



**UNIwersytet Medyczny**  
**IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU**

Katedra Morfologii i Embriologii Człowieka

Zakład Histologii i Embriologii

PRACA DOKTORSKA

**Krzysztof Kurnol**

***„Ekspresja tesminy w raku żołądka”***

Promotor pracy: prof. dr hab. Piotr Dzięgiel

Wrocław 2023



*Składam podziękowania mojemu Promotorowi -*

*Panu Profesorowi Piotrowi Dzięgielowi*

*za nieocenioną pomoc przy pisaniu tej rozprawy.*

*Pracę dedykuję wszystkim osobom, które swoim*

*wsparciem przyczyniły się do jej powstania.*

**SPIS TREŚCI**

1. WYKAZ SKRÓTÓW.....	7
2. WSTĘP.....	9
2.1. Tesmina.....	9
2.1.1. Struktura i funkcje tesminy.....	9
2.1.2. Tesmina w patogenezie chorób człowieka.....	12
2.1.3. Tesmina a metalotioneiny.....	13
2.2. Rak żołądka.....	16
2.2.1. Etiologia raka żołądka.....	16
2.2.2. Aspekty patomorfologii raka żołądka.....	17
2.2.2.1. Budowa histologiczna.....	17
2.2.2.2. Zaburzenia molekularne w raku żołądka.....	19
2.2.2.3 Budowa makroskopowa oraz drogi szerzenia się nowotworu.....	20
2.2.3 Aspekty kliniczne raka żołądka.....	20
2.2.3.1 Objawy kliniczne raka żołądka.....	20
2.2.3.2 Diagnostyka raka żołądka.....	21
2.2.3.3 Klasyfikacja TNM oraz stopnie zaawansowania raka żołądka.....	23
2.2.3.4 Leczenie chirurgiczne raka żołądka.....	26
2.2.3.5 Leczenie skojarzone raka żołądka.....	31
2.2.3.6 Leczenie paliatywne raka żołądka.....	32

3. CELE PRACY.....	33
4. MATERIAŁ I METODY.....	35
4.1 Materiał.....	35
4.1.1 Grupa badana i kontrolna.....	35
4.2 Metody.....	38
4.2.1 Mikromacierze tkankowe.....	38
4.2.2 Reakcje immunohistochemiczne (IHC).....	38
4.2.3 Ocena nasilenia reakcji immunohistochemicznych.....	40
4.2.4 Metoda real-time PCR.....	41
4.2.4.1 Izolacja całkowitego RNA.....	41
4.2.4.2 Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	42
4.2.4.3 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym.....	43
4.3 Analiza statystyczna.....	43
5. WYNIKI.....	45
5.1 Real - time PCR oraz reakcje IHC.....	45
5.2 Poziom ekspresji mRNA <i>MTL5</i> oraz nasilenie ekspresji IHC tesminy i Ki-67.....	48
5.3 Analiza badanych markerów względem stopnia złośliwości histologicznej.....	51
5.4 Analiza badanych markerów względem stopnia zaawansowania nowotworu.....	54
5.4.1 Analiza badanych markerów względem statusu T.....	54
5.4.2 Analiza badanych markerów względem statusu N.....	56

5.4.3 Analiza badanych markerów względem statusu M.....	57
5.5 Analiza badanych markerów względem typu nowotworu wg klasyfikacji Laurena.....	59
5.6 Analiza badanych markerów względem płci pacjentów.....	61
5.7 Analiza badanych markerów względem przeżyć odległych pacjentów.....	62
5.8 Korelacje ekspresji mRNA <i>MTL5</i> oraz ekspresji IHC tesminy i Ki-67 w grupie badanej.....	64
5.9 Korelacje ekspresji mRNA <i>MTL5</i> oraz ekspresji IHC tesminy i Ki-67 ze stężeniem markerów nowotworowych Ca 19-9 oraz CEA w surowicy.....	66
5.10 Korelacje ekspresji mRNA <i>MTL5</i> oraz ekspresji IHC tesminy i Ki-67 z wiekiem pacjentów.....	67
6. DYSKUSJA.....	68
7. WNIOSKI.....	74
8. STRESZCZENIE.....	75
9. SUMMARY.....	78
10. PIŚMIENNICTWO.....	80

## 1. WYKAZ SKRÓTÓW

AJCC – ang. American Joint Committee on Cancer, Amerykański Wspólny Komitet do Spraw Raka

CEA – ang. carcinoembryonic antigen, antygen rakowo-płodowy

CIN – ang. chromosome instability, niestabilność chromosomalna

CXC – ang. CXC domain, domena zawierające sekwencje cysteinowe

EBV – ang. Epstein Barr virus, wirus Epsteina Barra

EMR – ang. endoscopic mucosal resection, endoskopowa resekcja błony śluzowej

ESD – ang. endoscopic submucosal dissection, endoskopową dysekcję podśluzówkową

FAP - ang. familial adenomatous polyposis, rodzinna polipowatość gruczolakowata

GS – ang. genomically stable, stabilny genomowo

HER2 – ang. human epidermal growth factor receptor 2, receptor ludzkiego, naskórkowego czynnika wzrostu

HIV – ang. human immunodeficiency virus, ludzki wirus niedoboru odporności

IHC – immunohistochemia

kDa - kilodaltony

MCM – ang. minichromosome maintenance, białka licencjonujące replikację

MSI – ang. microsatellite instability, niestabilność mikrosatelitarna

mRNA – ang. messenger RNA, matrycowy kwas rybonukleinowy

MTs – ang. metallothioneins, białka z rodziny metalotionein

## 1. WYKAZ SKRÓTÓW

---

MTL5 - ang. metallothionein like protein 5, białko podobne do metalotionein, tesmina

nm - nanometr

PCR - ang. polymerase chain reaction, reakcja łańcuchowa polimerazy

PET – ang. positron emission tomography, pozytonowa tomografia emisyjna

RNA - ang. ribonuclein acid, kwas rybonukleinowy

RT-PCR – ang. real time polymerase chain reaction, reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

TMA – ang. tissue microarrays, mikromacierze tkankowe

UICC – ang. Union for International Cancer Control, Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem

USA – ang. United States of America, Stany Zjednoczone Ameryki

WHO – ang. World Health Organization, Światowa Organizacja Zdrowia



## 2. WSTĘP

### 2.1 Tesmina

Tesmina (ang. testis specific metallothionein like protein, białko podobne do metalotionein, swoiste dla jąder), zwane też MTL5 (ang. metallothionein like protein 5, białko podobne do metalotionein 5) lub ang. CXC domain containing 2 (domena zawierająca sekwencje cysteinowe), jest białkiem posiadającym w swojej budowie domeny bogate w cysteinę. Ta określona cecha budowy upodabnia tesminę funkcjonalnie do białek z rodziny metalotionein, jednak obecność istotnych różnic w strukturze molekularnej nie pozwala na zakwalifikowanie jej do tej grupy [1].

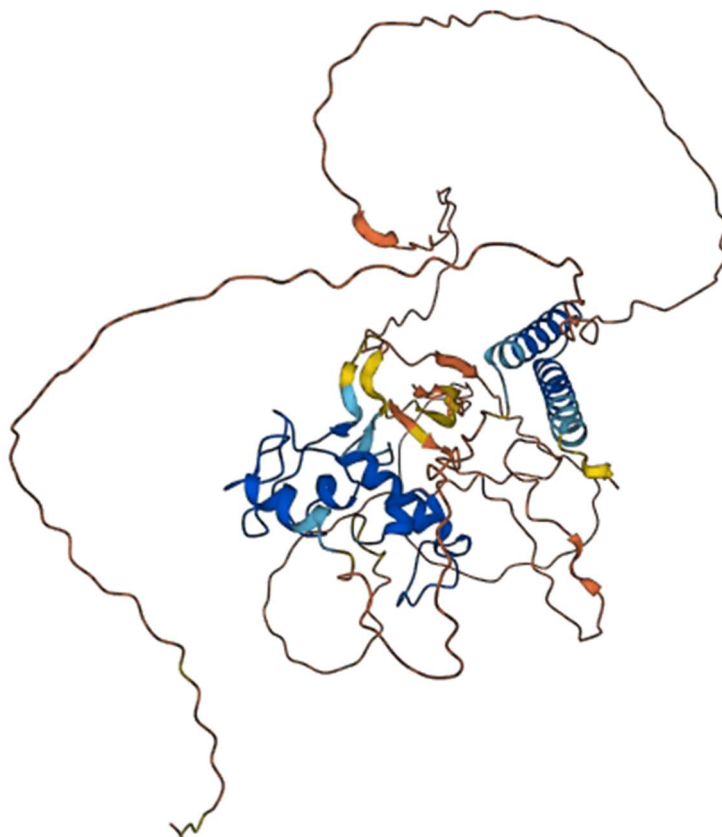
#### 2.1.1 Struktura i funkcje tesminy

Tesmina została pierwotnie opisana w 1999 roku jako białko, którego ekspresję stwierdzono w tkance jąder myszy w ósmym dniu rozwoju postnatalnego, a jej pojawienie się było związane z wejściem komórek germinalnych w proces mejozy [2]. Jednocześnie w innych tkankach, poza jądrem, nie stwierdzono ekspresji tesminy [2]. Późniejsze badania potwierdziły ekspresję tesminy w I profazie mejozy, zarówno w męskich jak i żeńskich komórkach germinalnych myszy, jednak u obu płci występowały różnice co do poziomu ekspresji i jej występowania w konkretnym stadium profazy [3]. Inną istotną obserwacją jest dynamicznie zmieniająca się lokalizacja ekspresji tesminy – przed wejściem w proces mejozy opisywane białko występuje głównie w cytoplazmie spermatocytów i przemieszcza się do jądra komórkowego, tuż przed fazą podziału mejotycznego. Proces translokacji tesminy sugeruje jej istotną rolę

w regulacji spermatogenezy. Dodatkowo, narażanie komórek na stres związany z ekspozycją na metale ciężkie, powodował przedwczesną translokację tesminy do jądra komórkowego, co poprzedzało proces apoptozy spermatocytów [1, 4]. Zbliżone zjawisko zostało opisane w organizmie szczurów - podawanie zwierzętom roztworu cynku powodowało wzrost ekspresji tesminy w cytoplazmie i jądrze komórkowym spermatocytów [5]. Również, stymulacja *in vitro* linii komórkowej fibroblastów uzyskanych z nerki małpy afrykańskiej, roztworami kadmu i cynku, powodowała pojawienie się jądrowej ekspresji tesminy [4]. Powyższe doniesienia sugerują, że wystąpienie tesminy na terenie jądra komórkowego jest związane z odpowiedzią komórkową na stres związany z obecnością metali ciężkich. Późniejsze badania pozwoliły na potwierdzenie ekspresji genu *MTL5* wraz z obecnością ekspresji mRNA (ang. messenger RNA, matrycowy kwas rybonukleinowy) w organizmie myszy, w tkankach m. in. mózgu, serca, wątroby czy nerek, jednocześnie wykazując, że występowanie tesminy nie jest ograniczone wyłącznie do komórek germinalnych [6]. Poza aktywnością związaną z procesami mejotycznymi, tesmina prawdopodobnie funkcjonuje również jako koaktywator dla jądrowego receptora mineralokortykosteroidów - czynnika transkrypcyjnego zależnego od obecności aldosteronu i deoksykortykosteronu [6]. Ekspresja tesminy, która pośrednio wzmacniałaby biologiczny wpływ aldosteronu aktywującego geny efektorowe poprzez proces łączenia się ze swoim receptorem, może mieć wpływ na znacznie szerszą grupę procesów zachodzących w organizmie [6].

Tesmina jest białkiem występującym u organizmów eukariotycznych i jest kodowana przez gen *MTL5* składający się z dziewięciu egzonów, zlokalizowany u człowieka w loci 11q13.3. Zbudowana z 508 aminokwasów, sumarycznie składających się na wagę około 55 kDa, tesmina posiada w swojej budowie dwie domeny zawierające trzy kopie sekwencji cysteina-X-cysteina (ang. CXC domain) zlokalizowane pomiędzy aminokwasami 305-331 oraz 365-406 (Rycina 1). Sekwencje cysteinowe, poprzez posiadane reszty sulfhydrylowe,

pozwalają tesminie na przyłączanie się i interakcję z DNA komórki jak również wiązanie metali ciężkich. Poprzez proces alternatywnego składania istnieje możliwość powstania dwóch odmiennych izoform tesminy o krótszym C końcu (długości 306 aminokwasów o masie 32,3 kDa oraz długości 251 aminokwasów o masie 26,73 kDa), dotychczas jednak nie zostały opisane żadne ich odmienne funkcje w stosunku do podstawowej izoformy [7].



**Rycina 1.** Model trzeciorzędowej struktury tesminy [8].

### 2.1.2 Tesmina w patogenezie chorób człowieka

Dotychczasowa baza wiedzy na temat potencjalnej roli tesminy w patogenezie chorób człowieka jest relatywnie uboga. Pomijając procesy chorobowe, ekspresja tesminy poza gonadami w organizmie człowieka występuje śladowo. Najlepiej przebadane jest jej znaczenie w niedrobnokomórkowym raku płuc [9]. W badaniu obejmującym 243 przypadki chorych z rozpoznanym niedrobnokomórkowym rakiem płuc oraz 104 przypadki niezmięnionej chorobowo tkanki płuca, wykazano podwyższoną ekspresję tesminy u chorych z rakiem w stosunku do grupy kontrolnej. Ekspresja tesminy również dodatnio korelowała z ekspresją markera proliferacyjnego Ki-67. Dodatkowo, wykazano pozytywną korelację pomiędzy jej jądrową ekspresją oraz ekspresją białek z rodziny MCM (ang. minichromosome maintenance proteins, białka licencjonujące replikację), dokładniej MCM-5 i MCM-7, które odgrywają istotną rolę w procesach cyklu komórkowego poprzez wzmacnianie procesów replikacji DNA i proliferacji komórek. W opisywanym badaniu, cytoplazmatyczna ekspresja tesmina okazała się być negatywnym markerem prognostycznym dla niedrobnokomórkowego raka płuc [9]. W literaturze obecne są również opisy stanów patologicznych związanych ze zjawiskiem polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (ang. SNP – single nucleotide polymorphism) chromosomu 11q, na którym zlokalizowany jest gen *MTL5*. W przypadku pojawienia się mutacji dochodzi do powstania wariantów białka o budowie różniącej się w stosunku do prawidłowej pojedynczym aminokwasem. Pojawienie się tych nieprawidłowych wariantów w przypadku tesminy jest związane z większym ryzykiem wystąpienia m.in. przewlekłej obturacyjnej choroby płuc czy osteoporozy [10, 11]. Ponadto, wystąpienie określonego allelu genu *MTL5* u matki może się wiązać ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia ostrej białaczki limfatycznej u potomstwa, natomiast obecność innego allelu opisywanego genu wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka stercza. U pacjentów z potwierdzoną mutacją i obecnością odmiennego wariantu genu *MTL5*

opisano zmniejszoną ekspresję mRNA *MTL5* zarówno w komórkach nowotworowych jak i komórkach niezmiętej nowotworowo tkanki stercza [12, 13]. Istnieją również doniesienia na temat spadku ekspresji mRNA niektórych genów, w tym *MTL5*, w linii komórkowej astrocytów, których hodowla odbywała się z zewnątrzkomórkowym białkiem R ludzkiego wirusa HIV-1 (ang. human immunodeficiency virus type 1, wirus nabytego niedoboru odporności) po narażeniu komórek na stres oksydacyjny. Zjawisko to mogłoby wpływać na zmniejszoną proliferację astrocytów związaną z zakażeniem wirusem HIV-1 i powodować zaburzenia funkcji neuronów centralnego układu nerwowego, prowadząc do zespołu otępiennego znanego jako encefalopatia zespołu nabytego niedoboru odporności [14].

### 2.1.3 Tesmina a metalotioneiny

Obecność reszt cysteinowych w budowie tesminy warunkuje czynnościowe podobieństwo do białek z rodziny metalotionein (MTs), jednak szereg istotnych różnic nie pozwala na zakwalifikowanie jej do tej grupy (Tabela 1). Będąc białkami niemal dziesięciokrotnie lżejszymi od tesminy, MTs stanowią szeroką grupę białek występujących zarówno w organizmach prokariotycznych jak i eukariotycznych, odpowiadających głównie za homeostazę stężenia metali ciężkich w organizmie poprzez tworzenie z nimi nieaktywnych kompleksów. W związku z powyższą cechą MTs, mają m. in. wpływ na procesy związane z cyklem komórkowym, indukcję apoptozy i chronią komórkę przed stresem oksydacyjnym [15, 16, 17]. Reszty cysteinowe wykazujące właściwości antyoksydacyjne umożliwiają ochronę komórki przed reaktywnymi formami tlenu [18]. W związku z opisywanymi właściwościami, postuluje się udział MTs w procesach neurodegeneracyjnych, zapalnych oraz kancerogenezy. Na podstawie różnic w ich budowie, dotychczas zostały opisane cztery izoformy MTs I-IV [19]. Większość wiedzy na temat właściwości MTs pochodzi z badań

nad izoformami I i II, pierwotnie odkrytymi w korze nerki konia w 1957 roku jako białka posiadające zdolność do wiązania kadmu. Dotychczas ich obecność została potwierdzona niemal we wszystkich tkankach i narządach człowieka [19]. W odróżnieniu od tesminy, MTs nie zawierają w swojej budowie aminokwasów aromatycznych, a *locus* ich genu znajduje się na odmiennym chromosomie (16q13) [20].

Istnieją liczne doniesienia na temat potencjalnej roli MTs w procesie kancerogenezy u człowieka, związane z ich wzmożoną ekspresją w różnych typach nowotworów złośliwych w stosunku do prawidłowych komórek. Wzmożona ekspresja MTs została potwierdzona m. in. w nowotworach sutka, płuc, nerki, pęcherza moczowego czy skóry [21, 22]. Wpływ MTs na proces kancerogenezy oraz wzrostu guza może się odbywać przez regulację procesów replikacji oraz różnicowania komórek. Będąc rezerwuarem jonów cynku, MTs regulują syntezę kwasów nukleinowych i białek zaangażowanych w procesy podziału komórki. Przemieszczenie się MTs z cytoplazmy na teren jądra komórkowego, w fazie syntezy DNA, potwierdzałoby powyższą tezę [22]. MTs są również uważane za modulator białka p53, które funkcjonuje jako czynnik transkrypcyjny, będący supresorem nowotworowym, posiadającym właściwość aktywacji procesów ochrony DNA komórki lub indukcji apoptozy w przypadku wystąpienia stresu komórkowego. Mutacje białka p53, jako białka supresorowego, występują w licznych nowotworach. Protekcyjne właściwości białka p53, polegające na tworzeniu ochronnych wiązań pomiędzy funkcjonalnymi domenami tego białka zawierającymi jony cynku i DNA komórki, są ograniczone przez zmniejszenie ilości dostępnych jonów cynku w przypadku wzrostu ekspresji MTs [23]. Innym istotnym zagadnieniem jest wpływ MTs na zwiększenie oporność komórek nowotworowych na radioterapię i chemioterapię, prawdopodobnie poprzez ich antyoksydacyjne właściwości [24]. Istnieją również doniesienia na temat poszczególnych nowotworów, w których ekspresja MTs jest zmniejszona w stosunku do prawidłowych komórek, co wskazuje na fakt, że rola białek z rodziny MT jest w procesach

nowotworzenia niejednoznaczna i może zależeć od różnych czynników. Do tych nowotworów zalicza się m.in. rak wątrobowokomórkowy, rak żołądka czy nowotwory złośliwe tarczycy [24, 25, 26].

**Tabela 1.** Różnice pomiędzy tesminą oraz MTs.

<b>Cecha</b>	<b>Tesmina</b>	<b>MTs</b>
Locus genu	11q13	16q13
Ilość znanych izoform	I-III	I-IV
Masa cząsteczkowa	55 kDa	6-7 kDa
Aminokwasy aromatyczne	obecne	nieobecne
Liczba egzonów	9	3

### 2.2 Rak żołądka

Rak żołądka to nowotwór złośliwy wywodzący się z tkanki nabłonkowej i jest najczęstszym typem histologicznym wśród wszystkich nowotworów złośliwych żołądka (ponad 95%). Wśród pozostałych typów nowotworów należy wymienić chłoniaki, guzy neuroendokrynne czy nowotwory podścieliskowe [27]. Uwzględniając dane statystyczne WHO (ang. World Health Organization, Światowa Organizacja Zdrowia) z 2022 roku, rak żołądka jest globalnie piątym, najczęstszym nowotworem biorąc pod uwagę zapadalność oraz czwartą, najczęstszą przyczyną zgonów z powodu chorób nowotworowych [28]. Rak żołądka jest chorobą częściej występującą w krajach niskorozwiniętych (z wyjątkiem takich krajów wysokorozwiniętych jak Japonia i Korea Południowa, gdzie częstość występowania raka żołądka pozostaje duża). W Polsce obserwuje się wieloletnią, malejącą tendencję zachorowalności i umieralności, obecnie notuje się około 5500 nowych zachorowań oraz 5000 zgonów rocznie. Rak żołądka występuje dwukrotnie częściej wśród mężczyzn, liczba zachorowań i zgonów rośnie z wiekiem, a szczyt występowania tej choroby występuje po 70 roku życia [29].

#### 2.2.1 Etiologia raka żołądka

Rak żołądka jest chorobą wieloczynnikową, przy czym jej etiologia nie jest całkowicie poznana. Za pojedynczy, najsilniejszy czynnik ryzyka jej rozwoju, jest uważane przewlekłe zakażenie bakterią *Helicobacter pylori*, jednak tylko u 1-2% osób ze stwierdzonym zakażeniem rozwinię się nowotwór [27]. Wśród innych czynników ryzyka rozwoju raka żołądka wymienia się nieodpowiednią dietę obejmującą spożywanie solonych i wędzonych pokarmów, czerwonego mięsa, małą aktywność fizyczną, picie alkoholu, palenie tytoniu oraz zakażenie



EPV (wirus Epsteina-Barra) [30]. Na uwagę zasługują również genetyczne czynniki ryzyka – uważa się, że nawet do 10% przypadków raka żołądka może występować w przebiegu różnych zespołów genetycznych takich jak m. in. rodzinna polipowatość gruczolakowata (ang. familial adenomatous polyposis, FAP), zespół Li-Fraumeni czy zespół Lyncha [27]. Ocenia się, że 3% wszystkich przypadków raka jest związanych z zespołem dziedzicznego, rozlanego raka żołądka (ang. hereditary diffuse gastric cancer), który spowodowany jest mutacją genu *CDH1* kodującego e-kadcherynę, białka funkcjonującego jako supresor nowotworów pochodzenia nabłonkowego. E-kadheryna poprzez wzmacnianie adhezji komórkowej zapobiega nadmiernemu podziałowi, inwazji oraz wzrostowi komórek [31, 32]. Do stanów przednowotworowych zalicza się zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka, stan po częściowej resekcji żołądka z przyczyn innych niż nowotworowe oraz obecność polipów gruczolakowatych [27]. Jako profilaktykę zaleca się unikanie spożywania solonych i wędzonych pokarmów, eradykację zakażenia *H. pylori*, unikanie palenia tytoniu i picia alkoholu oraz aktywność fizyczną [30].

### 2.2.2 Aspekty patomorfologii raka żołądka

#### 2.2.2.1. Budowa histologiczna

Histologicznie nowotwory nabłonkowe żołądka dzieli się na [33]:

- raka gruczolowego (adenocarcinoma),
  - brodawkowatego raka gruczolowego (ang. papillary adenocarcinoma),
  - cewkowego raka gruczolowego (ang. tubular adenocarcinoma),
  - śluzowego raka gruczolowego (ang. mucinous adenocarcinoma),
  - raka o słabej kohezji / ang. poorly cohesive carcinoma (signet ring carcinoma),

- mieszanego raka gruczołowego (ang. mixed adenocarcinoma),
- raka gruczołowo-płaskonabłonkowego (ang. adenosquamous carcinoma),
- raka z limfoidnym podścieliskiem / rdzeniastego (ang. carcinoma with lymphoid stroma / medullary),
- raka gruczołowego hepatoidalnego (ang. hepatoid adenocarcinoma),
- raka płaskonabłonkowego (ang. squamous cell carcinoma),
- raka neuroendokrynnego o wysokiej złośliwości (ang. high grade neuroendocrine carcinoma),
- raka niezróżnicowanego (ang. undifferentiated carcinoma).

Ocena stopnia złośliwości histologicznej wg. klasyfikacji WHO (ang. World Health Organization, Światowa Organizacja Zdrowia) z 2010 r. jest dokonywana dla raków gruczołowych cewkowych oraz brodawkowatych i zakłada podział na [33]:

- wysoko dojrzały G1 (dojrzałe struktury gruczołowe stanowią ponad 95% utkania raka),
- średnio dojrzały G2 (dojrzałe struktury gruczołowe stanowią od 95 % do 50% utkania),
- nisko dojrzały G3 (dojrzałe struktury gruczołowe stanowią poniżej 50% utkania).

Raki śluzowokomórkowe są wyjściowo kwalifikowane jako G3.

Istnieje kilka różnych klasyfikacji raka żołądka opisujących różnice w budowie morfologicznej m.in. Laurena, Goseka, Carniero czy Minga. Najbardziej powszechną z nich jest klasyfikacja Laurena, która bierze pod uwagę architekturę i aspekty cytologiczne zakładająca podział na [34]:

- typ jelitowy (I) – cechuje się egzofitycznym wzrostem z powstaniem owrzodzenia, występuje częściej u ludzi starszych, ma związek z czynnikami środowiskowymi,
- typ rozlany (II) – cechuje się naciekającym wzrostem, występuje częściej u ludzi młodych,
- typ mieszany (III).

### 2.2.2.2 Zaburzenia molekularne w raku żołądka

W wyniku zastosowania badań metodami molekularnymi, w raku żołądka udało się określić szereg nieprawidłowości na poziomie DNA i RNA. Za najbardziej kompleksowy system klasyfikacji zaburzeń molekularnych w raku żołądka uważa się The Cancer Genome Atlas określający poniższe podtypy [35]:

- związany z niestabilnością chromosomalną (CIN – chromosome instability, około 50 % przypadków) – podtyp związany z mutacją genu kodującego białko p53 oraz aktywacją kinaz tyrozynowych,
- związany z niestabilnością mikrosatelitarną (MSI – microsatellite instability, około 22% przypadków – podtyp związanych z wyciszeniem genu *MLH1* warunkującego uszkodzenie systemu naprawy nieprawidłowo sparowanych zasad,
- związany z zakażeniem wirusem EBV (EBV – Epstein-Barr virus, około 9% przypadków) – podtyp związany z hipermetylacją wysp CpG oraz ekspresją białek odpowiedzialnych za odpowiedź immunologiczną,
- związany ze stabilnym genomem (GS – genomically stable, około 20% przypadków) – podtyp związany z nieprawidłową ekspresją genów *CDH1*, *RHOA* biorących udział w adhezji międzykomórkowej oraz szlakach angiogenezy.

### 2.2.2.3 Budowa makroskopowa oraz drogi szerzenia się nowotworu

Ze względu na rozbieżności w morfologii raka żołądka, do oceny makroskopowej stosuje

się klasyfikację Bormanna zakładającą podział na [36]:

- typ 0 (postać wczesna, naciek nie przekracza błony podśluzowej),
- typ 1 (postać polipowata),
- typ 2 (postać grzybiasta),
- typ 3 (postać owrzodziała),
- typ 4 (postać rozlana).

Komórki raka żołądka mogą się rozprzestrzeniać drogą naczyń krwionośnych dając w pierwszej kolejności przerzuty do wątroby lub otrzewnej, spotyka się również przerzuty odległe do określonych lokalizacji, takich jak jajnik (guz Krukenberga) czy w okolicę pępka (guz siostry Mary Joseph). W razie przerzutów drogą naczyń chłonnych obserwuje się inwazję okolicznych węzłów chłonnych. Z uwagi na złożoną budowę splotu chłonnego dla żołądka stopień oraz kolejność ich zajęcia cechuje się znaczną różnorodnością. Opisywany nowotwór szerzy się również przez ciągłość zajmując sąsiadujące tkanki i narządy [27].

### 2.2.3 Aspekty kliniczne raka żołądka

#### 2.2.3.1 Objawy kliniczne raka żołądka

Objawy raka żołądka są niespecyficzne a ich nasilenie jest zależne od zaawansowania choroby. Najczęstszym objawem wczesnego raka jest ból zlokalizowany w nadbrzuszu, w razie postępowania procesu chorobowego pojawiają się objawy dyspeptyczne, anemizacja

spowodowana krwawieniem do światła przewodu pokarmowego, brak apetytu, uczucie pełności po posiłku czy utrata masy ciała [27]. W przypadku zaawansowanego procesu nowotworowego do obrazu klinicznego dołączają się również objawy wodobrzusza, utrata masy ciała, wysokiej niedrożności przewodu pokarmowego, a w przypadku zagrażających życiu powikłań związanych z perforacją ściany żołądka lub masywnym krwawieniem, objawy są właściwe dla tych stanów [27, 37].

### **2.2.3.2 Diagnostyka raka żołądka**

Badanie endoskopowe górnego odcinka przewodu pokarmowego z biopsją zmiany jest postępowaniem z wyboru w diagnostyce raka żołądka [27]. Badanie endoskopowe umożliwia opisanie lokalizacji zmiany i zakresu nacieku z uwzględnieniem zajęcia wpustu i odźwiernika. Ze względu na ryzyko pominięcia zmiany zaleca się odpowiedni czas badania endoskopowego wynoszący powyżej 7 minut. W przypadku uwidocznienia guza należy pobrać materiał do badania histopatologicznego (optymalnie 6-8 wycinków) [38].

Ultrasonografia jamy brzusznej dostarcza najczęściej niespecyficznych informacji, natomiast ultrasonografia endoskopowa (ang. endoscopic ultrasound, EUS) poprzez wizualizację warstw ściany żołądka, umożliwia różnicowanie pomiędzy rakiem wczesnym a guzami naciekającymi warstwę mięśniową. Dodatkowo, ta metoda diagnostyczna pozwala na ocenę regionalnych węzłów chłonnych pod kątem zajęcia przez proces nowotworowy oraz określenie możliwości przeprowadzenia endoskopowej resekcji [39].

Tomografia komputerowa jest badaniem dedykowanym do radiologicznej diagnostyki i oceny stopnia zaawansowania raka żołądka. Metoda ta zwykle umożliwia uwidocznienie nacieku na błonę surowiczą żołądka, nacieku na okoliczne tkanki, jak również obecność odległych przerzutów czy zajęcia węzłów chłonnych. Tomografia rezonansu magnetycznego

umożliwia dokładniejszą ocenę guza pierwotnego, natomiast nie daje dodatkowej korzyści w ocenie stopnia zajęcia węzłów chłonnych [40, 41]. Pozytonowa tomografia emisyjna (ang. positron emission tomography, PET) umożliwia obrazowanie aktywności metabolicznej tkanek. Ze względu na niską aktywność metaboliczną tego nowotworu, ocena guza pierwotnego

w badaniu PET jest niepełna, dostarczane są natomiast informacje na temat przerzutów do odległych narządów oraz pozaregionalnych węzłów chłonnych [40]. W przypadkach trudnych diagnostycznie, gdzie zachodzą trudności w dokładnej ocenie zaawansowania choroby lub brak jest potwierdzenia histopatologicznego można wykonać zabieg diagnostycznej laparotomii lub laparoskopii zwiadowczej, w trakcie której istnieje możliwość oceny jamy otrzewnej oraz znajdujących się w niej narządów wraz z pobraniem materiału do badania histopatologicznego lub cytologicznego [42].

Wśród badań laboratoryjnych przydatnych w diagnostyce raka żołądka, należy wymienić oznaczenie stężenia markerów nowotworowych Ca 19-9 oraz CEA (ang. carcinoembryonic antygen, antygen rakowo-płodowy), jednak dotychczas nie znaleziono markera nowotworowego swoistego dla raka żołądka [43]. Do innych pomocniczych parametrów laboratoryjnych pozwalających zaplanować odpowiednio proces terapeutyczny, można zaliczyć stężenie hemoglobiny, parametrów stanu zapalnego czy stopnia odżywienia pacjenta [27].

### 2.2.3.3 Klasyfikacja TNM oraz stopnie zaawansowania raka żołądka

W celu określenia zaawansowania raka żołądka stosowany jest system TNM używany w klasyfikacjach AJCC (ang. American Joint Committee on Cancer, Amerykański Wspólny Komitet do Spraw Raka) oraz UICC (ang. Union for International Cancer Control, Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem). System TNM opiera się na składowych: T - wielkość guza pierwotnego, N - braku lub obecności przerzutów do węzłów chłonnych, M - braku lub obecności przerzutów odległych [44]. Definicje kategorii T, N, M dla raka żołądka według AJCC przedstawiają się następująco:

#### **Guz pierwotny (cecha T):**

Tx – nie można ocenić guza pierwotnego,

T0 – nie stwierdza się guza pierwotnego,

Tis – rak nienaciekający (*in situ*): nowotwór śródnabłonkowy nienaciekający blaszki właściwej błony śluzowej,

T1 – guz nacieka blaszkę właściwą, blaszkę mięśniową błony śluzowej lub warstwę podśluzową,

T1a – guz nacieka blaszkę właściwą lub blaszkę mięśniową błony śluzowej,

T1b – guz nacieka błonę podśluzową,

T2 – guz nacieka błonę mięśniową,

T3 – guz nacieka tkankę łączną znajdującą się pod warstwą surowiczą, ale nie nacieka otrzewnej trzewnej ani otaczających struktur,

T4 – guz nacieka otrzewną trzewną lub sąsiadujące struktury,

T4a – guz nacieka otrzewną ścienną,

T4b – guz nacieka sąsiadujące struktury.

**Regionalne węzły chłonne (cecha N):**

Nx – nie można ocenić regionalnych węzłów chłonnych,

N0 – nie stwierdza się przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych,

N1 – obecne są przerzuty w 1-2 regionalnych węzłach chłonnych,

N2 - obecne są przerzuty w 3-6 regionalnych węzłach chłonnych,

N3 - obecne są przerzuty w  $\geq 7$  regionalnych węzłach chłonnych,

N3a - obecne są przerzuty w 7-15 regionalnych węzłach chłonnych,

N3b - obecne są przerzuty w  $\geq 16$  regionalnych węzłach chłonnych.

**Przerzuty odległe (cecha M):**

Mx – nie można ocenić przerzutów odległych,

M0 – nie stwierdza się przerzutów odległych,

M1 – stwierdza się przerzuty odległe.

Stopnie zaawansowanie dla raka żołądka zostały przedstawione poniżej (Tabela 2).



**Tabela 2.** Stopnie zaawansowania dla raka żołądka wg AJCC [44].

<b>Stopień</b>	<b>Cecha T</b>	<b>Cecha N</b>	<b>Cecha M</b>
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	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

### 2.2.3.4 Leczenie chirurgiczne raka żołądka

Leczenie chirurgiczne pozostaje podstawą terapii raka żołądka, jednak jego zakres zależy od lokalizacji oraz zaawansowania procesu chorobowego.

W przypadku rozpoznania w badaniu gastroskopowym postaci wczesnego raka żołądka w stopniu zaawansowania IA, pacjent może zostać zakwalifikowany do endoskopowego usunięcia zmiany. Stosuje się dwie techniki: endoskopową resekcję błony śluzowej (ang. endoscopic mucosal resection, EMR) polegająca na podaniu poniżej warstwy błony śluzowej żołądka roztworu ułatwiającego usunięcie zmiany za pomocą pętli diatermicznej oraz endoskopową dysekcję podśluzówkową (ang. endoscopic submucosal dissection, ESD) w trakcie której odcina się zmianę nowotworową wraz z błoną śluzową i podśluzową, docierając do błony mięśniowej. Ze względu na większą radykalność, technika ESD znajduje większe zastosowanie w endoskopowych zabiegach usuwania wczesnego raka żołądka [45]. Mimo oczywistych korzyści obejmujących uniknięcie stresu i urazu okołoperacyjnego, pacjent decydujący się na endoskopowe metody leczenia musi być świadomy konieczności nadzoru endoskopowego i możliwych, kolejnych interwencji chirurgicznych zależnych w pierwszej kolejności od uzyskanego marginesu resekcji [46].

Dla pacjentów z rakiem żołądka w stopniu IB-III, z dystalną lub środkową lokalizacją zmiany, dopuszcza się wykonanie subtotalnej resekcji żołądka polegającej w praktyce na usunięciu 4/5 narządu, dopuszczalny margines zdrowej tkanki w tego typu zabiegach wynosi 5 cm. Subtotalna resekcja żołądka jest związana z mniejszą liczbą powikłań oraz wyższą jakością życia w stosunku do zabiegu całkowitego usunięcia żołądka [47]. W przypadku wieloogniskowości raka, braku możliwości uzyskania odpowiedniego marginesu histopatologicznego czy obecności typu rozlanego wg klasyfikacji Laurena, zachodzi konieczność wykonania całkowitej gastrektomii [48]. W razie naciekania raka na sąsiadujące narządy wskazane jest resekcja *en bloc* żołądka wraz z narządami objętymi naciekiem.

W związku z rozwojem technik małoinwazyjnych, zabiegi metodą laparoskopową oraz zabiegi z zastosowaniem technik chirurgii robotowej są coraz powszechniejsze i według najnowszych analiz, prowadzonych głównie przez badaczy w krajach azjatyckich, wyniki leczenia są porównywalne jak w chirurgii opartej na laparotomii, z zastrzeżeniem wykonywania tego typu zabiegów przez doświadczonego operatora [49]. Po przeprowadzeniu zabiegów resekcyjnych zachodzi konieczność odtworzenia ciągłości przewodu pokarmowego: w przypadku całkowitej gastrektomii najczęściej wykonuje się zespolenia z wyizolowaną pętlą Roux-en-Y lub zastosowaniem wstawki jelitowej, w przypadku subtotalnych resekcji istnieje możliwość połączenia żołądka z dwunastnicą (metoda Rydygiera / Billroth I), pętlą jelita czczego (Billroth II) lub zespolenie typu Roux-en-Y [27].

Istotnym elementem leczenia radykalnego jest właściwa limfadenektomia, która pozwala na ustalenie stopnia zaawansowania nowotworu. Tabela 3 przedstawia klasyfikację poszczególnych grup węzłów chłonnych żołądka [27].

**Tabela 3.** Klasyfikacja poszczególnych grup węzłów chłonnych w raku żołądka

<b>Nr stacji</b>	<b>Lokalizacja stacji węzłów chłonnych w raku żołądka</b>
1	Węzły okołopustowe prawe
2	Węzły okołopustowe lewe
3a	Węzły krzywizny mniejszej położone wzdłuż gałęzi tętnicy żołądkowej lewej
3b	Węzły krzywizny mniejszej położone wzdłuż dystalnej części tętnicy żołądkowej prawej i jej odgałęzień
4sa	Węzły krzywizny większej położone wzdłuż naczyń żołądkowych krótkich
4sb	Węzły krzywizny większej położone wzdłuż lewej tętnicy żołądkowo-sieciowej
4d	Węzły położone wzdłuż naczyń żołądkowo-sieciowych prawych
5	Węzły nadodźwienikowe wzdłuż proksymalnej części tętnicy żołądkowo-sieciowej prawej i jej odgałęzień
6	Węzły pozaodźwienikowe wzdłuż pierwszych gałęzi i proksymalnego odcinka tętnicy żołądkowo-sieciowej prawej do wysokości spływu prawej żyły żołądkowo-sieciowej oraz żyły przedniej górnej trzustkowo-dwunastniczej i jej odgałęzień
7	Węzły położone wzdłuż pnia tętnicy żołądkowej lewej od odejścia od pnia trzewnego do podziału na gałęzie wstępujące
8a	Węzły przednio-górne położone wzdłuż tętnicy wątrobowej wspólnej
8p	Węzły tylne położone wzdłuż tętnicy wątrobowej wspólnej
9	Węzły położone wokół pnia trzewnego
10	Węzły wnęki śledziony i końcowego odcinka tętnicy śledzionowej

## 2. WSTĘP

---

11p	Węzły położone wzdłuż bliższej części tętnicy śledzionowej
11d	Węzły położone wzdłuż dalszej części tętnicy śledzionowej
12a	Węzły więzadła wątrobowo-dwunastniczego wzdłuż tętnicy wątrobowej właściwej od głowy trzustki do wysokości połączenia przewodów wątrobowych prawego i lewego
12b	Węzły więzadła wątrobowo-dwunastniczego wzdłuż przewodu żółciowego wspólnego od głowy trzustki do wysokości połączenia przewodów wątrobowych prawego i lewego
12p	Węzły więzadła wątrobowo-dwunastniczego za żyłą wrotną od głowy trzustki do wysokości połączenia przewodów wątrobowych prawego i lewego
13	Węzły na tylnej powierzchni głowy trzustki okolicy brodawki Vatera
14v	Węzły położone wzdłuż żyły kręzkowej górnej
14a	Węzły położone wzdłuż tętnicy kręzkowej górnej
15	Węzły położone wzdłuż naczyń okrężniczych środkowych
16a1	Węzły położone w okolicy roztworu aortalnego przepony
16a2	Węzły położone wokół aorty brzusznej (od górnego brzegu pnia trzewnego do dolnego brzegi żyły nerkowej lewej)
16b1	Węzły położone wokół aorty brzusznej (od dolnego brzegu żyły nerkowej lewej do górnego brzegu tętnicy kręzkowej dolnej)
16b2	Węzły położone wokół aorty brzusznej (od górnego brzegu tętnicy kręzkowej dolnej o rozwidlenia aorty)
17	Węzły przedniej powierzchni głowy trzustki
18	Węzły wzdłuż dolnego brzegu trzustki
19	Węzły podprzeponowe przeważenie wzdłuż tętnicy podprzeponowej
20	Węzły położone w rozworze przełykowym przepony

---

## 2. WSTĘP

---

---

110	Węzły okołoprzełykowe w dolnej części klatki piersiowej
111	Węzły nadprzeponowe
112	Węzły śródpiersiowe tylne

---

W przypadku całkowitej resekcji żołądka wyróżnia się następujące typy limfadenektomii:

**D0:** limfadenektomia mniejsza niż D1

**D1:** wycięcie węzłów chłonnych stacji 1-7

**D1+:** limfadenektomia jak w D1 oraz dodatkowo wycięcie węzłów stacji 8a, 9, 11p

**D2:** limfadenektomia jak w D1 oraz dodatkowo wycięcie stacji 8a, 9, 10, 11p, 11d, 12a

**D2+:** limfadenektomia jak w D2 oraz dodatkowo wycięcie stacji 16, 19, 20, 110, 111

W przypadku subtotalnej resekcji żołądka wyróżnia się następujące typy limfadenektomii:

**D0:** limfadenektomia mniejsza niż D1

**D1:** wycięcie węzłów chłonnych stacji 1, 3, 4sb, 4d, 5, 6, 7

**D1+:** limfadenektomia jak w D1 oraz dodatkowo wycięcie węzłów stacji 8a, 9

**D2:** limfadenektomia jak w D1 oraz dodatkowo wycięcie stacji 8a, 9, 1, 11p, 12a

Aktualnie u chorych operowanych z intencją wykonania zabiegu radykalnego zaleca się wykonywanie limfadenektomii D2. Limfadenektomia o mniejszym zakresie jest dopuszczalna w przypadku chorych z wczesną postacią raka, którzy nie zostali zakwalifikowani do leczenia endoskopowego. Ocenia się, że przeprowadzenie limfadenektomii w stopniu D2 poprawia odległe wyniki leczenia [50, 51].

### **2.2.3.5 Leczenie skojarzone raka żołądka**

Wyniki dotychczasowych, szeroko zakrojonych badań przemawiają za stosowaniem okołooperacyjnej chemioterapii, w trakcie której chorzy najczęściej otrzymują 2-4 cykle chemioterapii przedoperacyjnej oraz 3-4 cykle po zabiegu. Wykazano, że chemioterapia okołooperacyjna wydłuża przeżycia chorych i nie zwiększa odsetka okołooperacyjnych powikłań [52]. Najczęściej stosowanymi schematami lekowymi są FLOT (5-fluorouracyl, leukoworyna, oksaliplatyna, docetaksel) oraz ECF / ECX (epirubicyna, cisplatyna, 5-fluorouracyl / kapecytabina) [53, 54].

W przypadku pacjentów po leczeniu operacyjnym, z potwierdzeniem miejscowo zaawansowanego raka, którzy nie byli zakwalifikowani do okołooperacyjnej chemioterapii zaleca się chemioradioterapię pooperacyjną. Wykazano, że takie postępowanie poprawia odległe przeżycia chorych oraz zmniejsza odsetek wznów miejscowych [55].

Dodatkową możliwością drogi podania leków cytostatycznych jest chemioterapia śródoperacyjna, której zamysłem jest prewencja lub leczenie przerzutów do jamy otrzewnej. Optymalnym postępowaniem poprzedzającym dootrzewnowe wprowadzenie leków jest kompletna operacja cytoredukcyjna. Wykazano, że postępowanie tego typu może wydłużać przeżycia chorych, jednak zwiększa ryzyko wystąpienia powikłań pooperacyjnych [56, 57].

### 2.2.3.6 Leczenie paliatywne raka żołądka

Postępowanie chirurgiczne w rozsiałym procesie nowotworowym (stopień IV) ma na celu zachowanie drożności przewodu pokarmowego i odżywiania chorego, co uzyskuje się poprzez wykonanie zespołów omijających żołądkowo – jelitowych lub endoskopowe wprowadzenie protezy rozprężającej światło żołądka. W przypadku okołodzwiernikowej lokalizacji zmiany istnieje również możliwość przeprowadzenia zabiegów paliatywnej, obwodowej resekcji żołądka. W przypadku obecności znacznego nacieku nowotworowego uniemożliwiającego przeprowadzenie jednej z wyżej opisanych procedur, wykonuje się zabieg implantacji mikrojejunostomii odżywczej pozwalającej na żywienie dojelitowe dietą przemysłową bezpośrednio do światła jelita cienkiego [27].

Jeśli stan chorego na to pozwala, zalecana jest paliatywna chemioterapia w celu przedłużenia życia chorego. Wśród innych, niezabiegowych metod należy wziąć pod uwagę leczenie z zastosowaniem trastuzumabu (przeciwciała przeciwko receptorowi nabłonkowego czynnika wzrostu, ang. human epidermal growth factor receptor, HER2) czy radioterapii mającej na celu powiększenie światła żołądka oraz zmniejszenie ryzyka krwawienia z guza nowotworowego [58].



### 3. CELE PRACY

Ze względu na rozpowszechnienie, złożoność procesu terapeutycznego oraz częste rozpoznawanie w stadium uniemożliwiającym całkowite wyleczenie, rak żołądka jest chorobą stwarzającą istotne wyzwanie terapeutyczne [27, 28]. Dotychczasowe efekty leczenia obejmujące niezadawalające wyniki odległych przeżyć skłaniają do poszukiwania nowych, potencjalnych markerów nowotworowych pozwalających na szybsze wykrywanie procesu nowotworowego, jak również do poszerzania wiedzy na temat procesów regulujących biologię tego nowotworu na poziomie molekularnym, co pozytywnie wpłynęłoby na efektywność procesu diagnostycznego i terapeutycznego.

Mając na uwadze doniesienia na temat potencjalnej roli MTs w procesie kancerogenezy mogącej oddziaływać między innymi poprzez regulację procesów podziału komórki, poprzez gospodarkę jonami cynku lub ochronę komórki przed stresem komórkowym, należy podejrzewać, że tesmina, będąc białkiem funkcjonalnie podobnym do MTs, również może odgrywać rolę w procesach transformacji nowotworowej. Rola tesminy w procesie kancerogenezy jest do tej pory stosunkowo słabo poznana, a jej potencjalny wpływ na mechanizmy komórkowe związane z występowaniem raka żołądka jest właściwie nieznan.

Powyższe fakty skłoniły mnie do zbadania znaczenia ekspresji tesminy w raku żołądka oraz sformułowania następujących celów pracy:

1. Określenie poziomu ekspresji mRNA *MTL5* metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real time polymerase chain reaction, RT-PCR) oraz nasilenia ekspresji i lokalizacji białka tesminy metodą immunohistochemiczną (IHC) w przypadkach raka żołądka oraz niezmięnionej nowotworowo błonie śluzowej żołądka, stanowiącej kontrolę.

2. Ocena związku pomiędzy poziomem ekspresji mRNA *MTL5* oraz białka tesminy w badanych przypadkach raka żołądka z danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów, w tym przeżyciami całkowitymi chorych.

### 4. MATERIAŁ I METODY

#### 4.1 Materiał

##### 4.1.1 Grupa badana i kontrolna

Materiał do przeprowadzonych badań stanowiły fragmenty guzów oraz zdrowej tkanki żołądka z marginesu cięcia chirurgicznego, pobierane i archiwizowane z preparatów chirurgicznych od pacjentów zakwalifikowanych do zabiegu gastrektomii, z potwierdzonym wcześniej endoskopowo i histopatologicznie rakiem żołądka. Pobierany materiał był utrwalany w zbuforowanej 5% formalinie a następnie zabezpieczany w postaci bloczków parafinowych. Dodatkowo, pozyskane tkanki były utrwalone w płynie *RNAlater* celem późniejszego wykorzystania do badań molekularnych. Materiał ten pochodził od pacjentów, u których wykonano zabieg gastrektomii, operowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu w latach 2018-2020, po wcześniejszym uzyskaniu świadomej zgody od chorych. Ponadto, uzyskano archiwalny materiał w postaci bloczków parafinowych z guzów nowotworowych od pacjentów operowanych z powodu raka żołądka w latach 2011-2016 z Zakładu Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego, dzięki uprzejmości Kierownika Zakładu, Pani Prof. dr hab. Agnieszki Hałoń.

Grupa badana obejmowała:

- **85 przypadków** fragmentów guzów raka żołądka, w tym:

- pobierane śródoperacyjnie (**40 przypadków**),

- preparaty pochodzące z zarchiwizowanego materiału w postaci bloczków parafinowych (**45 przypadków**).

Grupę kontrolną dla wyżej wymienionego materiału stanowiło:

- **38 przypadków** zdrowej tkanki żołądka uzyskanej śródoperacyjnie z zachowanego marginesu cięcia chirurgicznego.

Do opisywanych przypadków uzyskano, z zachowaniem anonimowości, dane kliniczno-patologiczne z bazy danych Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu, obejmujące rozpoznanie histopatologiczne, stopień złośliwości histologicznej, klasyfikację stopnia zaawansowania nowotworu, typ nowotworu wg klasyfikacji Laurena, dostępne dane dotyczące przeżyć, jak również wiek, płeć pacjentów i stężenie w surowicy markerów nowotworowych Ca 19-9 i CEA. Charakterystykę grupy badanej przedstawia Tabela 4.

Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (nr KB 506/2018).

**Tabela 4.** Grupa badana – charakterystyka kliniczno-patologiczna pacjentów.

<b>PARAMETR</b>	<b>WARTOŚĆ</b>
<b>ŚREDNIA WIEKU PACJENTÓW (rozkład lat)</b>	64 (35-83)
<b>PŁEĆ, n (%)</b>	
Mężczyźni	53 (62,35)
Kobiety	32 (37,65)
<b>STOPIEŃ ZŁOŚLIWOŚCI, n (%)</b>	
G1	5 (5,88)
G2	36 (42,35)
G3	44 (51,76)
<b>STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA CECHA T, n (%)</b>	
T1	13 (15,29)
T2	19 (22,36)
T3	31 (36,47)
T4	22 (25,88)
<b>STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA CECHA N, n (%)</b>	
N0	31 (36,47)
N1, N2, N3	54 (63,53)
<b>STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA CECHA M, n (%)</b>	
Mx	41 (48,23)
M0	41 (48,23)
M1	3 (3,54)
<b>KLASYFIKACJA LAURENA, n (%)</b>	
Typ jelitowy	31 (46,97)
Typ rozlany	22 (33,34)
Typ mieszany	13 (19,69)
<b>ŚREDNIE WARTOŚCI MARKERÓW NOWOTWOROWYCH</b>	
Ca 19-9	62,64
CEA	116,31

### 4.2 Metody

#### 4.2.1 Mikromacierze tkankowe

Mikromacierze tkankowe (ang. tissue microarrays, TMAs) są metodą archiwizowania materiału tkankowego w bloczkach parafinowych, pozwalającą na ujednoczenie warunków reakcji IHC, skrócenie czasu niezbędnego na ich przeprowadzenie oraz znaczące ograniczenie sumarycznych kosztów [59]. Po odpowiednim przygotowaniu bloczka parafinowego z tkanką, został z niego pobrany skrawek, który poddano barwieniu hematoksyliną i eozyną. W dalszej kolejności wybarwione skrawki były skanowane przy pomocy skanera histologicznego Pannoramic Midi II (3DHISTECH Ltd.), następnie przy użyciu programu Pannoramic Viewer Program (3DHISTECH Ltd.) wybrano z preparatu najbardziej reprezentatywne obszary. Celem zwiększenia reprezentatywności, z każdego przypadku zostały pobrane 3 rdzenie o średnicy 1,5 mm, które zostały naniesione w ściśle określonej pozycji na macierz przy użyciu automatycznego systemu do przygotowania macierzy tkankowych TMA Grand Master (3DHISTECH Ltd.). Celem przeprowadzenia badania zostało przygotowanych 4 bloczki TMAs z 85 przypadków tkanki nowotworowej raka żołądka oraz 2 bloczki TMAs z 38 przypadków zdrowej tkanki żołądka z zachowanym marginesem cięcia chirurgicznego.

#### 4.2.2 Reakcje immunohistochemiczne (IHC)

Bloczki z pobraną tkanką zostały pocięte na skrawki parafinowe o grubości 4  $\mu\text{m}$  i nałożone na szkiełka podstawowe SuperFrost Plus (Menzel Gläser, Braunschweig, Niemcy). Następnie przeprowadzono proces 20 minutowej inkubacji w buforze Target Retrieval Solution o pH 9,0, w aparacie PT Linki (Dako Cytomation, Glostrup, Dania) celem uwodnienia,

deparafinizacji i odsłonięcia determinant antygenowych. W dalszej kolejności dokonano ostudzenia preparatów w buforze płuczącym (TBS z 0,1% Tween) przez czas 3 minut. Celem wizualizacji wykorzystano system EnVision™ FLEX, High pH (Link) (Dako nr kat. K8000). Przeprowadzono proces blokowania endogennej peroksydazy przez 5 min. inkubacja w roztworze EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, a resztki odczynnika usunięto na drodze płukania w buforze płuczającym (TBS z 0,1% Tween). Następnie nakropiono przeciwciała pierwszorzędowe – poliklonalne, królicze przeciwciała anty-tesmina (Novus Biologicals; nr kat. NBP2-13624) w rozcieńczeniu 1:600 oraz monoklonalne, mysie przeciwciała antyludzkie anty-Ki-67, klon MIB-1 (Dako, nr kat. IR626) stosowane jako *ready-to-use*, inkubacja w temperaturze pokojowej trwała 20 minut, pozostałości roztworu przeciwciał usunięto na drodze przepłukania w buforze (TBS z 0,1% Tween). W następnym etapie naniesiono przeciwciało drugorzędowe znakowane peroksydazą chrzanową (EnVision FLEX/HRP) i przeprowadzono 20 minutową inkubację, pozostałości roztworu przeciwciał usunięto analogicznie przepłukując buforem (TBS z 0,1% Tween). Po 5 minutowej inkubacji szkiełek w buforze (TBS z 0,1% Tween), na preparat naniesiono diaminobenzydynę (DAB) i poddano 10 minutowej inkubacji. Następnie, szkiełka przepłukano w buforze (TBS z 0,1% Tween) i usunięto nadmiar DABu. Następnie, przeprowadzono 5 minutową inkubację przy użyciu odczynnika EnVision FLEX Hematoxylin dzięki czemu uwidoczniło strukturę tkanki oraz jąder komórkowych na zasadzie barwienia kontrastowego. Pozostałości wyżej wymienionego odczynnika wypłukano wodą destylowaną i w kolejnym kroku odwodniono preparat na drodze przeprowadzenia przez szereg alkoholi o wzrastającym stężeniu (5 minutowe inkubacje w roztworach o stężeniu 70%, 96%, alkohol absolutny), a na końcu w ksylenie. W ostatnim stadium reakcji, preparaty zostały zamknięte szkiełkiem nakrywkowym wykorzystując środek SUB-X Mounting Medium i urządzenie Cover Slipper. Pozostały, niewymieniony w opisie sprzęt był produkcji Dako Cytomation, Glostrup, Dania.

Celem określenia prawidłowości przeprowadzonych reakcji IHC dla przeciwciał anty-tesmina oraz anty-Ki-67 wykonano próbę kontrolną z użyciem skrawków tkanki jądra ludzkiego.

#### 4.2.3 Ocena nasilenia reakcji immunohistochemicznych

W celu dokonania oceny nasilenia cytoplazmatycznej ekspresji antygeny tesminy w komórkach raka żołądka oraz prawidłowych komórkach żołądka wykorzystano skalę wg Remmele i Stagnera (IRS) określającą iloraz intensywności reakcji IHC oraz odsetek komórek o pozytywnej ekspresji antygeny (Tabela 5). W celu określenia ekspresji tesminy na obszarze jądra komórkowego komórek raka zastosowano półilościową skalę punktową opisującą odsetek komórek nowotworowych wykazujących pozytywną ekspresję antygeny tesminy w stosunku do ogółu komórek nowotworowych widocznych w zakresie badanego fragmentu tkanki (Tabela 6).

**Tabela 5.** Skala oceny preparatów IHC wg Remmele i Stagnera zastosowana do oceny nasilenia reakcji cytoplazmatycznej tesminy, uzyskany rezultat to iloczyn wartości A i B ( $\Sigma = A \times B$ ) [60].

<b>Ilość punktów</b>	<b>Intensywność reakcji barwnej (A)</b>	<b>Procent komórek wykazujących reakcję (B)</b>
0	Brak reakcji	0 %
1	Słaba reakcja	<10 %
2	Średnia reakcja	10-50 %
3	Silna reakcja	51-80 %
4		81-100 %



**Tabela 6.** Skala oceny jądrowej reakcji IHC zastosowana do oceny ekspresji tesminy [61].

<b>Odsetek komórek z pozytywną ekspresją jądrową</b>	<b>Ilość punktów</b>
0 %	0
1-10 %	1
11-25 %	2
26-50 %	3
>50 %	4

#### 4.2.4 Metoda real-time PCR

##### 4.2.4.1 Izolacja całkowitego RNA

Pobierany śródoperacyjnie materiał był natychmiast zabezpieczany w roztworze *RNAlater* (Invitrogen, USA) i przechowywany w temperaturze -20°C.

Całkowity RNA był izolowany z badanego materiału dzięki wykorzystaniu zestawu *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Niemcy), z zastosowaniem zalecanych przez producenta wytycznych. Fragmenty tkanek o masie 20-30 mg umieszczano w 600 µl buforu lizującego *RTL* z dodatkiem 6 µl β-merkaptotanolu (Merck, Niemcy) i poddawano 40 sekundowej homogenizacji na lodzie stosując homogenizator *Tissue Ruptor* (Qiagen, Niemcy). Uzyskany w ten sposób lizat tkankowy był odwirowany przez czas 3 minut przy 12000 x g, następnie otrzymany po odwirowaniu supernatant mieszano w nowej probówce z 600 µl 70% alkoholu

etylenowego. Tak przygotowaną mieszaninę nanoszono w porcjach na kolumnę z żelem krzemionkowym, po czym poddawano wirowaniu przez 15 sekund przy 8000 x g. Następnie, kolumnę obmywano 350 µl buforu RW1 i poddawano ponownemu wirowaniu. Aby usunąć genomowe DNA próbki poddawano trawieniu DNazą I, do 10 µl DNazy I dodawano 70 µl buforu RDD (RNase-Free DNase Set, Quigen, Niemcy) i delikatnie mieszano, następnie enzym nanoszono na żel krzemionkowy i inkubowano przez 15 min. w temperaturze pokojowej. Po przebytej inkubacji kolumnę przemywano 350 µl buforu RW1 i dwa razy 500 µl buforu RPE. Całkowity RNA związany z żelem krzemionkowym eluowano nanosząc na kolumnę 40 µl wody wolnej od RNaz i poddawano wirowaniu przez czas 1 min. przy 8000 x g. Następnie, oznaczano czystość i stężenie uzyskanego RNA spektrofotometrycznie mierząc absorbancję próbek przy długości dal 260 i 280 nm przy zastosowaniu spektrofotometru NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Otrzymane próbki RNA były przechowywane w temperaturze -80°C.

#### 4.2.4.2 Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z zastosowaniem zestawu odczynników High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA), stosując się do wytycznych zalecanych przez producenta. Mieszaninę reakcyjną składającą się z 10 µl całkowitego RNA o wadze 500 ng, 2 µl buforu, 0,8 µl dNTP, 2 µl primerów, 1 µl odwrotnej transkryptazy MultiScribe, 1 µl inhibitora RNaz i 3,2 µl wody wolnej od nukleaz poddawano kolejno procesom: inkubacji w temperaturze 25°C przez czas 10 min., 37°C przez czas 2 godz. oraz 85°C przez czas 5 min. Próbki cDNA były przechowywane w temp. -20°C.

### 4.2.4.3 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Poziom ekspresji mRNA *MTL5* był badany metodą real-time PCR przy zastosowaniu aparatu 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) i wykorzystaniu TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA). Uzyskane wyniki były normalizowane w oparciu o ekspresję genu referencyjnego *GAPDH*. Reakcje przeprowadzano z wykorzystaniem gotowych, walidowanych zestawów starterów i sond typu TaqMan dla *MTL5* – Hs01127481\_m1, dla *GAPDH* – Hs99999905\_m1 (Applied Biosystems, USA). Reakcje były przeprowadzane z zachowaniem trzech powtórzeń w ustalonych warunkach dotyczących czasu i temperatury: aktywacja polimerazy w 50°C przez 2 min., wstępna denaturacja w 94°C przez 10 min., w dalszej kolejności 40 cykli składających się z denaturacji w 94°C przez 15 sek. oraz przyłączenia starterów wraz z syntezą w 60°C przez 1 min. Względna ekspresja mRNA *MTL5* była obliczana metodą  $\Delta\Delta C_t$ .

### 4.3 Analiza statystyczna

Wyniki przeprowadzonych badań zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu programu Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, Kalifornia, USA). Dzięki zastosowaniu testu Kołomorowa-Smirnowa został zbadany rozkład zmiennych oraz określono dla nich wartości - minimalną, maksymalną, średnią, medianę, odchylenie standardowe oraz rozrzut. Celem przeprowadzenia analizy statystycznej różnicy badaniach cech w dwóch grupach zastosowano test t-Studenta dla danych cechujących się rozkładem parametrycznym lub test U-MannaWhitney'a dla danych cechujących się rozkładem nieparametrycznym. Celem przeprowadzenia analizy statystycznej różnicy badanych cech pomiędzy wieloma grupami zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji z testem post hoc Dunna dla danych cechujących się rozkładem parametrycznym, natomiast dla danych cechujących się rozkładem

nieparametrycznym został zastosowany test Kruskalla-Wallisa z testem post hoc Bonferroniego. Uwzględniając rozkład badanych cech ilościowych, ich ewentualny związek określono przy użyciu testu korelacji rang Spearmana. Przy poziomie istotności mniejszym niż 0,05 ( $p < 0,05$ ), uznawano wyniki analiz statystycznych za istotne.

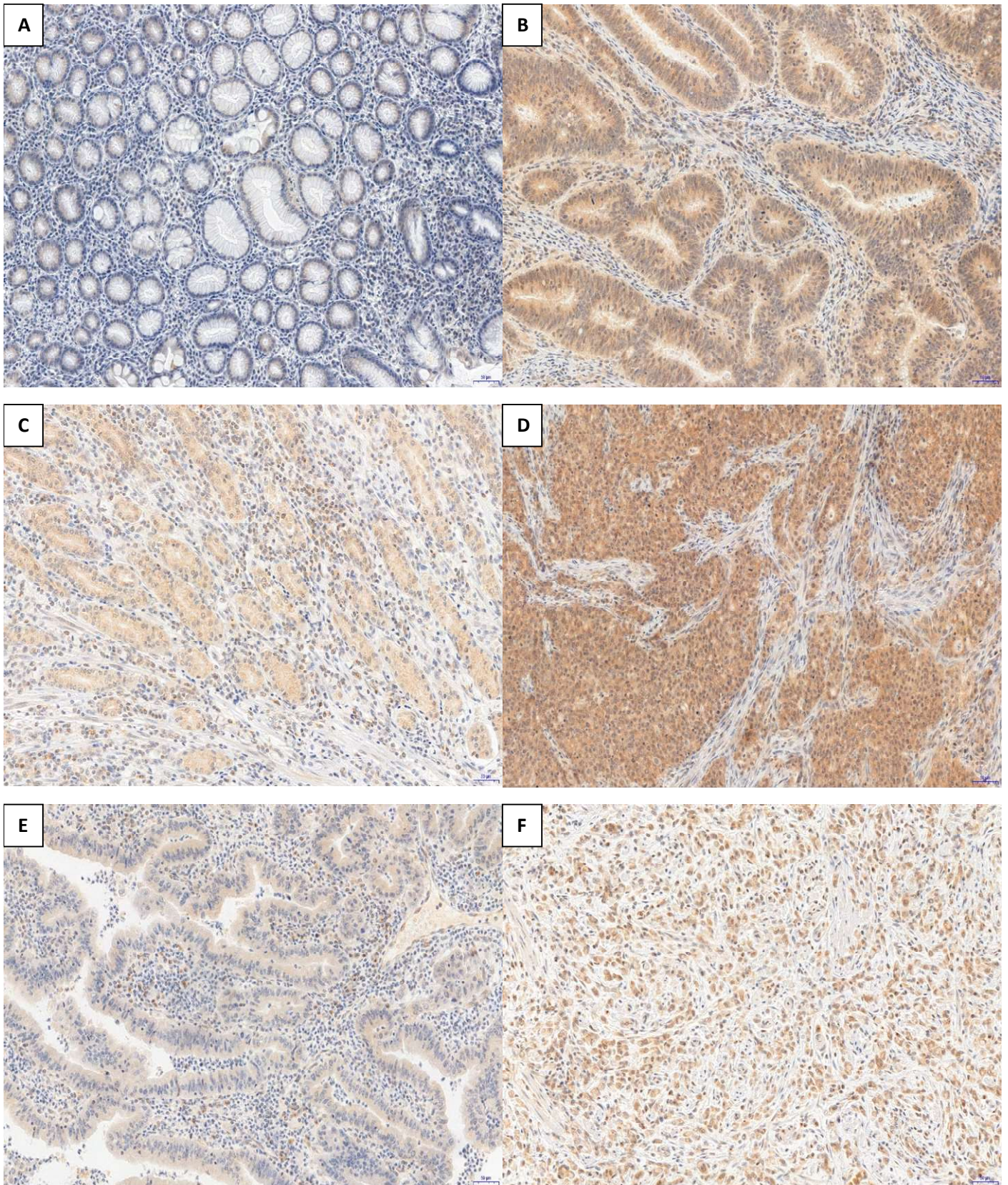
## 5. WYNIKI

## 5.1 Real-time PCR oraz reakcje IHC

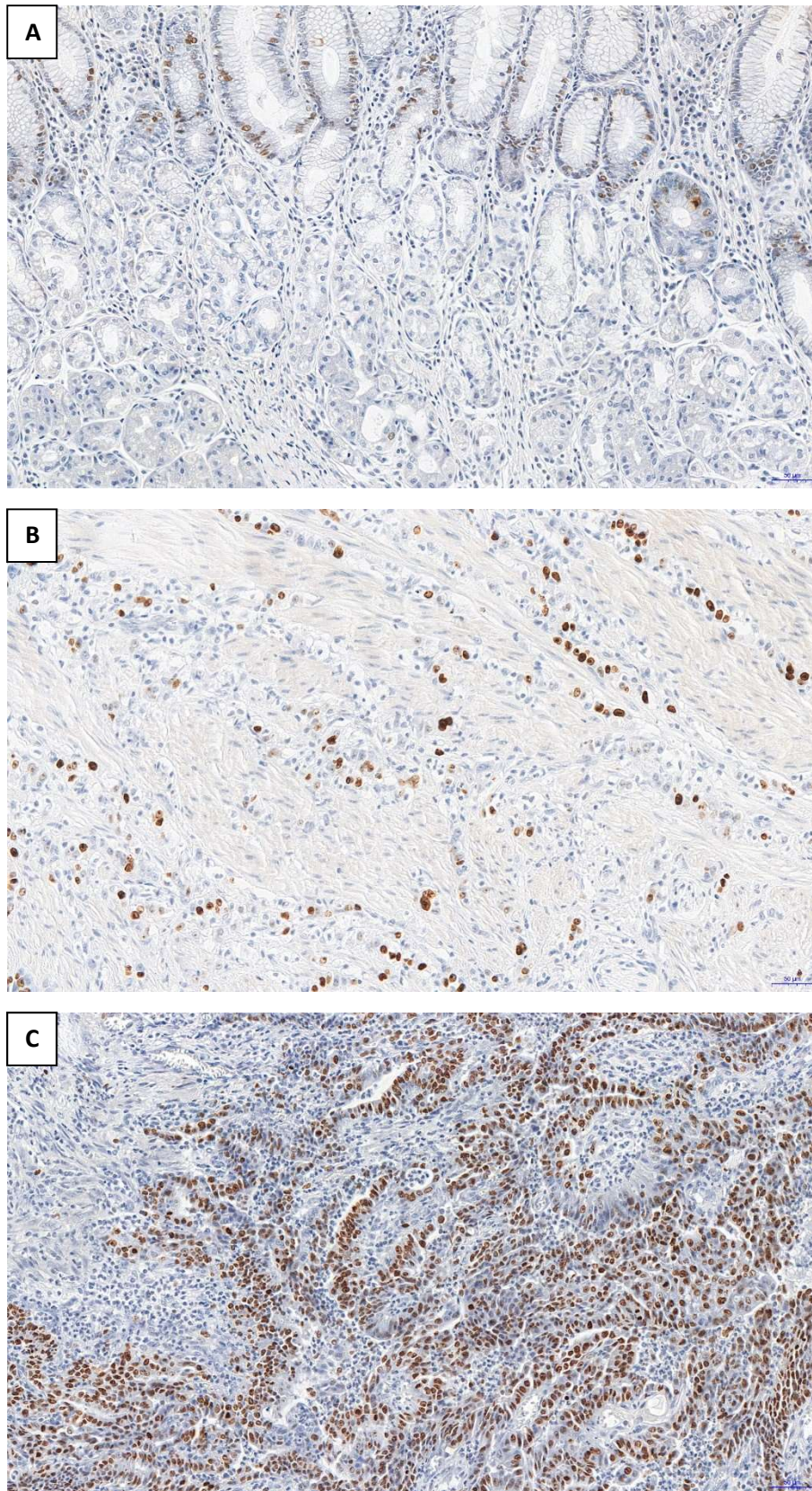
W celu określenia ekspresji mRNA *MTL5* przeprowadzono reakcje RT-PCR w grupie 38 przypadków (materiał zabezpieczony w *RNAlater*). Ekspresję mRNA *MTL5* stwierdzono w 36 (94,73 %) badanych przypadkach grupy badanej oraz 33 (86,84%) przypadkach grupy kontrolnej. Ponadto, w celu określenia poziomu ekspresji białek tesminy i Ki-67, przeprowadzono reakcje IHC. Ocena mikroskopowa wykazała cytoplazmatyczno-jądrową ekspresję tesminy oraz jądrową ekspresję Ki-67 (Rycina 2 i 3). Szczegółowy rozkład ilościowy wyżej wymienionych białek jest zaprezentowany w Tabeli 7.

**Tabela 7.** Grupa badana - rozkład ilościowy obecności ekspresji IHC białek tesminy i Ki-67.

	Grupa kontrolna (n=38)	Grupa badana (n=85)
<b>Tesmina IRS, n (%)</b>		
0	20 (52,63)	4 (4,7)
1-12	18 (47,36)	81 (95,29)
<b>Tesmina jądrowa, n (%)</b>		
0	2 (5,26)	4 (4,7)
1-4	36 (94,73)	81 (95,29)
<b>Ki-67, n (%)</b>		
0	7 (18,42)	2 (2,35)
1-4	31 (81,58)	83 (97,65)



**Rycina 2.** Immunohistochemiczna ekspresja tesminy w grupie kontrolnej i grupie badanej. (A) Niska ekspresja tesminy w komórkach nabłonkowych żołądka. (B) Cytoplazmatyczna i jądrowa ekspresja tesminy w komórkach raka żołądka. Niska i wysoka ekspresja cytoplazmatyczna (odpowiednio C i D) oraz jądrowa (odpowiednio E i F) tesminy w komórkach raka żołądka. Powiększenie 200 x.



**Rycina 3.** Immunohistochemiczna ekspresja białka Ki-67 w grupie kontrolnej i grupie badanej.

(A) Niska ekspresja Ki-67 w komórkach nabłonkowych żołądka.

(B) Niska i (C) wysoka ekspresja Ki-67 w komórkach raka żołądka. Powiększenie 200 x.

**5.2 Poziom ekspresji mRNA *MTL5* oraz nasilenie ekspresji IHC tesminy i Ki-67****Tabela 8.** Ekspresja mRNA *MTL5* oraz IHC tesminy i Ki-67 – statystyka opisowa grupy kontrolnej.

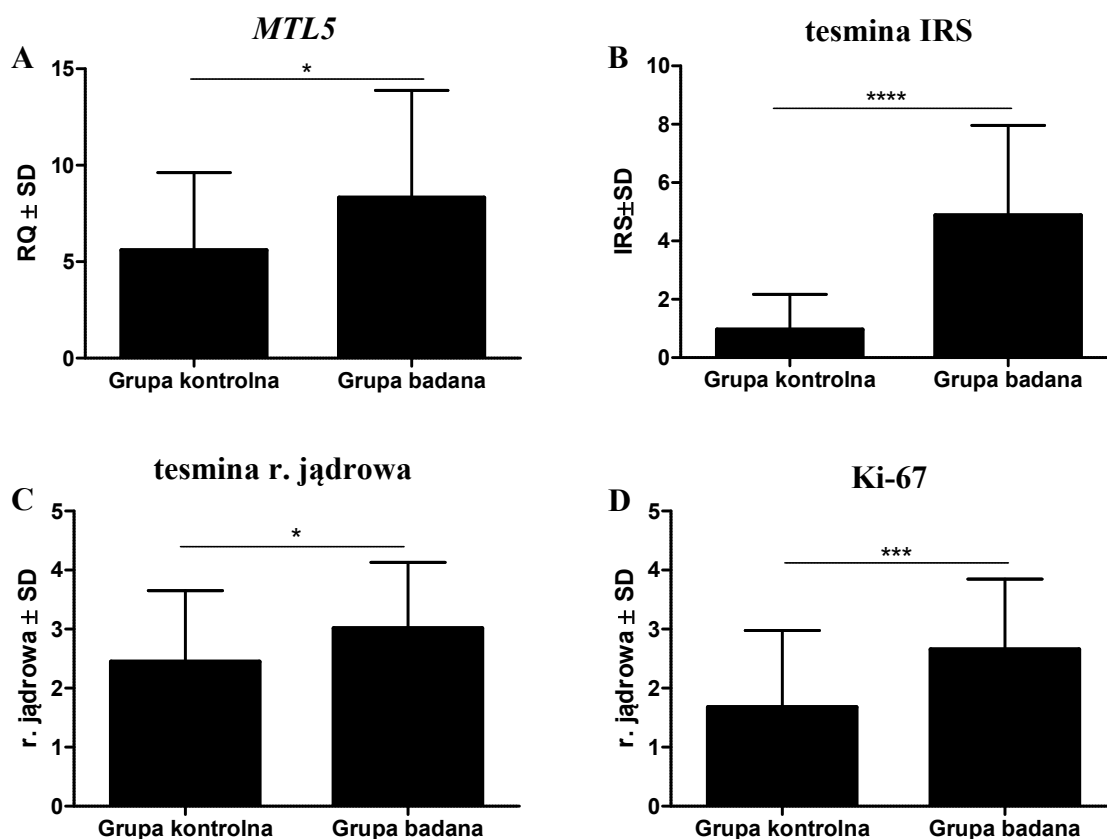
<b>N=38</b>	<b>Średnia</b>	<b>Mediana</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>	<b>Odchylenie standardowe</b>
RQ <i>MTL5</i>	5,593	5,498	0	12,96	4,022
Tesmina IRS	0,9640	0	0	4	1,204
Tesmina r. jądrowa	2,447	2,5	0	4	1,206
Ki-67	1,675	1,333	0	4	1,3

**Tabela 9.** Ekspresja mRNA *MTL5* oraz IHC tesminy i Ki-67 – statystyka opisowa grupy badanej.

<b>N=85</b>	<b>Średnia</b>	<b>Mediana</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>	<b>Odchylenie standardowe</b>
RQ <i>MTL5</i>	8,324	6,737	1	22,96	5,551
Tesmina IRS	4,883	4	0	12	3,08
Tesmina r. jądrowa	3,014	3,167	0	4	1,118
Ki-67	2,657	3	0	4	1,191



Ekspresja mRNA *MTL5* była zróżnicowana i cechowała się obecnością przypadków z istotnie wyższą ekspresją w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej ( $p < 0,05$ , test Manna-Whitney'a, Ryc. 4A). Również cytoplazmatyczna i jądrowa ekspresja IHC tesminy były istotnie wyższe w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej (odpowiednio  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,05$ , test Manna-Whitney'a, Ryc. 4B i 4C). Podobnie w przypadku jądrowej ekspresji IHC Ki-67, stwierdziłem istotnie wyższą ekspresję w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ , test Manna-Whitney'a, Ryc. 4D).

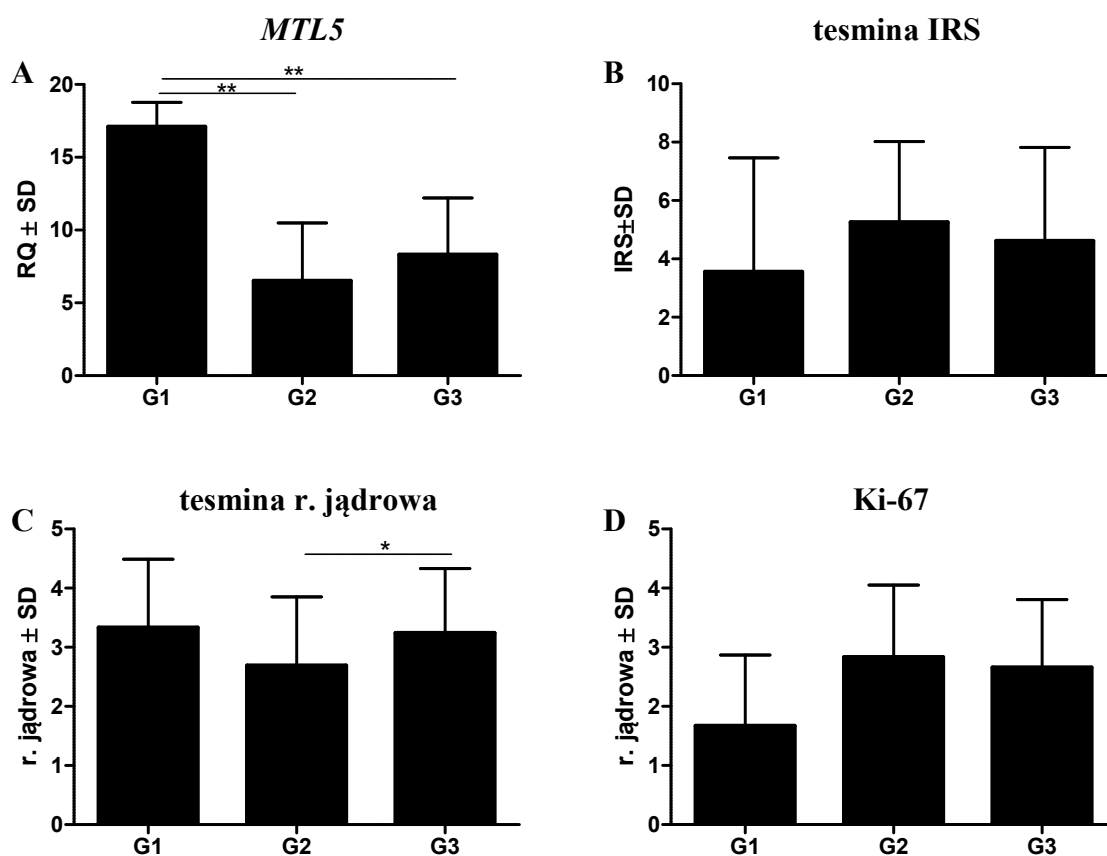


**Rycina 4.** Analiza statystyczna poziomu ekspresji mRNA *MTL5* (A) wykazała istotnie wyższą ekspresję mRNA *MTL5* w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej ( $p < 0,05$ , test Manna-Whitney'a). W przypadku analizy nasilenia cytoplazmatycznej (B) oraz jądrowej ekspresji IHC tesminy (C), wykazałem istotnie wyższą ekspresję cytoplazmatyczną i jądrową tesminy w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,05$ , test Manna-Whitney'a). W przypadku analizy poziomu jądrowej ekspresji IHC Ki-67 (D), wykazałem istotnie wyższą ekspresję Ki-67 w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ , test Manna-Whitney'a), (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

### 5.3 Analiza badanych markerów względem stopnia złośliwości histologicznej

Podjąłem analizę porównawczą ekspresji mRNA *MTL5*, cytoplazmatycznej i jądrowej ekspresji IHC tesminy, jak również ekspresji jądrowej IHC Ki-67 w grupach o poszczególnych stopniach złośliwości histologicznej G. Grupę badaną podzielono na 3 podgrupy: 5 przypadków raka o stopniu złośliwości G1, 36 przypadków o stopniu złośliwości G2 oraz 44 przypadki o stopniu złośliwości G3 (Tabela 4).

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotnie wyższą ekspresję mRNA *MTL5* w podgrupie przypadków o stopniu złośliwości G1 w stosunku do podgrup przypadków o stopniu złośliwości G2 i G3 (odpowiednio  $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ , test Manna-Whitney'a, Ryc. 5A). Dodatkowo zaobserwowałem istotnie niższą, jądrową ekspresję IHC tesminy w podgrupie przypadków o stopniu złośliwości G2 w stosunku do podgrupy przypadków cechującej się stopniem G3 ( $p < 0,05$ , test Manna-Whitney'a, Ryc. 5C). Analiza stopnia cytoplazmatycznej ekspresji IHC tesminy oraz jądrowej ekspresji IHC Ki-67 w podgrupach o poszczególnych stopniach złośliwości histologicznej G nie wykazała istotnych statystycznie różnic (odpowiednio Ryc. 5B i 5D).



**Rycina 5.** Analiza statystyczna poziomu ekspresji mRNA *MTL5* (A) wykazała istotnie wyższą ekspresję mRNA *MTL5* w podgrupie przypadków o stopniu G1 w stosunku do podgrup o stopniu złośliwości G2 i G3 (odpowiednio  $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ , test Manna-Whitney'a), nie obserwowano istotnych różnic pomiędzy podgrupami o stopniach G2 i G3 ( $p = 0,26$ , test Manna-Whitney'a). W przypadku cytoplazmatycznej ekspresji IHC tesminy (B) nie wykazałem istotnie statystycznych różnic pomiędzy podgrupami o stopniu G1 i G2, G1 i G3 ani G2 i G3 (odpowiednio  $p = 0,32$ ;  $p = 0,55$ ;  $p = 0,29$ , test Manna-Whitney'a). Jądrowa ekspresja IHC tesminy (C) była istotnie niższa w podgrupie przypadków o stopniu złośliwości G2 w stosunku do podgrupy cechującej się stopniem G3 ( $p < 0,05$ , test Manna-Whitney'a),

nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami o stopniach G1 i G2 ani G1 i G3 (odpowiednio  $p=0,38$ ;  $p=0,85$ , test Manna-Whitney'a). W przypadku analizy jądrowej ekspresji IHC Ki-67 (**D**) nie wykazałem istotnie statystycznych różnic pomiędzy podgrupami o stopniu G1 i G2, G1 i G3 ani G2 i G3 (odpowiednio  $p=0,1$ ;  $p=0,19$ ;  $p=0,45$ , test Manna-Whitney'a), (\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ ; \*\*\*\* $p<0.0001$ ).

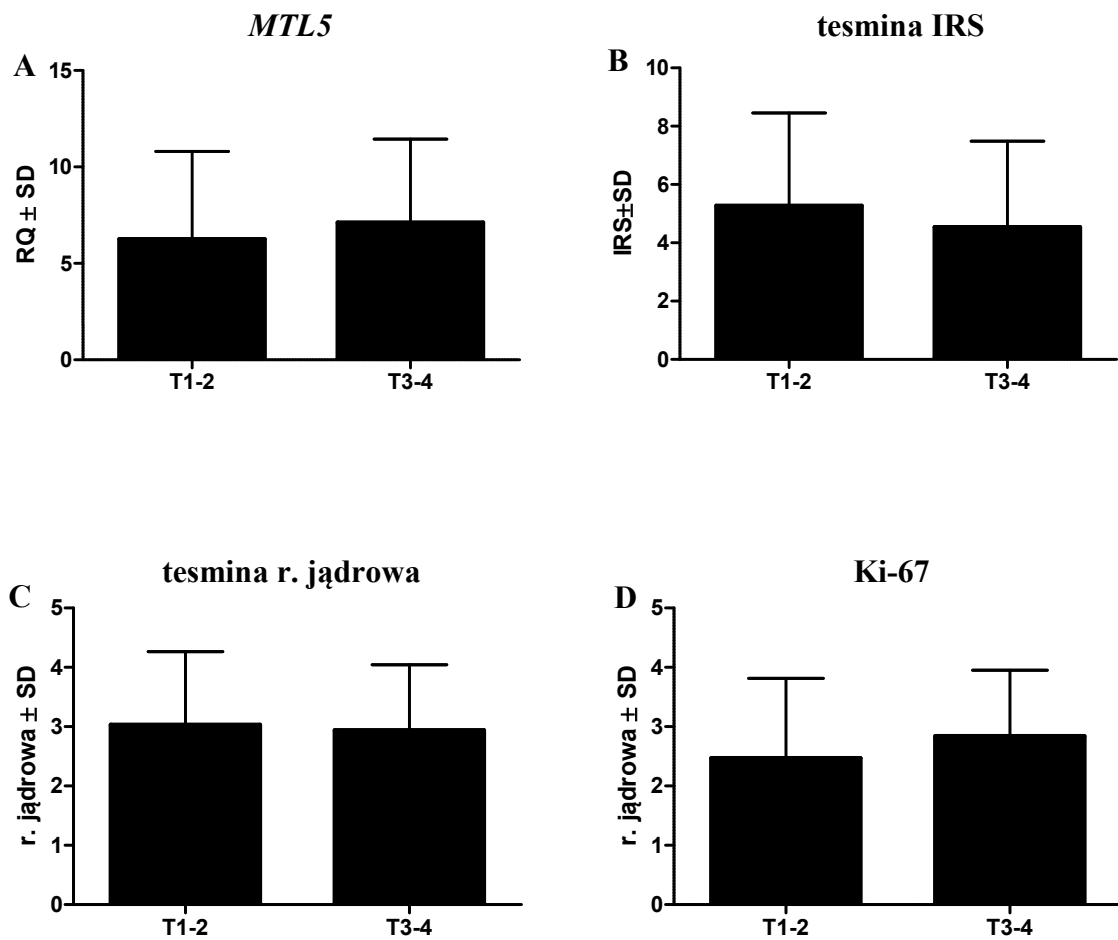
#### **5.4 Analiza badanych markerów względem stopnia zaawansowania nowotworu**

Podjąłem również analizę ekspresji mRNA *MTL5*, cytoplazmatycznej i jądrowej ekspresji IHC tesminy oraz jądrowej ekspresji IHC Ki-67 w stosunku do grup cechujących się określonymi wartościami T, N oraz M w klasyfikacji stopnia zaawansowania nowotworu.

##### **5.4.1 Analiza badanych markerów względem statusu T**

Badaną grupę podzielono na dwie podgrupy: przypadki o wartościach T1-2 (32 przypadki) oraz T3-4 (53 przypadki) (Tabela 4).

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w poziomie ekspresji mRNA *MTL5*, cytoplazmatycznej i jądrowej ekspresji IHC tesminy oraz jądrowej ekspresji IHC Ki-67 pomiędzy podgrupami cechującymi się wartościami T1-2 i T3-4 (odpowiednio Ryc. 6A, 6B, 6C i 6D).

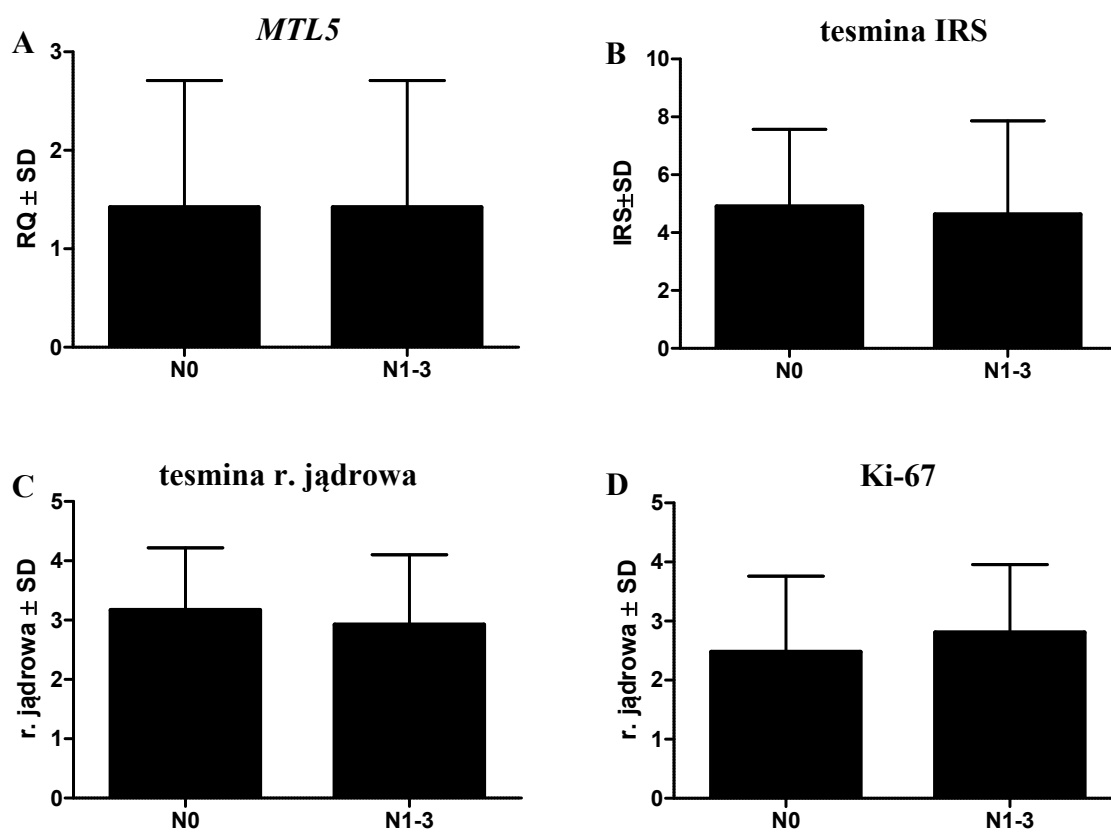


**Rycina 6.** Analiza statystyczna ekspresji mRNA *MTL5* (A), cytoplazmatycznej (B) i jądrowej (C) ekspresji IHC tesminy oraz jądrowej ekspresji IHC Ki-67 (D) nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy podgrupami T1-2 oraz T3-4 (odpowiednio  $p=0,42$ ;  $p=0,35$ ;  $p=0,71$ ;  $p=0,27$ , test Manna-Whitney'a), ( $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ ;  $***p<0.001$ ;  $****p<0.0001$ ).

### 5.4.2 Analiza badanych markerów względem statusu N

Badaną grupę podzielono na dwie podgrupy: przypadki o wartościach N0 (31 przypadków) oraz o wartościach N1-3 (54 przypadki) (Tabela 4).

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w poziomie ekspresji mRNA *MTL5*, cytoplazmatycznej i jądrowej ekspresji IHC tesminy oraz jądrowej ekspresji IHC Ki-67 pomiędzy podgrupami cechującymi się wartościami N0 oraz N1-3 (odpowiednio Ryc. 7A, 7B, 7C i 7D).



**Rycina 7.** Analiza statystyczna ekspresji mRNA *MTL5* (A), cytoplazmatycznej (B) i jądrowej (C) ekspresji IHC tesminy oraz jądrowej ekspresji IHC Ki-67 (D) nie wykazała istotnych

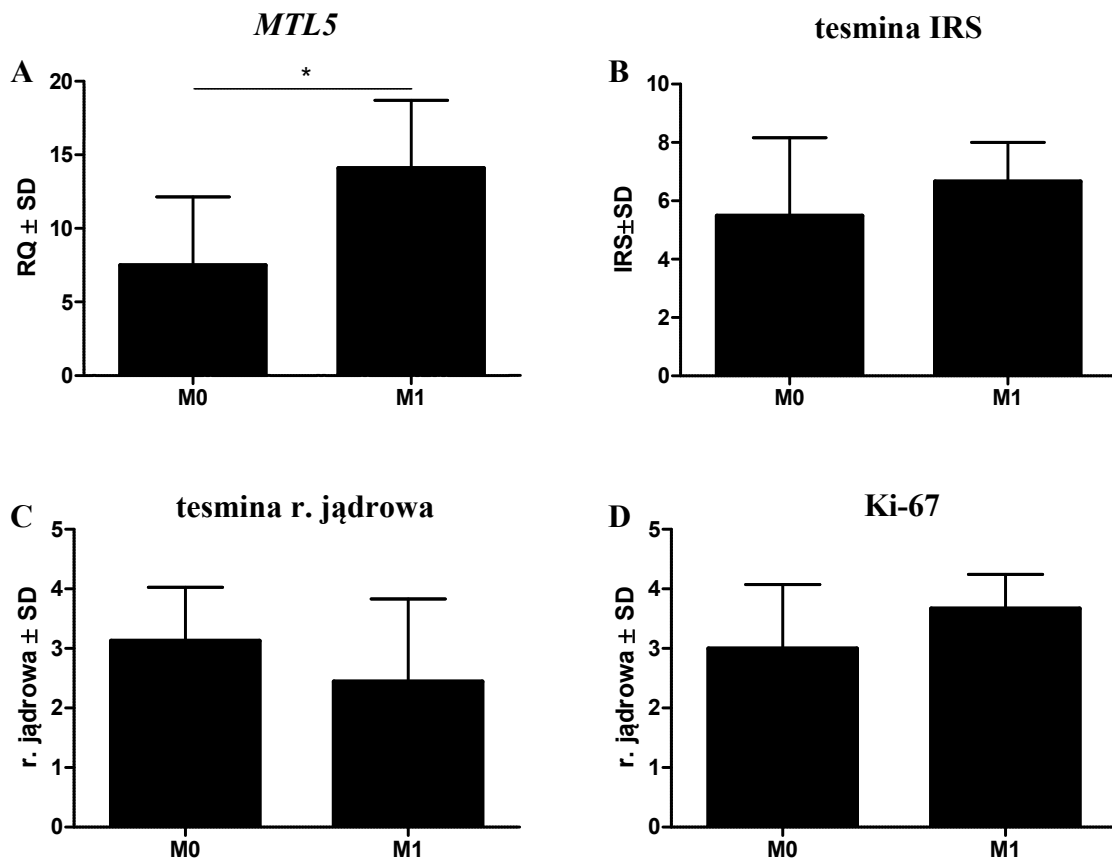


statystycznie różnic pomiędzy podgrupami N0 oraz N1-3 (odpowiednio  $p=0,98$ ;  $p=0,72$ ;  $p=0,51$ ;  $p=0,32$ , test Manna-Whitney'a), ( $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ ;  $***p<0.001$ ;  $****p<0.0001$ ).

### 5.4.3 Analiza badanych markerów względem statusu M

Badaną grupę podzielono na dwie podgrupy: przypadki o wartościach M0 (41 przypadków) oraz o wartości M1 (3 przypadki) (Tabela 4).

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotnie niższą ekspresję mRNA *MTL5* w podgrupie M0 w stosunku do podgrupy M1 ( $p<0,05$ , test Manna-Whitney'a, Ryc. 8A), poza tym nie wykazano istotnych różnic w poziomie cytoplazmatycznej i jądrowej ekspresji IHC tesminy oraz jądrowej ekspresji IHC Ki-67 pomiędzy podgrupami M0 i M1 (odpowiednio Ryc. 8B, 8C i 8D).

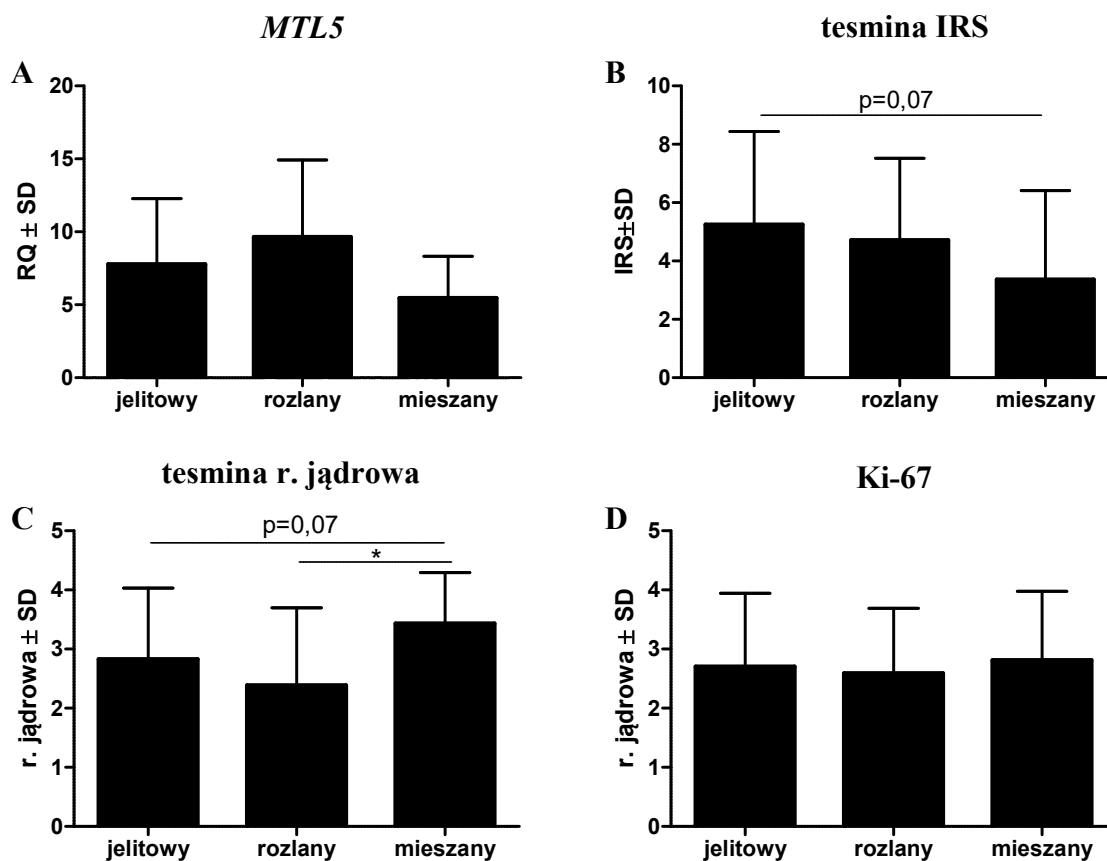


**Rycina 8.** Analiza statystyczna ekspresji mRNA *MTL5* (A) wykazała istotnie wyższą ekspresję mRNA *MTL5* w podgrupie przypadków o stopniu M1 w stosunku do podgrupy przypadków z stopniem M0 ( $p < 0,05$ , test Manna-Whitney'a). W przypadku cytoplazmatycznej (B) i jądrowej (C) ekspresji IHC tesminy oraz jądrowej ekspresji IHC Ki-67 (D) nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy podgrupami M0 oraz M1 (odpowiednio  $p = 0,44$ ;  $p = 0,3$ ;  $p = 0,26$ , test Manna-Whitney'a), (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

### 5.5 Analiza badanych markerów względem typu nowotworu wg klasyfikacji Laurena

Przeprowadziłem dodatkowo analizę statystyczną ekspresji mRNA *MTL5*, cytoplazmatycznej i jądrowej ekspresji IHC tesminy oraz jądrowej ekspresji IHC Ki-67 w stosunku do poszczególnych typów nowotworu żołądka wg klasyfikacji Laurena. Badaną grupę podzielono na 3 podgrupy wg typów nowotworu: typ jelitowy (31 przypadków), typ rozlany (22 przypadki) oraz typ mieszany (13 przypadków) (Tabela 4).

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotnie niższą, jądrową ekspresję IHC tesminy w podgrupie o rozlanym typie nowotworu w stosunku do podgrupy o typie mieszanym ( $p < 0,05$ , test Manna-Whitney'a, Ryc. 9C), poza tym nie wykazano innych istotnie statystycznie różnic w poziomie ekspresji mRNA *MTL5*, cytoplazmatycznej ekspresji IHC tesminy oraz jądrowej ekspresji IHC Ki-67 pomiędzy wyżej scharakteryzowanymi podgrupami (odpowiednio Ryc. 9A, 9B i 9D).



**Rycina 9.** Analiza statystyczna poziomu ekspresji mRNA *MTL5* (A) nie wykazała istotnie statystycznych różnic pomiędzy podgrupami o typie jelitowym i rozlanym, jelitowym i mieszanym ani rozlanym i mieszanym (odpowiednio  $p=0,37$ ;  $p=0,23$ ;  $p=0,16$ , test Manna-Whitney'a). W przypadku cytoplazmatycznej ekspresji IHC tesminy (B) nie wykazałem istotnych różnic pomiędzy podgrupami o typie jelitowym i rozlanym, jelitowym i mieszanym ani rozlanym i mieszanym (odpowiednio  $p=0,41$ ;  $p=0,07$ ;  $p=0,19$ , test Manna-Whitney'a). Jądrowa ekspresja IHC tesminy (C) była istotnie niższa w podgrupie przypadków o typie rozlanym w stosunku do podgrupy cechującej się typem mieszanym ( $p<0,05$ , test Manna-Whitney'a), nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami o typach

jelitowym i rozlanym ani jelitowym i mieszanym (odpowiednio  $p=0,29$ ;  $p=0,07$ , test Manna-Whitney'a). W przypadku analizy poziomu jądrowej ekspresji IHC Ki-67 (**D**) nie wykazałem istotnych statystycznych różnic pomiędzy podgrupami o typie jelitowym i rozlanym, jelitowym i mieszanym ani rozlanym i mieszanym (odpowiednio  $p=0,57$ ;  $p=0,87$ ;  $p=0,42$ , test Manna-Whitney'a), ( $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ ;  $***p<0.001$ ;  $****p<0.0001$ ).

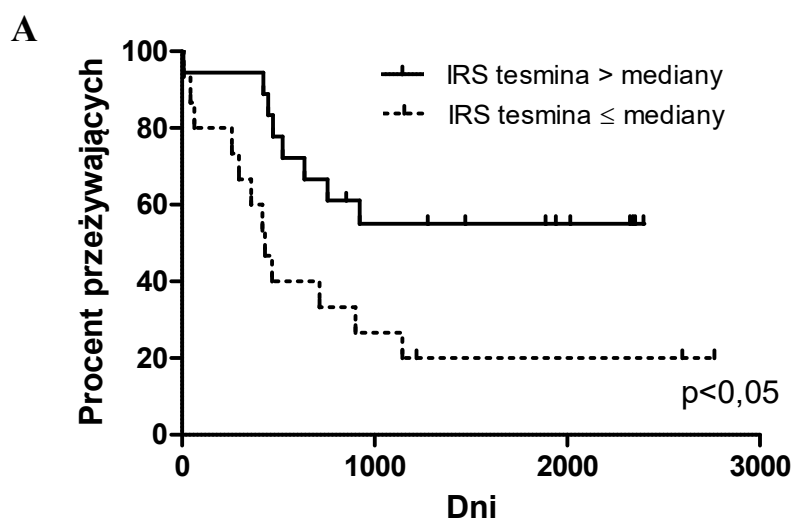
### 5.6 Analiza badanych markerów względem płci pacjentów

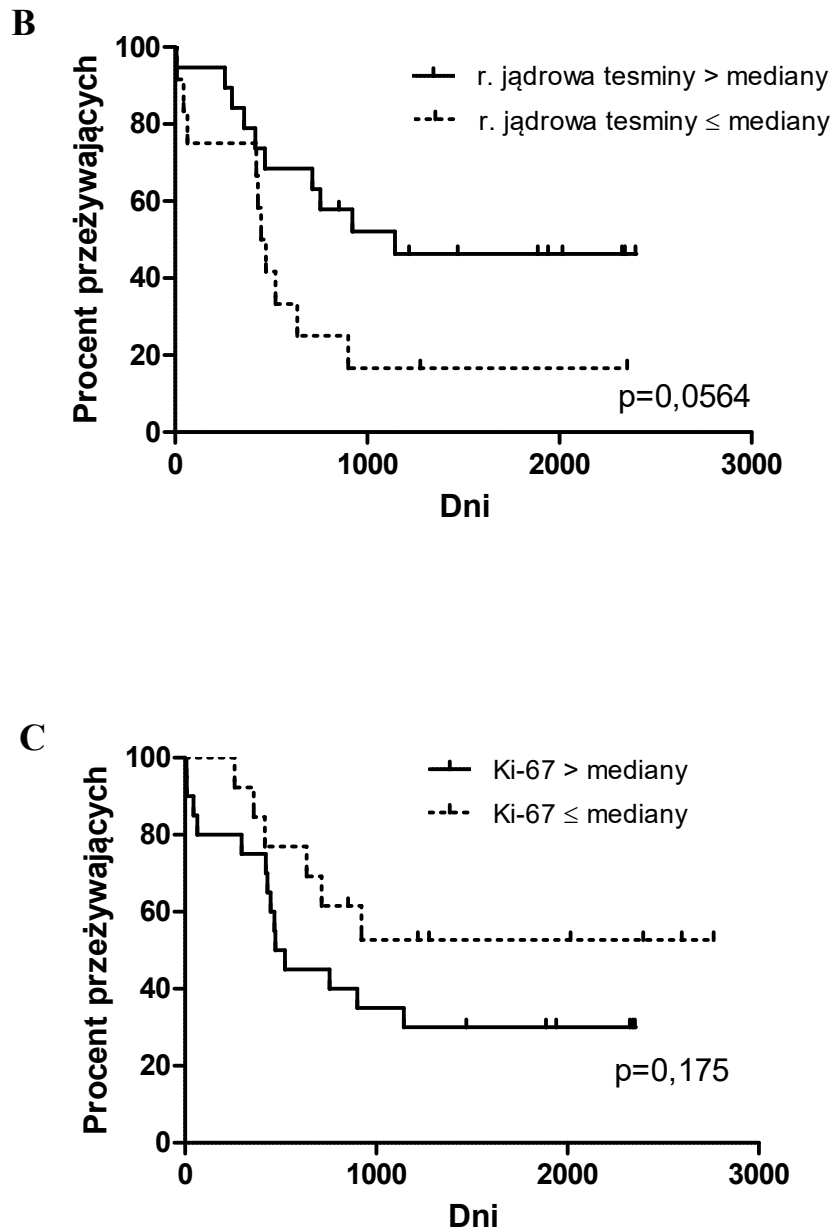
Grupa badana została podzielona wg płci na dwie podgrupy: płeć żeńska (32 przypadki) i płeć męska (53 przypadki) (Tabela 4).

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w poziomie ekspresji mRNA *MTL5*, cytoplazmatycznej i jądrowej ekspresji IHC tesminy oraz jądrowej ekspresji IHC Ki-67 pomiędzy podgrupami o różnych płciach (odpowiednio  $p=0,13$ ;  $p=0,97$ ;  $p=0,73$ ;  $p=0,54$ , test Manna-Whitney'a).

### 5.7 Analiza badanych markerów względem przeżyć odległych pacjentów

Analiza statystyczna dostępnych danych dotyczących przeżyć w grupie badanej wykazała, że przypadki raka żołądka cechujące się niższą od mediany cytoplazmatyczną ekspresją IHC tesminy cechowały się istotnie krótszym czasem przeżycia całkowitego w stosunku do grupy, w której ekspresja cytoplazmatyczna tego białka była wyższa od mediany ( $p < 0.05$ , test Mantela-Coxa, Ryc. 10A). Podobny trend obserwowałem w przypadku niższej od mediany, jądrowej ekspresji IHC tesminy, wykazując różnicę na granicy istotności ( $p = 0.056$ , test Mantela-Coxa, Ryc. 10B). W przypadku jądrowej ekspresji IHC Ki-67 wykazałem odwrotną tendencję – grupa przypadków z ekspresją Ki-67 poniżej mediany cechowała się dłuższym czasem przeżycia całkowitego (trend bez istotności statystycznej  $p = 0.17$ , test Mantela-Coxa, Ryc. 10C). Powyższe analizy ilustrują wykresy krzywych przeżyć Kaplana-Maiera zawarte na Rycinie 10. Ze względu na brak danych klinicznych nie przeprowadziłem analizy dotyczącej przeżyć w stosunku do ekspresji mRNA *MTL5*.





**Rycina 10.** Analiza statystyczna przeżyć całkowitych w zależności od poziomu cytoplazmatycznej (A) i jądrowej ekspresji IHC tesminy (B) oraz jądrowej ekspresji IHC Ki-67 (C).

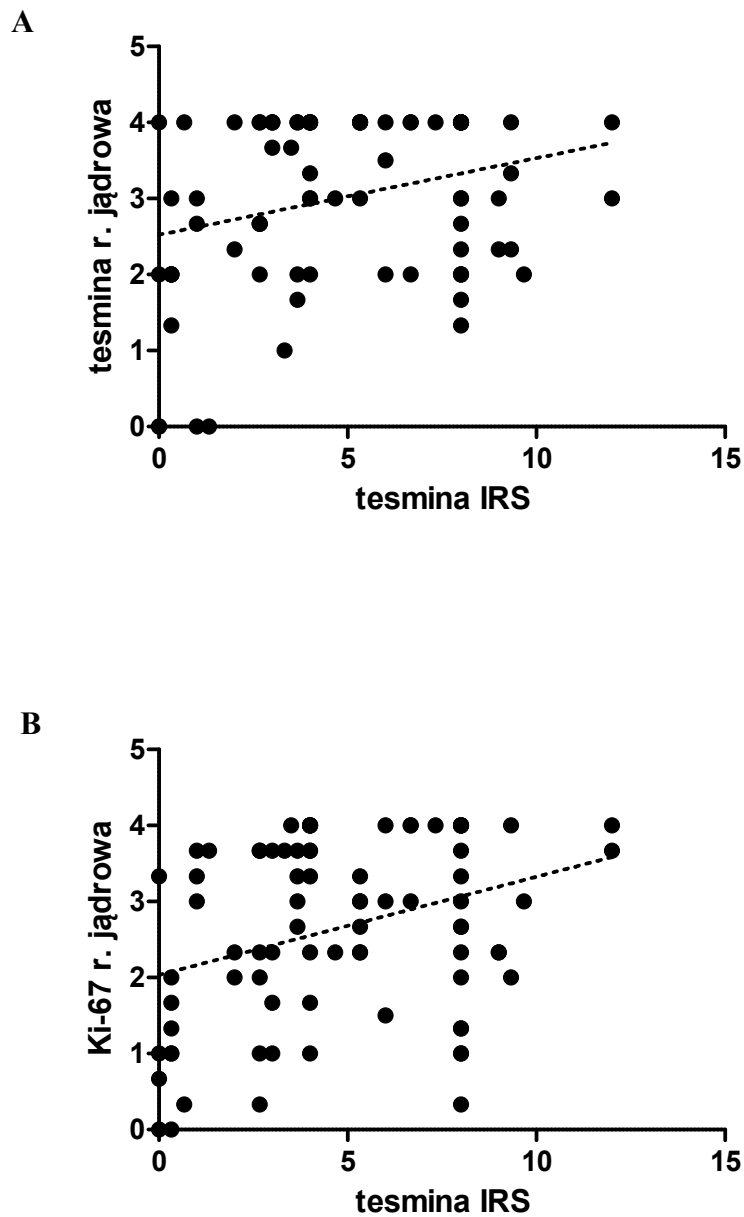
### **5.8 Korelacje ekspresji mRNA *MTL5* oraz ekspresji IHC tesminy i Ki-67 w grupie badanej**

Przeprowadzona analiza związku ekspresji mRNA *MTL5*, cytoplazmatycznej i jądrowej ekspresji IHC tesminy oraz jądrowej ekspresji IHC Ki-67 w grupie badanej, z wykorzystaniem testu Spearmana, wykazała istotne statystycznie, pozytywne korelacje pomiędzy:

- cytoplazmatyczną ekspresją IHC tesminy a jądrową ekspresją IHC tesminy ( $r=0,2288$ ;  $p<0,05$ ; Ryc. 11A),
- cytoplazmatyczną ekspresją IHC tesminy a jądrową ekspresją IHC Ki-67 ( $r=0,3274$ ;  $p<0,01$ ; Ryc. 11B).

Pozostałe korelacje nie okazały się istotnie statystycznie (Tabela 10).





**Rycina 11.** Dodatnia korelacja cytoplazmatycznej ekspresji IHC tesminy z: **(A)** jądrową ekspresją IHC tesminy ( $r=0,2288$ ;  $p<0,05$ , test korelacji Spearmana), **(B)** jądrową ekspresją IHC Ki-67 ( $r=0,3274$ ;  $p<0,01$ , test korelacji Spearmana).

Szczegółowe wyniki analizy korelacji pomiędzy badanymi wartościami przedstawia Tabela 10.

**Tabela 10.** Macierz korelacji pomiędzy ekspresją mRNA *MTL5*, cytoplazmatyczną i jądrową ekspresją IHC tesminy oraz jądrową ekspresją IHC Ki-67. W tabeli zostały przedstawione współczynniki korelacji, wyniki istotne statystycznie zostały oznaczone gwiazdkami (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

	<b>Tesmina IRS</b>	<b>Tesmina r. jądrowa</b>	<b>Ki-67</b>
<b>RQ <i>MTL5</i></b>	0,05296	-0,2811	-0,1006
<b>Tesmina IRS</b>		0,2288*	0,3274**
<b>Tesmina r. jądrowa</b>			-0,08019

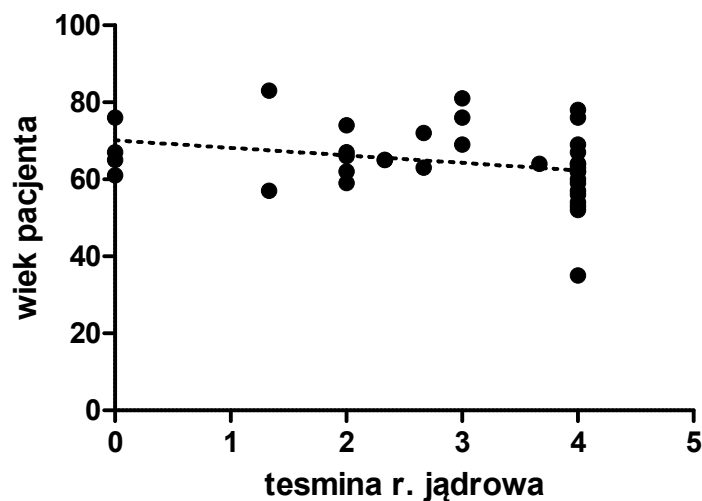
(\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

### 5.9 Korelacje ekspresji mRNA *MTL5* oraz ekspresji IHC tesminy i Ki-67 z stężeniem markerów nowotworowych Ca 19-9 oraz CEA w surowicy

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych korelacji pomiędzy ekspresją mRNA *MTL5*, cytoplazmatyczną i jądrową ekspresją IHC tesminy oraz jądrową ekspresją IHC Ki-67, a stężeniem markerów nowotworowych Ca 19-9 oraz CEA w surowicy w grupie badanej (test korelacji Spearmana).

### 5.10 Korelacje ekspresji mRNA *MTL5* oraz ekspresji IHC tesminy i Ki-67 z wiekiem pacjentów

Po przeprowadzeniu analizy statystycznej związku pomiędzy ekspresją mRNA *MTL5*, cytoplazmatyczną i jądrową ekspresją IHC tesminy oraz jądrową ekspresją IHC Ki-67, a wiekiem chorych w grupie badanej wykazano istotną statystycznie, ujemną korelację pomiędzy poziomem jądrowej ekspresji IHC tesminy oraz wiekiem pacjentów (Rycina 12). Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA *MTL5*, cytoplazmatyczną ekspresją IHC tesminy oraz jądrową ekspresją IHC Ki-67, a wiekiem chorych nie wykazała istotnych statystycznie różnic (test korelacji Spearmana).



**Rycina 12.** Ujemna korelacja jądrowej ekspresji IHC tesminy z wiekiem chorych w grupie badanej ( $r=-0,3687$ ;  $p<0,05$ , test korelacji Spearmana).

### 6. DYSKUSJA

W krajach rozwiniętych choroby nowotworowe są drugą najczęstszą przyczyną zgonów po chorobach układu sercowo-naczyniowego, a rak żołądka pozostaje jedną z najczęstszych przyczyn umieralności z powodu chorób nowotworowych [28, 29]. Ze względu na brak zadawalających metod leczenia, jak również częste rozpoznawanie tej choroby w stadium utrudniającym lub uniemożliwiającym całkowite wyleczenie, istnieje konieczność usprawniania metod diagnostycznych i poszukiwania nowych celów terapeutycznych, co pozwoliłoby na wcześniejsze wykrycie i poprawę wyników leczenia [27].

Tesmina jest białkiem posiadającym w swojej budowie sekwencje cysteinowe, dzięki czemu może tworzyć wiązania z metalami ciężkimi kontrolując ich stężenie w środowisku komórki [7]. Wiążąc metale (m.in. cynk), tesmina może pośrednio regulować aktywność czynników transkrypcyjnych zależnych od cynku, np. zawierających w swojej budowie domenę „palców cynkowych”. Wpływając na aktywność genów lub enzymów wymagających jonów cynku jako kofaktora, tesmina może potencjalnie oddziaływać na DNA komórki i regulować procesy proliferacji komórki [7, 9]. Tesmina może również chronić komórkę przed stresem związanym z obecnością metali ciężkich czy wpływać na indukcję procesu apoptozy [7, 9]. Właściwości te odgrywają rolę w procesie kancerogenezy. Ponadto, opisywane cechy upodobią ją funkcjonalnie do białek z rodziny MTs, których zaburzona ekspresja została potwierdzona w różnych nowotworach, m. in. w raku żołądka [22, 23]. Jednak biorąc pod uwagę aktualny stan wiedzy, rola tesminy w procesach kancerogenezy jest słabo poznana, a jej udział w procesach komórkowych w raku żołądka jest nieznan.

W przeprowadzonym eksperymencie wykazałem statystycznie wyższą, cytoplazmatyczną oraz jądrową ekspresję IHC białka tesminy jak również mRNA *MTL5*

w przypadku komórek raka żołądka w porównaniu do zdrowej tkanki. Powyższa obserwacja może świadczyć o roli tesminy w procesie kancerogenezy tego nowotworu. Być może podwyższona ekspresja tesminy ma działanie protekcyjne wobec komórek raka np. w sytuacji zaistnienia stresu komórkowego związanego z obecnością metali ciężkich lub zaburza inicjację procesu apoptozy w przypadku wystąpienia mutacji odpowiedzialnych za transformację nowotworową. Ponadto, dotychczas potwierdzono udział tesminy w procesach proliferacji w przypadku komórek przechodzących podziały mejotyczne oraz komórek raka niedrobnokomórkowego płuc. Wykazana przeze mnie jej wyższa ekspresja w komórkach raka żołądka w stosunku do prawidłowych komórek mogłaby sugerować jej rolę w stymulacji podziału komórek raka żołądka [1, 3, 9]. Ponadto, stwierdzona w moich badaniach istotnie wyższa ekspresja tesminy w jądrze komórkowym komórek raka żołądka może sugerować jej udział w procesach syntezy DNA oraz organizacji chromatyny analogicznie do procesu mejozy [7]. Opisywana w literaturze wzmożona ekspresja oraz translokacja tesminy z cytoplazmy do jądra komórkowego w przebiegu procesów podziału komórki były dodatkowo zintensyfikowane w środowisku bogatym w jony cynku [3, 4, 7]. W moich badaniach stwierdziłem dodatnią korelację pomiędzy ekspresją cytoplazmatyczną oraz jądrową tesminy co mogłoby sugerować bardziej złożoną rolę tego białka jako występującego w różnych lokalizacjach komórki.

Mimo niewielkiego stanu wiedzy na temat roli tesminy w chorobach nowotworowych wyniki moich badań zdają się w pewnym stopniu różnić od doniesień innych autorów [9, 63]. Dotychczas ekspresja tesminy została stwierdzona u człowieka w niedrobnokomórkowym raku płuc, raku płaskonabłonkowym szyjki macicy, jak również raku prostaty i żołądka [9, 62, 63]. Grzegorzółka i wsp. w badaniu obejmującym obszerną grupę przypadków niedrobnokomórkowego raka płuc wykazali istotnie wyższą ekspresję mRNA *MTL5* oraz cytoplazmatyczną i jądrową ekspresję IHC tesminy w komórkach niedrobnokomórkowego

raka płuc w stosunku do zdrowej tkanki płuca, jak również pozytywną korelację pomiędzy ekspresją tesminy i Ki-67. W badaniu wykazano również dodatnią korelację ekspresji tesminy z ekspresją MCM5 i MCM7, białek będących markerami proliferacji komórkowej. Wyciszenie mRNA *MTL5* w komórkach linii komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuc powodowało zmniejszenie ekspresji MCM5 i MCM7 oraz zmniejszenie ilości komórek wchodzących w fazę G2 podziału komórkowego, co może potwierdzać udział tesminy w procesach proliferacji [9]. Analogicznie jak w przeprowadzonym przeze mnie eksperymencie, Huang i wsp., w badaniach z użyciem metod IHC oraz PCR, udowodnili wyższą ekspresję tesminy w komórkach raka płaskonabłonkowego szyjki macicy w stosunku do prawidłowego nabłonka szyjki macicy. W opisywanym badaniu, ekspresja tesminy korelowała również ze zwiększoną agresywnością nowotworu oraz gorszym rokowaniem. Po przeprowadzeniu eksperymentu na liniach komórkowych raka szyjki macicy wykazano, że wyciszenie genu *MTL5* w znaczącym stopniu hamowało proliferację komórek nowotworowych [63]. Badanie rozszerzano również o wykorzystanie modelu podskórnych przeszczepów ksenogenicznych u myszy – potwierdzono, że wyciszenie genu *MTL5* może hamować wzrost guza [63]. Pomimo zbieżnych do moich wyników obserwacji ww. autorów o wyższej ekspresji tesminy w komórkach raka w porównaniu do komórek tkanek prawidłowych, stanowiących kontrolę, rezultaty własnych badań dotyczące związku tesminy z procesem proliferacji są w pewnym stopniu z nimi sprzeczne. W moich badaniach stwierdziłem słabą, pozytywną korelację pomiędzy ekspresją cytoplazmatyczną tesminy oraz ekspresją Ki-67, jakkolwiek nie odnotowałem podobnej zależności w przypadku ekspresji jądrowej. Ponieważ, według dostępnej literatury aktywność biologiczna tesminy (m.in. regulacja procesów podziałów komórkowych) dotyczy jądra komórkowego, powyższa obserwacja sugeruje, że mechanizmy regulujące proces proliferacji komórkowej w raku

żołądka przez tesminę są odmiennie niż analogiczne procesy w rakach niedrobnokomórkowych płuc oraz raku płaskonabłonkowym szyjki macicy i wymagają dalszych badań.

Dodatkowo, wykazana przez mnie istotnie wyższa ekspresja mRNA *MTL5* w grupie przypadków charakteryzujących się stopniem złośliwości histologicznej G1 w stosunku do grup o stopniu G2 i G3, może potwierdzać supresorowe właściwości badanego białka w przypadku raka żołądka. Ponadto, w mojej pracy wykazałem istotny statystycznie związek wyższego poziomu cytoplazmatycznej i jądrowej ekspresji IHC białka tesminy z dłuższym czasem przeżyć pacjentów, jakkolwiek brak odpowiedniej ilości danych nie pozwolił mi na określenie zależności przeżyć z poziomem ekspresji mRNA *MTL5*. Dłuższy czas przeżyć pacjentów z wyższą cytoplazmatyczną i jądrową ekspresją IHC tesminy oraz wyższa ekspresja *MTL5* w przypadkach o mniejszej złośliwości mogą sugerować supresorową rolę tesminy w raku żołądka.

Tesmina, będąc białkiem zawierającym w swojej budowie reszty cysteinowe, posiada zdolność do wiązania metali ciężkich, co może upodabniać ją do MTs pod względem funkcjonalności. Powyższe podobieństwo pozwala przypuszczać, że tesmina może odgrywać w raku żołądka podobną rolę do MTs. Na przestrzeni lat były opublikowane różne doniesienia na temat potencjalnej roli MTs w raku żołądka [64, 65, 66]. Badając metodą real time PCR ekspresję podtypu I izoformy, MT1J, Xu Y i wsp. wykazali, że jej ekspresja była istotnie niższa w komórkach nowotworowych raka żołądka, a niski poziom ekspresji istotnie korelował z zaawansowanym stadium choroby nowotworowej [64]. Ponadto, jej wysoka ekspresja wpływała hamująco na procesy proliferacyjne i prowadziła do apoptozy komórek [64]. Do podobnych wniosków doszli Xu G i wsp. - w badaniu przeprowadzonym na liniach komórkowych raka żołądka wykazali, że ekspresja podtypu MT1G również była niższa w komórkach raka w stosunku do prawidłowych komórek [65]. Dodatkowo potwierdzony został korzystny wpływ MT1G polegający na hamowaniu proliferacji komórkowej

oraz zmniejszaniu inwazyjności – wykazano, że wysoka ekspresja MT1G na drodze negatywnej regulacji ścieżki sygnałowej PI3K/AKT osłabia proces przejścia epitelialno-mezenhymalnego, zmniejszając potencjał przerzutowy komórki [65]. W badaniach dotyczących podtypu II izoformy MTs, MT2A, Pan i wsp. również wykazali istotnie niższą ekspresję MT2A w przypadku komórek raka żołądka w porównaniu komórkami pochodzącymi z linii komórkowej wyprowadzonej ze zdrowej tkanki żołądka. Dodatkową obserwacją była niższa ekspresja w raku nisko zróżnicowanym [66]. Inną interesującą obserwacją była niższa ekspresja MTs w komórkach żołądka pobieranych od pacjentów z potwierdzonym zakażeniem bakterią *H. pylori*, które jest uznawane za czynnik ryzyka rozwoju raka [67]. Ponadto, w grupie chorych z potwierdzonym zakażeniem *H. pylori*, ekspresja MTs była niższa wśród osób u których potwierdzono obecność wczesnej postaci raka żołądka w stosunku do osób bez potwierdzenia choroby nowotworowej [67]. Dostępna wiedza na temat niskiej ekspresji MTs w raku żołądka stoi niejako w opozycji do uzyskanych przeze mnie wyników dotyczących istotnie wyższej ekspresji tesminy w komórkach raka. Być może, pomimo strukturalnego podobieństwa, MTs oraz tesmina posiadają odmienne mechanizmy regulujące ekspresję, a sama zdolność do wiązania metali ciężkich nie warunkuje uczestnictwa w jednakowych procesach komórkowych.

W związku z hipotetyczną rolą tesminy jako koaktywatora warunkującego aktywność aldosteronu oraz dezoksykortykosteronu dla receptora mineralokortykoidowego, będącego zależnym od wyżej wymienionych związków czynnikiem transkrypcyjnym, można przypuszczać, że tesmina mogłaby spełniać rolę koaktywatora również dla ekspresji innych genów, w tym też dla genów związanych z procesami transformacji nowotworowej lub proliferacji komórkowej [6]. Aktualny stan wiedzy na temat tesminy nie pozwala jednak na jednoznaczne na potwierdzenie tej hipotezy.



Zgodnie z posiadaną przez mnie wiedzą, przeprowadzone przeze mnie badanie jest pierwszym określającym ekspresję tesminy na poziomie genu oraz białka w gruczolakoraku i prawidłowej tkance żołądka. Istotnie wyższa ekspresja cytoplazmatyczna i jądrowa mRNA *MTL5* i białka tesminy w komórkach raka w porównaniu z tkanką niezmienną nowotworowo, sugeruje możliwą rolę tesminy w procesie kancerogenezy w raku żołądka. Mimo niewielkiego stanu wiedzy na temat roli opisywanego białka w biologii nowotworów, jego wyższa ekspresja została dotychczas potwierdzona w niedrobnokomórkowym raku płuca oraz raku płaskonabłonkowym szyjki macicy, co jest wynikiem zbieżnym z rezultatem moich badań [9, 66]. Niewątpliwie niezbędna jest kontynuacja badań, które umożliwiłyby poszerzenie wiedzy na temat roli tesminy w raku żołądka oraz innych nowotworach złośliwych człowieka.

## 7. WNIOSKI

1. Podwyższona ekspresja mRNA *MTL5* jak również cytoplazmatyczna i jądrowa ekspresja IHC tesminy w komórkach raka żołądka w porównaniu z komórkami niezmiennymi nowotworowo mogą świadczyć o udziale tesminy w kancerogenezie raka żołądka.

2. Wyższa ekspresja mRNA *MTL5* w stopniu złośliwości G1 w porównaniu do stopnia G2 i G2 oraz dłuższy czas przeżyć pacjentów z wyższą cytoplazmatyczną i jądrową ekspresją IHC tesminy mogą sugerować supresorową rolę tesminy w raku żołądka oraz świadczyć o jej potencjalnej roli jako pozytywnego czynnika prognostycznego w tej chorobie.

### 8. STRESZCZENIE

Tesmina (ang. testis specific metallothionein like protein), zwane też MTL5 (ang. metallothionein like protein 5) jest białkiem o masie 55 kDa, posiadającym w swojej budowie sekwencje cysteinowe. Ta określona cecha budowy umożliwia tesminie oddziaływanie na DNA komórki jak również wiązanie metali ciężkich wpływając na ich homeostazę komórkową. Postuluje się, że tesmina może mieć wpływ na procesy związane z replikacją komórki i indukcją apoptozy jak również chronić komórkę przed stresem związanym z obecnością metali ciężkich. Właściwości te mogą odgrywać rolę w procesie kancerogenezy. Ponadto, opisywane cechy upodobniają ją funkcjonalnie do białek z rodziny metalotionein, których zaburzona ekspresja została potwierdzona w różnych rodzajach nowotworów. Dotychczas potwierdzono istotnie wyższą ekspresję tesminy w komórkach nowotworowych niedrobnokomórkowego raka płuc oraz raka płaskonabłonkowego szyjki macicy.

Rak żołądka stanowi globalnie piątą pod uwagę zapadalności oraz czwarty pod względem umieralności nowotwór złośliwy. Cechuje go skąpoobjawowy przebieg oraz częste rozpoznanie w stadium utrudniającym lub uniemożliwiającym całkowite wyleczenie. Najczęstszym typem histologicznym jest rak gruczołowy. Wśród czynników ryzyka wymienia się m. in. nieodpowiednią dietę, małą aktywność fizyczną, picie alkoholu, palenie tytoniu czy zakażenie bakterią *H. pylori*.

Celem mojej pracy było zbadanie ekspresji tesminy (*MTL5*) na poziomie mRNA i białka w komórkach raka oraz niezmienionej nowotworowo tkance żołądka. Ponadto celem było określenie związku pomiędzy uzyskanymi rezultatami oraz danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów, w tym przeżyciami całkowitymi chorych.

Materiał do przeprowadzonych badań stanowiły fragmenty guzów oraz zdrowej tkanki żołądka pobierane i archiwizowane z preparatów chirurgicznych pacjentów z potwierdzonym wcześniej histopatologicznie rakiem żołądka. Pobierany materiał był utrwalany w formalinie a następnie zabezpieczany w postaci bloczków parafinowych jak również w płynie RNAlater. Materiał ten pochodził od pacjentów operowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej USK im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu. Ponadto, uzyskano archiwalny materiał guzów nowotworowych w postaci bloczków parafinowych z Zakładu Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej. Zgromadzony materiał badawczy stanowiło 85 przypadków raka żołądka oraz 38 przypadków niezmięnionej nowotworowo tkanki żołądka.

Na skrawkach parafinowych przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne (IHC) z użyciem przeciwciał przeciwko tesminie oraz Ki-67. Ocenie podlegał stopień ekspresji cytoplazmatycznej i jądrowej ww. białek. Poziom ekspresji mRNA *MTL5* był określany za pomocą techniki Real-Time PCR. Uzyskane rezultaty były analizowane w odniesieniu do danych kliniczno-patologicznych (stopień złośliwości histologicznej, klasyfikacja stopnia zaawansowania nowotworu, typ nowotworu wg klasyfikacji Laurena, wiek oraz płeć pacjentów, wartości markerów nowotworowych, przeżycia całkowite pacjentów).

Wykazałem ekspresję mRNA *MTL5* oraz ekspresję IHC cytoplazmatyczną i jądrową tesminy i Ki-67 w komórkach raka żołądka oraz w komórkach zdrowej tkanki żołądka. Ekspresja mRNA *MTL5* oraz ekspresja IHC cytoplazmatyczna i jądrowa tesminy jak również Ki-67 były istotnie wyższe w przypadku raka żołądka (odpowiednio  $p < 0,05$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$  test Manna-Whitney'a). Cytoplazmatyczna ekspresja tesminy korelowała istotnie dodatnio z ekspresją jądrową tesminy ( $r = 0,2288$ ;  $p < 0,05$ ) oraz ekspresją Ki-67 ( $r = 0,3274$ ;  $p < 0,01$ ). Dodatkowo wykazałem, że niższa, cytoplazmatyczną ekspresja tesminy korelowała z niższymi wartościami przeżyć ( $p < 0,05$ , test Mantela-Coxa).

W oparciu o przeprowadzone badania stwierdziłem ekspresję tesminy w prawidłowej tkance żołądka jak również w komórkach raka żołądka zarówno na poziomie mRNA i białka. Ponadto wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują na potencjalny udział tesminy w procesie transformacji nowotworowej raka żołądka.

### 9. SUMMARY

Tesmin (testis specific metallothionein like protein), also known as MTL5 (metallothionein like protein 5) is a 55 kDa weight protein that contains cysteine sequences in its structure. This specific structural feature enables tesmin to interact with cell DNA as well as bind heavy metals, conditioning their cellular homeostasis. It is considered that tesmin may affect the processes related to cell replication, induction of apoptosis and protection against heavy metal presence induced cellular stress. These properties may have impact on carcinogenesis process. In addition, described features determine tesmin's functional similarity to proteins from the metallothionein family, whose disturbed expression has been confirmed in various types of cancer. So far, significantly higher expression of tesmin has been described in cancer cells of non-small cell lung cancer and cervical cancer.

Globally, gastric cancer is the fifth most common malignant tumor in terms of incidence and the fourth most common in terms of mortality. It is characterized by oligosymptomatic course and frequent diagnosis at a stage that makes complete recovery difficult or impossible. The most common histological type is adenocarcinoma. Among the risk factors are poor diet, low physical activity, alcohol consumption, smoking or *H. pylori* infection.

The aim of my research was to investigate the cytoplasmic and nuclear expression of tesmin (*MTL5*) at the mRNA and protein level in cancer cells and non-cancerous gastric tissue. Additionally, we tried to determine the relationship between the obtained results and clinical and pathological data of patients, including overall survival.

The material for the study consisted of fragments of tumors and healthy gastric tissue obtained from surgical specimens from patients with histopathologically confirmed gastric cancer. The collected material was partially fixed in formaline and then protected in the form

of paraffin blocks, partially fixed in RNAlater fluid. Collected material were obtained from patients operated in the Department of General Surgery and Oncological Surgery of University Clinical Hospital in Wrocław. In addition, archival material of cancer tumors in the form of paraffin blocks was obtained from the Department of Pathology and Oncological Cytology. The research material consisted of 85 cases of gastric cancer and 38 cases of non-cancerous gastric tissue.

Immunohistochemical (IHC) reactions were performed on paraffin sections using antibodies against tesmin and Ki-67. The degree of cytoplasmic and nuclear expression of tesmin as well as Ki-67 was evaluated. mRNA *MTL5* expression level was determined by Real-Time PCR technique. The obtained results were analyzed in relation to clinicopathological data (histological malignancy, tumor staging, type of tumor according to Lauren's classification, patients age and sex, tumor marker values, overall survival patients data).

I demonstrated expression of mRNA *MTL5* and IHC cytoplasmic and nuclear expression of tesmin and Ki-67 in gastric cancer and normal gastric tissue cells. The expression of mRNA *MTL5* and IHC cytoplasmic and nuclear expression of tesmin and Ki-67 was significantly higher cancer cells compared to healthy tissue ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$  Mann-Whitney test). Cytoplasmic tesmin expression correlated significantly positively with nuclear tesmin expression ( $r = 0,2288$ ;  $p < 0,05$ ) and Ki-67 expression ( $r = 0,3274$ ;  $p < 0,01$ ). In addition, I showed that lower cytoplasmic expression of tesmin correlated with lower survival rates ( $p < 0,05$ , Mantel-Cox test).

Based on the conducted research, I found the expression of tesmin in normal gastric tissue as well as in gastric cancer cells, both at the mRNA and protein level. In addition, results of my research indicate the potential involvement of tesmin in the process of malignant transformation in gastric cancer.

**10. PIŚMIENICTWO**

1. Sutou, S., Miwa, K., Matsuura, T., Kawasaki, Y., Ohinata, Y., & Mitsui, Y. (2003). Native tesmin is a 60-kilodalton protein that undergoes dynamic changes in its localization during spermatogenesis in mice. *Biology of reproduction*, 68(5), 1861–1869. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.005603>
2. Sugihara, T., Wadhwa, R., Kaul, S. C., & Mitsui, Y. (1999). A novel testis-specific metallothionein-like protein, tesmin, is an early marker of male germ cell differentiation. *Genomics*, 57(1), 130–136. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5756>
3. Olesen, C., Møller, M., & Byskov, A. G. (2004). Tesmin transcription is regulated differently during male and female meiosis. *Molecular reproduction and development*, 67(1), 116–126. <https://doi.org/10.1002/mrd.20007>.
4. Matsuura, T., Kawasaki, Y., Miwa, K., Sutou, S., Ohinata, Y., Yoshida, F., & Mitsui, Y. (2002). Germ cell-specific nucleocytoplasmic shuttling protein, tesmin, responsive to heavy metal stress in mouse testes. *Journal of inorganic biochemistry*, 88(2), 183–191. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(01\)00377-4](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(01)00377-4)
5. Maremanda, K. P., Khan, S., & Jena, G. (2014). Zinc protects cyclophosphamide-induced testicular damage in rat: involvement of metallothionein, tesmin and Nrf2. *Biochemical and biophysical research communications*, 445(3), 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.055>
6. Rogerson, F. M., Yao, Y. Z., Young, M. J., & Fuller, P. J. (2014). Identification and characterization of a ligand-selective mineralocorticoid receptor coactivator. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(10), 4200–4210. <https://doi.org/10.1096/fj.13-242479>



7. Grzegorzółka J., Podhorska-Okołów M., Krawczuk Z., Dzięgiel P. (2019). The role of tesmin in the physiology and pathogenesis of human diseases. *Postepy Hig Med Dosw* 2019; 73: 762-767. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0013.6592>
8. AlphaFold Protein Structure Database <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9Y4I5> (28.04.2023)
9. Grzegorzolka, J., Olbromski, M., Gomulkiewicz, A., Piotrowska, A., Glatzel-Plucinska, N., Ratajczak, K., Sputa-Grzegorzolka, P., Rzechonek, A., Werynska, B., Podhorska-Okołow, M., & Dzięgiel, P. (2021). Role of tesmin expression in non-small cell lung cancer. *Oncology letters*, 21(1), 48. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12309>
10. Liu K, Tan LJ, Wang P, et al. Functional relevance for associations between osteoporosis and genetic variants. *PLoS One*. 2017;12(4):e0174808. Published 2017 Apr 3. doi: 10.1371/journal.pone.0174808
11. Nedeljkovic I, Terzikhan N, Vonk JM, et al. A Genome-Wide Linkage Study for Chronic Obstructive Pulmonary Disease in a Dutch Genetic Isolate Identifies Novel Rare Candidate Variants. *Front Genet*. 2018; 9:133. Published 2018 Apr 19. doi:10.3389/fgene.2018.00133
12. Archer NP, Perez-Andreu V, Scheurer ME, et al. Family-based exome-wide assessment of maternal genetic effects on susceptibility to childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia in hispanics. *Cancer*. 2016;122(23):3697-3704. doi:10.1002/cncr.30241
13. Penney KL, Sinnott JA, Tyekuceva S, et al. Association of prostate cancer risk variants with gene expression in normal and tumor tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015;24(1):255-260. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0694-T
14. Ferrucci A, Nonnemacher MR, Wigdahl B. Extracellular HIV-1 viral protein R affects astrocytic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity and neuronal survival. *J Neurovirol*. 2013;19(3):239-253. doi:10.1007/s13365-013-0170-1

15. Atrian, S., & Capdevila, M. (2013). Metallothionein-protein interactions. *Biomolecular concepts*, 4(2), 143–160. <https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0049>
16. Palacios, O., Atrian, S., & Capdevila, M. (2011). Zn- and Cu-thioneins: a functional classification for metallothioneins?. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 16(7), 991–1009. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0827-2>
17. Babula, P., Masarik, M., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborova, M., Trnkova, L., Skutkova, H., Provaznik, I., Hubalek, J., & Kizek, R. (2012). Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics : integrated biometal science*, 4(8), 739–750. <https://doi.org/10.1039/c2mt20081c>
18. Theocharis, S. E., Margeli, A. P., Klijanienko, J. T., & Kouraklis, G. P. (2004). Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology*, 45(2), 103–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2004.01922.x>
19. Dziegiel, P., Pula, B., Kobierzycki, C., Stasiolek, M., & Podhorska-Okolow, M. (2016). Metallothioneins in Normal and Cancer Cells. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 218, 1–117. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27472-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27472-0_1)
20. Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., & Rofe, A. M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 59(4), 627–647. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8454-2>
21. Eckschlager, T., Adam, V., Hrabeta, J., Figova, K., & Kizek, R. (2009). Metallothioneins and cancer. *Current protein & peptide science*, 10(4), 360–375. <https://doi.org/10.2174/138920309788922243>
22. Cherian, M. G., Jayasurya, A., & Bay, B. H. (2003). Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation research*, 533(1-2), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.013>

23. Méplan, C., Richard, M. J., & Hainaut, P. (2000). Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. *Oncogene*, *19*(46), 5227–5236. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203907>
24. Chen, Y., Quan, R., Bhandari, A., Chen, Z., Guan, Y., Xiang, J., You, J., & Teng, L. (2019). Low metallothionein 1M (MT1M) is associated with thyroid cancer cell lines progression. *American journal of translational research*, *11*(3), 1760–1770.
25. Pan, Y. M., Xing, R., Cui, J. T., Li, W. M., & Lü, Y. Y. (2013). Clinicopathological significance of altered metallothionein 2A expression in gastric cancer according to Lauren's classification. *Chinese medical journal*, *126*(14), 2681–2686.
26. Fu, C. L., Pan, B., Pan, J. H., & Gan, M. F. (2017). Metallothionein 1M suppresses tumorigenesis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, *8*(20), 33037–33046. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16521>
27. Jeziorski A, Rutkowski P, Wysocki W. Chirurgia Onkologiczna. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2018, 12-13 oraz 1019-1053
28. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
29. Didkowska J, Wojciechowska U, Barańska K, Michałek I, Olasek P, Miklewska M. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2020 roku. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie. Dostępne na stronie <http://onkoogia.org.pl/raporty>; dostęp na dzień 18.02.2023
30. Lee YY, Derakhshan MH. Environmental and lifestyle risk factors of gastric cancer. *Arch Iran Med*. 2013;16(6):358-365.

31. Blair VR, McLeod M, Carneiro F, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical practice guidelines. *Lancet Oncol.* 2020;21(8):e386-e397. doi:10.1016/S1473-2045(20)30219-9
32. Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, et al. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J Med Genet.* 2004;41(7):508-517. doi:10.1136/jmg.2004.018275
33. Nasierowska-Guttmajer A, Górnicka B. Zalecenia do diagnostyki histopatologicznej nowotworów. Centrum Onkologii, Oddział Gliwice, Polskie Towarzystwo Patologów, Warszawa 2013
34. Chen YC, Fang WL, Wang RF, et al. Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2016;22(1):197-202. doi:10.1007/s12253-015-9996-6
35. Wang Z, Jensen MA, Zenklusen JC. A Practical Guide to The Cancer Genome Atlas (TCGA). *Methods Mol Biol.* 2016; 1418:111-141. doi:10.1007/978-1-4939-3578-9\_6
36. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer.* 2011;14(2):101-112. doi:10.1007/s10120-011-0041-5
37. Yang K, Lu L, Liu H, et al. A comprehensive update on early gastric cancer: defining terms, etiology, and alarming risk factors. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;15(3):255-273. doi:10.1080/17474124.2021.1845140
38. Yao K, Uedo N, Kamada T, et al. Guidelines for endoscopic diagnosis of early gastric cancer. *Dig Endosc.* 2020;32(5):663-698. doi:10.1111/den.13684
39. Cardoso R, Coburn N, Seevaratnam R, et al. A systematic review and meta-analysis of the utility of EUS for preoperative staging for gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2012;15 Suppl 1: S19-S26. doi:10.1007/s10120-011-0115-4

40. Marcus C, Subramaniam RM. PET/Computed Tomography and Precision Medicine: Gastric Cancer. *PET Clin.* 2017;12(4):437-447. doi: 10.1016/j.cpet.2017.05.004
41. Zhang Y, Yu J. The role of MRI in the diagnosis and treatment of gastric cancer. *Diagn Interv Radiol.* 2020;26(3):176-182. doi:10.5152/dir.2019.19375
42. Leake PA, Cardoso R, Seevaratnam R, et al. A systematic review of the accuracy and indications for diagnostic laparoscopy prior to curative-intent resection of gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2012;15 Suppl 1:S38-S47. doi:10.1007/s10120-011-0047-z
43. Feng F, Tian Y, Xu G, et al. Diagnostic and prognostic value of CEA, CA19-9, AFP and CA125 for early gastric cancer. *BMC Cancer.* 2017;17(1):737. Published 2017 Nov 9. doi:10.1186/s12885-017-3738-y
44. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(6):1471-1474. doi:10.1245/s10434-010-0985-4
45. Ono H, Yao K, Fujishiro M, et al. Guidelines for endoscopic submucosal dissection and endoscopic mucosal resection for early gastric cancer (second edition). *Dig Endosc.* 2021;33(1):4-20. doi:10.1111/den.13883
46. Liu Q, Ding L, Qiu X, Meng F. Updated evaluation of endoscopic submucosal dissection versus surgery for early gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int J Surg.* 2020; 73:28-41. doi:10.1016/j.ijsu.2019.11.027
47. Santoro R, Ettorre GM, Santoro E. Subtotal gastrectomy for gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(38):13667-13680. doi:10.3748/wjg.v20.i38.13667
48. Zhao L, Ling R, Chen J, et al. Clinical Outcomes of Proximal Gastrectomy versus Total Gastrectomy for Proximal Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dig Surg.* 2021;38(1):1-13. doi:10.1159/000506104

49. Liu F, Huang C, Xu Z, et al. Morbidity and Mortality of Laparoscopic vs Open Total Gastrectomy for Clinical Stage I Gastric Cancer: The CLASS02 Multicenter Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2020;6(10):1590-1597. doi:10.1001/jamaoncol.2020.3152
50. Songun I, Putter H, Kranenbarg EM, Sasako M, van de Velde CJ. Surgical treatment of gastric cancer: 15-year follow-up results of the randomised nationwide Dutch D1D2 trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(5):439-449. doi:10.1016/S1470-2045(10)70070-X
51. Degiuli M, Reddavid R, Tomatis M, et al. D2 dissection improves disease-specific survival in advanced gastric cancer patients: 15-year follow-up results of the Italian Gastric Cancer Study Group D1 versus D2 randomised controlled trial. *Eur J Cancer.* 2021; 150:10-22. doi: 10.1016/j.ejca.2021.03.031
52. Choi AH, Kim J, Chao J. Perioperative chemotherapy for resectable gastric cancer: MAGIC and beyond. *World J Gastroenterol.* 2015;21(24):7343-7348. doi:10.3748/wjg.v21.i24.7343
53. Moussa O, Bhogal RH, Malietzis G, et al. Effect of perioperative FLOT versus ECF/ECX on short-term outcomes after surgery for resectable oesophagogastric adenocarcinoma: propensity score-matched study. *BJS Open.* 2022;6(1): zrac003. doi:10.1093/bjsopen/zrac003
54. Adenis A, Samalin E, Mazard T, Portales F, Mourregot A, Ychou M. Le protocole FLOT est-il le nouveau standard de chimiothérapie péri-opératoire des cancers de l'estomac ? [Does the FLOT regimen a new standard of perioperative chemotherapy for localized gastric cancer?]. *Bull Cancer.* 2020;107(1):54-60. doi: 10.1016/j.bulcan.2019.12.005
55. Smalley SR, Benedetti JK, Haller DG, et al. Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus

- observation after curative gastric cancer resection. *J Clin Oncol.* 2012;30(19):2327-2333. doi:10.1200/JCO.2011.36.7136
56. Huang JY, Xu YY, Sun Z, et al. Comparison different methods of intraoperative and intraperitoneal chemotherapy for patients with gastric cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(9):4379-4385. doi:10.7314/apjcp.2012.13.9.4379
57. Khan H, Johnston FM. Current role for cytoreduction and HIPEC for gastric cancer with peritoneal disease. *J Surg Oncol.* 2022;125(7):1176-1182. doi:10.1002/jso.26894
58. Liang X, Zhu J, Li Y, et al. Treatment strategies for metastatic gastric cancer: chemotherapy, palliative surgery or radiotherapy. *Future Oncol.* 2020;16(5):91-102. doi:10.2217/fon-2019-0495
59. Kobierzycki C, Pula B, Wojnar A, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P. Tissue microarray technique in evaluation of proliferative activity in invasive ductal breast cancer. *Anticancer Res.* 2012;32(3):773-777.
60. Remmele W, Stegner HE: Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe*, 1987, 8(3): 138.
61. Grzegorzolka J, Biala M, Wojtyra P, et al. Expression of EMT Markers SLUG and TWIST in Breast Cancer. *Anticancer Res.* 2015;35(7):3961-3968.
62. Oh, J. H., Yang, J. O., Hahn, Y., Kim, M. R., Byun, S. S., Jeon, Y. J., Kim, J. M., Song, K. S., Noh, S. M., Kim, S., Yoo, H. S., Kim, Y. S., & Kim, N. S. (2005). Transcriptome analysis of human gastric cancer. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 16(12), 942–954. <https://doi.org/10.1007/s00335-005-0075-2>

63. Huang, Y., Wu, Q., & Tan, X. (2022). Metallothionein-like 5 expression is correlated with poor prognosis and promotes proliferation of cervical squamous cell carcinoma. *Bioengineered*, *13*(3), 6955–6965. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2036901>
64. Xu, Y., Zhang, G., Zou, C., Zhang, H., Gong, Z., Wang, W., Ma, G., Jiang, P., & Zhang, W. (2018). LncRNA MT1JP Suppresses Gastric Cancer Cell Proliferation and Migration Through MT1JP/MiR-214-3p/RUNX3 Axis. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, *46*(6), 2445–2459. <https://doi.org/10.1159/000489651>
65. Xu, G., Fan, L., Zhao, S., & OuYang, C. (2022). MT1G inhibits the growth and epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells by regulating the PI3K/AKT signaling pathway. *Genetics and molecular biology*, *45*(1), e20210067. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2021-0067>
66. Pan, Y. M., Xing, R., Cui, J. T., Li, W. M., & Lü, Y. Y. (2013). Clinicopathological significance of altered metallothionein 2A expression in gastric cancer according to Lauren's classification. *Chinese medical journal*, *126*(14), 2681–2686.
67. Mitani, T., Shirasaka, D., Aoyama, N., Miki, I., Morita, Y., Ikehara, N., Matsumoto, Y., Okuno, T., Toyoda, M., Miyachi, H., Yoshida, S., Chayahara, N., Hori, J., Tamura, T., Azuma, T., & Kasuga, M. (2008). Role of metallothionein in Helicobacter pylori-positive gastric mucosa with or without early gastric cancer and the effect on its expression after eradication therapy. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *23*(8 Pt 2), e334–e339. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.05124.x>