz określenia zależności *Cp* od początkowej ilości matrycy dla każdego analizowanego genu wykonano krzywe standardowe z użyciem kolejnych rozcieńczeń cDNA. W celu sporządzenia krzywej wykonano szereg rozcieńczeń matrycy wzorcowej ($1,6 \cdot 10^{-1}$, $3,6 \cdot 10^{-1}$, $2,16 \cdot 10^{-1}$, $1,3 \cdot 10^{-1}$, $7,78 \cdot 10^{-2}$) uzyskanej z mieszaniny wszystkich matryc poddanych analizie.

W ocenie ekspresji badanych genów posługiwano się względną metodą ilościową (ang. *relative quantification*). Ilość specyficznego cDNA w próbie wzorcowej przyjmowano jako 1. Wyniki oznaczeń ilościowych badanych transkryptów normalizowano względem standardów wewnętrznych, czyli cDNA genów konstytutywnych (ang. *house-keeping genes*) ulegających konstytutywnej ekspresji w komórkach eukariotycznych. Jako standard wewnętrzny wykorzystano cDNA genu kodującego deaminazę porfobilinogenu *PBGD* (ang. *porphobilinogen deaminase*).

Specyficzność reakcji amplifikacji sprawdzono poprzez analizę temperatury topnienia produktów reakcji PCR. W warunkach optymalnych reakcja daje produkt o charakterystycznej temperaturze topnienia.

Reakcje *real-time* PCR przeprowadzano w objętości 10 μ l w szklanych kapilarach z użyciem aparatu LightCycler firmy Roche (Niemcy), przy pomocy zestawu odczynników AmpliLIGHT firmy Novazym.

Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący:

- 5 μ l Mix,
- 1 μ l swoistych starterów, każdy w stężeniu 5 μ M,
- 1 μ l cDNA,
- 3 μ l H₂O.

Reakcja RT-PCR obejmowała następujące etapy:

- denaturacja wstępna (aktywacja polimerazy), 95°C, 10 minut;
- oznaczenie ilościowe – 40 cykli:
 - denaturacja, 95°C, 10 s,
 - przyłączanie starterów (temperatura zależna od użytych starterów), * 10 s,
 - wydłużanie starterów, 72°C, 10 s;
- analiza temperatury topnienia produktów:
 - 95°C, 0 s,
 - 70°C, 15 s,
 - 70°C-99°C, 0,2°C/s-ciągły pomiar fluorescencji;
- chłodzenie aparatu.

* - w zależności od długości produktu

Sekwencje badanych genów zostały zidentyfikowane przy użyciu baz danych: ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>) oraz NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Startery do amplifikacji w czasie rzeczywistym (*Real-Time* PCR) zaprojektowano z użyciem programu Oligo v.6.71 (tabela 5).

Tabela 5. Startery wykorzystywane w reakcji RT-PCR.

cDNA	Transkrypt	Starter F (<i>forward</i>) i R (<i>reverse</i>)	Amplikon
<i>HIF-1α</i>	ENST00000337138	F: 5' TTAGAACCAAATCCAGAGTCAC 3'	125 pz
		R: 5' TATTCAGTGGGACTATTAGGCT 3'	
<i>EGLN1</i>	ENST00000258246	F: 5' TGCGAAACCATTGGGCTGCT 3'	179 pz
		R: 5' GTCACACATCTTCCATCTCC 3'	
<i>VHL</i>	ENST00000256474	F: 5' AACGGATGGGAGATTGAAGATT 3'	183 pz
		R: 5' CAATGCCTAGTGAAGTCAGTTA 3'	
<i>VEGF</i>	NM_001025366	F: 5' GTCACACATCTTCCATCTCC 3'	186 pz
		R: 5' GTGTGCCCTGATGCGATG 3'	
<i>CXCR4</i>	ENST00000241393	F: 5' TTCTTAAGTGGCATTGTGGG 3'	130 pz
		R: 5' GAAGCGTGATGACAAAGAGG 3'	
<i>PBGD</i>	ENST00000278715	F: 5' GCCAAGGACCAGGACATC 3'	160 pz
		R: 5' TCAGGTACAGTTGCCCATC 3'	

3.2.1.5. Elektroforeza produktów reakcji RT-PCR

Po sporządzeniu żelu agarozowego 2% i po jego spolimeryzowaniu, do kieszonek nałożono po 10 µl produktów RT-PCR zawieszonych w 1 µl obciążacza 6 x Loading Dye Solution (*Fermentas*). Elektroforezę przeprowadzano w buforze 0,5 x TBE przy napięciu 80 V w aparacie do elektroforezy poziomej (*Kucharczyk*), w obecności markera wielkości mas DNA (*Fermentas*). Po rozdziale żel analizowano w świetle UV i fotografowano w aparacie do analizy żeli Gel Logic 440 (Kodak).

3.2.2. Analiza Western blot

3.2.2.1. Izolacja białka

Do tkanek dodano roztworu RIPA zawierającego zestaw inhibitorów proteaz (Roche, Niemcy). Komórki poddawano lizie przez 1 h na lodzie. Następnie lizat wirowano (10 minut, 4°C, 10000 x g). Supernatant zawierający białka przeniesiono do probówek 1,5 ml i przechowywano w temperaturze -80°C.

3.2.2.2. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka w lizatach oznaczano spektrofotometrycznie metodą Bradforda z użyciem Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent. Krzywa standardowa dla białka wzorcowego przygotowana była w następujący sposób:

Do 1,5 ml probówek polietylenowych podawano po 0,495 ml roztworu zawierającego BSA (ang. *bovine serum albumine*) oraz po 5 µl buforu RIPA uzyskując próby o następujących stężeniach BSA: 0;5; 10; 20; 30; 40 i 60 µg/ml. Do tak przygotowanych prób dodano po 0,5 ml 2× stężonego odczynnika Bradford. Końcowe stężenie BSA w poszczególnych punktach krzywej standardowej wynosiło odpowiednio: 0; 2,5; 5; 10; 15; 20 i 30 µg/ml.

Pomiar stężenia białka w badanych próbach przeprowadzono w następujący sposób:

Do 1,5 ml probówek polietylenowych podawano po 0,495 ml wody, 5 µl roztworu oznaczanego białka w buforze RIPA i 0,5 ml 2× stężonego odczynnika Bradford. Stężenie białka mierzono na spektrofotometrze firmy Eppendorf

(Biophotometer, Niemcy) przy długości fali $\lambda=595$ nm wobec próby standardowej. Na podstawie odczytanych wartości absorbancji i sporządzonej wcześniej krzywej standardowej dla białka wzorcowego (BSA) określono zawartość białka w badanych próbach.

3.2.2.3. Rozdział elektroforetyczny białek i analiza Western blot

Białka wyizolowane z tkanek nowotworowych i marginesu operacyjnego zostały rozdzielone zgodnie z ich masą przy zastosowaniu elektroforezy w warunkach denaturujących w 10% żelu poliakrylamidowym (Bio-Rad Sigma-Aldrich, USA) zawierającym SDS (siarczan dodecyłu sodu), a następnie zidentyfikowane przy pomocy swoistych przeciwciał.

Do próbek o objętości 1,5 ml podawano po 30 μ g białka zawieszonego w buforze RIPA, 6 μ l buforu denaturującego i uzupełniano wodą do końcowej objętości 18 μ l. Przygotowane w ten sposób próby poddawano inkubacji w termobloku w temperaturze 99°C przez 10 minut w celu denaturacji białek, po czym przenoszono do lodu na 5 minut i wirowano. Białka poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 1x stężonym buforze glicynowym przy napięciu 120V przez 1h. Po rozdzieleniu białek następował ich transfer na membranę z polifluorku winylidenu PVDF (ang. *polyvinylidene fluoride*) przy natężeniu 350mA w buforze do transferu przez okres 1,5 h. Wydajność transferu sprawdzano barwiąc błonę za pomocą odczynnika Ponceau S celem uwidocznienia poszczególnych frakcji białek. Barwnik zlewano, błonę przemywano wodą dejonizowaną, a następnie blokowano roztworem 5% odtłuszczonego mleka w buforze TBST 1x stężonym przez 1h. w temperaturze pokojowej.

Detekcję białek przeprowadzono poprzez inkubację z odpowiednimi przeciwciałami I- i II- rzędowymi (*Santa-Cruz Biotechnology, CA, USA*). Wykorzystano następujące stężenia przeciwciał: I-rzędowe *anti-PHD2-rabbit polyclonal IgG* o rozcieńczeniu 1:3000 oraz II-rzędowe *goat anti-rabbit HRP* sprzężone z peroksydazą chrzanową (ang. *horseradish peroxidase*) o rozcieńczeniu 1:5000. Następnie odmyto niespecyficznie związane przeciwciała poprzez cykl trzech płukań trwających po 10 minut w buforze TBST 1x stężonym. W celu detekcji białek użyto odczynników *SuperWest/Femto* (Pierce). Wizualizację wyników przeprowadzono przy pomocy kliszy rentgenowskich FOTON XS-IN. Czas naświetlania filmu ustalany był

eksperymentalnie i wynosił od 30s do 20min. Sygnał analizowano na podstawie stopnia zaczernienia kliszy rentgenowskiej.

Celem analizy ilości białka referencyjnego (β -aktyny) usuwano przeciwciała I- i II-rzędowe z membrany PVDF wykorzystując technikę strippingu. Błone przemywano wodą dejonizowaną i blokowano roztworem 5% odtłuszczonego mleka w buforze 1x stężonym TBST przez 1h w temperaturze pokojowej. Następnie inkubowano z przeciwciałem *anti-actin* HRP o stężeniu 1:3000 w temperaturze pokojowej. Przeciwciało przeciw β -aktynie było sprzężone z peroksydazą chrzanową, nie wymagało więc przeciwciała II-rzędowego. Dalej postępowano analogicznie jak w wyżej opisanej procedurze dla detekcji białka EGLN1.

Ilość oznaczanego białka oceniono na podstawie analizy densytometrycznej z wykorzystaniem programu Kodak MI 4,5SE. Wyniki ekspresji białka EGLN1 normalizowano względem białka β -aktyny i przedstawiano jako względną gęstość optyczną.

3.2.3. Badania immunohistochemiczne

3.2.3.1. Przygotowanie histopatologiczne materiału do badań

Materiał tkankowy został utrwalony w 10% buforowanej formalinie o pH 7.4-7.6 i umieszczony w procesorze. Tkanekę zatopiono w parafinie w temperaturze 58°C z zastosowaniem standardowych metod histopatologicznych. Z otrzymanych w ten sposób, odpowiednio oznaczonych blozków parafinowych skrojono na mikrotomie skrawki o grubości 4-5 μ m, które nałożono na szkiełka podstawowe, adhezyjne i pozostawiono na 2h w temperaturze 58°C.

Zastosowano metodę odparafinowania i odmaskowania antygenów w skrawkach z użyciem aparatu PT Link (Dako, Carpinteria, CA, USA). Preparaty umieszczono w aparacie w buforze EnVision Flex (10x) o wysokim pH (EnVisionTM Flex Target Retrieval Solution, High pH;) i poddano inkubacji w temperaturze 95°C przez 20 minut, następnie przeniesiono do buforu TBS. System PT Link Dako zastępuje czynności odparafinowania w ksylenie, przeprowadzania przez szereg alkoholi oraz odślonięcia antygenów z użyciem kuchenki mikrofalowej lub łaźni wodnej.

3.2.3.2. Metody immunoperoksydazowe

W badaniach, w celu wykrycia markerów: CD34 i VEGF korzystano z zestawów EnVision Flex firmy Dako. System wykrywa pierwotne przeciwciała mysie i królicze, a zachodząca reakcja jest wizualizowana przy użyciu chromogenu EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen.

3.2.3.3. Rodzaje zastosowanych przeciwciał pierwszorzędowych

Zastosowano przeciwciała: mysie monoklonalne IgG anti-CD34 (43A1) i królicze poliklonalne IgG anti-VEGFA (A-20), (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

3.2.3.4. Odczynniki i reagenty stosowane do barwień

- A. TBS - sól fizjologiczna buforowana przy użyciu TRIS/HCL (TRIS – Buffered Saline; Dako, Carpinteria, CA, USA), pH 7,6;
- B. Bufor do aparatu PT Link (Bufor EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x); Dako, Carpinteria, CA, USA);
- C. Przeciwciała pierwszorzędowe:
 - anti-CD34 (43A1): sc-65261, 100µg/ml, 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA);
 - anti-VEGF (A-20): sc-152, 200µg/ml, 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA);
- D. Diluent (EnVision™ FLEX Antibody Diluent; Dako, Carpinteria, CA, USA);
- E. EnVision Flex/HRP (EnVision FLEX /HRP; Dako, Carpinteria, CA, USA); Dekstran sprzężony z peroksydazą i wtórnymi przeciwciałami kozimi przeciwko immunoglobulinom króliczym i mysim;
- F. EnVision DAB (EnVision FLEX Substrate Buffer + Chromogen, 3'3 diaminobenzzydyna; Dako, Carpinteria, CA, USA);
- G. Hematoksylina Mayer'a (EnVision™ FLEX Hematoxylin; Dako, Carpinteria, CA, USA), Wodny roztwór hematoksyliny;

H. Medium Pertex (Pertex Mounting Medium for light microscopy; HistoLab, Goeteborg, Szwecja); Medium do zatapiania szkiełek nakrywkowych.

3.2.3.5. Metodyka badań

Po odparafinowaniu skrawków, poprzez inkubowanie w buforze EnVision Flex High pH w aparacie PT Link w temperaturze 95°C przez 20 minut, blokowano aktywność endogennej peroksydazy 3% roztworem nadtlenu wodoru przez 10 minut. Po płukaniu inkubowano skrawki w buforze TBS przez 10 minut. Następnie inkubowano skrawki z przeciwciałami pierwszorzędowymi przez 20 minut. Zastosowano następujące rozcieńczenia przeciwciał: anty-CD34 1:50; anty-VEGF 1:500. Do rozcieńczania stężonych przeciwciał pierwotnych stosowano odczynnik EnVision™ FLEX Antibody Diluent. Po inkubacji z przeciwciałami skrawki płukano w buforze TBS przez 10 minut i inkubowano z odczynnikiem EnVision Flex przez 20min. Odczynnik detekcyjny wchodzący w skład zestawu zawiera szkielet dekstranowy, z którym sprzężonych jest wiele cząsteczek peroksydazy (HRP) i przeciwciał wtórnych. Skrawki płukano ponownie w buforze TBS i inkubowano z odczynnikiem EnVision DAB zawierającym tetrachlorowodorek 3,3'-diaminobenzyny w rozpuszczalniku organicznym przez 5 minut. Po przepłukaniu w wodzie destylowanej podbarwiano jądra komórkowe za pomocą hematoksyliny Mayer'a przez 3 minuty, płukano i inkubowano w wodzie destylowanej aż do wizualizacji jąder komórkowych. W kolejnym etapie przeprowadzano skrawki przez szereg roztworów alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu: 76%, 96%, 96%, 99,9%, 99,9%, 99,9% i odwadniano w ksylenie: Ksylen I, Ksylen II, Ksylen III. W końcowym etapie zatapiano preparaty przy pomocy medium Pertex Mounting Medium.

3.2.3.6. Interpretacja wyników

Roztwór roboczy substratów zawierający diaminobenzynę powoduje brązowe zabarwienie w miejscach występowania wykrywanych antygenów rozpoznawanych przez przeciwciała pierwotne. Jądra komórkowe w barwieniu kontrastowym hematoksyliną barwią się na niebiesko.

Celem sprawdzenia aktywności stosowanych przeciwciał monoklonalnych skierowanych wybiórczo i swoiście przeciwko CD34 i VEGF, jak również w celu weryfikacji poprawności wykonywania reakcji immunohistochemicznej, badania uzupełniano kontrolą dodatnią i kontrolą ujemną.

3.2.3.7. Metoda oceny reakcji przeciwciał

Ekspresję przeciwciał oceniano szacunkowo przyjmując skalę od (-) do (+++). W przypadku (-) i (+) reakcję uznawano za negatywną i kwalifikowano do grupy o niskiej ekspresji, natomiast w przypadku (++) i (+++) reakcję uznano za pozytywną i kwalifikowano do grupy o wysokiej ekspresji.

3.2.3.8. Półilościowa ocena ekspresji białka CD34 i VEGF

- CD34 (+) reakcja uwidaczniająca nieliczne naczynia proliferujące pomiędzy dużymi gniazdami komórek nowotworowych
- (++) reakcja uwidaczniająca naczynia proliferujące pomiędzy dużymi i małymi gniazdami komórek nowotworowych rzadko obejmujące pojedyncze komórki raka
- (+++) reakcja uwidaczniająca bardzo liczne drobne naczynia proliferujące wokół małych gniazd komórek nowotworowych wnikające pomiędzy pojedyncze komórki raka
- VEGF (+) dodatnia reakcja w mniej niż 10% komórek podścieliska w obrębie guza i jego otoczeniu
- (++) dodatnia reakcja w 10 do 50% komórek podścieliska w obrębie guza i jego otoczeniu
- (+++) dodatnia reakcja w powyżej 50% komórek podścieliska w obrębie guza i jego otoczeniu

3.3. Analizy statystyczne

Obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica 6.0. Normalność rozkładu zmiennych zweryfikowano testem Shapiro-Wilka. W przypadku gdy rozkład zmiennych istotnie odbiegał od rozkładu normalnego zastosowano testy

nieparametryczne. Dla analizy zmiennych powiązanych stosowano test Wilcozona, a dla zmiennych niepowiązanych test Manna-Whitney'a. Po spełnieniu warunku rozkładu normalnego stosowano test T-studenta.

Analizę zależności pomiędzy ekspresją analizowanych genów a wybranymi parametrami klinicznymi przeprowadzono z wykorzystaniem dokładnego testu Fishera i testu Chi-kwadrat. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji poszczególnych markerów analizowano przy pomocy współczynnika korelacji Pearsona z użyciem programu GraphPad InStat wersja 3.05. Za pomocą krzywych Kaplana-Meyera oznaczono również krzywe przeżycia całkowitego w grupach w zależności od poziomu ekspresji analizowanego genu. Różnice w przeżywalności oceniono testem log-rank. Wszystkie wykazane różnice przyjęto za statystycznie istotne przy poziomie istotności $p \leq 0,05$.

3.4. Zagadnienia etyczne

Na prowadzenie projektu uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 304/06 z dnia 09-03-2006 oraz nr 35/09 z dnia 08-01-2009).

Pacjenci biorący udział w badaniu zostali stosownie poinformowani i wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu.

4. WYNIKI

4.1. Dane kliniczne i histopatologiczne

W badanej grupie 28 chorych było 20 mężczyzn i 8 kobiet w wieku 21-79 lat (mediana 64 lata). U 20 chorych wykonano zabieg całkowitej resekcji żołądka, natomiast u 8 chorych wykonano subtotalną dystalną resekcję żołądka. Ciągłość przewodu pokarmowego odtwarzano sposobem Roux-Y. Resekcję RO wykonano u 23 chorych, natomiast u 5 chorych nie uzyskano resekcji radykalnej (R1). U 15 chorych nowotwór obejmował 1/3 dalszą żołądka, u 5 chorych 1/3 środkową żołądka, u 7 chorych 1/3 proksymalną. U jednego chorego stwierdzono nacieki nowotworowy całego żołądka. U 9 chorych średnica guza nie przekraczała 4cm, u 16 chorych mieściła się w

przedziale 4-12cm, natomiast w 3 przypadkach przekraczała 12cm. Dominował typ jelitowy wg klasyfikacji Laurena (12 chorych), typ rozlany stwierdzono u 7 chorych, a pozostałych 9 chorych typ mieszany. U większości stwierdzono stopień G3 złośliwości histologicznej (18 chorych). U 16 chorych wykonano limfadenektomię D2, natomiast D1 u 12 chorych. Mediana liczby usuniętych węzłów chłonnych wynosiła 16 (6-28). U 19 chorych stwierdzono występowanie przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. U większości chorych stwierdzono zaawansowany rak żołądka. W badanej grupie dominowali chorzy w III stopniu (16 chorych) zaawansowania klinicznego, 8 operowanych chorych znajdowało się w stopniu II, tylko 4 chorych w stopniu I. Szczegółowe dane na temat stopnia zaawansowania nowotworu według najnowszej klasyfikacji TNM zawarte są w tabeli 6. Po leczeniu operacyjnym monitorowano przeżywalność chorych. Mediana czasu obserwacji wynosiła 27,5 miesiąca (0,5-58 miesięcy). W czasie obserwacji z powodu progresji nowotworu zmarło 15 chorych. Przeżywalność 3-letnia w badanej grupie chorych wyniosła 46,4%.

Tabela 6. Dane kliniczne i histopatologiczne pacjentów operowanych z powodu raka żołądka; ^a - klasyfikacja TNM według UICC – edycja 7 [181].

Cecha	Ilość	%
Wiek:		
<60	9	32,0
60-69	10	36,0
≥70	9	32,0
Średnia ± SD	62,5±12,7	
Mediana	64(21-79)	
Płeć:		
mężczyzna	20	71,4
kobieta	8	28,6
Rodzaj resekcji:		
gastrektomia totalna	20	71,4
gastrektomia subtotalna	8	28,6
Limfadenektomia		
D1	12	42,9
D2	16	57,1
Lokalizacja guza:		
1/3 proksymalna	7	25,0
1/3 środkowa	5	17,8
1/3 dystalna	15	53,6
cały żołądek	1	3,6
Średnica guza (cm)		
0,0-3,9	9	32,2
4,0-7,9	10	35,7
8,0-11,9	6	21,4
≥12	3	10,7

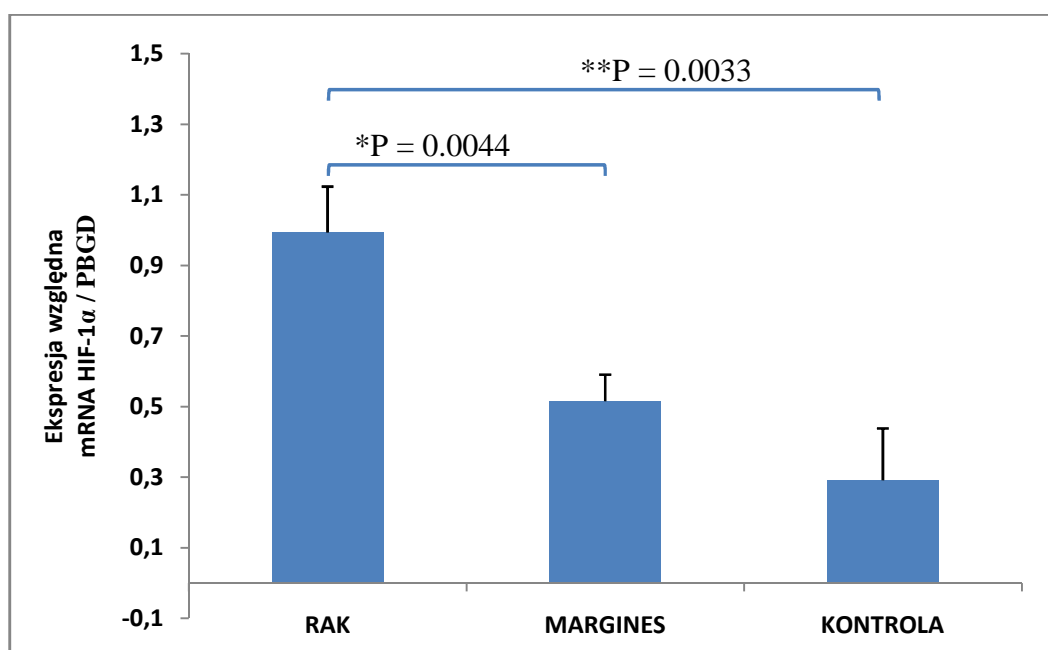
Cecha	Ilość	%
Klasyfikacja Laurena		
typ jelitowy	12	42,9
typ rozsiany	7	25,0
typ mieszany	9	32,1
Liczba usuniętych węzłów chłonnych		
≤10	5	17,8
11-20	15	53,6
>20	8	28,6
Stopień złośliwości histologicznej		
G1	1	3,6
G2	9	32,1
G3	18	64,3
Cecha T^a:		
pT1	4	14,3
pT1a	1	
pT1b	3	
pT2	3	10,7
pT3	11	39,3
pT4	10	35,7
pT4a	7	
pT4b	3	
Cecha N^a:		
pN0	9	32,1
pN1	4	14,3
pN2	4	14,3
pN3	11	39,3
pN3a	5	
pN3b	6	
Stopień zaawansowania^a		
I	4	14,3
IA	3	
IB	1	
II	8	28,6
IIA	5	
IIB	3	
III	16	57,1
IIIA	4	
IIIB	6	
IIIC	6	
IV	0	0

4.2. Analiza poziomu ekspresji mRNA genów *HIF-1α*, *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w tkance nowotworowej, marginesie operacyjnym i kontroli

Za pomocą techniki RT-PCR oceniono ekspresję genów u 28 chorych w materiale operacyjnym pobranym z guza nowotworowego oraz błony śluzowej marginesu operacyjnego, która stanowiła kontrolę. Dodatkową grupę kontrolną stanowiło 5 chorych, u których wykonano resekcję żołądka z powodu innego niż rak.

4.2.1. Ekspresja mRNA genu *HIF-1α*

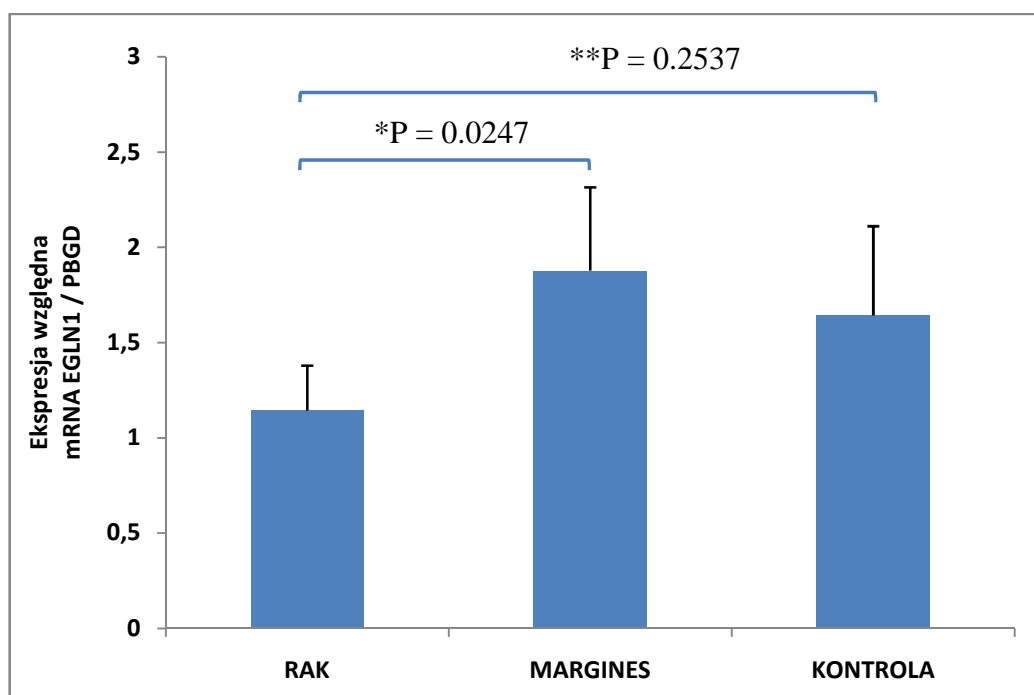
Średni poziom ekspresji mRNA genu *HIF-1α* był istotnie wyższy w tkance nowotworowej (0.99 ± 0.13) w porównaniu do marginesu operacyjnego (0.52 ± 0.07), $p=0.0044$, oraz kontroli (0.29 ± 0.14), $p=0.0033$ (ryc. 5). Nadekspresję *HIF-1α* w tkance nowotworowej stwierdzono u 21 chorych (75.0%).



Rycina 5. Poziom ekspresji mRNA genu *HIF-1α* w tkance nowotworowej, marginesie operacyjnym i kontroli. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM; *- różnica w poziomie ekspresji mRNA *HIF-1α* w raku i marginesie operacyjnym (test Wilcoxon'a); **- różnica w poziomie ekspresji mRNA pomiędzy rakiem a kontrolą (test Mann-Whitney'a).

4.2.2. Ekspresja mRNA genu *EGLN1*

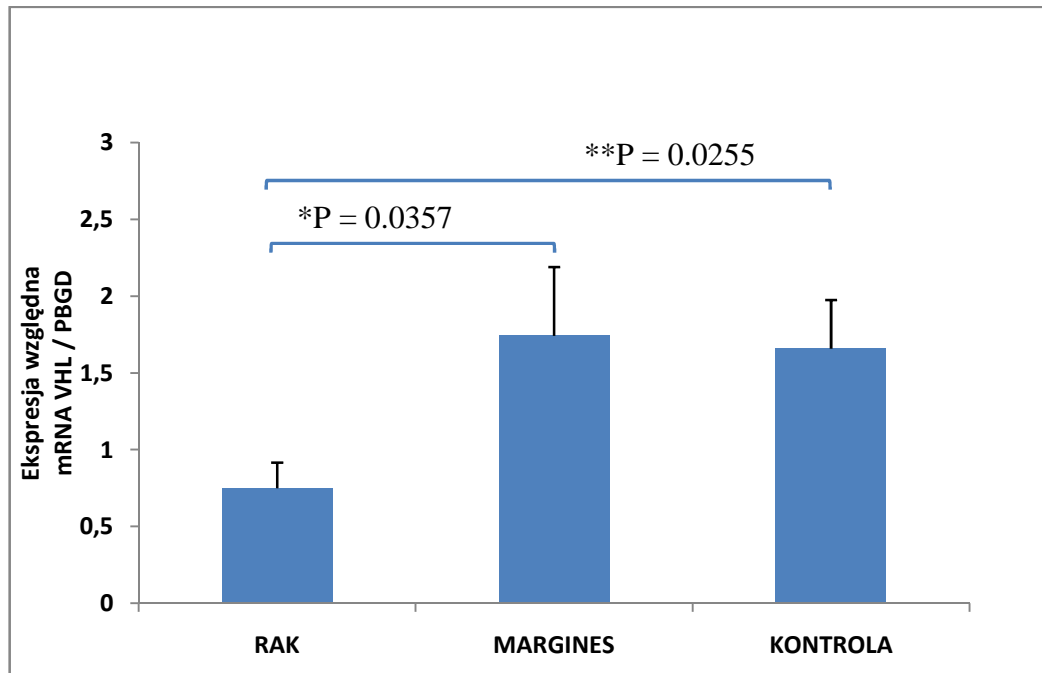
Poziom ekspresji genu *EGLN1* był istotnie niższy w tkance nowotworowej (1.14 ± 0.25) w porównaniu do marginesu operacyjnego (1.88 ± 0.44), $p=0,0247$. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w poziomie ekspresji genu *EGLN1* w tkance nowotworowej i kontroli (1.64 ± 0.47), $p=0.2537$ (ryc. 6). Zmniejszoną ekspresję *EGLN1* stwierdzono u 20 chorych (71.0%).



Rycina 6. Poziom ekspresji mRNA genu *EGLN1* w tkance nowotworowej, marginesie operacyjnym i kontroli. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM; *- różnica w poziomie ekspresji mRNA *EGLN1* w raku i marginesie operacyjnym (test Wilcoxon'a); **- różnica w poziomie ekspresji mRNA pomiędzy rakiem a kontrolą (test Mann-Whitney'a).

4.2.3. Ekspresja mRNA genu *VHL*

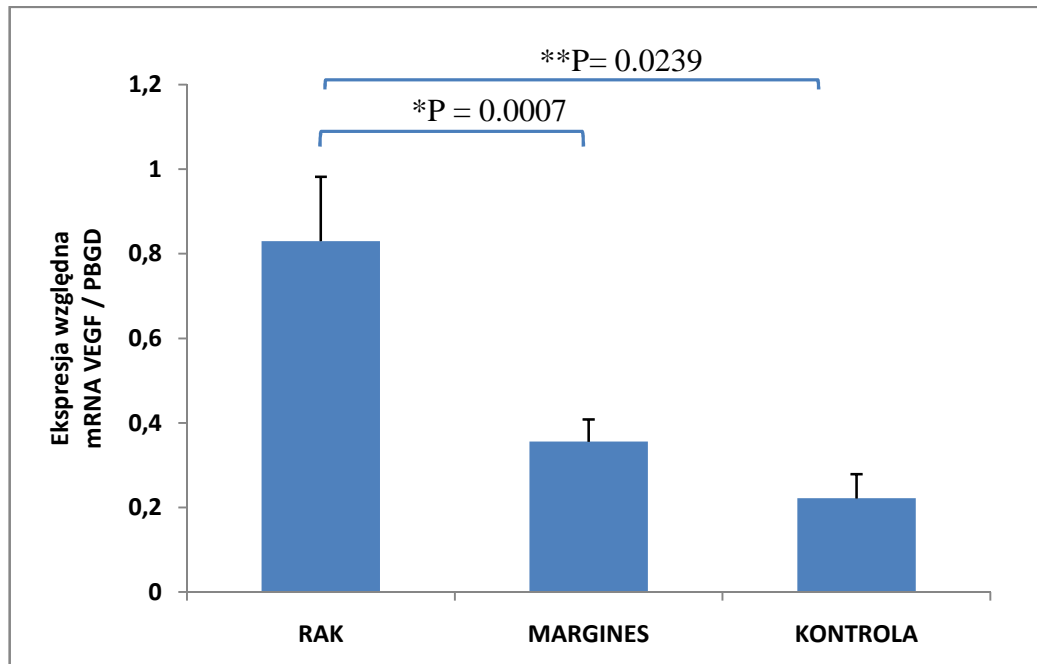
Poziom ekspresji genu *VHL* był istotnie niższy w tkance nowotworowej (0.75 ± 0.17) w porównaniu do marginesu operacyjnego (1.74 ± 0.45), $p=0.0357$ oraz kontroli (1.66 ± 0.32), $p=0.0255$ (ryc. 7). Zmniejszoną ekspresję *VHL* stwierdzono u 22 chorych (79.0%).



Rycina 7. Poziom ekspresji mRNA genu *VHL* w tkance nowotworowej, marginesie operacyjnym i kontroli. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM; *- różnica w poziomie ekspresji mRNA *VHL* w raku i marginesie operacyjnym (test Wilcoxon'a); **- różnica w poziomie ekspresji mRNA pomiędzy rakiem a kontrolą (test Mann-Whitney'a).

4.2.4. Ekspresja mRNA genu *VEGF*

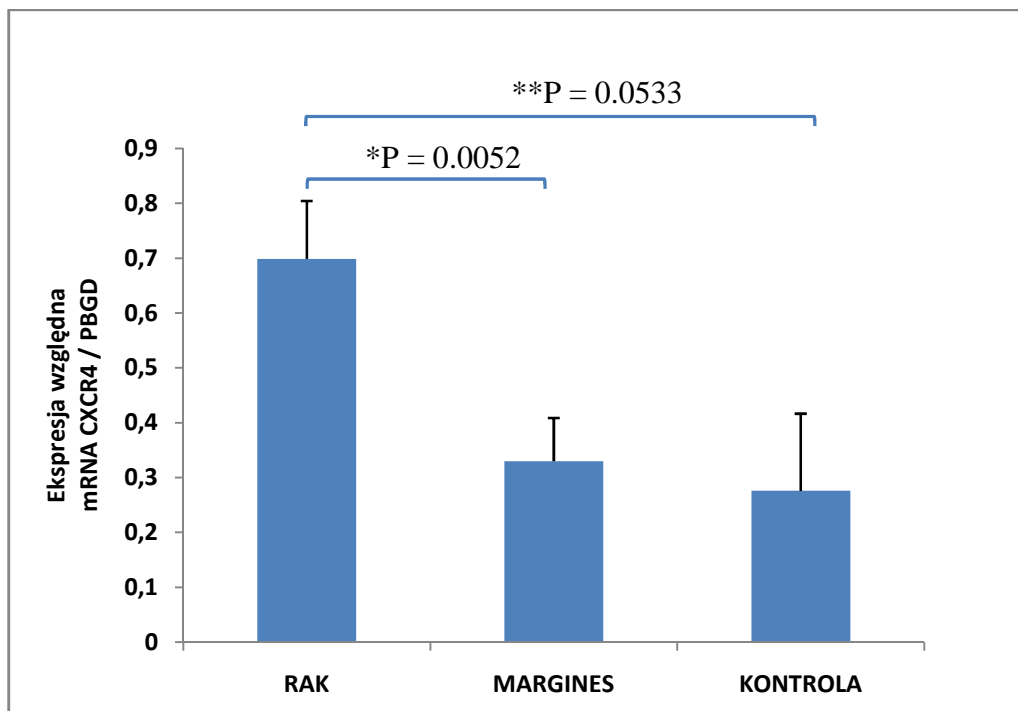
Poziom ekspresji genu *VEGF* był istotnie wyższy w tkance nowotworowej (0.83 ± 0.15) w porównaniu do marginesu operacyjnego (0.36 ± 0.05), $p=0.0007$ oraz kontroli (0.22 ± 0.06), $p=0.0239$ (ryc. 8). Zwiększoną ekspresję *VEGF* stwierdzono u 20 chorych (71.0%).



Rycina 8. Poziom ekspresji mRNA genu *VEGF* w tkance nowotworowej, marginesie operacyjnym i kontroli. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM; *- różnica w poziomie ekspresji mRNA *VEGF* w raku i marginesie operacyjnym (test Wilcoxon'a); **- różnica w poziomie ekspresji mRNA pomiędzy rakiem a kontrolą (test Mann-Whitney'a).

4.2.5. Ekspresja mRNA genu *CXCR4*

Poziom ekspresji genu *CXCR4* był istotnie wyższy w tkance nowotworowej (0.70 ± 0.11) w porównaniu do marginesu operacyjnego (0.33 ± 0.08), $p=0.0052$, natomiast nie różnił się istotnie w porównaniu do poziomu ekspresji w kontroli (0.28 ± 0.14), $p=0.0533$ (ryc. 9). Zwiększoną ekspresję *CXCR4* stwierdzono u 18 chorych (64.0%).



Rycina 9. Poziom ekspresji mRNA genu *CXCR4* w tkance nowotworowej, marginesie operacyjnym i kontroli. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM; *- różnica w poziomie ekspresji mRNA *CXCR4* w raku i marginesie operacyjnym (test Wilcoxon'a); **- różnica w poziomie ekspresji mRNA pomiędzy rakiem a kontrolą (test Mann-Whitney'a).

4.3. Zależność pomiędzy ekspresją mRNA genów: *HIF-1α*, *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w tkance nowotworowej a danymi klinicznymi i histopatologicznymi

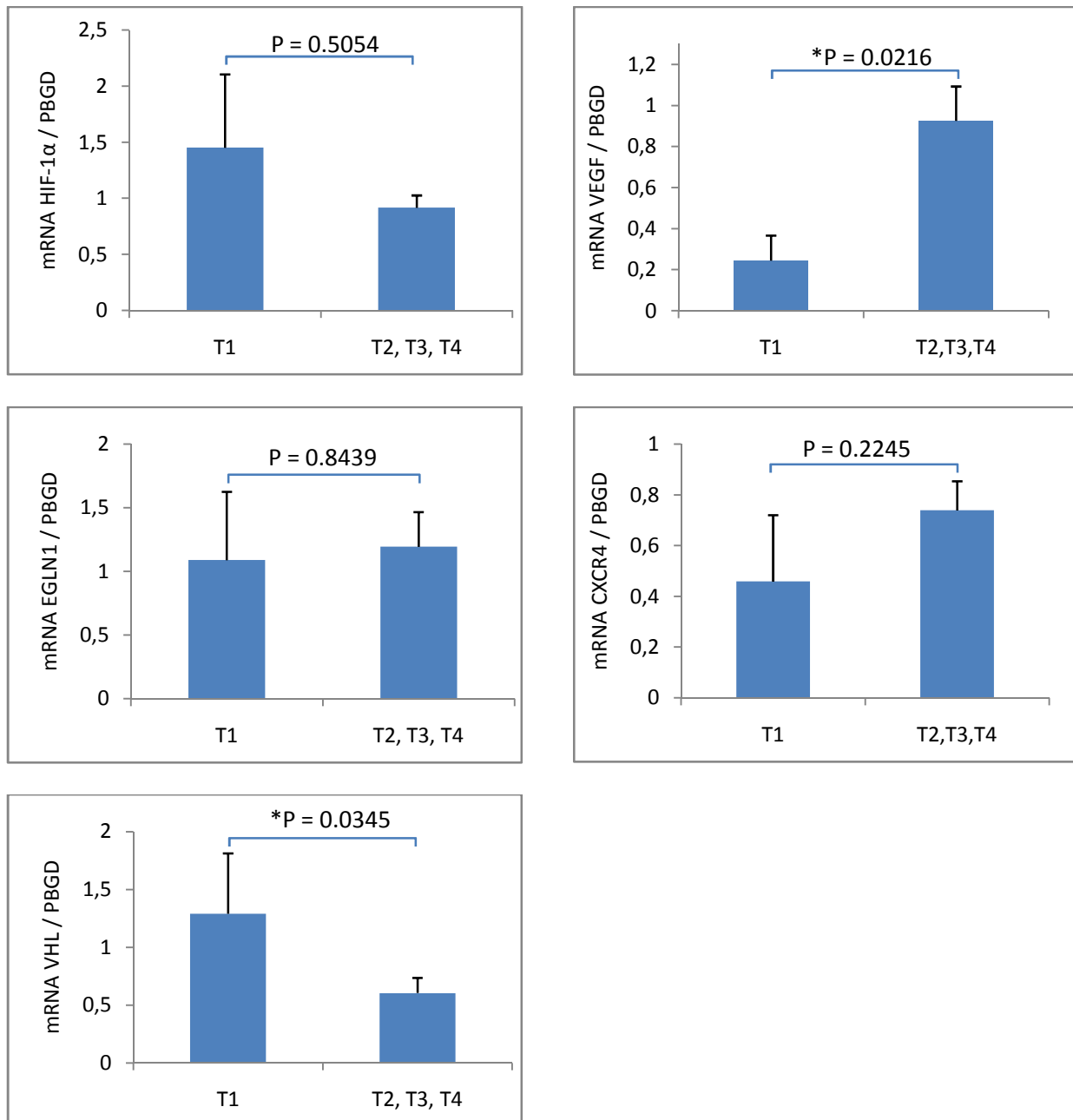
Zaobserwowano istotną statystycznie korelacją pomiędzy średnicą guza nowotworowego a poziomem ekspresji mRNA genów *HIF-1α*, *EGLN1*, *VHL* ($p=0.0233$), ($p=0.0062$), ($p=0.0221$). Stwierdzono korelacją pomiędzy nadekspresją mRNA genu *VEGF* w tkance nowotworowej a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu ($p=0.0441$). Nadekspresja mRNA *CXCR4* korelowała zarówno z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych ($p=0.0028$), jak również ze stopniem zaawansowania klinicznego raka żołądka ($p=0.0054$), (tabela 7).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją analizowanych genów a pozostałymi cechami klinicznymi i histopatologicznymi, takimi jak wiek, płeć, lokalizacja guza, stopień złośliwości histologicznej, przeżywalność pooperacyjna, itd. (tabela 7).

Tabela 7. Korelacja wyników ekspresji mRNA analizowanych genów z danymi klinicznymi i histopatologicznymi pacjentów; (-) - niski poziom ekspresji; (+) - wysoki poziom ekspresji; # - dokładny test Fisher'a; * - test Chi-kwadrat.

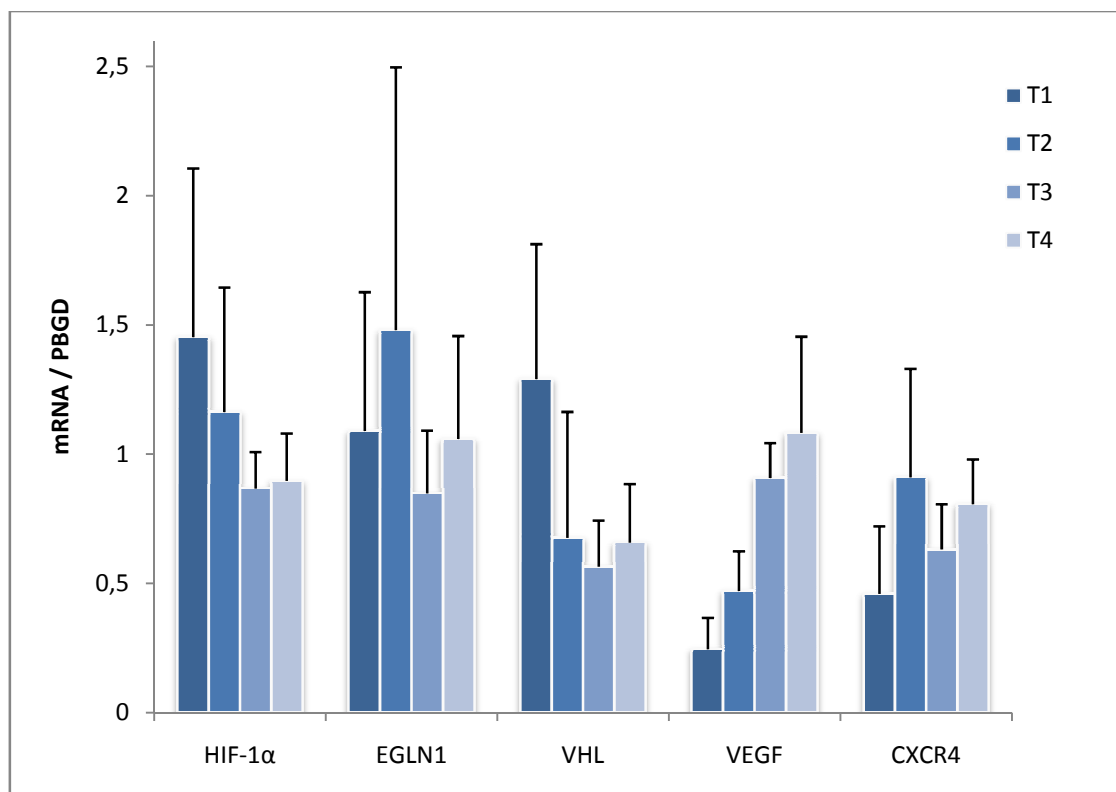
	n	HIF			EGLN1			VHL			VEGF			CXCR4		
		- 7	+ 21	P	- 17	+ 11	P	- 22	+ 6	P	- 8	+ 20	P	- 10	+ 18	P
Wiek ≤60 >60	10 18	1 6	9 12	0.3642 [#]	7 10	3 8	0.6888 [#]	9 13	1 5	0.3746 [#]	3 5	7 13	1.0000 [#]	7 3	3 15	0.0113 [#]
Płeć K M	8 20	3 4	5 16	0.3715 [#]	6 11	2 9	0.4188 [#]	8 14	0 6	0.1412 [#]	2 6	6 14	1.0000 [#]	2 8	6 12	0.6692 [#]
Średnica ≤4cm >4cm	11 17	0 7	11 10	0.0233[#]	3 14	8 3	0.0062[#]	6 16	5 1	0.0221[#]	5 3	6 14	0.1998 [#]	4 6	7 11	1.0000 [#]
Typ jelitowy rozlany mieszany	12 7 9	4 0 3	8 7 6	0.2111 [*]	7 5 5	5 2 4	0.7922 [*]	9 6 7	3 1 2	0.8580 [*]	2 2 4	10 5 5	0.3782 [*]	4 4 2	8 3 7	0.3425 [*]
pT T1-T2 T3-T4	7 21	1 6	6 15	0.6391 [#]	4 13	3 8	1.0000 [#]	5 17	2 4	0.6219 [#]	4 4	3 17	0.1423 [#]	3 7	4 14	0.6744 [#]
pN N0 N1-N3	9 19	0 7	9 12	0.0621 [#]	5 12	4 7	1.0000 [#]	6 16	3 3	0.3518 [#]	4 4	5 15	0.3715 [#]	7 3	2 16	0.0028[#]
pTNM I-II III-IV	12 16	3 4	9 12	1.0000 [#]	7 10	5 6	1.0000 [#]	10 12	2 4	0.6730 [#]	6 2	6 14	0.0441[#]	8 2	4 14	0.0054[#]
G G1/G2 G3	10 18	3 4	7 12	1.0000 [#]	4 13	6 5	0.1245 [#]	6 16	4 2	0.1472 [#]	3 5	7 13	1.0000 [#]	2 8	8 10	0.2474 [#]
Lokalizacja 1/3górna 1/3środkowa 1/3 dystalna Cały żołądek	7 5 15 1	3 0 4 0	4 5 11 1	0.3600 [*]	6 2 8 1	1 3 7 0	0.2929 [*]	6 5 10 1	1 0 5 0	0.3748 [*]	1 1 6 0	6 4 9 1	0.5241 [*]	1 4 5 0	6 1 10 1	0.0995 [*]
Naciekanie naczyń nie tak	19 9	5 2	14 7	1.0000 [#]	11 6	8 3	1.0000 [#]	15 7	4 2	1.0000 [#]	7 1	12 8	0.2144 [#]	9 1	10 8	0.0980 [#]
Przeżycie 6 m-y nie tak	4 24	1 6	3 18	1.0000 [#]	3 14	1 10	1.0000 [#]	3 19	1 5	1.0000 [#]	0 8	4 16	0.2947 [#]	0 10	4 14	0.2652 [#]
Przeżycie 1 rok nie tak	9 19	2 5	7 14	1.000 [#]	6 11	3 8	1.0000 [#]	6 16	3 3	0.3518 [#]	2 6	7 13	1.0000 [#]	1 9	8 10	0.0980 [#]
Przeżycie 3 lata nie tak	15 13	4 3	11 10	1.000 [#]	10 7	5 6	0.7000 [#]	11 11	4 2	0.6546 [#]	3 5	12 8	0.4097 [#]	3 7	12 6	0.1141 [#]

4.4. Analiza poziomu ekspresji mRNA genów *HIF-1α*, *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu (cecha T)



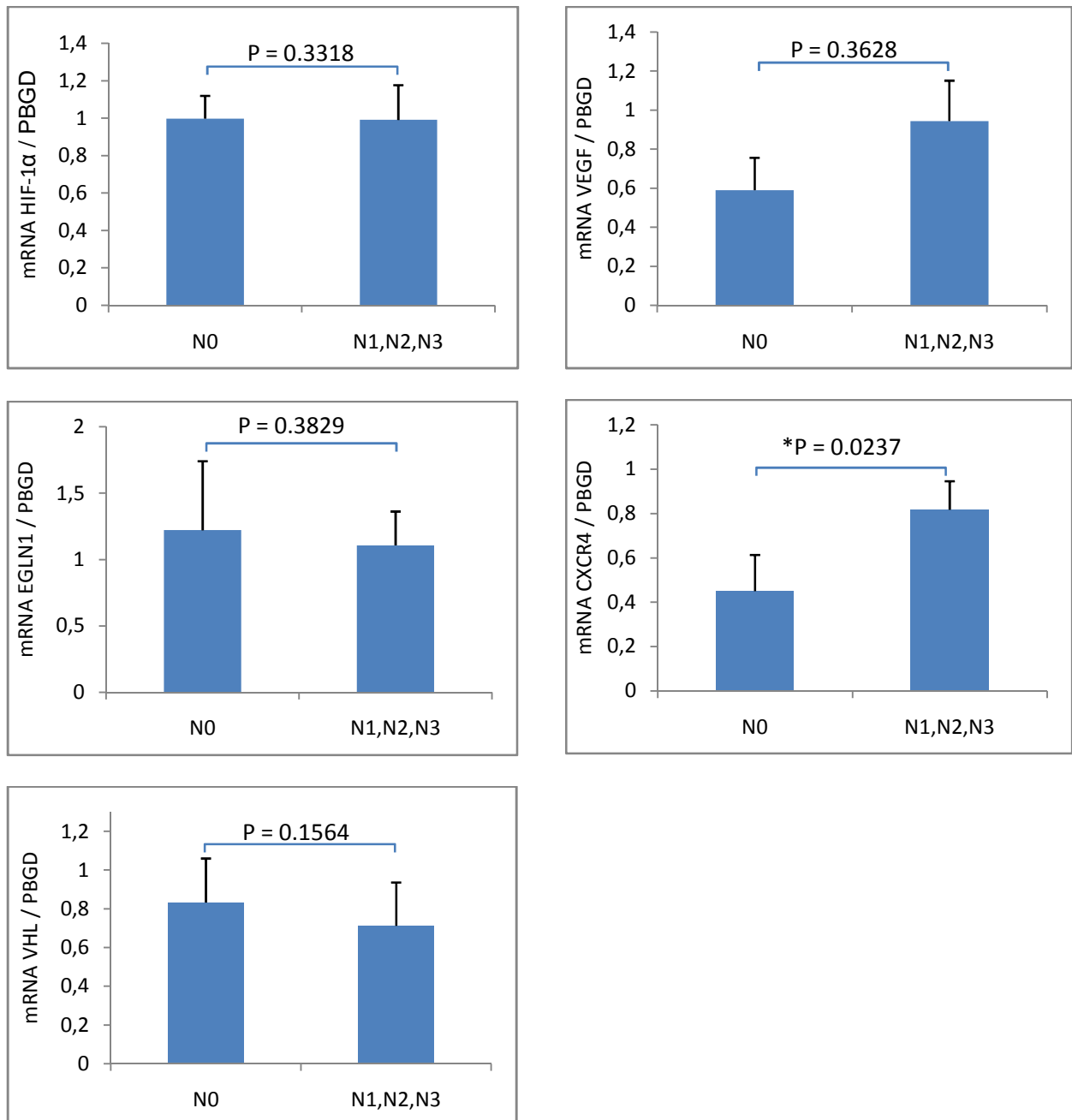
Rycina 10. Porównanie poziomu ekspresji genów *HIF-1α*, *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w guzach T1 z poziomem ekspresji w guzach T2, T3, T4. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM; * $p < 0,05$; test Mann-Whitney'a.

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w średnim poziomie ekspresji mRNA genu *VHL* i *VEGF* pomiędzy chorymi z guzem T1, a chorymi z guzami zaawansowanymi T2, T3, T4 ($p = 0.0345$, $p = 0.0216$) (ryc. 10).



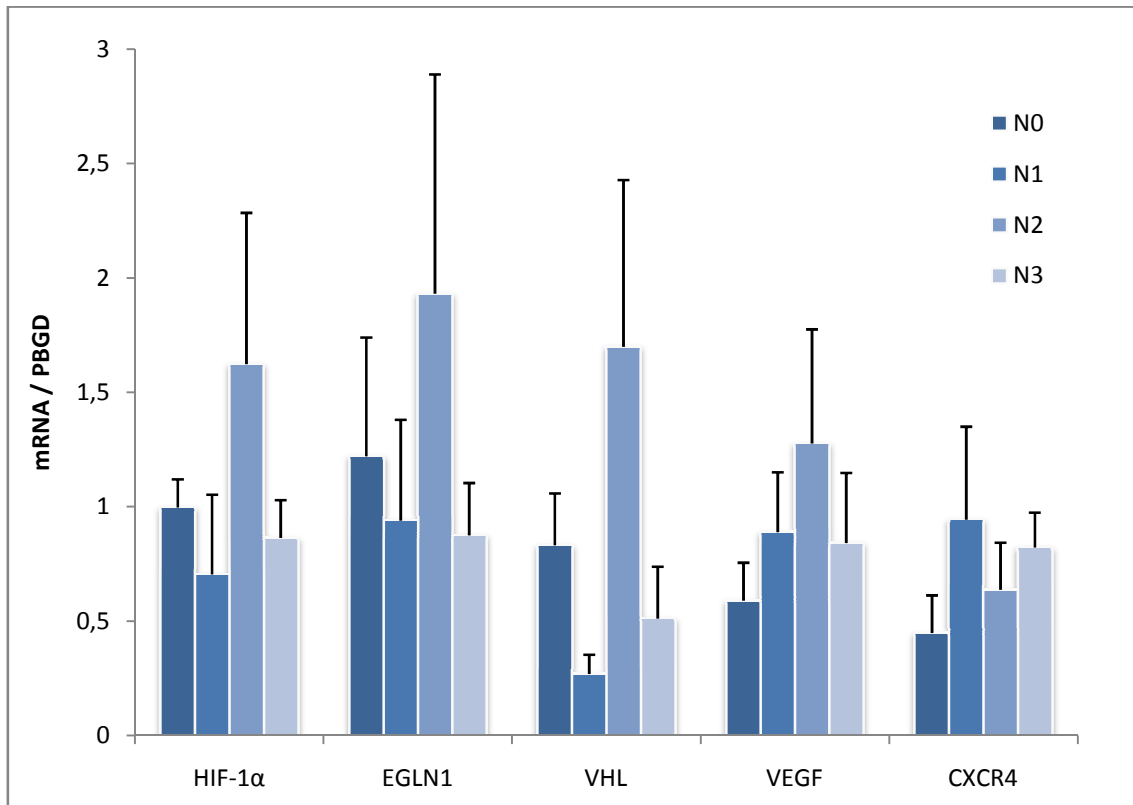
Rycina 11. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA analizowanych genów: *HIF-1α*, *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* a wielkością guza nowotworowego (cecha T). Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM.

4.5. Analiza poziomu ekspresji mRNA genów *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w zależności od obecności przerzutów do węzłów chłonnych (cecha N)



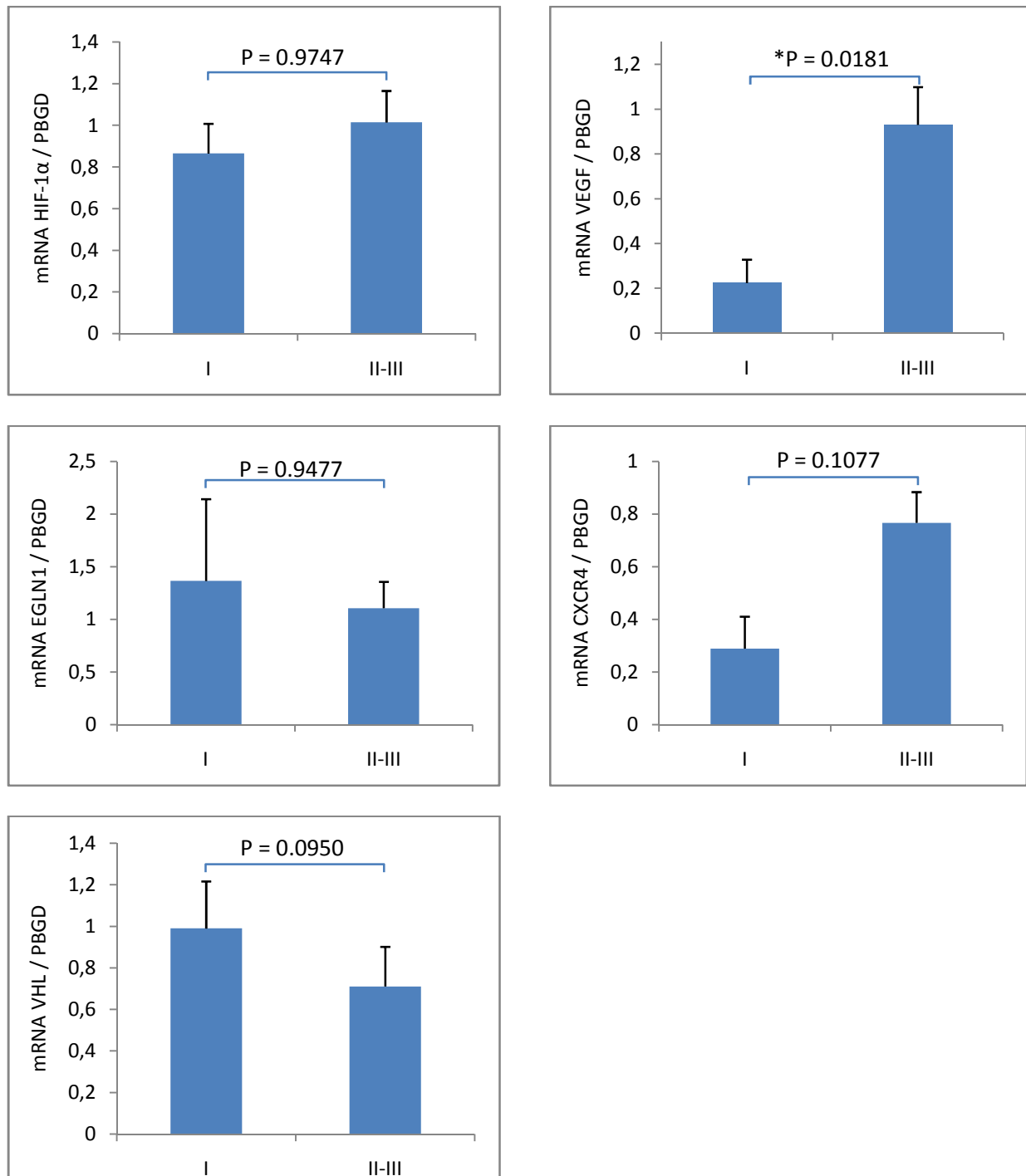
Rycina 12. Porównanie poziomu ekspresji genów *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w guzach u pacjentów bez przerzutów do węzłów chłonnych (N0) z poziomem ekspresji w guzach N1, N2, N3. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM; * $p < 0,05$; test Mann-Whitney'a.

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w średnim poziomie ekspresji mRNA genu *CXCR4* pomiędzy chorymi bez przerzutów do węzłów chłonnych (N0), a chorymi z obecnością przerzutów (N1, N2, N3) ($p = 0.0237$) (ryc. 12).



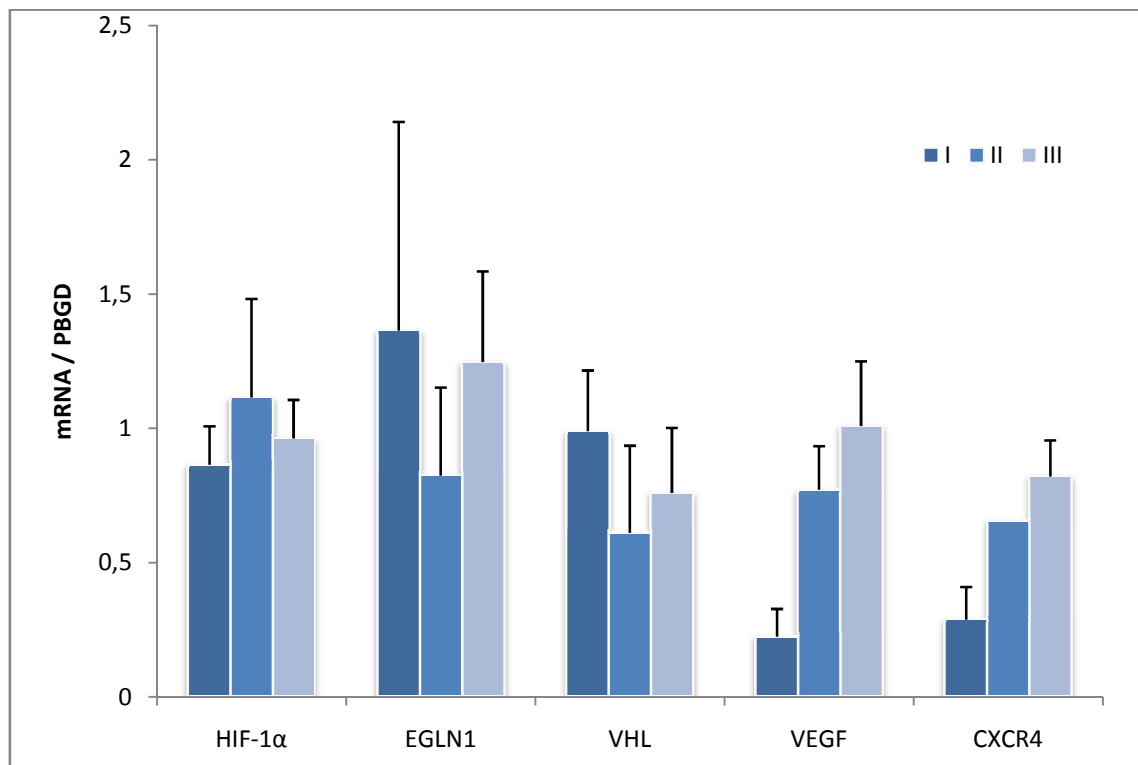
Rycina 13. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA analizowanych genów: *HIF-1α*, *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* a stopniem zaawansowania węzłów chłonnych (cecha N). Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM.

4.6. Analiza poziomu ekspresji mRNA genów: *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu



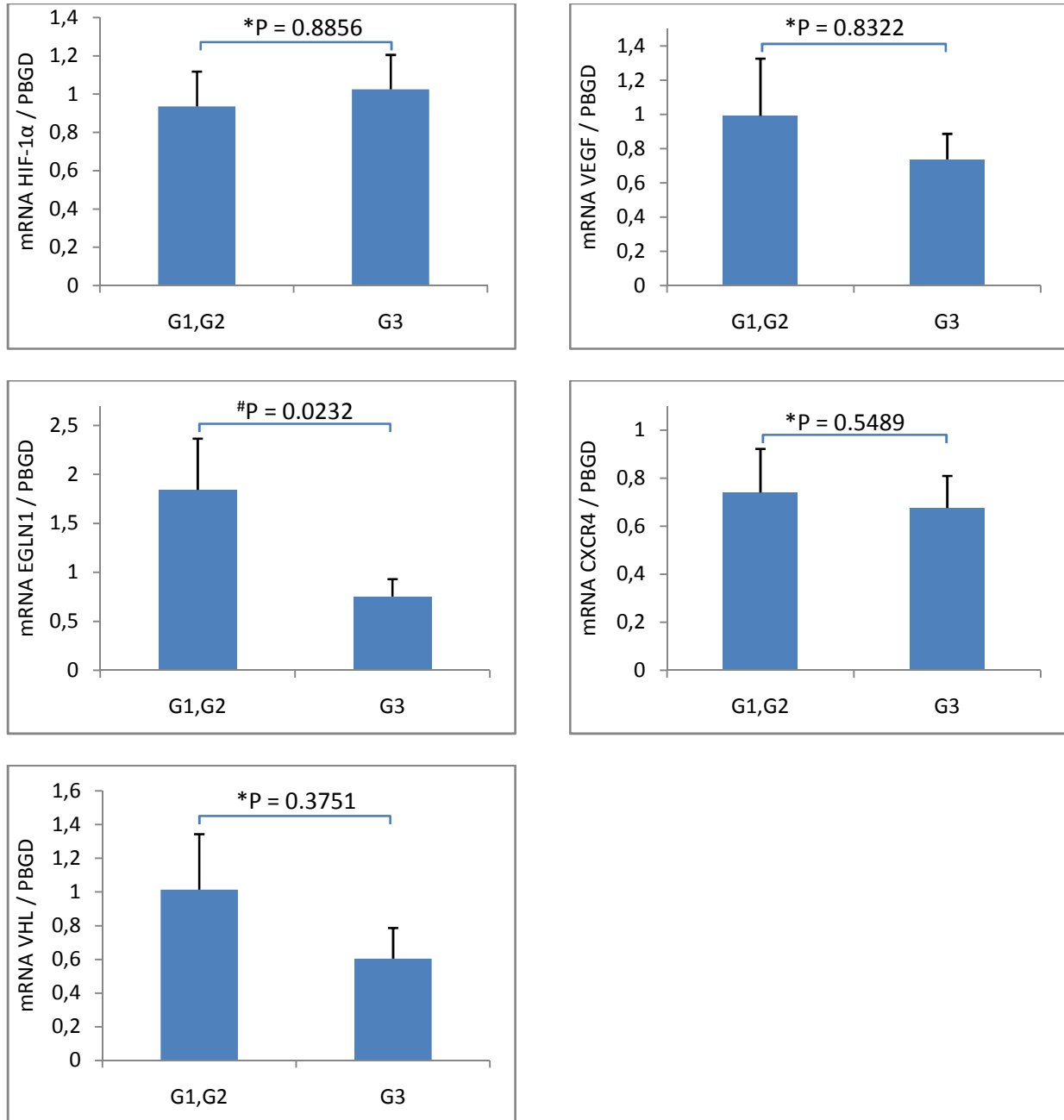
Rycina 14. Porównanie poziomu ekspresji mRNA analizowanych genów: *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w guzach u pacjentów w stadium I zaawansowania klinicznego ze stadiami II i III. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM; * $p < 0,05$; test Mann-Whitney'a.

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w średnim poziomie ekspresji mRNA genu *VEGF* pomiędzy chorymi w stopniu I zaawansowania klinicznego, a chorymi w stopniu II/II ($p = 0.0181$) (ryc. 14).



Rycina 15. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA genów *HIF-1α*, *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworów. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM.

4.7. Analiza poziomu ekspresji mRNA genów *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w zależności od stopnia złośliwości histologicznej nowotworu (cecha G)

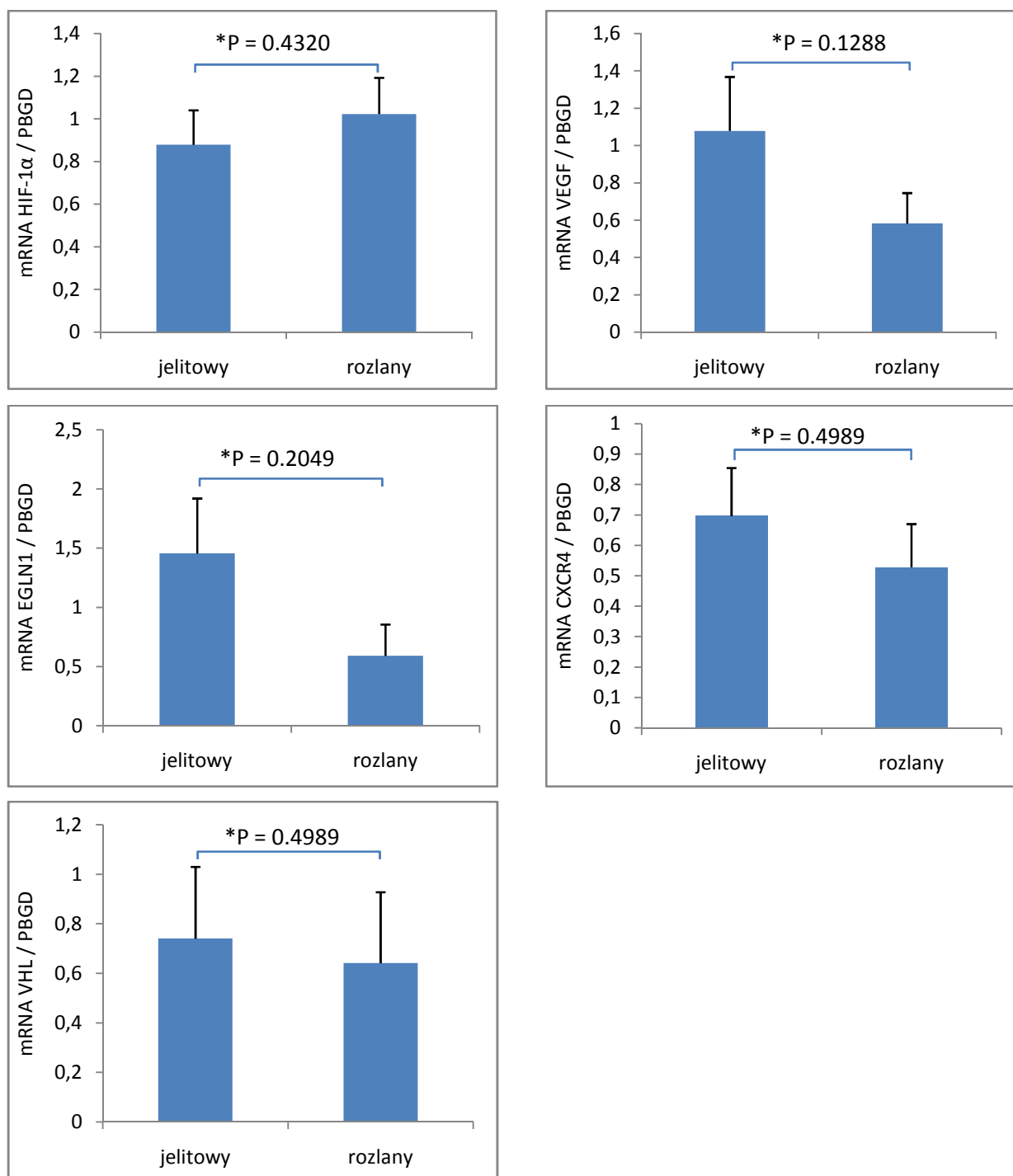


Rycina 16. Porównanie poziomu ekspresji mRNA analizowanych genów: *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w guzach o stopniu złośliwości G1/G2 z guzami o stopniu złośliwości G3. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM; # - test T-Studenta; *- test Mann-Whitney'a.

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w średnim poziomie ekspresji mRNA genu *EGLN1* pomiędzy chorymi z guzem G1/G2 a chorymi z guzami o stopniu złośliwości G3 ($p = 0.0232$) (ryc. 16).

4.8. Analiza poziomu ekspresji mRNA genów *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w zależności od typu raka żołądka w klasyfikacji Laurena

Zaobserwowano różnicę w poziomie ekspresji genów *EGLN1* i *VEGF* w zależności od typu raka żołądka w klasyfikacji Laurena. Różnice te jednak nie były istotne statystycznie. Ekspresja mRNA *EGLN1* była niższa w typie rozlanym w porównaniu do typu jelitowego ($p=0.2049$). Jeżeli chodzi o ekspresję mRNA *VEGF* to zaobserwowano jej wyższy poziom w typie jelitowym raka żołądka ($p=0.1288$).



Rycina 17. Porównanie poziomu ekspresji mRNA analizowanych genów: *HIF-1α*, *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w guzach pomiędzy typem jelitowym i rozlanym według klasyfikacji Laurena. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM;*- test Mann-Whitney'a.

4.9. Analiza zależności pomiędzy poziomem ekspresji mRNA poszczególnych genów: *HIF-1α*, *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4*

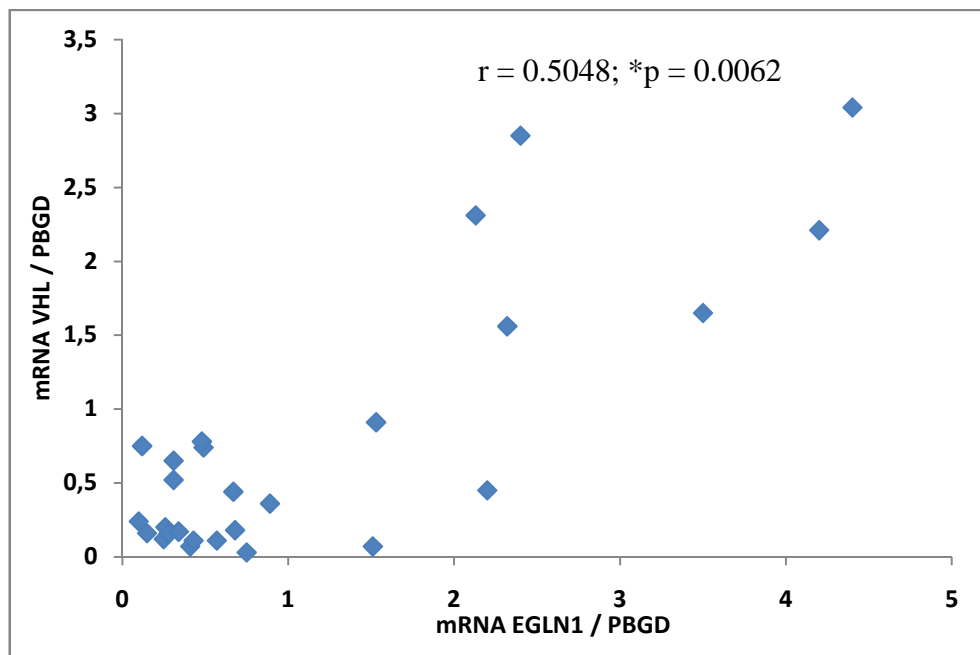
Zaobserwowano istotną statystycznie korelację pomiędzy poziomem ekspresji mRNA genu *EGLN1* i *VHL* ($p=0.0012$). U wszystkich chorych z niską ekspresją mRNA *EGLN1* zaobserwowano również niski poziom ekspresji mRNA *VHL* (tabela 8). Nie stwierdzono natomiast korelacji pomiędzy poziomem ekspresji mRNA czynnika *HIF-1α* a poziomem ekspresji mRNA jego genów docelowych: *VEGF*, *CXCR4*. Nie wykazano również istotnej statystycznie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji *HIF-1α* a genami odgrywającymi rolę w regulacji tego czynnika: *EGLN1*, *VHL* (tabela 8).

Tabela 8. Zależność poziomu ekspresji mRNA pomiędzy poszczególnymi analizowanymi genami; (-) – niski poziom ekspresji; (+) – wysoki poziom ekspresji; #P – dokładny test Fisher’a.

		n	HIF			EGLN1			VHL			VEGF		
			-	+	#P	-	+	#P			#P			#P
N			7	21		17	11		22	6		8	20	
EGLN1	-	17	5	12	0.6683									
	+	11	2	9										
VHL	-	22	6	16	1.0000	17	5	0.0012						
	+	6	1	5		0	6							
VEGF	-	8	2	6	1.0000	6	2	0.4188	7	1	0.6399			
	+	20	5	15		11	9		15	5				
CXCR4	-	10	1	9	0.3642	6	4	1.0000	10	0	0.0619	4	6	0.4004
	+	18	6	12		11	7		12	6		4	14	

4.9.1. Analiza związku pomiędzy poziomem ekspresji mRNA genu *EGLN1* i *VHL*

Stwierdzono istotną statystycznie liniową korelację pomiędzy poziomem ekspresji mRNA genów *VHL* i *EGLN1* (współczynnik korelacji Spearman'a $r=0.5048$; $p=0.0062$). W większości przypadków w tkance nowotworowej raka żołądka obserwowano niski poziom ekspresji mRNA zarówno genu *EGLN1* jak i *VHL* (ryc. 18).



Rycina 18. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA genu *EGLN1* a poziomem ekspresji mRNA genu *VHL* w tkance nowotworowej raka żołądka; *-test korelacji Spearmana.

4.10. Analiza immunohistochemiczna

Na podstawie oceny immunohistochemicznej ekspresji białek VEGF i CD34 zakwalifikowano chorych do grupy o niskiej ekspresji (+) oraz wysokiej ekspresji (++)/+++).

4.10.1. Ekspresja białka VEGF w tkance nowotworowej raka żołądka

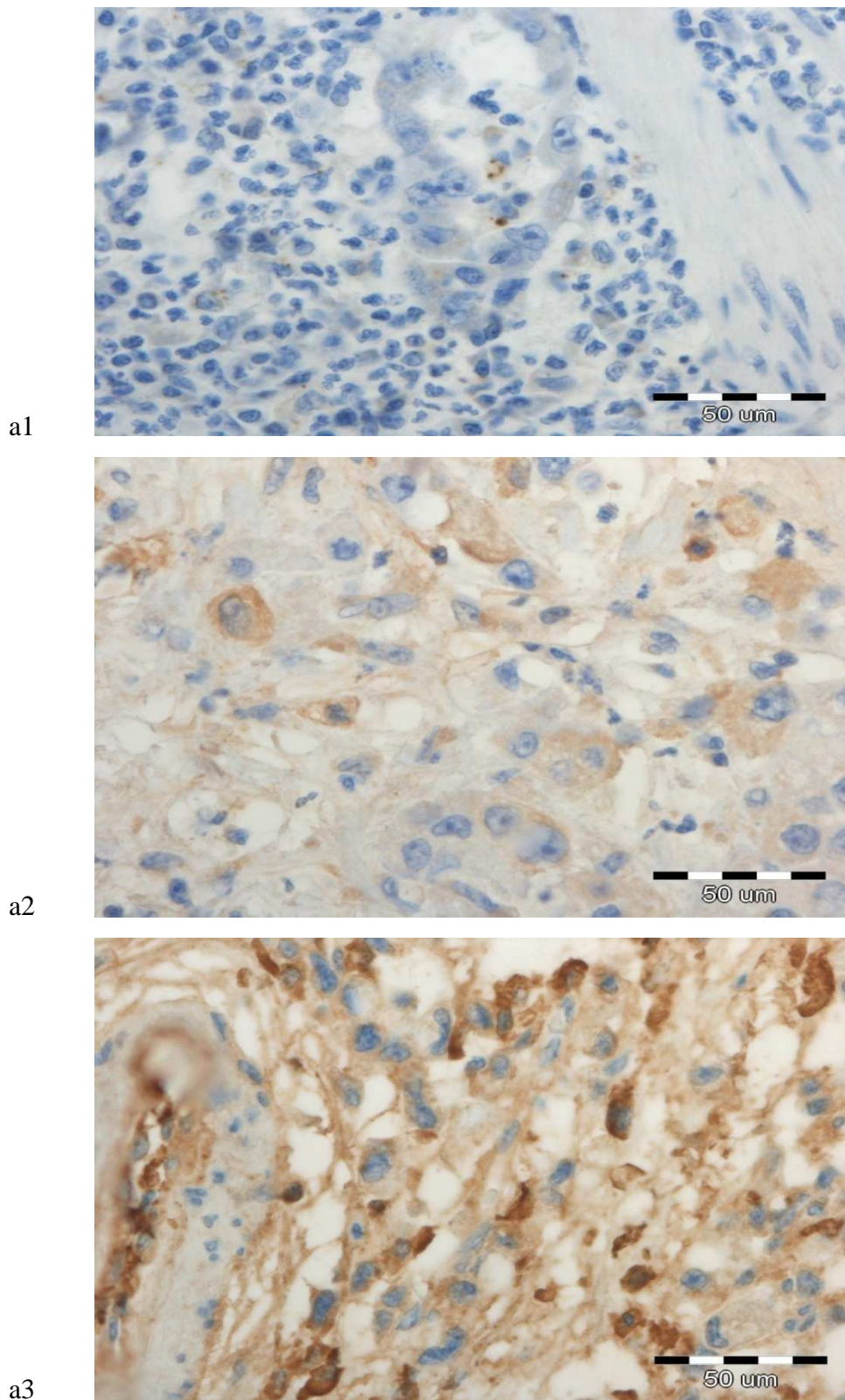
Wysoki poziom ekspresji białka VEGF (++)/+++ [ryc. a2; a3] stwierdzono u 12 chorych (60%), natomiast poziom niski (+) [ryc. a1] zaobserwowano u 8 chorych (40%) (tabela 9).

4.10.2. Ekspresja białka CD34 w tkance nowotworowej raka żołądka

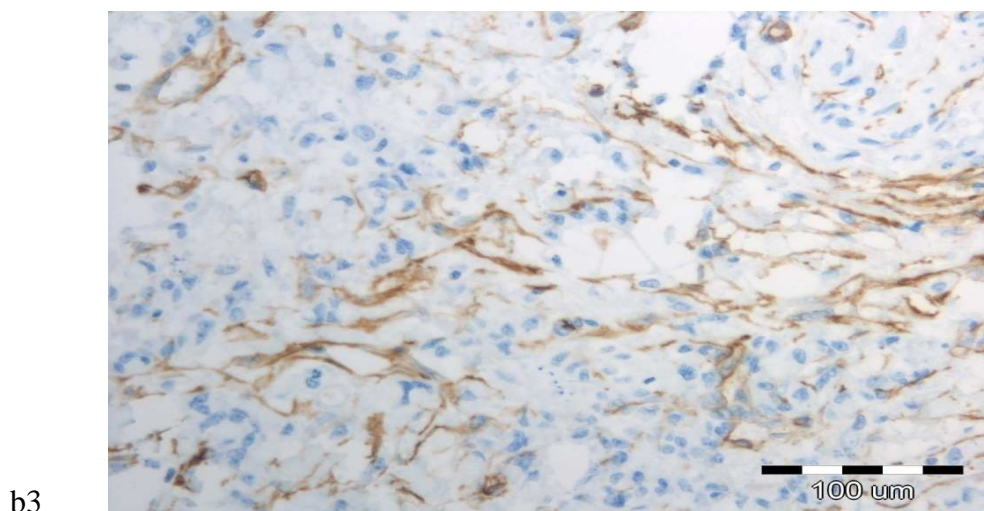
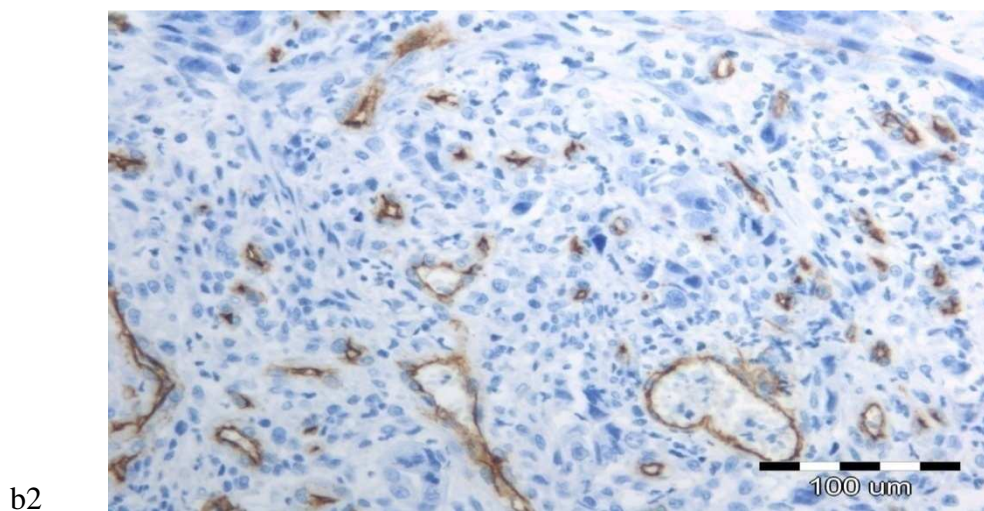
Wysoki poziom gęstości naczyń krwionośnych MVD (ang. *microvascular density*) oceniony za pomocą immunohistochemicznej analizy antygenu CD34 (++)/+++ [ryc. b2; b3] stwierdzono u 17 chorych (85%), natomiast poziom niski (+) [ryc. b1] zaobserwowano u 3 chorych (15%) (tabela 9).

Tabela 9. Ocena immunohistochemiczna ekspresji białka VEGF i CD34 w tkance nowotworowej raka żołądka u 20 analizowanych pacjentów.

	n (20)	%
VEGF		
+ (<10%)	8	40.0
++ (10-50%)	7	35.0
+++ (>50%)	5	25.0
CD34		
+	3	15.0
++	7	35.0
+++	10	50.0



Rycina 19. Wyniki badania immunohistochemicznego VEGF w tkance nowotworowej raka żołądka u wybranych chorych. Kolor brązowy oznacza reakcję pozytywną. Niski poziom ekspresji (+) VEGF (a1); średni poziom ekspresji (++) VEGF (a2); wysoki poziom ekspresji (+++) VEGF (a3).



Rycina 20. Wyniki badania immunohistochemicznego CD34 w tkance nowotworowej raka żołądka u wybranych chorych. Kolor brązowy oznacza reakcję pozytywną. Niski poziom ekspresji (+) CD34 (b1); średni poziom ekspresji (++) CD34 (b2); wysoki poziom ekspresji (+++) CD34 (b3).

4.11. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji białek VEGF i CD34 w tkance nowotworowej a danymi klinicznymi i histopatologicznymi

Związek pomiędzy ekspresją białka VEGF i CD34 a parametrami klinicznymi i patologicznymi podsumowano w tabeli 10. Nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją białek VEGF i CD34 a cechami klinicznymi, takimi jak wiek, płeć, lokalizacja guza, i histopatologicznymi (tabela 10). Zaobserwowano związek pomiędzy średnicą guza nowotworowego, a poziomem ekspresji białka VEGF. Zależność ta nie była jednak istotna statystycznie ($p = 0.0547$).

Tabela 10. Korelacja wyników immunohistochemicznej oceny ekspresji białek VEGF i CD34 z danymi klinicznymi i histopatologicznymi; # - dokładny test Fisher'a; * - test Chi-kwadrat.

	N	VEGF			CD34		
		+	++/+++	P	+	++/+++	P
N		8	12		3	17	
Wiek							
≤60	8	4	4	0.6479 [#]	1	7	1.0000 [#]
>60	12	4	8		2	10	
Płeć							
K	8	3	5	1.0000 [#]	1	7	1.0000 [#]
M	12	5	7		2	10	
Średnica							
≤4cm	5	0	5	0.0547 [#]	0	5	0.5395 [#]
>4cm	15	8	7		3	12	
Klasyfikacja Laurena							
jelitowy	9	3	6	0.5738*	2	7	0.4665*
rozlany	6	2	4		0	6	
mieszany	5	3	2		1	4	
Cecha T							
T1-T2	4	2	2	1.0000 [#]	0	4	1.0000 [#]
T3-T4	16	6	10		3	13	
Cecha N							
N0	6	2	4	1.0000 [#]	1	5	1.0000 [#]
N1-N3	14	6	8		2	12	
Stopień zaawansowania							
I-II	8	4	4	0.6479 [#]	2	6	0.5368 [#]
III-IV	12	4	8		1	11	

	N	VEGF			CD34		
Stopień złośliwości histologicznej							
G1/G2	6	3	3	0.6424 [#]	0	6	0.5211 [#]
G3	14	5	9		3	11	
Lokalizacja							
1/3górna	6	1	5	0.3217*	1	5	0.5316*
1/3środkowa	5	3	2		0	5	
1/3 dystalna	9	4	5		2	7	
cały żołądek	0	0	0		0	0	
Naciekanie naczyń							
nie	13	5	8	1.0000 [#]	3	10	0.5211 [#]
tak	7	3	4		0	7	
Przeżycie (6 m-y)							
nie	3	1	2	1.0000 [#]	0	3	1.0000 [#]
tak	17	7	10		3	14	
Przeżycie (1 rok)							
nie	6	2	4	1.0000 [#]	0	6	0.5211 [#]
tak	14	6	8		3	11	
Przeżycie (3 lata)							
nie	11	4	7	1.0000 [#]	0	11	0.0737 [#]
tak	9	4	5		3	6	

4.12. Analiza związku pomiędzy ekspresją białka VEGF a gęstością naczyń (MVD) ocenioną za pomocą markera CD34

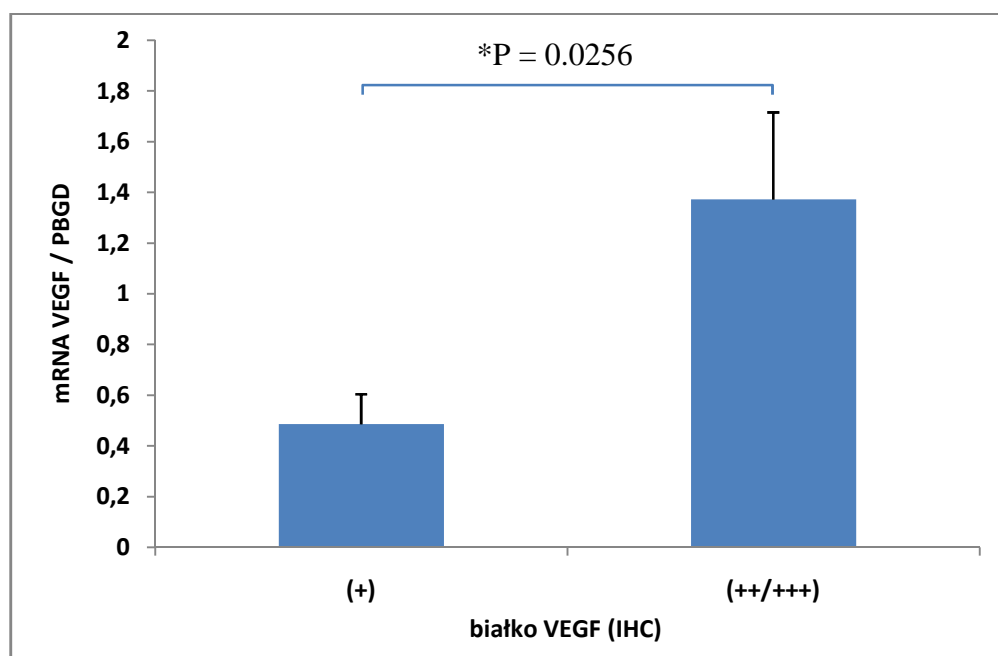
Poziom ekspresji białka VEGF oceniony za pomocą badania immunohistochemicznego był istotnie statystycznie związany z gęstością naczyń (MVD) ocenioną za pomocą markera CD34. Wszystkie guzy, w których stwierdzono wysoką ekspresję białka VEGF cechowały się również wysoką ekspresją białka CD34, będącego markerem gęstości naczyń. Stwierdzono statystycznie istotną korelację pomiędzy wynikami badań immunohistochemicznych markerów VEGF i CD34 ($p=0.0491$) (tabela 11).

Tabela 11. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji białka VEGF i markera CD34 ocenionych za pomocą badania immunohistochemicznego w tkance nowotworowej raka żołądka u 20 chorych; # - dokładny test Fisher'a.

	VEGF		*P
	+ (8)	++/+++ (12)	
CD34			
+ (3)	3	0	0.0491
++/+++ (17)	5	12	

4.13. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA genu *VEGF* a ekspresją białka VEGF ocenioną za pomocą badania immunohistochemicznego

Zaobserwowano istotną statystycznie korelację pomiędzy poziomem ekspresji mRNA *VEGF* ocenionej za pomocą RT-PCR oraz ekspresją białka VEGF ocenioną za pomocą badania immunohistochemicznego (IHC) (ryc. 21). W grupie chorych o niskiej ekspresji białka VEGF (+) średni poziom ekspresji mRNA *VEGF* w tkance nowotworowej był istotnie statystycznie niższy niż w grupie chorych z wysoką (++)/+++ ekspresją białka VEGF ($p = 0.0256$).

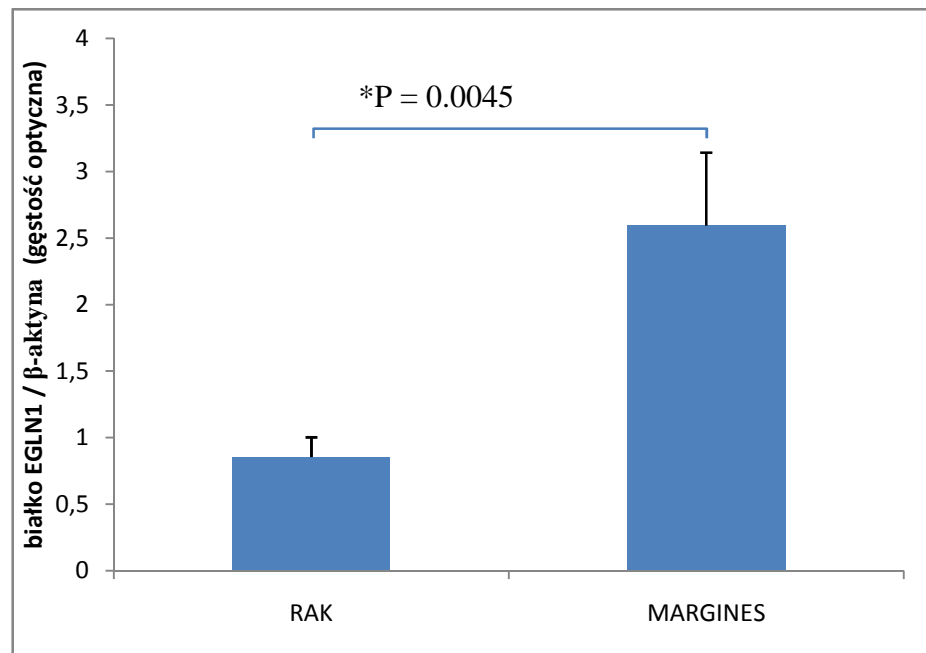


Rycina 21. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA *VEGF* ocenionej za pomocą RT-PCR oraz ekspresją białka VEGF ocenioną za pomocą badania immunohistochemicznego. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM; *- test T-Studenta.

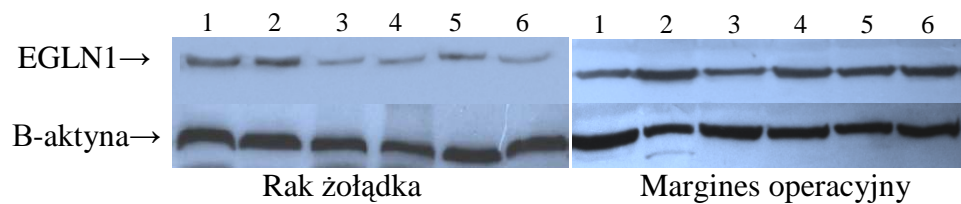
4.14. Analiza Western blot ekspresji białka EGLN1

Za pomocą techniki Western blot oceniono ekspresję białka EGLN1 u 18 chorych w materiale operacyjnym pobranym z guza nowotworowego oraz błony śluzowej marginesu operacyjnego, która stanowiła kontrolę. Poziom ekspresji białka EGLN1 był istotnie niższy w tkance nowotworowej (0.85 ± 0.15) w porównaniu do marginesu operacyjnego (2.59 ± 0.55), $p=0.0045$ (ryc. 22A).

A



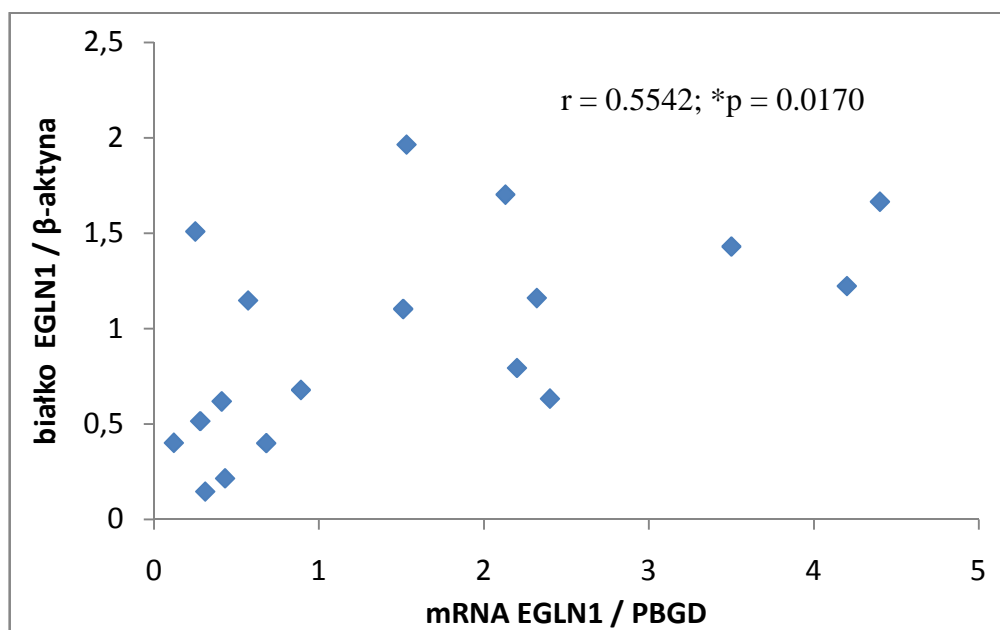
B



Rycina 22. (A) Poziom ekspresji białka EGLN1 w tkance nowotworowej raka żołądka i marginesie operacyjnym. Wyniki ekspresji białka EGLN1 normalizowano względem białka β -aktyny i przedstawiano, jako względną gęstość optyczną. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM; *-test T-studenta dla zmiennych powiązanych. (B) Przykładowe zdjęcie analizy Western blott poziomu białka EGLN1 w tkance nowotworowej raka żołądka i błonie śluzowej marginesu operacyjnego.

4.15. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA genu *EGLN1* a ekspresją białka *EGLN1* ocenioną za pomocą analizy Western blot

Zaobserwowano istotną statystycznie korelację pomiędzy poziomem ekspresji mRNA *VEGF* ocenionej za pomocą RT-PCR oraz ekspresją białka *VEGF* ocenioną za pomocą badania Western blot (współczynnik korelacji Spearmana $r=0.5542$; $p=0.0170$) (ryc. 23).



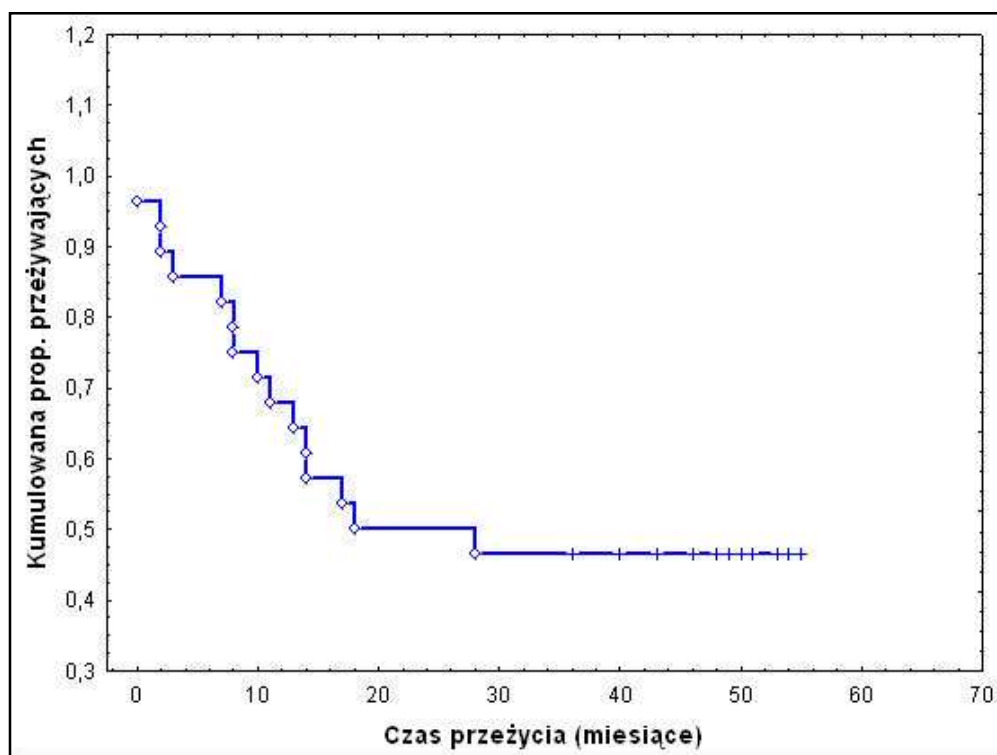
Rycina 23. Korelacja pomiędzy poziomem ekspresji mRNA *EGLN1* ocenionej za pomocą RT-PCR oraz ekspresją białka *EGLN1* ocenioną za pomocą analizy Western blot; *-test korelacji Spearmana.

4.16. Analiza przeżywalności pooperacyjnej

Przeanalizowano przeżywalność chorych operowanych z powodu raka żołądka. Chorzy w analizowanej grupie byli operowani od maja 2006r do stycznia 2008r.

4.16.1. Przeżywalność całkowita

W grupie chorych żyjących w momencie przeprowadzania analizy okres obserwacji mieścił się w przedziale od 36 do 55 miesięcy. Przeżywalność 3-letnia w analizowanej grupie chorych wynosiła 46,4% (ryc. 24).



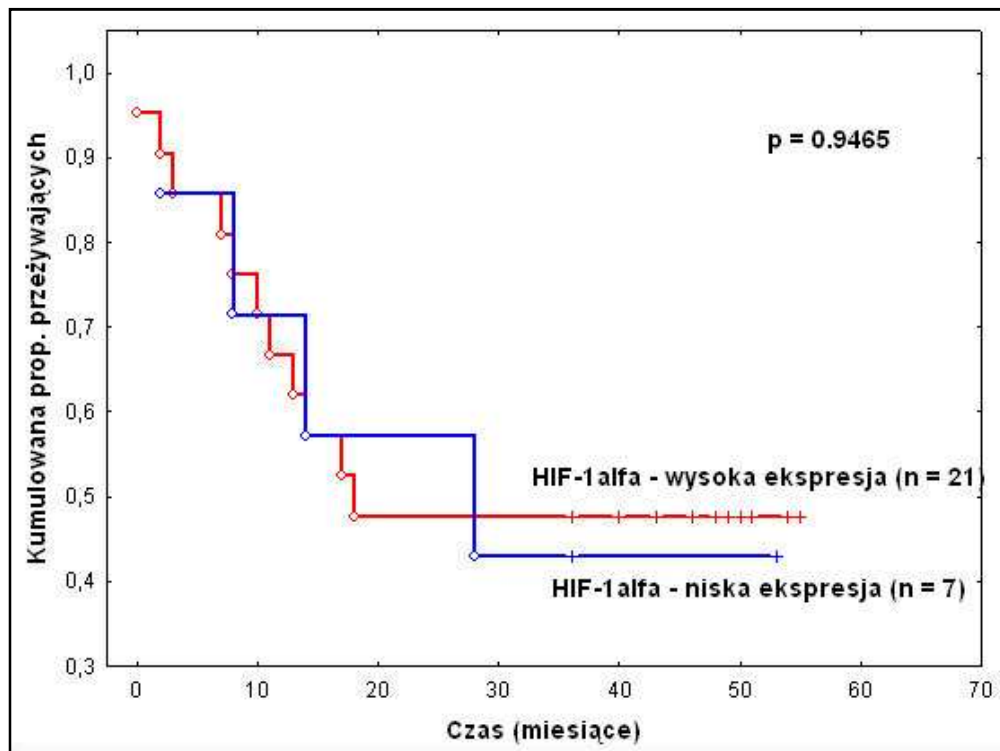
Rycina 24. Krzywa Kaplana-Meiera przeżycia pacjentów operowanych z powodu raka żołądka.

4.16.2. Analiza przeżywalności pooperacyjnej w zależności od poziomu ekspresji mRNA genów *HIF-1α*, *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4*

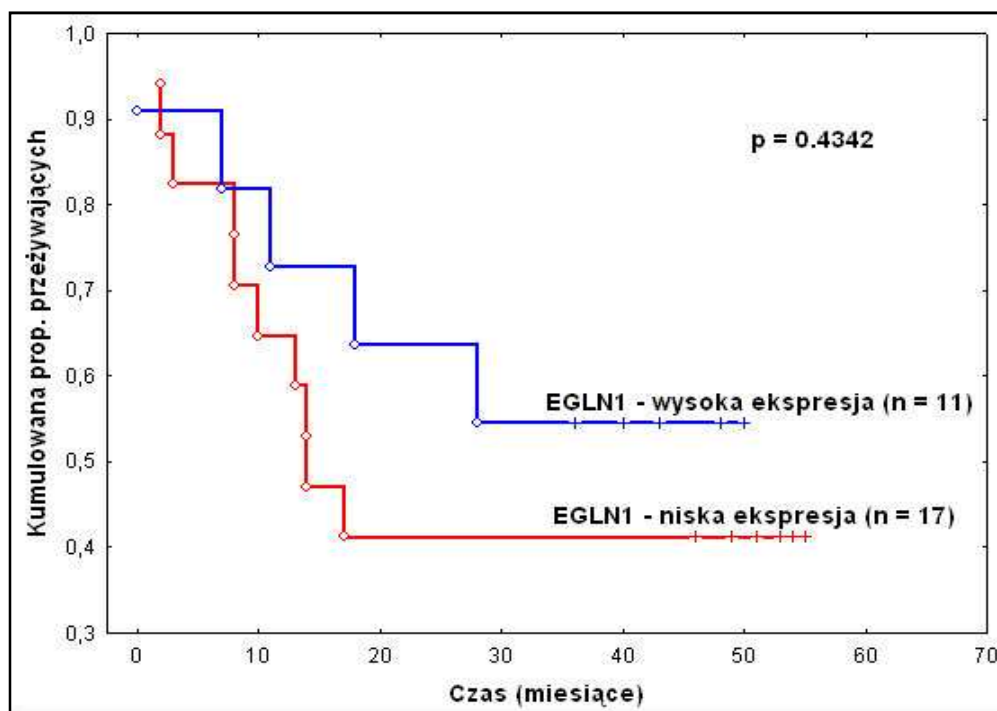
Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w przeżywalności w zależności od poziomu ekspresji mRNA genu *CXCR4*, $p = 0.0089$ (ryc. 29). Przeżywalność w grupie chorych z wysoką ekspresją genu *CXCR4* była istotnie niższa od przeżywalności chorych z niską ekspresją tego genu.

Analiza przeżywalności w zależności od poziomu ekspresji mRNA genu *VEGF* w tkance nowotworowej wskazuje na różnicę w przeżywalności w obydwu grupach, tzn. przeżywalność w grupie chorych z wysoką ekspresją genu *VEGF* jest niższa niż w przypadku chorych z niską ekspresją (ryc 28). Jednak różnica ta nie była istotna statystycznie, $p=0.2673$.

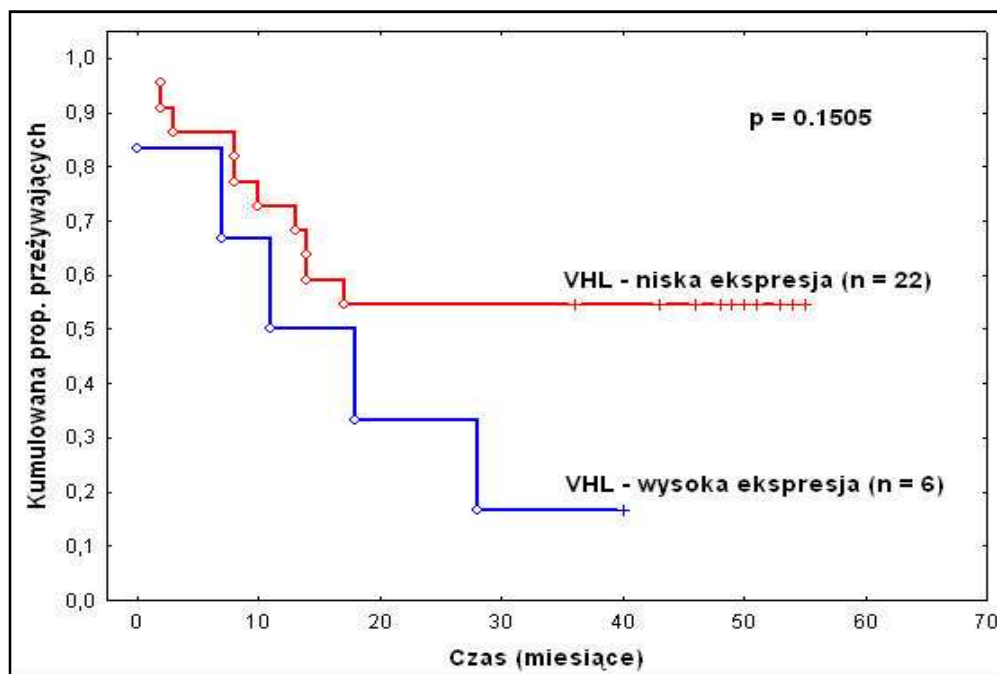
Analizując przeżywalności chorych w zależności od poziomu ekspresji mRNA genów: *HIF-1α*, *EGLN1*, *VHL* nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie: $p=0.9465$; $p=0.4342$; $p=0.1505$ (ryc. 25-27).



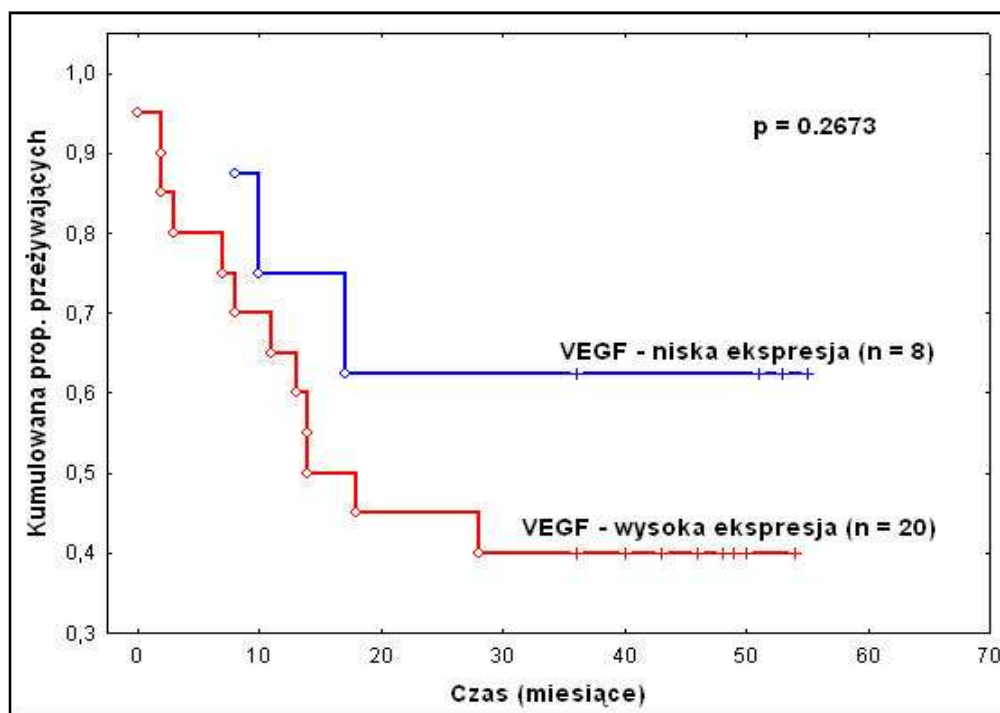
Rycina 25. Porównanie przebiegu krzywych przeżycia Kaplan-Meiera w zależności od poziomu ekspresji mRNA genu *HIF-1α* w tkance nowotworowej raka żołądka; test log-rank.



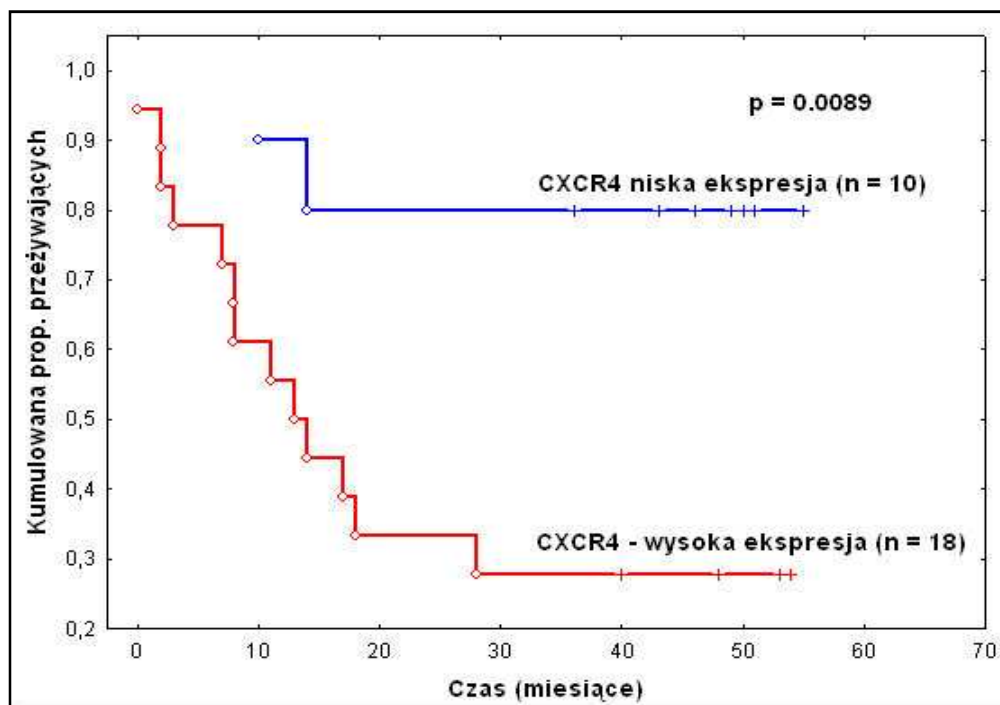
Rycina 26. Porównanie przebiegu krzywych przeżycia Kaplan-Meiera w zależności od poziomu ekspresji mRNA genu *EGLN1* w tkance nowotworowej raka żołądka; test log-rank.



Rycina 27. Porównanie przebiegu krzywych przeżycia Kaplan-Meiera w zależności od poziomu ekspresji mRNA genu *VHL* w tkance nowotworowej raka żołądka; test log-rank.



Rycina 28. Porównanie przebiegu krzywych przeżycia Kaplan-Meiera w zależności od poziomu ekspresji mRNA genu *VEGF* w tkance nowotworowej raka żołądka; test log-rank.



Rycina 29. Porównanie przebiegu krzywych przeżycia Kaplan-Meiera w zależności od poziomu ekspresji mRNA genu *CXCR4* w tkance nowotworowej raka żołądka; test log-rank.

5. DYSKUSJA

Resekcja chirurgiczna jest podstawową formą leczenia raka żołądka. Z uwagi jednak na duży odsetek wznów po operacjach radykalnych wyleczalność raka żołądka pozostaje niezmiennie na niskim poziomie [182]. Identyfikacja czynników biologicznych i genetycznych charakterystycznych dla genezy i progresji raka żołądka mogłaby umożliwić bardziej precyzyjną ocenę prognostyczną tej choroby, a w szczególności być pomocna w przewidywaniu odpowiedzi na zastosowaną terapię.

Przeprowadzone badanie po raz pierwszy określa jednocześnie ekspresję *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w raku żołądka oraz związek pomiędzy ekspresją tych genów w tkance nowotworowej, a cechami histopatologicznymi i wynikami leczenia u pacjentów z resekcyjnym rakiem żołądka.

Analizując wpływ czynników zaangażowanych w biologię nowotworu przeprowadza się m.in. ocenę stabilności genomu, liczby kopii DNA w komórce, ekspresji wielu genów zarówno na poziomie mRNA jak również białka. Ocena immunohistochemiczna jest w praktyce klinicznej najczęściej do tego celu wykorzystywaną techniką. Nie tylko dostarcza nam informacji na temat ilości białka w sposób półilościowy, ale również daje informacje na temat rozmieszczenia białka w obrębie jądra komórkowego, cytoplazmy, czy wreszcie błony komórkowej. Badania immunohistochemiczna na stałe wpisały się do metod służących nie tylko do diagnozowania, ale również prognozowania wyników leczenia. W oparciu o wynik badania immunohistochemicznego wielokrotnie ustala się odpowiedni schemat leczenia. Niemniej jednak badanie to cechuje kilka podstawowych wad, takich jak: różnice wynikające z zastosowania odmiennych warunków reakcji, zwłaszcza różnych przeciwciał oraz subiektywność oceny przez różnych patologów.

Hipoksja jest czynnikiem środowiskowym, który nasila progresję wielu nowotworów złośliwych. Odbywa się to przy udziale kluczowego białka, jakim jest czynnik transkrypcyjny HIF-1. W wielu badaniach wykazywano, że aktywacja HIF-1 zachodzi w nowotworach litych, zwłaszcza w nowotworach przewodu pokarmowego. Simiantonaki i wsp. wykazali nadekspresję *HIF-1 α* w raku jelita grubego. Stwierdzili również, że zwiększona ekspresja *HIF-1 α* korelowała z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych oraz obecnością przerzutów odległych [183]. Nadekspresja HIF-1 α wiąże się ze złą prognozą także u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego, szyjki macicy, nowotworami przewodu pokarmowego, rakiem piersi [184].

Ekspresja HIF-1 α została oceniona w badaniach immunohistochemicznych wielu nowotworów, niewiele jednak wiadomo o ekspresji mRNA *HIF-1 α* , zwłaszcza w raku żołądka [73, 185-188]. Matsuyama i wsp. wykazali nadekspresję *HIF-1 α* w raku płaskonabłonkowym przełyku, dodatkowo korelację pomiędzy mRNA i białkiem HIF-1 α [188]. Wyniki analiz ilościowych mRNA *HIF-1 α* w tkance raka żołądka okazały się przydatne w ocenie ryzyka przerzutów do węzłów chłonnych [189, 190]. Urano i wsp. wykazali nadekspresję *HIF-1 α* u 61% chorych na raka żołądka. Była ona związana z ekspresją białka p53 i VEGF, ale nie wykazano jej związku z danymi histopatologicznymi i przeżywalnością chorych [191].

Aktywacja HIF-1 α wpływa na miejscową progresję nowotworu oraz jego potencjał do dawania przerzutów odległych. Odbywa się to poprzez regulację szeregu procesów z udziałem czynników zależnych od HIF-1, takich jak: białko E-kadheryna (ang. *E-cadherin*)' oksydaza lizylowa LOX (ang. *lysyl oxidase*), inhibitor aktywatora plazminogenu PAI-1 (ang. *plasminogen activator inhibitor-1*), CXCR4 [192-195]. Wiele wskazuje na to, że stan hipoksji wpływa na proces migracji komórek nowotworowych poprzez nasilenie, przy udziale HIF-1, ekspresji receptora CXCR4. Wykazano, że ekspresja CXCR4 w komórkach glejaków jest zależna od poziomu HIF-1 α i wiąże się ze zwiększonym potencjałem tych komórek do migracji [196].

Mając na uwadze powyższe fakty poddano analizie ekspresję *HIF-1 α* w tkance nowotworowej raka żołądka i badano korelację tej ekspresji ze stopniem zaawansowania nowotworu oraz innymi parametrami klinicznymi. Niekorzystnym aspektem przeprowadzonych badań jest fakt, że nie oceniono ekspresji *HIF-1 α* również na poziomie białka.

W badaniu wykazano, że ekspresja mRNA *HIF-1 α* w tkance nowotworowej raka żołądka jest znamienne statystycznie wyższa niż w błonie śluzowej pochodzącej z marginesu operacyjnego, czy też w kontrolnej błonie śluzowej żołądka. Zaobserwowano również, że nadekspresja *HIF-1 α* towarzyszy zwłaszcza guzom małym o średnicy nie przekraczającej 4cm. Nie wykazano natomiast istotnej statystycznie zależności pomiędzy średnim poziomem ekspresji mRNA *HIF-1 α* , a wielkością guza (cecha T), obecnością przerzutów w węzłach chłonnych (cecha N), stopniem złośliwości histologicznej (G), stopniem zaawansowania klinicznego.

W badaniu Seong-Eun i wsp. wykazano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją mRNA *HIF-1 α* a *VEGF* [197]. Było to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, że zwiększony poziom HIF-1 α nasila transkrypcję mRNA *VEGF* [198].

W wielu pracach wskazywano na pozytywną korelację pomiędzy HIF-1 α i VEGF na poziomie białka [187, 199, 200]. W przeprowadzonym badaniu nie zaobserwowano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji mRNA *HIF-1 α* a *VEGF*.

Wyniki większości badań wskazują na to, że wysoka ekspresja *HIF-1 α* w różnych nowotworach jest związana ze złą prognozą, zaawansowaniem klinicznym, czy też obecnością przerzutów [184, 185, 201]. Zaobserwowano to również w odniesieniu do raka żołądka i guzów stromalnych przewodu pokarmowego [186, 187, 198, 200, 202]. W odróżnieniu od tych badań, niektórzy autorzy wykazywali brak istotnego związku pomiędzy ekspresją *HIF-1 α* , a cechami klinicznymi, stopniem zróżnicowania nowotworu, klasyfikacją Laurena, czy też stopniem zaawansowania klinicznego raka żołądka [191, 201]. Różnice pomiędzy wynikami ekspresji *HIF-1 α* w raku żołądka w odniesieniu do wpływu ekspresji *HIF-1 α* na przebieg kliniczny są niejasne. Być może decydujące znaczenie ma metodyka badań i sposób oceny ekspresji HIF-1 α na poziomie białka. Część autorów twierdzi natomiast, że decydujące znaczenie w progresji raka ma nie sam poziom białka HIF-1 α , ale mechanizmy wpływające na jego stabilność, regulujące odpowiedź komórki nowotworowej na hipoksję. Autorzy sugerują również wpływ onkogenów oraz innych czynników z rodziny HIF (HIF-2, HIF-3) w regulacji odpowiedzi na hipoksję komórek nowotworowych [77, 201, 203].

W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono istotnej korelacji pomiędzy poziomem mRNA *HIF-1 α* a stopniem zaawansowania klinicznego i danymi histopatologicznymi. Stwierdzono natomiast istotną zależność pomiędzy nadekspresją mRNA *HIF-1 α* a średnicą guza nowotworowego. Otóż guzy o średnicy mniejszej niż 4cm wykazywały się nadekspresją HIF-1 α . Nie zaobserwowano już tej zależności w odniesieniu do cechy T, czyli stopnia naciekania przez nowotwór. Analizując przeżywalność pooperacyjną chorych nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą chorych o niskiej ekspresji *HIF-1 α* , a chorymi z wysoką ekspresją *HIF-1 α* w tkance nowotworowej.

Z uwagi na udział *EGLN1* w regulacji *HIF-1 α* sugeruje się, że spełnia on rolę genu supresorowego. Mało jest badań porównujących ekspresję mRNA *EGLN1* z ekspresją białka EGLN1 w tkance nowotworowej. Również wiele prac oceniających poziom ekspresji EGLN1 w normalnych tkankach opiera się na badaniach analizujących tylko mRNA. Z drugiej strony wyniki badań pochodzących z różnych ośrodków badających ekspresję białka EGLN1 w oparciu o badania immunohistochemiczne są bardzo rozbieżne. Może to wynikać z zastosowania różnej

metodyki badań i różnych przeciwciał. Dla pełnego poznania roli *EGLN1* konieczne jest potwierdzenie nie tylko ekspresji mRNA tego genu, ale również aktywnego enzymatycznie białka. Wciąż brakuje wystarczających danych na temat roli *EGLN1* w raku żołądka, dlatego poddano ocenie poziom ekspresji tego czynnika w tkance nowotworowej raka żołądka oraz marginesie operacyjnym na poziomie mRNA i białka.

W przeprowadzonym badaniu wykazano, że ekspresja mRNA *EGLN1* w tkance nowotworowej raka żołądka jest istotnie statystycznie niższa niż w marginesie operacyjnym. Różnicę tą potwierdziły również wyniki ekspresji białka *EGLN1* ocenionej za pomocą analizy Western blot. Zaobserwowano również, że zmniejszona ekspresja *EGLN1* jest charakterystyczna dla raków żołądka o stopniu złośliwości G3. W przeprowadzonych analizach nie stwierdzono korelacji pomiędzy poziomem ekspresji mRNA *EGLN1*, a stopniem zaawansowania klinicznego i innymi cechami histopatologicznymi. Analizując przeżywalność pooperacyjną nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą chorych o niskiej ekspresji *EGLN1*, a chorymi z normalną ekspresją *EGLN1*.

Wiele publikacji zwraca uwagę na korelację pomiędzy ekspresją białka HIF-1 α i *EGLN1*. Najczęściej autorzy obserwują zmniejszoną ekspresję *EGLN1* towarzyszącą nadekspresji czynnika HIF-1 α . Badania immunohistochemiczne w nowotworach u ludzi wykazują często zwiększoną, ale zmienną ekspresję *EGLN1*. Generalnie przyjęto, że należy się spodziewać ujemnej korelacji pomiędzy ekspresją *EGLN1* i HIF-1 α w regionach nowotworu o optymalnym zaopatrzeniu w tlen, natomiast dodatniej korelacji pomiędzy ekspresją tych czynników w regionach hipoksji. Zależność ta jednak nie potwierdza się wśród wielu przeanalizowanych nowotworów. Badania Chan i wsp. na 60 liniach komórkowych wykazały, że poziom ekspresji *EGLN1* jest bardzo zmienny i niekoniecznie odwrotnieproporcjonalny do poziomu ekspresji HIF-1 α , jak można by się tego spodziewać [204]. Różnice w poziomie ekspresji *EGLN1* zaobserwowano nawet porównując różne linie komórkowe wywodzące się spośród tego samego nowotworu [204]. Dla przykładu: linia komórkowa raka piersi MCF7 charakteryzuje się bardzo niskim poziomem ekspresji *EGLN1*, w odróżnieniu do linii BT-549 [204]. W niektórych przypadkach niski poziom ekspresji *EGLN1* koreluje z nadekspresją HIF-1 α (np. linia HS 578T). Poziom ekspresji HIF-1 α bywa również podwyższony pomimo wysokiego poziomu ekspresji *EGLN1*, jak zaobserwowano w linii komórkowej 786-O, w której to defekt białka VHL skutkuje stabilizacją czynnika HIF-1 α . Zasugerowano również, że ekspresja *EGLN1* jest bezpośrednio

zależna od HIF-1 [205]. Wykazano zwiększenie poziomu ekspresji EGLN1 w warunkach hipoksji. Indukcja syntezy EGLN1 w warunkach hipoksji ma prawdopodobnie znaczenie w autoregulacji poziomu HIF-1 α na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Gen *EGLN1* zawiera funkcjonalny element odpowiedzi na hipoksję (HRE) w regionie promotorowym, wobec tego jego transkrypcja jest zwiększana pod wpływem HIF-1 [206]. W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji mRNA *HIF-1 α* i *EGLN1*.

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy HIF-1 α jest jedynym funkcjonalnie scharakteryzowanym substratem dla EGLN1. Pojawiają się jednak pewne doniesienia sugerujące pełnienie przez EGLN1 funkcji hamującej rozwój nowotworów niezależnie od regulacji HIF-1 α [204]. Według Chan i wsp. EGLN1 hamuje, w mechanizmie niezależnym od HIF-1 α , rekrutację komórek macierzystych szpiku niezbędnych w procesie waskulogenezy w nowotworach. [204]. Negatywny wpływ EGLN1 na rozwój naczyń w nowotworze odbywa się poprzez regulację NF- κ B, Il-8 i angiogenninę [204].

Wiele publikacji potwierdza fakt, że ekspresja *EGLN1* jest znacząco zmniejszona w nowotworach w porównaniu do tkanek zdrowych [207]. Graudens i wsp. wykazali statystycznie istotne zmniejszenie poziomu ekspresji mRNA *EGLN1* w raku okrężnicy w porównaniu do normalnej tkanki [208]. W odróżnieniu do tych wyników, w przypadku raka piersi i HNSCC stwierdzono nadekspresję *EGLN1*, w dodatku korelowała ona z agresywnością nowotworu [209]. Oprócz różnicy w poziomie ekspresji *EGLN1* w różnych nowotworach wskazuje się również znaczne różnice w odniesieniu do wewnątrzkomórkowej dystrybucji EGLN1. Ekspresja EGLN1 jest w raku piersi i HNSCC nie tylko podwyższona, ale również w tych nowotworach zaobserwowano translokację EGLN1 do jądra komórkowego, która wiązała się z większą agresywnością [209]. Co ciekawe zaobserwowano korelację pomiędzy niskim poziomem ekspresji EGLN1 w jądrach komórek raka HNSCC, a dobrą odpowiedzią na leczenie za pomocą radioterapii [210]. Trzeba jednak mieć na uwadze, że żadne z badań wykorzystujących immunohistochemię nie daje nam odpowiedzi na pytanie czy wykryte białko EGLN1 jest aktywne enzymatycznie i spełnia swoją rolę w komórkach nowotworowych.

Wciąż nie wyjaśniony pozostaje mechanizm, za pomocą którego dochodzi do obniżenia ekspresji EGLN1 w nowotworach. Być może mamy do czynienia z mutacjami genu *EGLN1* w komórkach nowotworowych, które powodują obniżenie ekspresji EGLN1, jego stabilności, bądź aktywności enzymatycznej. Innym

wyjaśnieniem jest modyfikacja epigenetyczna, poprzez metylację promotora genu *EGLN1*, mogąca powodować zmniejszenie jego ekspresji. Dalsze badania nad mechanizmem zmniejszonej aktywności *EGLN1* mają kluczowe znaczenie. Badanie nad identyfikacją innych genów docelowych dla *EGLN1* mogą okazać się istotne dla poznania mechanizmów regulujących progresję nowotworów.

Zaobserwowano, że zmniejszeniu ekspresji *EGLN1* w guzach nowotworowych towarzyszy szybki wzrost guzów oraz ich silne unaczynienie sugerujące rolę *EGLN1* w hamowaniu neoangiogenezy. W badaniach nad rakiem piersi zaobserwowano istotną statystycznie negatywną korelację pomiędzy ekspresją mRNA *EGLN1* a markerem komórek endotelialnych CD31 sugerującą zdolność *EGLN1* do hamowania neoangiogenezy w nowotworach *in vivo* [211, 212]. Wykazano, że *EGLN1* hamuje indukowaną w warunkach hipoksji proliferację komórek prekursorowych dla komórek endotelialnych [213]. *EGLN1* blokuje również rekrutację endotelialnych komórek prekursorowych, hamując w ten sposób waskulogenezę nowotworową [204].

Indukcja neoangiogenezy poprzez lokalny rozpląt naczyń krwionośnych, jak również waskulogenezę jest kluczowa dla szybkiego wzrostu nowotworów litych. Znajomość mechanizmów regulujących te procesy jest polem szczególnego zainteresowania, gdyż te mechanizmy i ścieżki sygnałne są potencjalnym punktem uchwytu nowych strategii terapeutycznych. W dotychczasowych badaniach skupiano się głównie na roli HIF-1 i VEGF w neoangiogenezie. W badaniu Chen i wsp. zaobserwowano, że *EGLN1* oprócz roli regulującej aktywność HIF-1 α , wpływa również na syntezę angiogeniny (ANG) i interleukiny-8 (IL-8), które spełniają rolę w angiogenezie oraz rekrutacji BMDCs czyli waskulogenezie [204]. Docenia się rolę BMDCs w rozwoju naczyń w nowotworach litych, jednakże wciąż nieznane są mechanizmy, za pomocą których nowotwory nasilają rekrutację tych komórek.

Karcynogeneza jest procesem wieloetapowym, w czasie którego dochodzi do nagromadzenia wielu zaburzeń genetycznych, wśród których istotną rolę odgrywa aktywacja onkogenów i inaktywacja genów supresorowych (ang. *tumor suppressor genes* – TSGs). Zaburzenie lub utrata funkcji genów supresorowych odgrywa kluczową rolę w patogenezie guzów litych, także raka żołądka. Do inaktywacji genu supresorowego może dojść na skutek zmian genetycznych (mutacje punktowe, delecje) lub epigenetycznych (hipermetylacja regionów promotorowych).

Utrata funkcji białka VHL jest uważana za jeden z elementów odpowiedzialnych za proces nowotworzenia. *VHL* prawdopodobnie funkcjonuje jako gen supresorowy,

odpowiadający za hamowanie rozwoju i progresji raka żołądka. Do chwili obecnej opublikowano wiele badań analizujących zaburzenia genetyczne w obrębie *VHL*, nie tylko w nowotworach występujących w zespole VHL, ale również w nowotworach niezwiązanych z tą jednostką chorobową [214]. Jednakże nie ma wystarczającej liczby doniesień na temat zaburzeń genetycznych genu *VHL* w raku żołądka. W badaniu Cao i wsp. stwierdzono brak mutacji genu *VHL* w raku żołądka [215]. W badaniu tym przeanalizowano także potencjalną rolę zmian epigenetycznych wpływających na inaktywację *VHL*. Również w tym przypadku nie potwierdzono zmian o charakterze modyfikacji epigenetycznych w rejonie promotorowym genu *VHL*.

Z uwagi na brak wyczerpujących danych na temat ekspresji genu *VHL* w raku żołądka, a także kluczową rolę czynnika VHL w regulacji aktywności HIF-1 α , analizowano poziom ekspresji mRNA *VHL* u chorych na raka żołądka. W przeprowadzonym badaniu wykazano, że ekspresja mRNA *VHL* w tkance nowotworowej raka żołądka jest istotnie statystycznie niższa niż w błonie śluzowej pochodzącej z marginesu operacyjnego. Zaobserwowano również, że występuje istotna różnica w poziomie ekspresji mRNA *VHL* pomiędzy rakiem wczesnym (T1) a zaawansowanym (T2, T3). Na tej podstawie można wysunąć wniosek, że do utraty funkcji czynnika VHL na skutek zmniejszonej ekspresji mRNA dochodzi w późniejszym etapie karcinogenezy. Przeprowadzone analizy nie wykazały istotnej statystycznie zależności pomiędzy średnim poziomem ekspresji mRNA *VHL* a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych, stopniem złośliwości histologicznej, stopniem zaawansowania klinicznego. Analizując przeżywalność pooperacyjną chorych nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą chorych o niskiej ekspresji mRNA *VHL* a chorymi z normalną ekspresją *VHL*.

Zaobserwowano istotną korelację pomiędzy poziomem ekspresji mRNA *VHL* i *EGLN1* w raku żołądka. Guzy cechujące się niską ekspresją *VHL* jednocześnie wykazywały niską ekspresją *EGLN1*. Być może istnieje wspólny czynnik regulujący negatywnie ekspresję obu genów na poziomie mRNA.

VEGF jest obecnie najlepiej poznanym czynnikiem proangiogennym. Ekspresja *VEGF* jest nasilana przez HIF-1 α w odpowiedzi na hipoksję [216]. *VEGF* jest także regulowany za pomocą czynników i mechanizmów niezależnych od hipoksji, takich jak: mutacje P53 i innych genów supresorowych, czynniki transkrypcyjne, koaktywatory, mikro-RNA, cytokiny i mediatory stanu zapalnego [217, 218]. Dane te sugerują istnienie wielu mechanizmów regulujących aktywność VEGF w nowotworze.

Wpływ czynników odpowiedzialnych za neoangiogenezę w raku żołądka jest obecnie przedmiotem burzliwej debaty. Maeda i wsp. analizowali związek pomiędzy ekspresją *VEGF* we wczesnym raku żołądka a odsetkiem wznów. Stwierdzono, że poziom ekspresji *VEGF* był istotnie wyższy w grupie chorych, u których doszło do nawrotu choroby w porównaniu z chorymi bez wznowy procesu nowotworowego. Przeżywalność 8-letnia wynosiła 99% wśród chorych bez ekspresji *VEGF* i 85% wśród chorych z ekspresją *VEGF* w tkance nowotworowej [219]. Wykazano już dawno, że ekspresja *VEGF* związana jest z poziomem unaczynienia guza, obecnością przerzutów i rokowaniem w przypadku raka piersi i jelita grubego [220, 221]. Montero i wsp. wykazali w badaniach immunohistochemicznych ekspresję *VEGF* u 96,77% chorych na raka przewodu pokarmowego [222]. Uważa się, że ekspresja *VEGF* jest ważnym czynnikiem prognostycznym w nowotworach przewodu pokarmowego, raku piersi, raku wątrobowokomórkowym [223-226]. Postuluje się znaczenie ekspresji *VEGF* w ocenie prognozy raka żołądka. Ekspresja ta jest bezpośrednio związana z rozwojem wodobrzusza i rozsiewem nowotworowym w obrębie jamy otrzewnowej w przebiegu zaawansowanego raka żołądka [227]. Nadekspresja *VEGF* koreluje z gęstością naczyń limfatycznych, co wpływa negatywnie na wyniki odległe leczenia raka żołądka [228, 229]. Zwiększoną ekspresję czynników angiogennych: *VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D* w guzie nowotworowym w porównaniu do otaczającej błony śluzowej zaobserwowano w trakcie badań immunohistochemicznych [230, 231]. Wysoki poziom ekspresji *VEGF-A* w raku żołądka koreluje z naciekaniami przez proces nowotworowy naczyń żylnych i obecnością mikroprzerzutów w szpiku kostnym [231]. Ekspresja *VEGF* w raku żołądka została skorelowana z różnymi parametrami klinicznymi i patologicznymi, takimi jak stopień złośliwości histologicznej, typ histologiczny wg klasyfikacji Laurena, obecność inwazji naczyń limfatycznych i krwionośnych [163, 232, 233].

Rozwój naczyń krwionośnych w nowotworach ma znaczenie decydujące we wzroście guza. Gęstość tych naczyń oceniano w raku żołądka w wielu pracach w oparciu o badania immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko *CD31*, *CD34*, *CD105* [234, 235]. Gęstość naczyń w raku żołądka korelowała z prognozą [236], ale również z ryzykiem krwawienia z górnego odcinka przewodu pokarmowego w przebiegu raka żołądka [234]. W wielu badaniach udowodniono zależność pomiędzy gęstością naczyń w nowotworze, a potencjałem tworzenia

przerzutów [237, 236, 238]. Zwiększona gęstość naczyń w raku żołądka koreluje z inwazją naczyń, zajęciem węzłów chłonnych, ekspresją VEGF [182].

W przeprowadzonym badaniu nie zaobserwowano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy gęstością naczyń a stopniem zaawansowania nowotworu, przeżywalnością odległą i odsetkiem wznów choroby. Wpływu gęstości naczyń ocenianej za pomocą CD34 na przeżywalność w raku żołądka nie potwierdzili również Kim i wsp. [239]. W badaniu tym analizowano różne techniki oceny neoangiogenezy za pomocą różnych markerów rekomendując przydatność przeciwciał anty CD31 [239].

Oprócz znaczenia gęstości naczyń krwionośnych i ekspresji VEGF w ocenie rokowania w raku żołądka, postuluje się również wykorzystanie tych markerów w monitorowaniu leczenia przeciwnowotworowego, zwłaszcza terapii systemowej wykorzystującej leki antyangiogenne. Terapia antyangiogenna została zastosowana w leczenie raków przewodu pokarmowego i jest standardem postępowania w zaawansowanym raku jelita grubego. Natomiast trwają wciąż badania nad zastosowaniem inhibitorów neoangiogenezy w leczeniu raka żołądka [240]. Wyniki leczenia antyangiogennego w raku żołądka opierają się o badania I i II fazy klinicznej. Potrzeba wciąż wyników badań randomizowanych III fazy by można było określić skuteczność i bezpieczeństwo tej terapii. Badania oceniające biomarkery neoangiogenezy w raku żołądka w połączeniu z wynikami leczenia będą krytyczne w identyfikacji tych pacjentów, którzy mogą najbardziej skorzystać z celowanej terapii antyangiogennej [241]. Warto w tym miejscu podkreślić fakt, że terapia antyangiogenna wiąże się ze zwiększonym ryzykiem krwawienia z przewodu pokarmowego [242].

Poziom ekspresji VEGF w raku żołądka według różnych doniesień waha się od 30 do nawet 75% [163, 182, 219, 238, 243-247]. Różnica ta może wynikać ze specyfiki oraz różnych modyfikacji oznaczeń immunohistochemicznych. W przeprowadzonym badaniu ocena ekspresji białka VEGF za pomocą badania immunohistochemicznego wykazała, że nadekspresja VEGF była obecna w tkance nowotworowej u 60% chorych. Ujednolicenie metody immunohistochemicznej, w oparciu o to samo przeciwciało, jednolity protokół badania oraz sposób oceny, jest niezbędne do porównywania wyników w różnych ośrodkach. Innym wytłumaczeniem tej różnicy może być również fakt istnienia polimorfizmu genu *VEGF* [248].

W tym badaniu poddano analizie ekspresję VEGF w tkance nowotworowej raka żołądka oraz w błonie śluzowej marginesu operacyjnego zarówno na poziomie mRNA, jak również z wykorzystaniem badań immunohistochemicznych. Analizowano również

korelację pomiędzy poziomem ekspresji VEGF, a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu i innymi cechami klinicznymi. Wykazano istotną statystycznie różnicę w poziomie ekspresji mRNA *VEGF* w tkance nowotworowej w odniesieniu do marginesu operacyjnego, jak również kontroli negatywnej. U chorych z nadekspresją mRNA *VEGF* w tkance nowotworowej raka żołądka zaobserwowano istotną statystycznie korelację ze stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu. Wykazano również, że średni poziom ekspresji mRNA *VEGF* w tkance nowotworowej u chorych w stopniu I zaawansowania nowotworu jest istotnie statystycznie niższy niż w grupie chorych w stopniu II i III. Nie stwierdzono natomiast korelacji pomiędzy ekspresją mRNA *VEGF*, a stopniem zajęcia węzłów chłonnych przez proces nowotworowy. Analizując przeżywalność pooperacyjną chorych stwierdzono różnicę, mianowicie przeżywalność chorych z nadekspresją VEGF była niższa niż u chorych z niską ekspresją. Różnica ta jednak nie była istotna statystycznie.

Wyniki analiz ekspresji mRNA *VEGF* w raku żołądka istotnie korelowały z ekspresją VEGF na poziomie białka ocenioną za pomocą badania immunohistochemicznego.

Istnieją sprzeczne doniesienia na temat roli VEGF w powstawaniu przerzutów. Wyniki wielu badań wskazują na to, że ekspresja VEGF jest dobrym czynnikiem w prognozowaniu ryzyka obecności przerzutów w raku przełyku, piersi, niedrobnokomórkowym raku płuc, raku jajnika, a także w raku żołądka [249-252]. Niektóre badania zwracają uwagę na korelację pomiędzy ekspresją VEGF-A a naciekaniami naczyń przez komórki nowotworowe i powstawaniem przerzutów drogą krwionośną [221, 253]. Prawdopodobnie VEGF-A odgrywa rolę w rozsiewie nowotworu drogą krwi, a w mniejszym stopniu przez naczynia limfatyczne. Część autorów uważa, że za przerzuty raka żołądka do węzłów chłonnych odpowiada VEGF-D. Stwierdzono istotną statystycznie korelację pomiędzy wysokim poziomem ekspresji VEGF-D, a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych, co miało znaczenie prognostyczne [230, 231]. Wielu autorów wskazuje na wpływ VEGF-D na limfangiogenezę i obecność przerzutów w węzłach chłonnych, ale nie na angiogenezę. Dodatkowo wykazano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją VEGF-C a inwazją naczyń limfatycznych i przerzutami do węzłów chłonnych [254-256].

Wyniki badania Kim i wsp. wskazują, że poziom ekspresji mRNA *HIF-1 α* i *VEGF* był istotnie wyższy u pacjentów ze wznową procesu nowotworowego w ciągu pierwszych 3 lat po operacji z powodu raka żołądka [257]. Autorzy ci zasugerowali, że

półilościowa ocena ekspresji *HIF-1α* i *VEGF* za pomocą RT-PCR może być użyteczna w prognozowaniu ryzyka wznowy po operacji raka żołądka. W przeprowadzonym badaniu nie potwierdzono zależności pomiędzy wysokim poziomem mRNA *HIF-1α* i *VEGF* a ryzykiem zgonu w ciągu 3 lat od operacji.

Trwają również dyskusje nad związkiem pomiędzy ekspresją VEGF a stopniem zaawansowania raka żołądka. Istnieją prace, które podkreślają zjawisko nadekspresji VEGF i zwiększonej gęstości naczyń, jako charakterystycznego dla guzów zaawansowanych klinicznie. Inne doniesienia wskazują, że ekspresją VEGF jest szczególnie wysoka w rakach wczesnych, a nawet w zmianach przednowotworowych [258-260]. Wzrost ekspresji czynników proangiogennych już we wczesnych etapach nowotworzenia nie powinien dziwić skoro wiadomo, że guz ma ograniczone możliwości wzrostu ponad 2mm bez neowaskularyzacji.

Wiele badań nad oceną neoangiogenezy w raku żołądka podkreśla silną korelację pomiędzy ekspresją *HIF-1α*, VEGF i gęstością naczyń [182, 191, 261, 262]. W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją mRNA *HIF-1α* a *VEGF*. W 71,4% spośród guzów wykazujących nadekspresję mRNA *HIF-1α* stwierdzono także nadekspresję *VEGF*. Potwierdzono również związek pomiędzy ekspresją VEGF a gęstością naczyń (MVD) ocenioną za pomocą markera CD34 [263].

Najważniejszym czynnikiem predykcyjnym wskazującym na niekorzystne rokowanie jest zaawansowanie kliniczne nowotworu, a zwłaszcza przerzuty. W badaniu zaobserwowano korelację pomiędzy ekspresją VEGF a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu. W różnych nowotworach wyniki takich analiz przedstawiają się odmiennie. Nie stwierdzano korelacji pomiędzy ekspresją VEGF a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych w raku płuc i rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi [226]. W badaniu nad rakiem żołądka również takiej korelacji nie stwierdzano [264].

W ostatnich latach stosuje się chirurgiczne zabiegi oszczędzające w leczeniu wczesnego raka żołądka, np. mukosektomię endoskopową. Jednakże u pacjentów z silną ekspresją VEGF wydaje się uzasadnione stosowanie konwencjonalnej gastrektomii z limfadenektomią D2.

Ocena ekspresji białek rodziny VEGF w raku żołądka może być pomocna w ocenie prognostycznej dostarczając informacji na temat potencjału dawania przerzutów poszczególnymi drogami. Analiza ekspresji VEGF mogłaby posłużyć jako

jedno z kryteriów selekcji pacjentów z wysokim ryzykiem wznowy procesu nowotworowego, u których uzasadnione byłoby stosowanie agresywniejszego sposobu leczenia, czy też leczenia zindywidualizowanego, np. w oparciu o terapię antyangiogenną. Dalsze badania na znacznie większej grupie pacjentów są niezbędne do ustalenia czy analiza ekspresji białek z rodziny VEGF ma znaczenie w doborze schematu terapii przeciwnowotworowej.

W ostatnim czasie wiele badań potwierdza skuteczność terapii anti-VEGF w raku jelita grubego, płuc i raku piersi. Uzyskano wydłużenie czasu przeżycia tych chorych, którzy otrzymują oprócz standardowej chemioterapii leki blokujące VEGF. Lepsze zrozumienie procesu neoangiogenezy będzie skutkowało doskonalszym doбором terapii antyangiogennej w praktyce klinicznej. Dotyczy to między innymi ustalenia właściwej dawki, schematu podawania, czasu trwania terapii, monitorowania skuteczności terapii, jak również oceny bezpieczeństwa takiego leczenia. Trwa badanie randomizowane III fazy MAGIC-B badające skuteczność i bezpieczeństwo dodawania bevacizumabu do okołooperacyjnej chemioterapii w leczeniu raka żołądka.

Receptor CXCR4 wiąże się selektywnie z chemokina SDF-1. Połączenie to indukuje migrację komórki nowotworowej do normalnej tkanki, gdzie rozwija się następnie przerzut [265]. Pozostaje wciąż niewiadomą, dlaczego poszczególne typy komórek nowotworowych wykazują preferencje do zajmowania specyficznych tkanek i narządów i formowania tam właśnie ognisk przerzutowych.

Trwają dyskusje nad udziałem CXCR4 i jego liganda, SDF-1 w nowotworach. W badaniu Mitra i wsp. nie wykazano różnic w poziomie ekspresji mRNA *CXCR4* pomiędzy tkanką nowotworową raka okrężnicy, przełyku, żołądka a tkankami zdrowymi [266]. Wykazano ekspresję receptora CXCR4 w komórkach takich nowotworów jak: rak piersi, rak trzustki, rak jelita grubego, rak przełyku oraz rak żołądka [267-271]. Stwierdzono również zwiększoną ekspresję liganda dla CXCR4, czyli CXCL12 (SDF-1) w węzłach chłonnych [267], co leży u podstaw wytłumaczenia jednego z możliwych mechanizmów tworzenia się przerzutów do węzłów chłonnych. Muller i wsp. wykazali doświadczalnie, że u myszy iniekcje z przeciwciałami skierowanymi przeciw CXCR4 znacząco redukowały powstawanie przerzutów raka piersi do regionalnych węzłów chłonnych [267]. Interakcje pomiędzy CXCR4 a CXCL12 prawdopodobnie odgrywają istotną rolę w mechanizmie powstawania przerzutów do węzłów chłonnych z guza pierwotnego. Pomimo udowodnionej w kilku

badaniach znaczącej korelacji pomiędzy ekspresją CXCR4 a obecnością przerzutów, szczegółowy mechanizm ich powstawania jest wciąż obiektem kontrowersji.

W raku żołądka mamy do czynienia również z problemem częstych przerzutów do węzłów chłonnych. Dlatego poddano analizie ekspresję CXCR4 w tkance nowotworowej raka żołądka i analizowano korelację tej ekspresji ze stanem węzłów chłonnych oraz innymi parametrami klinicznymi.

W przeprowadzonych badaniach wykazano istotną statystycznie różnicę w poziomie ekspresji mRNA *CXCR4* w tkance nowotworowej w odniesieniu do marginesu operacyjnego, jak również kontroli negatywnej. U chorych z nadekspresją mRNA *CXCR4* w tkance nowotworowej raka żołądka zaobserwowano istotną statystycznie korelację z poziomem przerzutów do węzłów chłonnych oraz stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu. Stwierdzono również, że średni poziom ekspresji mRNA *CXCR4* w tkance nowotworowej u chorych bez przerzutów do węzłów chłonnych jest istotnie statystycznie niższy niż w grupie chorych z zajęciem przez proces nowotworowy węzłów chłonnych. Analiza przeżywalności pooperacyjnej wykazała, że w grupie chorych, u których stwierdzono nadekspresję CXCR4, przeżywalność pooperacyjna była istotnie niższa niż w przypadku chorych z niską ekspresją CXCR4.

Wyniki te wskazują na duży związek pomiędzy progresją raka żołądka a poziomem ekspresji CXCR4 w tkance nowotworowej. Ocena ekspresji CXCR4 w materiale przedoperacyjnym mogłaby dawać cenną informację odnośnie ryzyka obecności przerzutów w węzłach chłonnych i rokowania. Dotyczyć to może zwłaszcza tzw. mikroprzerzutów w węzłach chłonnych. Przewidywanie obecności przerzutów do węzłów chłonnych ma szczególne znaczenie w kwalifikowaniu pacjentów z wczesnym rakiem żołądka do zabiegów małoinwazyjnych np. endoskopowa resekcja błony śluzowej (ang. endoscopic mucosal resection - EMR). Węzły chłonne są najczęstszym miejscem przerzutów raka żołądka, a ich obecność istotnie pogarsza rokowanie [272, 273]. Obecność przerzutów w węzłach chłonnych pogarsza wyniki leczenia nawet pomimo przeprowadzenia doszczętnej resekcji R0 z limfadenektomią D2. Z drugiej strony w ostatnich latach wykonuje się, zwłaszcza w Japonii, coraz więcej zabiegów oszczędzających bez limfadenektomii w leczeniu wczesnego raka żołądka ograniczonego do błony śluzowej [274, 275]. Jednak zgodnie z danymi literaturowymi przerzuty do węzłów chłonnych są obecne u 2-4% chorych z wczesnym rakiem żołądka,

ograniczonym do błony śluzowej i aż u 13-20% chorych z rakiem wczesnym naciekającym błonę podśluzową [276, 277].

Przydatność dostępnych antagonistów CXCR4 w leczeniu kilku rodzajów nowotworów jest obecnie przedmiotem badań [278-280]. Antagoniści receptora CXCR4 jak TN14003 i T140 okazali się być skuteczną bronią hamującą powstawanie przerzutów w raku trzustki i raku piersi [280, 281]. Antagoniści CXCR4 mogą reprezentować nową grupę związków terapeutycznych hamujących proces powstawania przerzutów odległych u pacjentów z zaawansowanym rakiem żołądka.

6. WNIOSKI

1.
 - a) W tkance nowotworowej raka żołądka występuje zwiększona ekspresja genu *HIF-1 α* .
 - b) Poziom ekspresji genów *EGLN1* i *VHL*, które biorą udział w regulacji *HIF-1 α* , jest w raku żołądka obniżony.
 - c) W raku żołądka występuje nadekspresja *VEGF* i *CXCR4* będących genami docelowymi dla czynnika HIF-1.

2.
 - a) W zaawansowanym raku żołądka dochodzi do zmniejszenia poziomu ekspresji genu *VHL*.
 - b) Nadekspresja *VEGF* towarzyszy guzom zaawansowanym.
 - c) Zwiększona ekspresja genu *CXCR4* koreluje z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych.
 - d) Geny *VEGF* i *CXCR4* odgrywają dużą rolę w progresji raka żołądka, a ich ekspresja jest wysoka w guzach zaawansowanych.
 - e) Wysoka ekspresja *CXCR4* wiąże się z niską przeżywalnością pooperacyjną
 - f) Zmniejszona ekspresja *EGLN1* jest charakterystyczna dla niskozróżnicowanych raków żołądka o stopniu złośliwości G3.
 - g) *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* mogą być cennymi biomarkerami służącymi do przewidywania rokowania pacjentów operowanych z powodu raka żołądka.

3.
 - a) Istnieje korelacja pomiędzy poziomem ekspresji mRNA genu *EGLN1* i *VHL*.
 - b) Nie stwierdzono związku pomiędzy poziomem ekspresji czynnika *HIF-1 α*

- a genami docelowymi: *VEGF*, *CXCR4*.
- c) Nie stwierdzono korelacji pomiędzy poziomem ekspresji HIF-1 α a genami odgrywającymi rolę w regulacji tego czynnika: *EGLN1*, *VHL*.
- d) Poziom ekspresji VEGF jest silnie związany z gęstością naczyń (MVD) ocenioną za pomocą markera CD34.
4. a) Wyniki powyższych badań powinny być interpretowane z dużą rozwagą ze względu na małą grupę chorych.
- b) Dalsze badania molekularne i immunohistochemiczne są konieczne w celu oceny roli HIF-1 α , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w raku żołądka i innych rakach przewodu pokarmowego.
- c) Prowadzenie dalszych badań nad zastosowaniem terapii celowanej w leczeniu raka żołądka w oparciu o analizowane geny, zwłaszcza *VEGF*, wydaje się być w pełni uzasadnione i konieczne.

STRESZCZENIE

WSTĘP: Angiogeneza jest jednym z kluczowych procesów warunkujących rozwój nowotworu. W większości nowotworów litych, również w raku żołądka, występuje zjawisko hipoksji. Odpowiedź komórkowa na zmniejszony poziom tlenu prowadzi do nasilenia ekspresji czynnika indukowanego hipoksją (HIF-1 α) i genów przez niego regulowanych: naczyniowego czynnika wzrostu komórek endotelialnych (*VEGF*) i *CXCR4*. Aktywność czynnika HIF-1 α jest negatywnie regulowana przez enzymy z grupy hydroksylaz prolinowych, z których główną rolę odgrywa EGLN1.

CEL: Celem badań jest analiza ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w procesie angiogenezy i odpowiedzialne za progresję raka żołądka.

MATERIAŁ I METODY: Badaniom poddano grupę 28 chorych ze zdiagnozowanym rakiem żołądka leczonych operacyjnie od maja 2006r do stycznia 2008r. U chorych wykonywano zabieg radykalnej gastrektomii. Ocenę ekspresji badanych genów na poziomie mRNA przeprowadzono z wykorzystaniem metody RT-PCR, natomiast poziom białka oceniono za pomocą badań immunohistochemicznych i Western blot. Ekspresja genów *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* oceniona została zarówno w tkance nowotworowej jak i marginesie operacyjnym.

WYNIKI: Nadekspresję mRNA genów *HIF-1 α* , *VEGF*, *CXCR4* w tkance nowotworowej wykazano u odpowiednio 75.0%, 71.0% i 64.0% chorych. Średni poziom ekspresji mRNA genów *HIF-1 α* , *VEGF*, *CXCR4* był istotnie wyższy w tkance nowotworowej w porównaniu do marginesu operacyjnego; $p=0.0044$, $p=0.0247$, $p=0.0052$. Zmniejszoną ekspresję mRNA genów *EGLN1* i *VHL* w tkance nowotworowej wykazano u odpowiednio 71.0% i 78.0% chorych. Średni poziom ekspresji mRNA genów *EGLN1* i *VHL* w tkance nowotworowej był istotnie niższy w porównaniu do marginesu operacyjnego; $p=0.0357$, $p=0.0007$. Stwierdzono korelację pomiędzy poziomem ekspresji VEGF a wielkością guza ($p=0.0216$) i stopniem zaawansowania klinicznego ($p=0.0441$). Wykazano również zależność pomiędzy ekspresją CXCR4 a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych ($p=0.0237$) i stopniem zaawansowania klinicznego ($p=0.0054$). Poziom ekspresji VEGF oceniony za pomocą badania immunohistochemicznego był silnie związany z gęstością naczyń (MVD) ocenioną za pomocą markera CD34 ($p=0.0256$). Mediana czasu obserwacji wynosiła 27,5 miesiąca (0,5-58 miesięcy). Przeżywalność 3-letnia w analizowanej grupie chorych wynosiła 46,4%. Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę

w przeżywalności w zależności od poziomu ekspresji mRNA genu *CXCR4*, $p = 0.0089$. Przeżywalność w grupie chorych z wysoką ekspresją genu *CXCR4* była istotnie niższa od przeżywalności chorych z niską ekspresją tego genu.

WNIOSKI: Geny *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF* i *CXCR4* odgrywają dużą rolę w patogenezie raka żołądka, a ekspresja *VEGF* i *CXCR4* jest nasiloną w guzach zaawansowanych. Analizowane geny, zwłaszcza *CXCR4*, mogą być cennymi biomarkerami służącymi do przewidywania rokowania pacjentów operowanych z powodu raka żołądka. Istnieje potrzeba prowadzenia dalszych badań w celu oceny roli *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* w raku żołądka i innych rakach przewodu pokarmowego. Uzasadnione jest również prowadzenie badań nad zastosowaniem terapii celowanej w leczeniu raka żołądka w oparciu o analizowane geny, zwłaszcza *VEGF* i *CXCR4*.

SUMMARY

INTRODUCTION: Angiogenesis is one of the key steps in tumor growth and progression. Regions of hypoxia exist within solid tumors including gastric cancer. The cellular response to hypoxia includes the expression of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and its target genes: vascular endothelial growth factor (VEGF) and CXCR4 chemokine receptor 4 (CXCR4). HIF-1 α is negatively regulated by a family of prolyl hydroxylases. The EGLN1 isoform is the main down-regulator of HIF-1 α .

AIM: The aim of this study was to investigate the expression and clinical significance of genes, which are responsible for angiogenesis and progression in gastric cancer.

MATERIAL AND METHODS: 28 patients with gastric cancer, who underwent gastric resection between April 2006 and January 2008, were analyzed. The mRNA expression of *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* was examined in primary tumors and corresponding normal gastric mucosa by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein level was examined by immunohistochemistry and Western blot staining.

RESULTS: The high expression of *HIF-1 α* , *VEGF*, *CXCR4* was found in 75.0; 71.0 and 64% tumors respectively. The mean levels of mRNA of *HIF-1 α* , *VEGF* and *CXCR4* were significantly up-regulated in primary tumors compared to the normal mucosa (p=0.0044, p=0.0247, p=0.0052). The low expression of *EGLN1* and *VHL* mRNA was found in 71.0 and 78.0% tumors respectively. The mean levels of mRNA of *VHL* and *EGLN1* were significantly lower in primary tumors: (p=0.0357, p=0.0007). A correlation between the VEGF expression and tumor size (p=0.0216) and stage (p=0.0441) was found. In addition CXCR4 expression correlated with lymph node metastases (p=0.0237) and stage (p=0.0054). The VEGF expression correlated with microvessel density (MVD) (p=0.0256). The median follow-up period was 27.5 months (range: 0.5-58 months). Overall 3-year survival rate was 46.4%. The 3-year survival rate in the patients with high *CXCR4* mRNA expression was significantly lower than in those patients with low *CXCR4* expression, p = 0.0089.

CONCLUSIONS: *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* play an important role in progression in gastric cancer, and the expression of VEGF and CXCR4 are up-regulated in advanced tumors. The analyzed genes, especially *CXCR4*, may be important markers when assessing the prognosis of gastric cancer patients. There is a need to continue the analysis of the role of *HIF-1 α* , *EGLN1*, *VHL*, *VEGF*, *CXCR4* genes in gastric cancer.

Since the overexpression of VEGF and CXCR4 is an independent risk factor of bad prognosis it is necessary to analyze the effectiveness of targeted therapy in gastric cancer treatment.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- AJCC - Amerykański Komitet do Walki z Rakiem (ang. *American Joint Committee on Cancer*)
- ANG - angiogenina (ang. *angiogenin*)
- APC - gen supresorowy związany z rodzinną polipowatością gruczolakową (ang. *adenomatous polyposis coli*)
- ARNT (HIF-1 β) - podjednostka β czynnika indukowanego hipoksją 1 (ang. *aryl hydrocarbon nuclear translocator*)
- Bcl-2 - białko o funkcji antyapoptotycznej (ang. *B-cell lymphoma 2*)
- bFGF - czynnik wzrostu dla fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*)
- bHLH - domena helisa-pętla-helisa podjednostki α i β czynnika HIF-1 (ang. *basic helix-loop-helix*)
- BMDCs - komórki macierzyste szpiku (ang. *bone marrow-derived cells*)
- BRCA2 - gen związany z rodzinnym występowaniem raka piersi
- BSA - surowicza albumina wołowa (ang. *bovine serum albumine*)
- CAIX - anhydraza węglanowa IX (ang. *carbonic anhydrase IX*)
- CAXII - anhydraza węglanowa XII (ang. *carbonic anhydrase XII*)
- CBP/p300 - koaktywator transkrypcji (ang. *CREB binding protein*)
- CD31 - antygen różnicowania komórkowego (ang. *cluster of differentiation*)
- CD34 - antygen różnicowania komórkowego (ang. *cluster of differentiation*)
- CDH1 - gen supresorowy kodujący białko E-kadherynę (ang. *E-cadherin*)
- cDNA - komplementarny DNA (ang. *complementary DNA*)
- c-erbB2 (HER2/neu) - receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*)
- c-MET - onkogen kodujący białko receptorowe dla HGF (ang. *MET oncogen*)
- Cp - "cykl przegięcia" (ang. *crossing point*)
- CpG - sekwencje DNA bogate w dinukleotydy CpG (ang. *CpG islands*)
- C-TAD - domena transaktywacji czynnika HIF-1 (ang. *transactivation domain*)
- CXCR4 - receptor dla chemokiny SDF-1 (ang. *CXC chemokine receptor type 4*)
- DNA - kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)
- dsDNA - dwuniciowy DNA (ang. *double-stranded DNA*)
- ECF - epirubicyna, cisplatyna, 5-Fluorouracyl (ang. *epirubicin, cisplatin, 5-Fluorouracil*)

- ECX + B - epirubicyna, cisplatyna, kapecytabina + bewacizumab (ang. *epirubicin, cisplatin, capecytabine + bevacizumab*)
- ECX - epirubicyna, cisplatyna, kapecytabina (ang. *epirubicin, cisplatin, capecytabine*)
- EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. *ethylenediaminetetraacetate*)
- EGF - nabłonkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*)
- EMR - endoskopowa resekcja błony śluzowej (ang. *endoscopic mucosal resection*)
- EPCs - prekursorowe komórki śródbłonna (ang. *endothelial progenitor cells*)
- EPO - erytropoetyna (ang. *erythropoetin*)
- FAP - rodzinna polipowatość gruczolakowa (ang. *familial adenomatous polyposis*)
- FIH - czynnik hamujący HIF-1 będący hydroksylazą asparaginylową (ang. *factor inhibiting HIF-1*)
- GIST - nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego (ang. *gastrointestinal stromal tumor*)
- GLUT-1- transporter glukozy typ 1 (ang. *glucose transporter 1*)
- GLUT-3- transporter glukozy typ 3 (ang. *glucose transporter 3*)
- HDGC - dziedziczny rozlany rak żołądka (ang. *hereditary diffuse gastric cancer*)
- HGF - czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor*)
- HIF-1 - czynnik indukowany hipoksją (ang. *hypoxia inducible factor 1*)
- HIF-1 α - podjednostka α czynnika indukowanego hipoksją 1 (ang. *hypoxia inducible factor-1 α*)
- HIF-1 β - podjednostka β czynnika indukowanego hipoksją 1 (ang. *hypoxia inducible factor-1 β*)
- HNPCC - dziedziczny niezwiązany z polipowatością rak jelita grubego (ang. *hereditary nonpolyposis colon cancer*)
- HNSCC - rak płaskonabłonkowy głowy i szyi (ang. *head and neck squamous cell carcinoma*)
- HRE - element odpowiedzi na hipoksję (ang. *hypoxia responsive element*)
- HRP - peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxidase*)
- IGF-1 - insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. *insulin-like growth factor 1*)
- IGF-2 - insulinopodobny czynnik wzrostu 2 (ang. *insulin-like growth factor 2*)
- Il-1 - interleukina 1 (ang. *interleukin 1*)

- INT-0116 - badanie randomizowane dotyczące skuteczności zastosowania okołooperacyjnej chemioradioterapii w leczeniu raka żołądka (ang. *Intergroup 0116*)
- IUAC - Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem (ang. *International Union Against Cancer*)
- LDH - dehydrogenaza mleczanowa (ang. *lactate dehydrogenase*)
- LOH - utrata heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity*)
- LOX - oksydaza lizylowa (ang. *lysyl oxidase*)
- MAGIC (MRC STO2 trial) - badanie randomizowane III fazy nad skutecznością zastosowania okołooperacyjnej chemioterapii w leczeniu raka żołądka (ang. *MCR Adjuvant Gastric Cancer Infusional Chemotherapy*)
- MAGIC-B (MRC STO3 trial) - badanie randomizowane III fazy nad zastosowaniem okołooperacyjnej chemioterapii z lub bez bewacizumabu w leczeniu operacyjnego raka żołądka i połączenia żołądkowo-jelitowego (ang. *MRC STO3 Trial*)
- MLH1* - gen należący do grupy genów naprawczych DNA (ang. *mismatch repairMMG*)
- MMLV - odwrotna transkryptaza MMLV (ang. *Maloney Murine Leukemia Virus*)
- MMP14 - metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 14 (ang. *matrix metalloproteinase-14*)
- MMP2 - metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2 (ang. *matrix metalloproteinase-2*)
- MRC - (ang. *Medical Research Council*)
- mRNA - matrycowy RNA (ang. *messenger RNA*)
- MSH2* - gen należący do grupy genów naprawczych DNA (ang. *mismatch repairMMG*)
- MSH6* - gen należący do grupy genów naprawczych DNA (ang. *mismatch repairMMG*)
- MSI - niestabilność mikrosatelitarna (ang. *microsatellite instability*)
- NCI - dział amerykańskiej rządowej agencji National Institutes of Health (ang. *National Cancer Institute USA*)
- NO - tlenek azotu

NOS - syntaza tlenku azotu (ang. *nitric oxide synthase*)

Nrp-1 - neuropilina 1 (ang. *neuropilin 1*)

Nrp-2 - neuropilina 2 (ang. *neuropilin 2*)

N-TAD - domena trans aktywacji czynnika HIF-1 (ang. *transactivation domain*)

ODDD -domena podjednostki HIF-1 α odpowiedzialna za degradację (ang. *oxygen-dependent degradation domain*)

PAI - inhibitor aktywatora plazminogenu (ang. *plasminogen activator inhibitor*)

PAS - domena PER-ARNT-SIM podjednostki α i β czynnika HIF- α (ang. *PER-ARNT-SIM*)

PBGD - deaminaza porfobilinogenu (ang. *porphobilinogen deaminase*)

PDGF - płytkowy czynnik wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*)

PHD1 - (Egln2) hydroksylaza prolinowa typu 1 (ang. *prolyl hydroxylase domain protein 1*)

PHD2 - (Egln1) hydroksylaza prolinowa typu 2 (ang. *prolyl hydroxylase domain protein 2*)

PHD3 - (Egln3) hydroksylaza prolinowa typu 3 (ang. *prolyl hydroxylase domain protein 3*)

PHDs - enzymy z grupy hydroksylaz prolinowych (ang. *prolyl hydroxylase domain proteins*)

PI3K-Akt - ścieżka sygnałowa kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphatidylinositol-3-kinase/Akt*)

PIGF - łożyskowy czynnik wzrostu (ang. *placental growth factor*)

PMS1 - gen należący do grupy genów naprawczych DNA (ang. *mismatch repair MMG*)

PMS2 - gen należący do grupy genów naprawczych DNA (ang. *mismatch repair MMG*)

Pol II - polimeraza II (ang. *polymerase II*)

PVDF - polifluorek winylidenu (ang. *polyvinylidene fluoride*)

pVHL - produkt białkowy genu *VHL* (ang. *von Hippel-Lindau protein*)

RCC - rak jasnokomórkowy nerki (ang. *renal cell carcinoma*)

RIPA - bufor do izolacji białek

RT-PCR- reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*)

- SDF-1 (CXCL12) - chemokina będąca ligandem dla receptora CXCR4 (ang. *stromal cell-derived factor 1*)
- SDS - dodecylosiarczan sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*)
- STK11 - gen supresorowy kodujący białko kinazy treoninowo-serynowej (ang. *serine/threonine kinase 11*)
- sVEGFR-1 - forma rozpuszczalna receptora czynnika wzrostu śródbłónka naczyń typu 1 (ang. *soluble vascular endothelial growth factor receptor 1*)
- TAF - czynnik odpowiedzialny za angiogenezę w guzie (ang. *tumor angiogenic factor*)
- TBE - bufor (ang. *Tris/Borate/EDTA*)
- TGF- α - transformujący czynnik wzrostu alfa (ang. *transforming growth factor-alpha*)
- TGF- β - transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor-beta*)
- TNM - klasyfikacja stopnia zaawansowania nowotworów złośliwych (ang. *Tumour, Nodes, Metastases*)
- t-PA - tkankowy aktywator plazminogenu (ang. *tissue-type plasminogen activator*)
- TSGs - geny supresorowe (ang. *tumor suppressor genes*)
- UICC - Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem (ang. *Union for International Cancer Control*)
- uPA - aktywator plazminogenu typu urokinazy (ang. *urokinase-type plasminogen activator*)
- uPAR - receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazy (ang. *urokinase-type plasminogen activator receptor*)
- VEGF - naczyniowy czynnik wzrostu komórek endotelialnych (ang. *vescular endothelial growth factor*)
- VEGF-A - naczyniowy czynnik wzrostu komórek endotelialnych typ A (ang. *vescular endothelial growth faktor A*)
- VEGF-B - naczyniowy czynnik wzrostu komórek endotelialnych typ B (ang. *vescular endothelial growth factor B*)
- VEGF-C - naczyniowy czynnik wzrostu komórek endotelialnych typ C (ang. *vescular endothelial growth factor C*)
- VEGF-D - naczyniowy czynnik wzrostu komórek endotelialnych typ D (ang. *vescular endothelial growth factor D*)

- VEGFR-1 (Flt-1) - receptor czynnika wzrostu komórek endotelialnych typ 1 (ang. *vascular endothelial growth factor receptor 1; fms-like tyrosyl kinase-1*)
- VEGFR-2 (Flk-1/KDR) - receptor czynnika wzrostu komórek endotelialnych typ 2 (ang. *vascular endothelial growth factor receptor 2; fetal liver kinase-1/Kinase Domain-containing Receptor*)
- VEGFR-3 (Flt-4) - receptor czynnika wzrostu komórek endotelialnych typ 3 (ang. *vascular endothelial growth factor receptor 3; fms-related tyrosine kinase 4*)
- vHL - choroba von Hippel-Lindau (ang. *von Hippel-Lindau disease*)
- VHL - czynnik von Hippel-Lindau - produkt genu supresorowego *VHL* (ang. *von Hippel-Lindau*)
- VPF - czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń (ang. *vascular permeability factor*)
- WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organisation*)

PIŚMIENNICTWO

- 1 Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12:354-62.
- 2 Yamamoto S. Stomach cancer incidence in the world. *Jpn J Clin Oncol* 2001;31:471.
- 3 Szmidt J, Kuźdżał J. Podstawy chirurgii. Podręcznik dla lekarzy specjalizujących się w chirurgii ogólnej. Kraków 2009.
- 4 Firth HV, Hurst JA, Hall JG. Oxford Desk Reference: Clinical Genetics. Oxford University Press, 2005.
- 5 Huntsman DG, Carneiro F, i wsp. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. *New Engl J Med* 2001;344:1904-9.
- 6 Hamilton SR, Aaltonen LA. World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System. Lyon 2000.
- 7 Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. AJCC Cancer Staging Handbook, 7th ed. New York-Dordrecht-Heidelberg-London, Springer 2010;145-152.
- 8 Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* 1998;85:1457-9.
- 9 Santaro E. The history of gastric cancer: legends and chronicles. *Gastric Cancer* 2005;8:71-74.
- 10 Pèan JE. De l'ablation des tumeurs de l'estomac par la gastrectomie. *Gaz Hop* 1879;52:473-5.
- 11 Billroth T. Offenes schreiben an Herrn Dr. Wittelshofer. *Wien Med. Wochenschr* 1881;31:162-5.
- 12 Borszewski J. Ocena stosowania całkowitych wycięć żołądka w przypadkach nowotworów złośliwych. Poznań, PWN, 1956.
- 13 Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, i wsp. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med*. 2001;345:725-30.
- 14 Cunningham D, M.D., William H. Allum, M.D., i wsp. Perioperative Chemotherapy versus Surgery Alone for Resectable Gastroesophageal Cancer. *N Engl J Med*. 2006;355;11-20.

- 15 Starling N, Cunningham D. The role of systemic therapy for localized gastric cancer. *Annals of Oncology* 2006;17:115-121.
- 16 Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny, i wsp. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.
- 17 Miller KD, Chap LI, Holmes FA, i wsp. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:792-9.
- 18 Herbst RS, Johnson DH, Mininberg E, wsp. Phase I/II trial evaluating the anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with the HER-1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:2544-55.
- 19 Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 1996;76:839-85.
- 20 Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006;57:1-18.
- 21 North S, Moenner M, Biklavi A. Recent development in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer Letters* 2005;218:1-14.
- 22 Powis G, Kirkpatrick L. Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther* 2004;3:647-54.
- 23 Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med* 2007;85:1301-7.
- 24 Harris AL. Hypoxia-A key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38-47.
- 25 Esteban MA, Tran MG, Harten SK, i wsp. Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer Res* 2006;66:3567-75.
- 26 Koshiji M, To KK, Hammer S, wsp. HIF-1alpha induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSalpha expression. *Mol Cell* 2005;17:793-803.
- 27 Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:293-9.

- 28 Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996;379:88-91.
- 29 Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;9:239-52.
- 30 Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2004;4:437-47.
- 31 Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, i wsp. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 2002;62:3387-94.
- 32 Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-32.
- 33 Kaanders JH, Wijffels KI, Marres HA, i wsp. Pimonidazole binding and tumor vascularity predict for treatment outcome in head and neck cancer. *Cancer Res* 2002;62:7066-74.
- 34 Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Georgoulas V, i wsp. Angiogenesis vs. response after combined chemoradiotherapy of squamous cell head and neck cancer. *Int J Cancer* 1999;80:810-7.
- 35 Nordmark M, Bentzen SM, Rudat V, i wsp. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol* 2005;77:18-24.
- 36 Hockel M, Schlenger K, Hockel S, i wsp. Tumor hypoxia in pelvic recurrences of cervical cancer *Int J Cancer* 1998;79:365-9.
- 37 Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995;270:1320-7.
- 38 Wiesener MS, Maxwell PH. HIF and oxygen sensing; as important to life as the air we breathe? *Ann Med* 2003;35:183-90.
- 39 Kaelin WG, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: The central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 2008;30:393-402.
- 40 Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:2423-7.
- 41 Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: Oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* 2004;19:176-82.

- 42 Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:167-71.
- 43 Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 1996;271:32253-9.
- 44 Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996;271:C1172-80.
- 45 Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 2001;15:1312-14.
- 46 Kaluz S, Kaluzova M, Stanbridge EJ. Does inhibition of degradation of hypoxia-inducible factor (HIF) alpha always lead to activation of HIF? Lessons learnt from the effect of proteosomal inhibition on HIF activity. *J Cell Biochem* 2008;104:536-44.
- 47 Hewitson KS, Mcneill LA, Schofield CJ. Modulating the hypoxia-inducible factor signaling pathway: applications from cardiovascular disease to cancer. *Curr Pharm Des* 2004;10:821-33.
- 48 Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001;292:464-8.
- 49 Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468-72.
- 50 Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:343-54.
- 51 Cockman ME, Masson N, Mole DR, et al. Hypoxia-inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppression protein. *J Biol Chem* 2000; 275:25733-41.
- 52 Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-5.

- 53 Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 2001;15:2675-86.
- 54 Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, et al. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002;16:1466-71.
- 55 Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1999;15:551-78.
- 56 Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:967-75.
- 57 Chandel NS, Simon MC. Hypoxia-inducible factor: Roles in development, physiology, and disease. *Cell Death Differ* 2008;15:619-20.
- 58 Kaelin WG. Proline hydroxylation and gene expression. *Annu Rev Biochem* 2005;74:115-28.
- 59 Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology* 2009;24:97-106.
- 60 Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003;9:677-84.
- 61 Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:281-90.
- 62 Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:241-8.
- 63 Bindra RS, Crosby ME, Glazer PM. Regulation of DNA repair in hypoxic cancer cells. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:249-60.
- 64 Lukashev D, Ohta A, Sitkovsky M. Hypoxia-dependent anti-inflammatory pathways in protection of cancerous tissues. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:273-9.
- 65 Chan DA, Giaccia AJ. Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:333-9.
- 66 Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:319-31.

- 67 Chiche J, Ile K, Laferriere J, *wsp.* Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* 2009;69:358-68.
- 68 Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, *i wsp.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16:4604-13.
- 69 Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, *i wsp.* Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10595-9.
- 70 Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242-8.
- 71 Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG Jr. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* 2002;1:237-46.
- 72 Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 2000;60:4010-5.
- 73 Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, *i wsp.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1a in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999;59:5830-5.
- 74 Semenza GL. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. *Intern Med* 2002;41:79-83.
- 75 Hui EP, Chan AT, Pezzella F, *i wsp.* Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin Cancer Res* 2002;8:2595-604.
- 76 Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000;60:4693-6.
- 77 Talks KL, Turley H, Gatter KC, *i wsp.* The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000;157:411-21.

- 78 Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002;8:62-67.
- 79 Ivan M, Kaelin Jr WG. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:27-34.
- 80 Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001;294:1337-40.
- 81 Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001;107:43-54.
- 82 Taylor MS. Characterization and comparative analysis of the EGLN gene family. *Gene* 2001;275:125-32.
- 83 Hirsila M, Koivunen P, Gunzler V, et al. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 2003;278:30772-80.
- 84 Berra E, Benizri E, Ginouves A, et al. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J* 2003;22:4082-90.
- 85 Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 2004;279:38458-65.
- 86 Lieb ME, Menzies K, Moschella MC, et al. Mammalian EGLN1 genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochem Cell Biol* 2002;80:421-6.
- 87 Willam C, Maxwell PH, Nichols L, et al. HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:68-77.
- 88 To KK, Huang LE. Suppression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) transcriptional activity by the HIF prolyl hydroxylase EGLN1. *J Biol Chem* 2005;280:38102-7.
- 89 Mandriota SJ, Turner KJ, Davies DR, Murray PG, Morgan NV, Sowter HM, et al. HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell* 2002;1:459-468.
- 90 Kaelin WG. Von hippel-lindau disease. *Annu Rev Pathol* 2007;2:145-73.

- 91 Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chu V, Kaelin WG. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2000;2:423-7.
- 92 Wijnhoven BP, Lindstedt EW, Abbou M, i wsp. Molecular genetic analysis of the von Hippel-Lindau and human peroxisome proliferator-activated receptor gamma tumor-suppressor genes in adenocarcinomas of the gastroesophageal junction. *Int J Cancer* 2001;94:891-5.
- 93 Sakashita N, Takeya M, Kishida T, Stackhouse TM, Zbar B, Takahashi K. Expression of von Hippel-Lindau protein in normal and pathological human tissues. *Histochem J* 1999;31:133-44.
- 94 Maxwell PH, Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:29-37.
- 95 Hall AP. The role of angiogenesis in cancer. *Comp Clin Path.* 2005;13:95-99.
- 96 Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *NEJM* 1971;285:1182-1186.
- 97 Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med.* 1971;133:275-288.
- 98 Brem H, Folkman J. Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. *Journal of Experimental Medicine* 1975; 141:
- 99 Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-9.
- 100 Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25:581-611.
- 101 Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004;56:549-80.
- 102 Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-95.
- 103 Shojaei F, Wu X, Zhong C, i wsp. Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature* 2007;450:825-831.

- 104 Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;9:685-93.
- 105 Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002;20:4368-80.
- 106 Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011-27.
- 107 Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev in Oncol Hematol* 2007;62:179-213.
- 108 Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1099-107.
- 109 Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R. The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv Exp Med Biol* 2002;515:33-48.
- 110 Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-14.
- 111 Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947-54.
- 112 Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost* 2005;3:1835-42.
- 113 Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev* 1997;18:4-25.
- 114 Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 1983;46:5629-32.
- 115 Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U. Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem* 1996;271:19310-7.
- 116 Aase K, von Euler G, Li X, et al. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* 2001;104:358-64.

- 117 Lymboussaki A, Olofsson B, Eriksson U, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C show overlapping binding sites in embryonic endothelia and distinct sites in differentiated adult endothelia. *Circ Res* 1999;85:992-9.
- 118 Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, i wsp. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004;5:74-80.
- 119 Rocchigiani M, Lestingi M, Luddi A, i wsp. Human FIGF: cloning gene structure, and mapping to chromosome Xp22.1 between the PIGA and the GRPR genes. *Genomics* 1998;47:207-16.
- 120 Stacker SA, Stenvers K, Caesar C, i wsp. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem* 1999;274:32127-36.
- 121 Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, i wsp. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 2005;25:2441-9.
- 122 Cao Y, Ji WR, Qi P, Rosin A. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:493-8.
- 123 Yang W, Ahn H, Hinrichs M, Torry RJ, Torry DS. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol* 2003;60:53-60.
- 124 Shibuya M. Role of VEGF Flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1995;67:281-316.
- 125 Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy R, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1991;6:1677-83.
- 126 Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer cell* 2002;1:219-27.
- 127 Veikkola T, Jussila L, Makinen T, i wsp. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor 3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J* 2001;20:1223-31.

- 128 De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-91.
- 129 Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994;269:25646-54.
- 130 Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269:26988-95.
- 131 Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10705-9.
- 132 Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996;87:3336-43.
- 133 Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (Flt-1) is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 2001;97:785-91.
- 134 Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2002;2:826-35.
- 135 Luttun A, Tjwa M, Moons L, i wsp. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002;8:831-40.
- 136 Murakami M, Zheng Y, Hirashima M, i wsp. VEGFR1 tyrosine kinase signaling promotes lymphangiogenesis as well as angiogenesis indirectly via macrophage recruitment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* in press. 2008.
- 137 Lin EY, Li JF, Gnatovsky L, i wsp. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* 2006;66:11238-46.
- 138 Murakami M, Iwai S, Hiratsuka S, Yamauchi M, Nakamura K, Iwakura Y, Shibuya M. Signaling of vascular endothelial growth factor receptor 1

- tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocyte/macrophages. *Blood* 2006;108:1849-56.
- 139 Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, i wsp. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:1579-86.
- 140 Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993;90:7533-7.
- 141 Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 1999;274:31047-54.
- 142 Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J* 2001;20:2768-78.
- 143 Ebos JM, Bocci G, Man S, i wsp. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res* 2004;2:315-26.
- 144 Albuquerque RJ, Hayashi T, Cho WG, i wsp. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med* 2009;15:1023-30.
- 145 Kopfstein L, Veikkola T, Djonov VG, i wsp. Distinct roles of vascular endothelial growth factor-D in lymphangiogenesis and metastasis. *Am J Pathol* 2007;170:1348-61.
- 146 Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, i wsp. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996;122:3829-37.
- 147 Laakkonen P, Waltari M, Holopainen T, i wsp. Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res* 2007;67:593-9.
- 148 Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of α v integrins during angiogenesis: insight into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 1999;103:1227-1230.

- 149 Gerber H, McMurtrey A, Kowalski J, i wsp. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival by the PI3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998;273:30336-43.
- 150 Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273:13313-16.
- 151 Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:1-30.
- 152 Choong PF, Nadesapillai AP. Urokinase plasminogen activator system: A multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop* 2003;(suppl415):46-58.
- 153 Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.
- 154 Gerwins P, Skoldenberg E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;34:185-94.
- 155 Less JR, Skalak TC, Sevick EM, Jain RK. Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions. *Cancer Res* 1991;51:265-73.
- 156 Kakolyris S, Fox SB, Koukourakis M, i wsp. Relationship of vascular maturation in breast cancer blood vessels to vascular density and metastasis, assessed by expression of a novel basement membrane component, LH39. *Br J Cancer* 2000;82:844-51.
- 157 Luo JC, Yamaguchi S, Shinkai A, Shitara K, Shibuya M. Significant expression of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor in mouse ascites tumors. *Cancer Res* 1998;58:2652-60.
- 158 Yoshij H, Kuriyama S, Hicklin DJ, i wsp. The vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk-1 is a major regulator of malignant ascites formation in the mouse hepatocellular carcinoma model. *Hepatology* 2001;33:841-7.
- 159 Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, i wsp. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes progression. *Cancer Res* 2010;70:7465-75.

- 160 Lee JC, Chow NH, Wang ST, i wsp. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *Eur J Cancer* 2000;36:748-53.
- 161 Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, i wsp. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995;55:3964-8.
- 162 Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, i wsp. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:1679-84.
- 163 Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, i wsp. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77:858-63.
- 164 Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, i wsp. Expression of two angiogenic factors, vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor in human pancreatic cancer, and its relationship to angiogenesis. *Eur J Cancer* 1998;34:1439-47.
- 165 Ikeda N, Adachi M, Taki T, i wsp. Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1999;79:1553-63.
- 166 Berns EM, Klijn JG, Look MP, i wsp. Combined vascular endothelial growth factor and TP53 status predicts poor response to tamoxifen therapy in estrogen receptor-positive advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:1253-8.
- 167 Manders P, Beex LV, Tjan-Heijnen VC, i wsp. The prognostic value of vascular endothelial growth factor in 574 node-negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic therapy. *Br J Cancer* 2002;87:772-8.
- 168 George DJ, Halabi S, Shepard TF, i wsp. Prognostic significance of plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with hormone-refractory prostate cancer treated on Cancer and Leukemia Group B 9480. *Clin Cancer Res* 2001;7:1932-6.
- 169 Fontanini G, Lucchi M, Vignati S, i wsp. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: A prospective study. *J Nat Cancer Inst* 1997;89:881-6.

- 170 Garcea G, et al. Angiogenesis of gastrointestinal tumors and their metastases – a target for intervention? *Eur J Cancer* 2004;40:1302-13.
- 171 Achen MG, Williams RA, Minekus MP, i wsp. Localization of vascular endothelial growth factor-D in malignant melanoma suggests a role in tumor angiogenesis. *J Pathol* 2001;193:147-54.
- 172 Valtola R, Salven P, Heikkila P, i wsp. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 1999;154:1381-90.
- 173 Ishikawa T, Nakashiro K-I, Klosek SK, i wsp. Hypoxia enhances CXCR4 expression by activating HIF-1 in oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* 2009;3:707-712.
- 174 Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med* 2001;345:833-835.
- 175 Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006;5:1761-1767.
- 176 Balkwill F. Chemokine biology in cancer. *Semin Immunol* 2003;15:49-55.
- 177 Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stromal-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *American Journal of Physiology* 2007;3: 987-995.
- 178 Arya M, Ahmed A, Silhi N, Williamson M, Patel HRH. Clinical importance and therapeutic implications of the pivotal CXCL12-CXCR4 (chemokine-ligand-receptor) interaction in cancer cell migration. *Tumor biology* 2007;3:123-131.
- 179 Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, i wsp. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine* 2004;8:858-864.
- 180 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
- 181 Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours, 7th edition. 2010
- 182 Fondevila C, Metges JP, Fuster J, i wsp. p53 and VEGF expression are independent predictors of tumor recurrence and survival following curative resection of gastric cancer. *Br J Cancer* 2004;90:206-215.

- 183 Simiantonaki N, Taxeidis M, Jayasinghe C, Kurzik-Dumke U, Kirkpatrick CJ. Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression increases during colorectal carcinogenesis and tumor progression. *BMC Cancer* 2008;320.
- 184 Griffiths E-A, Pritchard S-A, Welch I-M, Price P-M, West C-M. Is the hypoxia-inducible factor pathway important in gastric cancer? *Eur J Cancer* 2005;41:2792-2805.
- 185 Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, i wsp. Expression of hypoxia inducible factor 1alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2003;105:176-181.
- 186 Takahashi R, Tanaka S, Hiyama T, i wsp. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncol Rep* 2003;10:797-802.
- 187 Chen WT, Huang CJ, Wu MT, Yang SF, Su YC, Chai CY. Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with risk of aggressive behavior and tumor angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35:207-213.
- 188 Matsuyama T, Nakanishi K, Hayashi T, i wsp. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2005;96:176-82.
- 189 Kitadai Y, Kodama M, Cho S, i wsp. Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes. *Int J Cancer* 2005;115:388-392.
- 190 Mori M, Mimori K, Inoue H, i wsp. Detection of cancers micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995;55:3417-3420.
- 191 Urano N, Fujiwara Y, Doki Y, i wsp. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer* 2006;9:44-49.
- 192 Evans AJ, Russell RC, Roche O, i wsp. VHL promotes E2 box-dependant E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and snail. *Mol Cell Biol* 2007;1:157-169.
- 193 Erler JT, Giacca AJ. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res* 2006;21:10238-41.
- 194 Sprague LD, Tomaso H, Mensele K, i wsp. Effects of hypoxia and reoxygenation on the expression levels of the urokinase-type plasminogen

- activator, its inhibitor plasminogen activator inhibitor type-1 and the urokinase-type plasminogen activator receptor in human head and neck tumour cells. *Oncol Rep* 2007;5:1259-68.
- 195 Gelmini S, Mangoni M, Serio M, Romagnani P, Lazzeri E. The critical role of SDF-1/CXCR4 axis in cancer and cancer stem cells metastasis. *J Endocrin Invest* 2008;9:809-19.
- 196 Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, i wsp. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Laboratory Invest* 2006;12:1221-32.
- 197 Seong-Eun K, Ki-Nam S, Sung-Ae J, Kwon Y, Joo HL. The clinicopathological significance of tissue levels of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in gastric cancer. *Gut and Liver* 2009;3:88-94.
- 198 Yoshikawa T, Tsuburaya A, Miyagi Y, i wsp. Up-regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and VEGF mRNAs in peritoneal dissemination of patients with gastric cancer. *Anticancer Research* 2006;26:3849-3854.
- 199 Stoeltzing O, McCarty MF, Wey JS, i wsp. Role of hypoxia-inducible factor 1alpha in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:946-956.
- 200 Mizokami K, Kakeji Y, Oda S, i wsp. Clinicopathologic significance of hypoxia-inducible factor 1alpha overexpression in gastric carcinomas. *J Surg Oncol* 2006;94:149-154.
- 201 Griffiths EA, Pritchard SA, Valentine HR, i wsp. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression in the gastric carcinogenesis sequence and its prognostic role in gastric and gastro-esophageal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 2007;96:95-103.
- 202 Sumiyoshi Y, Kakeji Y, Egashira A, Mizokami K, Orita H, Maehara Y. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha and p53 is a marker for an unfavorable prognosis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:5112-5117.
- 203 Mizukami Y, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O, Chung DC. Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer. *Cancer Res* 2004;64:1765-1772.

- 204 Chan DA, Kawahara TL, Sutphin PD, Chang HY, Chi JT, Giaccia AJ. Tumor Vasculature is regulated by PHD2-mediated angiogenesis and bone marrow-derived cell recruitment. *Cancer Cell* 2009;15:527-38.
- 205 D'Angelo G, Duplan E, Boyer N, Vigne P, Frelin C. Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation. *J Biol Chem* 2003;278:38183-38187.
- 206 Metzen E, Stiehl DP, Doege K, i wsp. Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. *Biochem J* 2005;387:711-7.
- 207 Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, i wsp. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:15149-15154.
- 208 Graudens E, Boulanger V, Mollard C, i wsp. Deciphering cellular states of innate tumor drug responses. *Genome Biol* 2006;7:R19.
- 209 Jokilehto T, Rantanen K, Luukkaa M, i wsp. Overexpression and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase PHD2 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness. *Clinical cancer research* 2006;12:1080-7.
- 210 Luukkaa M, Jokil 2009;85:900-8.
- 211 Pawitan Y, Biohle J, Amler L, i wsp. Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts. *Breast Cancer Res* 2005;7:R953-964.
- 212 Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, i wsp. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005;365:671-679.
- 213 Takeda K, Fong GH. Prolyl hydroxylase domain 2 protein suppresses hypoxia-induced endothelial cell proliferation. *Hypertension* 2007;49:178-84.
- 214 Miyakis S, Liloglou T, Kearney S, Xinarianos G, Spandidos DA, Field JK. Absence of mutations in the VHL gene but frequent loss of heterozygosity at 3p25-26 in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 2003;39:273-7.
- 215 Cao Z, Song JH, Kim CJ, Cho YG, Kim SY, Nam SW, Lee JY, Park WS. Genetic and epigenetic analysis of the VHL gene in gastric cancers. *Acta Oncologica* 2008;47:1551-1556.

- 216 Harms KM, Li L, Cunningham LA. Murine neural stem/progenitor cells protect neurons against ischemia by HIF-1 α -regulated VEGF signaling. *PLoS One* 2010
- 217 Arany Z, Foo SY, Ma Y, i wsp. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature* 2008;7181:1008-12.
- 218 McColl BK, Stacker SA, Achen MG. Molecular regulation of the VEGF family-inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *APMIS* 2004;7-8:463-80.
- 219 Maeda K, Kang SM, Onoda N, Ogawa M, Kato Y, Sawada T, Chung K. Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Preoperative Biopsy Specimens Correlates with Disease Recurrence in Patients with Early Gastric Carcinoma. *Cancer* 1999;86:566-71.
- 220 Toi M, Hoshina S, Takayanagi T, Tominaga T. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1994;85:1045-9.
- 221 Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1996;55:3964-8.
- 222 Montero E, Abreu C, Tonino P. Relationship between VEGF and p53 expressions and tumor cell proliferation in human gastrointestinal carcinomas. 2008;134:193-201.
- 223 Lim J, Kang S, Lee M, Pal H, Yoon H, Lee J, Hong S, Lim C. Expression of vascular endothelial growth factor in salivary gland carcinomas and its relation to p53, Ki-67 and prognosis. *J Oral Pathol Med* 2003;32:552-561.
- 224 Niu Q, Tang ZY, Ma ZC, Qin LX, Zhang LH. Serum vascular endothelial growth factor is a potential biomarker of metastatic recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000;6:565-68.
- 225 Okuyama T, Maehara Y, Kabashima A, Takahashi I, Kakeji Y, Sugimachi K. Combined evolution of expression of p53 and p21 proteins as prognostic factors for patients with gastric carcinoma. *Oncology* 2002;63:353-361.

- 226 Uehara M, Sano K, Ikeda H, Sekine J, Irie A, Yokota T, Tobita T, Ohba S, Inokuchi T. Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;40:321-325.
- 227 Aoyagi K, Kouhiji K, Yano S, i wsp. VEGF significance in peritoneal recurrence from gastric cancer, *Gastric cancer* 2005;8:155-163.
- 228 Hachisuka T, Narikiyo M, Yamada Y, i wsp. High lymphatic vessel density correlates with overexpression of VEGF-C in gastric cancer. *Oncol Rep* 2005;13:733-737.
- 229 Onogawa S, Kitadai Y, Amioka T, i wsp. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in early gastric carcinoma: correlation with clinocopathological parameters. *Cancer Lett* 2005;226:85-90.
- 230 Juttner S, Wissmann C, Jons T, i wsp. Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:228-40.
- 231 Gretschel S, Astrosini C, Vieth M, Jons T, Tomov T, Hocker M, Schlag PM, Kemmner W. Markers of tumour angiogenesis and tumour cells in bone marrow in gastric cancer patients. *EJSO* 2007;
- 232 Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, i wsp. Correlation between expression of vascular endothelial growth factor and tumor vascularity, and patient outcome in human gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1997;15:826-832.
- 233 Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, i wsp. Extend of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1996;56:2671-2676.
- 234 Iordache S, Saftoiu A, Georgescu CV, i wsp. Vascular endothelial growth factor expression and microvessel density-two useful tools for the assessment of prognosis and survival in gastric cancer patients. *J gastrointestin Liver Dis* 2010;2:135-139.
- 235 Ding S, Li C, Lin S, i wsp. Comperative evaluation of microvessel density determined by CD34 or CD105 in benign and malignant gastric lesions. *Hum Pathol* 2006;37:861-866.
- 236 Zhao HC, Qin R, Chen XX, i wsp. Microvessel density is a prognostic marker of human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12:7598-7603.

- 237 Wang YD, Wu P, Mao JD, Huang H, Zhang F. Relationship between vascular invasion and microvessel density and micrometastasis. *World J Gastroenterol* 2007;13:6269-6273.
- 238 Kolev Y, Uetake H, Iida S, Ishikawa T, Kawano T, Sugihara K. Prognostic significance of VEGF expression in correlation with COX-2 microvessel density, and clinicopathological characteristics in human gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007;14:2738-2747.
- 239 Kim HS, Kang HS, Messam CA, Min KW, Park CS. Comparative evaluation of angiogenesis in gastric adenocarcinoma by nestin and CD34. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10:121-127.
- 240 Iwasaki J, Nihira S. Anti-angiogenic therapy against gastrointestinal tract cancers. *Jpn J Clin Oncol* 2009;39:543-551.
- 241 Wagner AD, Moehler M. Development of targeted therapies in advanced gastric cancer: promising exploratory steps in a new era. *Curr Opin Oncol* 2009;21:381-385.
- 242 Tamiya A, Yamazaki K, Boku N, *et al*. Safety of bevacizumab treatment in combination with standard chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a retrospective review of 65 Japanese patients. *Int J Clin Oncol* 2009;14:513-517.
- 243 Kakeji Y, Koga T, Sumiyoshi Y, Shibahara K, Oda S, Maehara Y, Sugimachi K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2002;21:125-129.
- 244 Yamaguchi K, Saito H, Oro S, Tatebe S, Ikeguchi M, Tsujitani S. Expression of inducible nitric oxide synthase is significantly correlated with expression of vascular endothelial growth factor and dendritic cell infiltration in patients with advanced gastric carcinoma. *Oncology* 2005;68:471-478.
- 245 Tatsuguchi A, Matsui K, Shinji Y, *et al*. Cyclooxygenase-2 expression correlates with angiogenesis and apoptosis in gastric cancer tissue. *Hum Pathol* 2004;35:488-495.
- 246 Lazar D, Taban S, Raica M, *et al*. Immunohistochemical evaluation of the tumor neoangiogenesis as a prognostic factor for gastric cancers. *Rom J Morphol Embryol* 2008;49:137-148.

- 247 Cabuk D, Basaran G, Celikel C, i wsp. Vascular endothelial growth factor, hypoxia-inducible growth factor 1 alpha and CD34 expressions in early-stage gastric tumors: relationship with pathological factors and prognostic impact on survival. *Oncology* 2007;72:111-117.
- 248 Tzanakis N, Gazouli M, Rallis G, i wsp. Vascular endothelial growth factor polymorphism in gastric cancer development, prognosis, and survival. *J Surg Oncol* 2006;94:624-630.
- 249 Kitadai Y, Haruma K, Tokutomi T, i wsp. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. *Clin Cancer Res* 1998;4:2195-2200.
- 250 Gasparini G, Toi M, Gion M, i wsp. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:139-147.
- 251 Fontanini G, Vignati S, Boldrini L, i wsp. Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997;3:861-865.
- 252 Paley PJ, Staskus KA, Gebhard K, i wsp. Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma. *Cancer* 1997;80:98-106.
- 253 Maehara Y, Kabashima A, Koga T, i wsp. Vascular invasion and potential for tumour angiogenesis and metastasis in gastric carcinoma. *Surgery* 2000;128:408-16.
- 254 Ichikura T, Tomimatsu S, Ohkura E, i wsp. Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 2001;78:132-7.
- 255 Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, i wsp. Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1823-9.
- 256 Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, i wsp. Vascular endothelial growth factor C promotes tumour lymphangiogenesis and intralymphatic tumour growth. *Cancer Res* 2001;61:1786-90.
- 257 Kim SE, Shim KN, Jung SA, Yoo K, Lee JH. The clinicopathological significance of tissue levels of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in gastric cancer. *Gut and Liver* 2009;2:88-94.

- 258 Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer* 2002;2:8.
- 259 Tomoda M, Maehara Y, Kakeji Y, Ohno S, Ichiyoshi Y, Sugimachi K. Intratumoral neovascularization and growth pattern in early gastric carcinoma. *Cancer* 1999;85:2340-2346.
- 260 Konno H, Baba M, Tanaka M, Kamiya K, Ota M, Oba K, Shoji A, Kaneko T, Nakamura S. Overexpression of vascular endothelial growth factor is responsible for the hematogenous recurrence of early-stage gastric carcinoma. *Eur Surg Res* 2000;32:177-181.
- 261 Shi H, Xu J-M, Hu N-Z, Xie H-J. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1421-1426.
- 262 Du J-R, Jiang Y, Zhang Y-M, Fu H. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World J gastroenterol* 2003;9:1604-1606.
- 263 Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density: what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:883-893.
- 264 Saito H, Tsujitani S, Oka S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. The expression of transforming growth factor- β_1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1999;86:1455-1462.
- 265 Sun X, Wei L, Chen Q, Terek RM. CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression. *Mol Cancer* 2010.
- 266 Mitra P, Shibuta K, Mathai J, Shimoda K, Banner BF, Mori M, Bernard GF. CXCR4 mRNA expression in colon, esophageal and gastric cancers and hepatitis C infected liver. *Int J Oncol* 1999;14:917-925.
- 267 Müller A, Homey B, Soto H, i wsp. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410:50-56.

- 268 Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, i wsp. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res* 2000;6:3530-35.
- 269 Cabioglu N, Yazici MS, Arun B, Broglio KR, Hortobagyi GN, Price JE, Sabin A. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:5686-93.
- 270 Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N, i wsp. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:1743-50.
- 271 Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, Yanagita S, Arima H, Hirata M, Ishigami S, Aikou T. CCR7 and CXCR4 expression predicts lymph node status including micrometastasis in gastric cancer. *Int J Oncol* 2009;35:19-24.
- 272 Kwon SJ, Kim GS. Prognostic significance of lymph node metastasis in advanced carcinoma of the stomach. *Br J Surg* 1996;83:1600-1603.
- 273 Nitti D, Marchet A, Olivieri M, Ambrosi A, Mencarelli R, Belluco C, Lise M. Ratio between metastatic and examined lymph nodes is an independent prognostic factor after D2 resection for gastric cancer: analysis of a large European monoinstitutional experience. *Am Surg Oncol* 2003;10:1077-1085.
- 274 Oda I, Saito D, Tada M, i wsp. A multicenter retrospective study of endoscopic resection for early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2006;9:262-270.
- 275 Gotoda T. Endoscopic resection of early gastric cancer. *Gastric cancer* 2007;10:1-11.
- 276 Tsujitani S, Oka S, Saita H, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Less invasive surgery for Early gastric cancer based on the low probability of lymph node metastasis. *Surgery* 1999;125:148-154.
- 277 Kim DY, Joo JK, Ryu SY, Kim YJ, Kim SK. Factors related to lymph node metastasis and surgical strategy used to treat early gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:737-740.
- 278 Hatse S, Princen K, Bridger G, De Clercq E, Schols D. Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett* 2002;527:255-262.

- 279 Liang Z, Wu T, Lou H, i wsp. Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res* 2004;64:4302-08.
- 280 Mori T, Doi R, Koizumi M, i wsp. CXCR4 antagonist inhibits stromal cell-derived factor 1-induced migration and invasion of human pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2004;3:29-37.
- 281 Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, i wsp. T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS Lett* 2003;550:79-83.

SPIS TABEL I RYCIN

Tabela 1. Klasyfikacja histologiczna WHO złośliwych nowotworów nabłonkowych żołądka [6].....	12
Tabela 2. Klasyfikacja TNM raka żołądka wg AJCC (ang. American Joint Committee on Cancer) [7].....	14
Tabela 3. Klasyfikacja zaawansowania raka żołądka wg AJCC [7].....	15
Tabela 4. Wybrane geny docelowe regulowane z udziałem HIF-1, których produkty biorą udział w progresji nowotworów.....	32
Tabela 5. Startery wykorzystywane w reakcji RT-PCR.....	52
Tabela 6. Dane kliniczne i histopatologiczne pacjentów operowanych z powodu raka żołądka; ^a - klasyfikacja TNM według UICC – edycja 7 [181].....	60
Tabela 7. Korelacja wyników ekspresji mRNA analizowanych genów z danymi klinicznymi i histopatologicznymi pacjentów; (-) – niski poziom ekspresji; (+) – wysoki poziom ekspresji; # - dokładny test Fisher'a; * - test Chi-kwadrat.	68
Tabela 8. Zależność poziomu ekspresji mRNA pomiędzy poszczególnymi analizowanymi genami; (-) – niski poziom ekspresji; (+) – wysoki poziom ekspresji; #P – dokładny test Fisher'a.....	78
Tabela 9. Ocena immunohistochemiczna ekspresji białka VEGF i CD34 w tkance nowotworowej raka żołądka u 20 analizowanych pacjentów.	80
Tabela 10. Korelacja wyników immunohistochemicznej oceny ekspresji białek VEGF i CD34 z danymi klinicznymi i histopatologicznymi; # - dokładny test Fisher'a; *- test Chi-kwadrat.	83
Tabela 11. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji białka VEGF i markera CD34 ocenionych za pomocą badania immunohistochemicznego w tkance nowotworowej raka żołądka u 20 chorych; # - dokładny test Fisher'a.	85
Rycina 1. Schemat badania randomizowanego III fazy (UK MRC STO3) nad zastosowaniem bevacizumabu w terapii systemowej u pacjentów z resekcyjnym rakiem żołądka [15].....	25
Rycina 2. Regulacja podjednostki HIF-1 α poprzez hydroksylację w zależności od poziomu tlenu. W podjednostce HIF-1 α znajdują się trzy miejsca	

	hydroksylacji: dwie reszty prolinowe w domenie ODDD (Pro402 i Pro564) oraz reszta asparaginylowa w domenie CTAD (Asn803). W obecności tlenu ulegają one hydroksylacji z udziałem enzymów z grupy PHDs oraz FIH (opis w tekście).....	30
Rycina 3.	Schemat reakcji hydroksylacji reszt prolinowych z udziałem enzymów z grupy hydroksylaz prolinowych.	34
Rycina 4.	Receptory białek rodziny VEGF oraz ich ligandy.	40
Rycina 5.	Poziom ekspresji mRNA genu <i>HIF-1α</i> w tkance nowotworowej, marginesie operacyjnym i kontroli. Na wykresie przedstawiono wartość średnią ± SEM; * - różnica w poziomie ekspresji mRNA <i>HIF-1α</i> w raku i marginesie operacyjnym (test Wilcoxon'a); ** - różnica w poziomie ekspresji mRNA pomiędzy rakiem a kontrolą (test Mann-Whitney'a).	62
Rycina 6.	Poziom ekspresji mRNA genu <i>EGLN1</i> w tkance nowotworowej, marginesie operacyjnym i kontroli. Na wykresie przedstawiono wartość średnią ± SEM; * - różnica w poziomie ekspresji mRNA <i>EGLN1</i> w raku i marginesie operacyjnym (test Wilcoxon'a); ** - różnica w poziomie ekspresji mRNA pomiędzy rakiem a kontrolą (test Mann-Whitney'a).	63
Rycina 7.	Poziom ekspresji mRNA genu <i>VHL</i> w tkance nowotworowej, marginesie operacyjnym i kontroli. Na wykresie przedstawiono wartość średnią ± SEM; * - różnica w poziomie ekspresji mRNA <i>VHL</i> w raku i marginesie operacyjnym (test Wilcoxon'a); ** - różnica w poziomie ekspresji mRNA pomiędzy rakiem a kontrolą (test Mann-Whitney'a).	64
Rycina 8.	Poziom ekspresji mRNA genu <i>VEGF</i> w tkance nowotworowej, marginesie operacyjnym i kontroli. Na wykresie przedstawiono wartość średnią ± SEM; * - różnica w poziomie ekspresji mRNA <i>VEGF</i> w raku i marginesie operacyjnym (test Wilcoxon'a); ** - różnica w poziomie ekspresji mRNA pomiędzy rakiem a kontrolą (test Mann-Whitney'a).	65
Rycina 9.	Poziom ekspresji mRNA genu <i>CXCR4</i> w tkance nowotworowej, marginesie operacyjnym i kontroli. Na wykresie przedstawiono wartość średnią ± SEM; * - różnica w poziomie ekspresji mRNA	

	<i>CXCR4</i> w raku i marginesie operacyjnym (test Wilcoxon'a); ** - różnica w poziomie ekspresji mRNA pomiędzy rakiem a kontrolą (test Mann-Whitney'a).	66
Rycina 10.	Porównanie poziomu ekspresji genów: <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> w guzach T1 z poziomem ekspresji w guzach T2, T3, T4. Na wykresie przedstawiono wartość średnią ± SEM; *p<0,05; test Mann-Whitney'a.....	69
Rycina 11.	Zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA analizowanych genów: <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> a wielkością guza nowotworowego (cecha T). Na wykresie przedstawiono wartość średnią ± SEM.	70
Rycina 12.	Porównanie poziomu ekspresji genów: <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> w guzach u pacjentów bez przerzutów do węzłów chłonnych (N0) z poziomem ekspresji w guzach N1, N2, N3. Na wykresie przedstawiono wartość średnią ± SEM; *p<0,05; test Mann-Whitney'a.....	71
Rycina 13.	Zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA analizowanych genów: <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> a stopniem zaawansowania węzłów chłonnych (cecha N). Na wykresie przedstawiono wartość średnią ± SEM.	72
Rycina 14.	Porównanie poziomu ekspresji mRNA analizowanych genów: <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> w guzach u pacjentów w stadium I zaawansowania klinicznego ze stadiami II i III. Na wykresie przedstawiono wartość średnią ± SEM; *p<0,05; test Mann-Whitney'a.....	73
Rycina 15.	Zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA genów <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworów. Na wykresie przedstawiono wartość średnią ± SEM.	74
Rycina 16.	Porównanie poziomu ekspresji mRNA analizowanych genów: <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> w guzach o stopniu złośliwości G1/G2 z guzami o stopniu złośliwości G3. Na wykresie przedstawiono wartość średnią ± SEM; # - test T-Studenta; * - test Mann-Whitney'a.....	75

Rycina 17. Porównanie poziomu ekspresji mRNA analizowanych genów: <i>HIF-1α</i> , <i>EGLN1</i> , <i>VHL</i> , <i>VEGF</i> , <i>CXCR4</i> w guzach pomiędzy typem jelitowym i rozlanym według klasyfikacji Laurena. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM; * - test Mann-Whitney'a.....	77
Rycina 18. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA genu <i>EGLN1</i> a poziomem ekspresji mRNA genu <i>VHL</i> w tkance nowotworowej raka żołądka; *-test korelacji Spearmana.....	79
Rycina 19. Wyniki badania immunohistochemicznego VEGF w tkance nowotworowej raka żołądka u wybranych chorych. Kolor brązowy oznacza reakcję pozytywną. Niski poziom ekspresji (+) VEGF (a1); średni poziom ekspresji (++) VEGF (a2); wysoki poziom ekspresji (+++) VEGF (a3).....	81
Rycina 20. Wyniki badania immunohistochemicznego CD34 w tkance nowotworowej raka żołądka u wybranych chorych. Kolor brązowy oznacza reakcję pozytywną. Niski poziom ekspresji (+) CD34 (b1); średni poziom ekspresji (++) CD34 (b2); wysoki poziom ekspresji (+++) CD34 (b3).	82
Rycina 21. Zależność pomiędzy poziomem ekspresji mRNA <i>VEGF</i> ocenionej za pomocą RT-PCR oraz ekspresją białka VEGF ocenioną za pomocą badania immunohistochemicznego. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM; * - test T-Studenta.....	86
Rycina 22. (A) Poziom ekspresji białka <i>EGLN1</i> w tkance nowotworowej raka żołądka i marginesie operacyjnym. Wyniki ekspresji białka <i>EGLN1</i> normalizowano względem białka β -aktyny i przedstawiano, jako względną gęstość optyczną. Na wykresie przedstawiono wartość średnią \pm SEM; * - test T-studenta dla zmiennych powiązanych. (B) Przykładowe zdjęcie analizy Western blott poziomu białka <i>EGLN1</i> w tkance nowotworowej raka żołądka i błonie śluzowej marginesu operacyjnego.....	87
Rycina 23. Korelacja pomiędzy poziomem ekspresji mRNA <i>EGLN1</i> ocenionej za pomocą RT-PCR oraz ekspresją białka <i>EGLN1</i> ocenioną za pomocą analizy Western blot; * - test korelacji Spearmana.	88
Rycina 24. Krzywa Kaplana-Meiera przeżycia pacjentów operowanych z powodu raka żołądka.....	89

Rycina 25. Porównanie przebiegu krzywych przeżycia Kaplan-Meiera w zależności od poziomu ekspresji mRNA genu <i>HIF-1α</i> w tkance nowotworowej raka żołądka; test log-rank.....	90
Rycina 26. Porównanie przebiegu krzywych przeżycia Kaplan-Meiera w zależności od poziomu ekspresji mRNA genu <i>EGLN1</i> w tkance nowotworowej raka żołądka; test log-rank.....	91
Rycina 27. Porównanie przebiegu krzywych przeżycia Kaplan-Meiera w zależności od poziomu ekspresji mRNA genu <i>VHL</i> w tkance nowotworowej raka żołądka; test log-rank.....	91
Rycina 28. Porównanie przebiegu krzywych przeżycia Kaplan-Meiera w zależności od poziomu ekspresji mRNA genu <i>VEGF</i> w tkance nowotworowej raka żołądka; test log-rank.....	92
Rycina 29. Porównanie przebiegu krzywych przeżycia Kaplan-Meiera w zależności od poziomu ekspresji mRNA genu <i>CXCR4</i> w tkance nowotworowej raka żołądka; test log-rank.....	92

