

## Ocena ekspresji TNF- $\alpha$ oraz kolagenu I i III w tkance raka żołądka

Assessment of TNF- $\alpha$  and collagen type I and III expression in the gastric carcinoma tissue

Robert Partyka<sup>1</sup>, Daniel Knap<sup>3</sup>, Grażyna Biedrzyńska-Macyszyn<sup>2</sup>, Janusz Kobiela<sup>1</sup>, Przemysław Jałowiecki<sup>1</sup>, Danuta Kokocińska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Anestezjologii, Intensywnej Terapii i Medycyny Ratunkowej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach (Department of Anesthesiology, Intensive Treatment and Emergency Medicine, Medical University of Silesia, Katowice, Poland)

<sup>2</sup>Katedra Patomorfologii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach (Department of Pathomorphology, Medical University of Silesia, Katowice, Poland)

<sup>3</sup>Katedra Radiologii i Medycyny Nuklearnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach (Department of Radiology and Nuclear Medicine, Medical University of Silesia, Katowice, Poland)

### Streszczenie

**Wstęp:** Nowotwory są drugą, po chorobach naczyń, przyczyną zgonów w Polsce. Ostatnio zachorowalność na raka żołądka się zmniejszyła, ale śmiertelność jest stale na wysokim poziomie.

**Materiał i metody:** Materiał do badań stanowiły tkanki pobrane od 24 pacjentów z rozpoznaniem histopatologicznie rakiem gruczołowym żołądka. Pacjentów podzielono na dwie grupy: pacjentów bez przerzutów do wątroby (G1) i pacjentów z przerzutami (G2). RNA izolowano z homogenatów po wstępnym kruszeniu komórek w ciekłym azocie. Stężenie RNA oznaczano techniką spektrofotometryczną z zastosowaniem RNA/DNA kalkulator „Gene Quant” (LKB Pharmacia Biotech). Ocenie poddano ekspresję tkankową genów dla TNF- $\alpha$ , kolagenu typu I i kolagenu typu III.

**Wyniki:** Zwiększoną ekspresję genu dla TNF- $\alpha$  zaobserwowano jedynie u 2 pacjentów z grupy G1, podczas gdy w grupie G2 wyższą ekspresję zaobserwowano u 5 z 12 chorych w porównaniu ze zdrową tkanką. Zwiększoną ekspresję kolagenu I stwierdzono u 6 z 12 pacjentów z grupy G1 w porównaniu ze zdrową tkanką. W tkankach z przerzutami (G2) podwyższoną ekspresję genu dla kolagenu typu I stwierdzono w 5 badanych tkankach w porównaniu z marginesem. Zwiększoną ekspresję genu dla kolagenu III w porównaniu z marginesem stwierdzono w 8 z 12 badanych tkanek z grupy G1. Podwyższoną ekspresję w grupie II zaobserwowano także w 8 z 12 tkanek w porównaniu z wartością graniczną w grupie I. Analiza korelacji wykazała korelację między kolagenem I i TNF- $\alpha$  tylko w zdrowej tkance ( $r = -0,603$ ,  $p < 0,05$ ).

**Wnioski:** Statystycznie nieznamiennie zwiększenie ekspresji genu kodującego TNF- $\alpha$ , kolagen typu I i III oraz brak ich wzajemnych korelacji przemawia za faktem, że są to parametry niezależne. Nieznamiennie statystycznie wzrost ekspresji genu kodującego TNF- $\alpha$  i kolagen typu I oraz ujemna korelacja między nimi wskazuje, że TNF- $\alpha$  nie może wpływać na syntezę kolagenu I.

**Słowa kluczowe:** TNF- $\alpha$ , kolagen I, kolagen III, rak żołądka

Chirurgia Polska 2014, 16, 1, 28–35

### Abstract

**Introduction:** Neoplasms are the second most frequent cause of death in Poland after vascular diseases. Recently, gastric cancer morbidity has decreased, but mortality is still at a high level.

**Material and methods:** Tissues from 24 patients with a histopathologically diagnosed mucosal and adenomucosal gastric cancer have been tested. Patients were divided in two equal groups: patients without metastases (G1) and patients with metastases in the liver (G2). RNA was isolated from homogenates after preliminary powdering of tissues in liquid nitrogen. RNA concentration was determined using spectrophotometer with RNA/DNA calculator 'Gene Quant' (LKB Pharmacia Biotech). The tissue expression of the TNF- $\alpha$ , collagen type I and collagen type II encoding genes were assessed.

**Results:** Higher TNF- $\alpha$  RNA expression was observed only for 2 patients from group G1, while in G2 group higher expression was observed in 5 from 12 patients in comparison to mean expression in margin. Higher expression of collagen I was found in 6 of 12 patients from the G1 group in comparison to margin. In the tissues with metastases (G2) higher expression of collagen type I was found in 5 tested tissues in comparison to margin. Higher expression of collagen III gene in comparison to margin was found in 8 from 12 tested tissues from G1 group. Higher expression in group 2 was also observed in 8 out of 12 tissues, in comparison to margin value in group I. Correlation analysis showed correlation between collagen I and TNF- $\alpha$  only in the healthy tissue ( $r = -0.603$ ;  $p < 0.05$ ).

**Conclusions.** A statistically non-significant increase in expression of the TNF- $\alpha$  coding genes, type I and III collagen and lack of their mutual correlation weighs in favor of the fact that they are independent parameters. A statistically non-significant increase in expression of the TNF- $\alpha$  and collagen type I coding genes and a negative correlation between them indicates that TNF can't affect the synthesis of collagen I.

**Key words:** TNF- $\alpha$ , collagen I, collagen III, gastric cancer

Polish Surgery 2014, 16, 1, 28–35

## Wstęp

Rak żołądka jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych [1]. Pod względem występowania zajmuje trzecie miejsce, po raku płuc i jelita grubego, wśród mężczyzn oraz czwarte, po raku piersi, szyjki macicy i jelita grubego, u kobiet [2]. Jest jedynym nowotworem, którego zachorowalność i umieralność maleje. Tkanka raka charakteryzuje się w swojej strukturze wysoką twardością w porównaniu z innymi nowotworami, co może mieć związek ze zwiększoną zawartością kolagenu, głównie typu I i III lub zaburzeniami ich degradacji.

Przegląd piśmiennictwa, szczególnie z 2008 roku, wskazuje na podjęcie prób wyjaśnienia powyższego zagadnienia przez poszukiwanie związku między zawartością wyżej wymienionych kolagenów a produkcją i uwalnianiem cytokin, głównie TNF- $\alpha$ .

Czynnik martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ , *tumor necrosis factor alpha*) jest cytokiną regulującą reakcje zapalne, podstawową cytokiną prozapalną i odpornościową. Działa poprzez dwa receptory: p55 TNF receptor 1 i p75 TNF receptor 2. Indukuje powstawanie innych prozapalnych cytokin, między innymi interleukiny-1 (IL-1) i interleukiny-6 (IL-6), pobudza migrację leukocytów przez zwiększenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych w komórkach śródbłonna i leukocytach.

Ostatnio sugeruje się, że TNF- $\alpha$  może być czynnikiem powodującym wzrost akumulacji kolagenu i proliferacji miofibroblastów jelit, oraz że dodatkowo występuje w połączeniu z insulinozależnym czynnikiem wzrostu (IGF, *insulin growth factor*). Czynniki TNF- $\alpha$  i IGF-1 stymulują akumulację kolagenu typu I oraz syntezę jego DNA [3, 4].

Kolagen należy do rodziny bogatych w glicynę i prolinę białek włókninowych (fibrylarnych), które tworzą siatkę w tkance łącznej. Kolageny są głównymi składnikami polipeptydowymi macierzy zewnątrzkomórkowej, a w efekcie całego organizmu, stanowiąc 25% masy białkowej człowieka. Poza rolę strukturalną kolagen bierze także udział w transdukcji sygnałów przez wiązanie z integrynami [5].

Istotną cechą kolagenu jest wieloetapowa synteza, obejmująca procesy niezależne od zapisu genetycznego.

## Introduction

Gastric carcinoma is one of the most common malignant carcinomas [1]. It is the third most common carcinoma after lung and colon carcinomas in men and the fourth most common carcinoma after breast carcinoma, cervical carcinoma and colon carcinoma in women [2]. It is the only carcinoma, which morbidity and mortality decreases. Carcinoma tissue is characterized by a high hardness in comparison to other carcinomas, which may be related to the increased content of collagen type I and III, or disturbances in their degradation.

Literature review, and particularly the literature from 2008, indicates that many studies have been done in order to explain the above mentioned issue by searching for a correlation between collagens content and production and release of cytokines, such as tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

TNF- $\alpha$  is a cytokine regulating basic inflammatory and immune processes. It has two receptors: p55 TNF receptor 1 and p75 TNF receptor 2. It induces production of other pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 (IL-1) and interleukin-6 (IL-6), induces leucocyte migration by increasing expression of adhesion molecules in endothelial cells and leucocytes.

Recently, it has been suggested that TNF- $\alpha$  can be a factor inducing increase in collagen accumulation and proliferation of intestinal myofibroblasts, and it is present in combination with insulin-dependent growth factor (IGF). TNF- $\alpha$  and IGF-1 stimulate accumulation of collagen type I and synthesis of its RNA [3, 4].

Collagen belongs to the family of fibril proteins rich in glycine and proline, which create a net in the connective tissue. Collagens are main polypeptide components of the extracellular matrix, therefore they consist 25% of the human protein body mass. Apart from the structural role, collagen also takes part in signal transduction by binding with integrins [5].

The crucial characteristic of collagen is its multi-step synthesis comprising of the processes independent from the genetic information. It gives a possibility of production of countless numbers of different proteins in the same

Daje to możliwość wytworzenia wręcz nieskończonej liczby odmiennych białek również u tego samego osobnika, mimo że są one produktem tych samych genów. Ta heterogenność, której regulacyjne zasady nie są znane, jest zapewne przyczyną zróżnicowania kolagenu w poszczególnych tkankach. Być może jest to klucz do zrozumienia wielu procesów patofizjologicznych dotyczących tkanki łącznej [6].

### Cel pracy

Celem pracy była ocena ekspresji genu dla TNF- $\alpha$  i genów kodujących kolagen typu I i III.

### Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły fragmenty tkanek pobranych w czasie zabiegu operacyjnego od 24 chorych; kobiet i mężczyzn; z potwierdzonym histopatologicznie rakiem gruczołowym żołądka, średnio i dobrze zróżnicowanym. Chorych podzielono na dwie grupy, z czego grupę I (G1) stanowiło 12 chorych bez przerzutów do wątroby, a grupę II (G2) 12 chorych z przerzutami. Obydwie grupy były zbliżone pod względem wieku i płci. Średnia wieku chorych wynosiła: w grupie G1 — 64,16 roku, a w grupie G2 — 63,25 roku. W obu grupach wykonano przedoperacyjnie test ureazowy na obecność *Helicobacter pylori*. W G1 pozytywny wynik uzyskano u 4, a w G2 u 5 chorych.

Stopień zaawansowania raka określono według międzynarodowej klasyfikacji TNM (*tumor, node, metastasis*) oraz na podstawie danych uzyskane w badaniu klinicznym, USG jamy brzusznej i miednicy małej, tomografii komputerowej oraz badaniu radiologicznym klatki piersiowej. Szczegółową charakterystykę chorych przedstawiono w tabeli I.

Podczas zabiegu operacyjnego raka żołądka pobierano wycinki zmienionej chorobowo tkanki oraz tkanki marginesu w odległości przynajmniej 5 cm od guza. Pobrane fragmenty tkanek umieszczono w pojemniku z ciekłym azotem, a następnie zamrożono w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Za kryterium zróżnicowania między tkanką raka a podścieliskiem przyjęto ocenę ilości komórek martwiczych.

Diagnostyka stanowiąca metody biologii molekularnej objęła ocenę ekspresji genów dla TNF- $\alpha$  i kolagenu I i III. RNA izolowano z homogenatów po wstępnym kruszeniu komórek w ciekłym azocie. Stężenie kwasu nukleinowego w ekstrakcie zostało wyznaczone techniką spektrofotometryczną z zastosowaniem RNA/DNA kalkulator *Gene Quant* (LKB Pharmacia Biotech). Do ekstrakcji RNA została zastosowana zmodyfikowana metoda chloroformowo-fenolowa, opisana przez Chomczyńskiego i Sacchi (Total RNA Prep. Plus, A&A Biotechnology) [7, 8].

#### Kryteria włączenia do badań:

- rozpoznany klinicznie i potwierdzony histopatologicznie rak żołądka gruczołowy i gruczołowo-śluzowy;
- pisemna zgoda chorego na udział w badaniu.

#### Kryteria wyłączenia z badań:

- rozpoznanie histopatologiczne nowotworu innego niż rak żołądka;
- niewydolność wątroby;

Tabela I. Charakterystyka chorych i podział według klasyfikacji TNM

Table I. The group characteristics and TNM classification

	Grupa I / /Group 1 (G1) n = 12	Grupa II / /Group 2 (G2) n = 12
Wiek (wartość średnia w latach)/ <i>Agen (mean)</i>	64,16	63,25
Przedział wiekowy/ <i>Age interval</i>	43–81	45–81
Płeć K/M/ <i>Gender F/M</i>	3/9	3/9
Zaawansowanie raka wg Klasyfikacji TNM/ <i>Cancer advancement according to TNM classification</i>	(n)	(n)
T <sub>1</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	8	0
T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	4	0
T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1</sub>	0	9
T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1</sub>	0	3
Rodzaj wykonywanego zabiegu/ <i>Type of performed surgery</i> :		
Całkowita resekcja żołądka/ <i>Total gastrectomy</i>	12	4

organism, despite the fact that they are encoded by the same genes. This heterogeneity, the regulatory rules of which are unknown, is probably responsible for collagen differentiation in particular tissues. Therefore, this may be a key to understand many pathophysiological processes related with connective tissue [6].

### Aim of work

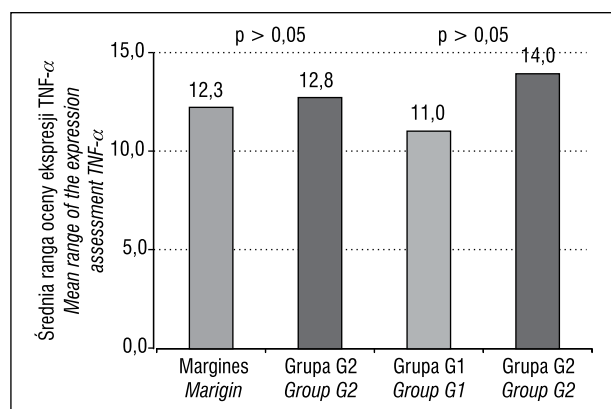
The aim of work is to assess expression of the genes encoding TNF- $\alpha$  and collagen type I and III.

### Materials and methods

The material included tissue fragments collected intraoperatively from 24 patients, men and women, with histopathologically confirmed gastric adenocarcinoma, well and intermediary differentiated. The patients were divided into two groups: group I (G1) were 12 patients without metastases, group II (G2) were 12 patients with metastases to liver. Both groups were matched for age and sex. The mean age was: in the group G1 — 64.16 years, and in the group G2 — 63.25 years. The test for urease for the presence of *Helicobacter pylori* was performed before operation. Positive results were obtained in 4 patients from the group I and in 5 patients from the group II.

Carcinoma progression stage was assessed according to the international TNM classification and on the basis of data from the clinical examination, ultrasonography of abdomen and small pelvis, CT and chest X-ray. Detailed characteristic of the patients is showed in Table I.

During operation, the tissue fragments were taken from the changed tissue and its margin at least 5 cm from the carcinoma. The collected tissue fragments were placed in liquid nitrogen, then moved to  $-70^{\circ}\text{C}$ . The number of necrotic cells were used as a criterion for differentiation between carcinoma tissue and its interstitium.



Rycina 1. Wynik testu Manna-Whitneya w ocenie różnic ekspresji genu dla TNF- $\alpha$  między tkanką zdrową (marginies) i grupą G2 oraz grupami G1 i G2

Figure 1. The Mann-Whitney test results of the comparison between the TNF- $\alpha$  gene expression between the healthy tissue (margin) and group G2 as well as Group 1 and Group 2

Tabela II. Wynik testu Wilcoxon w ocenie różnicy ekspresji genu dla TNF- $\alpha$  między tkanką zdrową (marginies) a grupą G1

Table II. Wilcoxon test results of an evaluation of the difference in the TNF- $\alpha$  gene expression between the healthy tissue (margin) and expression in the Group 1 tissue

Gen/Gene	Test Wilcoxon/Wilcoxon test	Różnica/Difference
TNF- $\alpha$	$p > 0,05$	$G1 \approx \text{marginies/margin}$

- choroby autoimmunologiczne;
- procesy zapalne i owrzodzenia;
- obecność innej złośliwej choroby nowotworowej;
- brak zgody chorego na udział w badaniu.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie wykorzystując program Microsoft Excel. Weryfikację hipotez statystycznych przeprowadzono wykorzystując nieparametryczne testy Manna-Whitneya (porównania tkanki zdrowej z grupą G1 oraz grupy G1 z G2) i Wilcoxon (porównanie tkanki zdrowej z grupą G1). Przyjęto poziom znaczenia statystycznej  $p < 0,05$ .

## Wyniki

Wyniki ekspresji genu dla TNF- $\alpha$  zobrazowano na rycinie 1 i w tabeli II.

Tylko u 2 z 12 chorych z G1 (16,6%) zaobserwowano większą ekspresję genu dla TNF- $\alpha$ , natomiast w grupie G2, w porównaniu ze średnią wartością ekspresji w marginesie, zwiększenie takie zaobserwowano u 5 z 12 tkanek, co stanowi 41,7%. Średnie wartości wynosiły:

- tkanka marginesu G1 — 0,88;
- grupa I (G1, bez przerzutów) — 0,59;
- grupa II (G2, z przerzutami) — 1,00.

Uzyskane wyniki nie są statystycznie znaczące, zarówno między badanymi grupami chorych na raka żołądka bez przerzutów (G1) i z przerzutami (G2), ani każdej z grup w stosunku do marginesu ( $p > 0,05$ ).

Molecular biology diagnostics included assessment of gene expression for TNF- $\alpha$  and collagen type I and III. RNA was isolated from homogenates after preliminary powdering of tissues in liquid nitrogen. RNA concentration was determined using spectrophotometer with RNA/DNA calculator "Gene Quant" (LKB Pharmacia Biotech). Modified chloroform-phenol method described by Chomczyński and Sacchi was used for extraction of RNA (Total RNA Prep. Plus, A&A Biotechnology) [7, 8].

### Inclusion criteria:

- clinically recognized and histopathologically confirmed gastric adenocarcinoma and mucinous adenocarcinoma;
- written patient's consent for participation in study.

### Exclusion criteria:

- histopathological recognition of a carcinoma other than gastric carcinoma;
- hepatic failure;
- autoimmune diseases;
- inflammatory processes;
- other malignant carcinoma;
- no patient's consent.

The results were statistically analyzed using Microsoft Excel software. Statistical hypotheses were verified using non-parametric Mann-Whitney's (comparison of healthy tissue with G1 group and G1 with G2) and Wilcoxon's tests (comparison of healthy tissue with G1 group). The statistical significance was considered at  $p < 0.05$ .

## Results

TNF- $\alpha$  RNA expression is shown in Figure 1 and Table II.

Higher TNF- $\alpha$  RNA expression was observed only for 2 of 12 patients from the group I, (16,6%), while in G2 group higher expression was observed in 5 from 12 tissues (41,7%) in comparison to mean expression in margin. The mean values were:

- margin tissue G1 — 0.88;
- group I (G1, no metastases) — 0.59;
- group II (G2, with metastases) — 1.00.

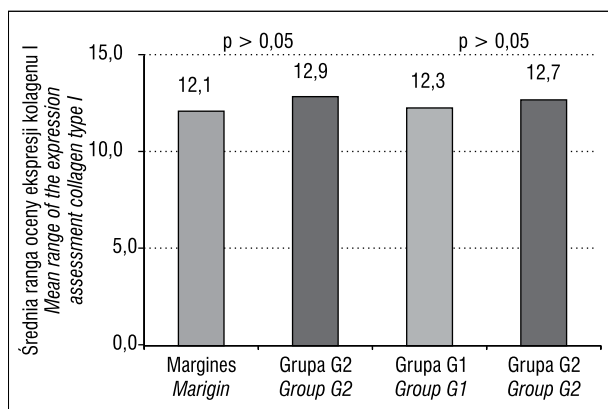
The obtained results are not statistically significant both between the tested patients group without metastases (G1) and with metastases (G2), and for any of the groups in comparison to the margin ( $p > 0.05$ ).

Gene expression results for collagen I is shown in Figure 2 and Table III.

Higher expression of collagen I was found in 6 out of 12 tested tissues from the G1 group (50%) in comparison to margin. In the carcinoma tissues with metastases (group II) higher expression was found in 5 out of 12 tested tissues (41,7%) in comparison to mean margin expression. The mean values were:

- margin tissue G1 — 0.83;
- group I (G1, without metastases) — 0.83;
- group II (G2, with metastases) — 0.85.

No statistically significant differences between the tested groups G1 and G2 were found ( $p > 0.05$ ) and between the tested groups and the margin ( $p_1 > 0.05$ ;  $p_2 > 0.05$ ).



Rycina 2. Wynik testu Manna-Whitneya w ocenie różnic ekspresji genu dla kolagenu I między tkanką zdrową (margines) i grupą G2 oraz grupami G1 i G2

Figure 2. The Mann-Whitney test results of the comparison between the collagen type I gene expression between the healthy tissue (margin) and group G2 as well as Group 1 and Group 2

Tabela III. Wynik testu Wilcoxon w ocenie różnicy ekspresji genu dla kolagenu I pomiędzy tkanką zdrową (margines) a grupą G1

Table III. Wilcoxon test results of an evaluation of the difference in the collagen type I gene expression between the healthy tissue (margin) and expression in the Group 1 tissue

Gen/Gene	Test Wilcoxon/Wilcoxon test	Różnica/Difference
Kolagen I/Collagen II	$p > 0,05$	$G1 \approx \text{margines/margin}$

Wyniki ekspresji genowej dla kolagenu I przedstawiono na rycinie 2 oraz w tabeli III.

W stosunku do marginesu większą ekspresję genu dla kolagenu I stwierdzono u 6 z 12 badanych tkanek grupy G1, co stanowi 50%. W tkankach chorych z przerzutami, czyli z grupy II większą ekspresję w stosunku do średniej wartości ekspresji w marginesie obserwowano w 5 z 12 tkanek, co stanowi 41,7%. Średnie wartości wynosiły:

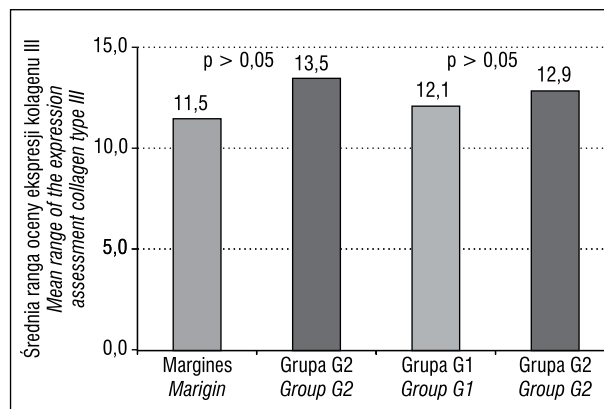
- tkanka marginesu G1 — 0,83;
- grupa I (G1, bez przerzutów) — 0,83;
- grupa II (G2, z przerzutami) — 0,85.

Nie stwierdzono znamiennej statystycznych różnic między badanymi grupami G1 i G2 ( $p > 0,05$ ) oraz każdej z badanym grup w stosunku do marginesu ( $p_1 > 0,05$ ;  $p_2 > 0,05$ ).

Większą ekspresję genu dla kolagenu III w stosunku do marginesu stwierdzono u 8 z 12 badanych tkanek z grupy G1, co stanowi 66,7%. W G2 z przerzutami zwiększenie ekspresji zaobserwowano także w 8 z 12 tkanek, w porównaniu z wartością średnią marginesu G1, co stanowi 66,7%. Średnie wartości wynosiły:

- tkanka marginesu G1 — 0,57;
- grupa I (G1, bez przerzutów) — 0,62;
- grupa II (G2, z przerzutami) — 0,67.

Nie stwierdzono znamiennej statystycznych różnic zarówno między badanymi grupami G1 i G2 w stosunku do marginesu ( $p_1 > 0,05$ ;  $p_2 > 0,05$ ) ani między badanymi grupami ( $p > 0,05$ ). Wyniki przedstawiono na rycinie 3 i w tabeli IV.



Rycina 3. Wynik testu Manna-Whitneya w ocenie różnic ekspresji genu dla kolagenu III między tkanką zdrową (Margines) i grupą G2 oraz grupami G1 i G2

Figure 3. The Mann-Whitney test results of the comparison between the collagen type III gene expression between the healthy tissue (margin) and group G2 as well as Group 1 and Group 2

Tabela IV. Wynik testu Wilcoxon w ocenie różnicy ekspresji genu dla kolagenu III pomiędzy tkanką zdrową (margines) a grupą G1

Table IV. Wilcoxon test results of an evaluation of the difference in the collagen type III gene expression between the healthy tissue (margin) and expression in the Group 1 tissue

Gen/Gene	Test Wilcoxon/Wilcoxon test	Różnica/Difference
Kolagen III/Collagen III	$p > 0,05$	$G1 \approx \text{margines/margin}$

Higher expression of collagen III gene in comparison to margin was found in 8 from 12 tested tissues from G1 group, which consists 66.7%. Higher expression in group II was also observed in 8 out of 12 tissues, in comparison to the mean margin value in group I, which makes 66.7%. The mean values were:

- margin tissue G1 — 0.57;
- group I (G1, without metastases) — 0.62;
- group II (G2, with metastases) — 0.67.

No statistically significant differences between the tested groups G1 and G2 in comparison to the margin ( $p_1 > 0,05$ ;  $p_2 > 0,05$ ), and between the tested groups ( $p > 0,05$ ) were found. The results are shown in Figure 3 and Table IV.

The assessment of the correlation between expression of the genes encoding TNF- $\alpha$  and collagen type I and III in the healthy tissues (margin) and in G1 and G2 groups was performed. The results were shown in Figure 4. Analysis of correlations showed correlation between collagen I and TNF- $\alpha$  only in the healthy tissue ( $r = -0.603$ ;  $p < 0.05$ ). Results are shown in Figure 4.

## Discussion

Tissue hardness in gastric carcinoma resulting from the high content of collagen, mainly type I and III, attracts constant interest of researchers. Increased synthesis of collagens and/or disturbances in its degradation attracts

Podjęto ponadto próbę oceny korelacji między ekspresją genów kodujących TNF- $\alpha$  i kolagen typu I i III w obrębie tkanki zdrowej (margines) oraz w grupach G1 i G2. Wyniki przedstawiono na rycinie 4. Analiza wyników wzajemnych zależności przedstawionych powyżej ekspresji genów wykazała istnienie korelacji między kolagenem I i TNF- $\alpha$  tylko w tkance zdrowej ( $r = -0,603$ ;  $p < 0,05$ ). Wyniki przedstawiono na rycinie 4.

## Dyskusja

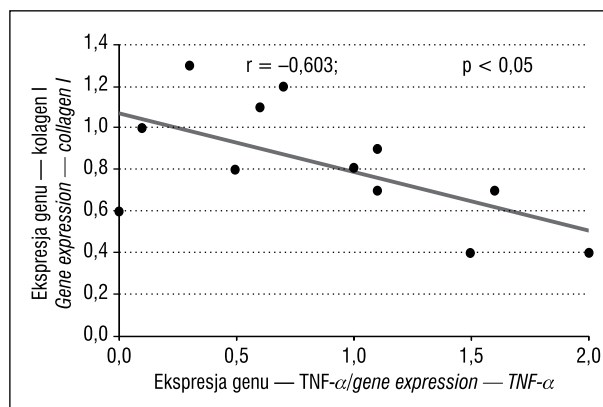
Stałe zainteresowanie badaczy wzbudza twardość tkanki raka żołądka wynikająca z dużej zawartości kolagenu, głównie typu I i III. Dyskusje koncentrują się wokół wzmoczonej syntezy kolagenów i/lub zaburzenia ich degradacji. W pracy podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, czy w tkance raka żołądka dochodzi do nadprodukcji kolagenów poprzez ocenę ekspresji genów kodujących te białka oraz czy TNF- $\alpha$  wpływa na zwiększoną syntezę kolagenu I.

Ocena uzyskanych wyników nie potwierdziła tych oczekiwań. Różnice ekspresji genów dla kolagenów I i III obu badanych grup G1 i G2 nie wykazują znamienności statystycznej w stosunku do marginesu ( $p > 0,05$ ;  $p > 0,05$ ) ani pomiędzy sobą ( $p > 0,05$ ).

Trudno porównywać własne wyniki z uzyskanymi przez innych badaczy, gdyż właściwie nie ma doniesień na temat zachowania się wymienionych wyżej kolagenów w tkance raka żołądka. Badacze ograniczają się przede wszystkim do weryfikacji dominacji kolagenów w tkance zmienionej chorobowo, głównie metodami immunohistochemicznymi [9–11]. Konsekwencją tych badań są stwierdzenia, że dominującą formą kolagenu jest kolagen typu I i III.

Tymczasem autorzy doniesień z ostatnich 6–8 lat skupiają swoje zainteresowania na kolagenie typu IV i jego prognostycznym znaczeniu w pooperacyjnym monitorowaniu chorych z potwierdzonym rakiem przewodu pokarmowego. Wang i wsp. wykazali, że kolagen typu IV — główny składnik błony podstawnej — odpowiedzialny jest za adhezję komórek i ma ścisły związek z inwazyjnością raka i przerzutami [13]. Podobne spostrzeżenia opublikowali David i wsp. Ich badania potwierdziły przydatność wykrywania wczesnej postaci raka przez dodatni wynik obecności kolagenu IV w błonie podstawnej metodami immunohistochemicznymi. Stwierdzono, że obecność kolagenu IV stanowi ryzyko wystąpienia przerzutów do wątroby [14]. Wydaje się, że kolagen IV sprzyja inwazyjności raka, a zdaniem Baba i wsp. szczególnie przydatna diagnostycznie jest ocena łańcuchów  $\alpha$ -5 i  $\alpha$ -6 tego białka [15].

Wyniki naszych badań nie potwierdzają sugestii Theiss i wsp. z 2005 roku, że TNF- $\alpha$  może zwiększać proliferację i akumulację kolagenu w tkance raka [3]. Ocena uzyskanych wyników nie potwierdziła znamiennej statystycznego wzrostu ekspresji genu dla TNF- $\alpha$  w tkankach badanych grup chorych G1 i G2 w stosunku do marginesu ( $p > 0,05$ ;  $p > 0,05$ ), znamienności statystycznej nie odnotowano także między badanymi grupami chorych ( $p > 0,05$ ).



**Rycina 4. Korelacja między ekspresją genów dla TNF- $\alpha$  i kolagenu I wyznaczona dla tkanki zdrowej (margines)**  
**Figure 4. Correlation between the TNF- $\alpha$  gene expression and the expression of collagen type I gene in the healthy tissue (margin)**

particular attention. This paper was aimed at checking whether overexpression of collagens takes place in the adenocarcinoma tissue by assessment of expression of the genes encoding these proteins and whether TNF- $\alpha$  influences upon the increased collagen I synthesis.

The obtained results did not confirm these expectations. The differences in gene expression for collagens I and III in both tested G1 and G2 group show no statistical significance in relation to the margin ( $p > 0.05$ ;  $p > 0.05$ ), or no statistical significance between them ( $p > 0.05$ ).

It is difficult to compare own results with the results obtained by other researchers, since there has been few papers on collagens expression in the gastric carcinoma tissue. Most studies are limited to the verification of collagen dominance in carcinoma tissue, mostly using immunohistochemistry [9–11]. As a consequence, collagen type I and III are believed to be the dominating collagen forms.

However, it is collagen IV and its prognostic value in post-operative monitoring of the patients with confirmed gastrointestinal tract carcinoma, which has attracted researchers' interest for the past 6–8 years. Wang *et al.* showed that collagen type IV — a main component of lamina propria — is responsible for cell adhesion and it has a close relationship with carcinoma invasiveness and metastases [13]. Similar conclusions were published by David *et al.* This study confirmed usefulness of detection of an early carcinoma form by a positive result of collagen IV presence in lamina propria using immunohistochemical methods. The presence of collagen IV posed a risk of metastases to liver [14]. It seems that collagen IV increases cancer invasiveness, and according to Baba *et al.*, assessment of  $\alpha$ -5 and  $\alpha$ -6 chains of this protein is diagnostically particularly useful [15].

Our results do not confirm conclusions of Arianne Theis *et al.* from 2005, that TNF- $\alpha$  can increase proliferation and accumulation of collagen in carcinoma tissue [3]. The obtained results showed no statistically significant increase in gene expression for TNF- $\alpha$  in the tissues of the tested patients groups G1 and G2 in comparison to margin

Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała ujemną, znamioną statystycznie, korelację między kolagenem I a TNF- $\alpha$  tylko w tkance zdrowej żołądka. Nie stwierdzono żadnej korelacji między TNF- $\alpha$  i kolagenem I w tkance raka żołądka charakteryzującej się dużą zawartością kolagenu I i dużą twardością. Wydaje się, że wysokie stężenie kolagenu I w tkance raka żołądka jest wynikiem działania nieznanymi mechanizmami.

Obok interleukiny 6 właśnie TNF- $\alpha$  jest najczęściej oznaczaną cytokiną prozapalną. Najwięcej publikacji eksponuje podwyższone stężenie TNF- $\alpha$  w surowicy krwi lub ekspresję genu kodującego TNF- $\alpha$  w procesach zapalnych, chorobach o podłożu autoimmunologicznym, takich jak: reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca, choroby tarczycy, toczeń rumieniowaty itp.

Od wielu lat zwraca się uwagę na wzrost ekspresji genów wielu cytokin, w tym TNF- $\alpha$ , w procesach nowotworowych. W odpowiedzi na obecność raka, podobnie jak w reakcji ostrej fazy, dochodzi do zwiększonej produkcji wielu cytokin, głównie IL-1, IL-6 i omawianego TNF- $\alpha$  [15–17].

Obydwie cytokiny prozapalne mają bezpośredni wpływ na syntezę białka ostrej fazy — CRP. Należy zwrócić uwagę, że podwyższone stężenie CRP wiąże się ze współistniejącym stanem zapalnym i jest złym czynnikiem prognostycznym, na co już przed wieloma latami zwrócili uwagę Nowacki i Szymendera wiążąc gorączkę pooperacyjną ze złym czynnikiem rokowniczym [18]. Nie można zapomnieć, że TNF- $\alpha$  jest cytokiną proangiogenną, stymulującą tworzenie nowotworowych naczyń krwionośnych, oplatających guz i ułatwiających głównie proces przerzutowania. Mimo poznania wielu funkcji, które pełni TNF- $\alpha$ , nie udało się znaleźć związku między tą cytokiną a nadmiarem kolagenu I i III zgromadzonego w tkance raka żołądka [18].

## Wnioski

1. Statystycznie nieznamienne zwiększenie ekspresji genu kodującego TNF- $\alpha$ , kolagen typu I i III oraz brak ich wzajemnych korelacji przemawia za faktem, że są to parametry niezależne.
2. Nieznamienne statystycznie wzrost ekspresji genu kodującego TNF- $\alpha$  i kolagen typu I oraz ujemna korelacja między nimi wskazuje, że TNF- $\alpha$  nie może wpływać na syntezę kolagenu I.

**Podziękowania.** Badania przeprowadzono w ramach projektu badawczego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego (NN-1-159/06).

## Piśmiennictwo (References)

1. Szczeklik A (ed.) Choroby wewnętrzne. In: Zatoński WA, Didkowska J, Olszewski W. Epidemiologia nowotworów i badania przesiewowe. Kraków 2005, t. II: 1983.
2. Layke JC, Lopez PP. Gastric cancer: diagnosis and treatment options. *Am Fam Physician* 2004; 69: 1145.
3. Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund KP. Tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J Biol Chem*. 2005; 280: 36099–36109.

( $p > 0.05$ ;  $p > 0.05$ ), no statistically significant differences were found between the tested patient groups ( $p > 0.05$ ).

Statistical analysis of the obtained results showed a negative, statistically significant correlation between collagen I and TNF- $\alpha$  in healthy stomach tissue only. There was no correlation between TNF- $\alpha$  and collagen I in gastric cancer tissue with a high concentration collagen I and high hardness. It seems that the high concentration of collagen in gastric cancer tissue is the result of unknown mechanisms.

TNF- $\alpha$ , apart from interleukin 6, is the most commonly detected pro-inflammatory cytokine. The highest number of papers shows increased TNF- $\alpha$  concentration in serum or TNF- $\alpha$  expression in inflammatory processes, auto-immunological diseases such as: rheumatoid arthritis, diabetes, thyroid diseases, lupus erythematosus, etc.

The increase in expression of many cytokine genes, including TNF- $\alpha$ , in carcinogenic processes has been noticed. In the response to the carcinoma presence, increased production of many cytokines, mainly of IL-1, IL-6 and described TNF- $\alpha$  takes place, similarly as during acute phase reaction [15–17].

Both pro-inflammatory cytokines have a direct influence upon synthesis of an acute phase protein — CRP. One should pay attention to the fact that CRP concentration is related with a co-existing inflammatory state and it consists a poor prognostic factor, as it was shown by Nowacki and Szymendera many years ago, who reported a post-operative fever as a poor prognostic factor [18]. TNF- $\alpha$  is a pro-angiogenic cytokine, stimulating angiogenesis in tumors and facilitating metastatic process. Despite many functions of TNF- $\alpha$ , no correlation between this cytokine and excess of collagen I and III accumulated in gastric carcinoma tissue was found [18].

## Conclusions

1. A statistically non-significant increase in expression of the TNF- $\alpha$  coding genes, type I and III collagen and lack of their mutual correlation weighs in favor of the fact that they are independent parameters.
2. A statistically non-significant increase in expression of the TNF- $\alpha$  and collagen type I coding genes and a negative correlation between them indicates that TNF can't affect the synthesis of collagen I.

**Acknowledgment.** The study was carried out as a research project supported by grant of Medical University of Silesia (NN-1-159/06).

6. Ohno S, Tachibana M, Fujii T, Ueda S, Kubota H, Nagasue N. Role of stromal collagen in immunomodulation and prognosis of advanced gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 97: 770–774.
7. Epstein RJ. *Biologia molekularna człowieka*. Lublin 2005; wyd. I pol.: 238–239.
8. Chomczyński P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162: 156–159.
9. Chomczyński P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. *Biotechniques* 1993, 15: 532–537.
10. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 4368–4380.
11. Afify M, Samy N, Hashim M, Essam T. Clinical significance of vascular endothelial growth factor in Egyptian colorectal cancer patients. *Int J Integr Biol*. 2008; 40: 100–107.
12. Prakobwong S, Pinlaor S, Yongvanit P, Sithithaworn P, Pairojkul C, Hiraku Y. Time profiles of the expression of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteases, cytokines and collagens in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* with special reference to peribiliary fibrosis and liver injury. *Int J Parasit*. 2009; 39: 825–835.
13. Wang ZN, Xu HM. Relationship between collagen IV expression and biological behavior of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2000; 6: 438–439.
14. David L, Nesland JM, Holm R *et al*. Expression of laminin, collagen IV, fibronectin and type IV collagenase in gastric carcinoma. An immunohistochemical study of 87 patients. *Cancer* 1994; 73: 518–527.
15. Baba Y, Iama K, Ikeda K *et al*. Differential expression of basement membrane type IV collagen alpha chains in gastric intramucosal neoplastic lesions. *J Gastroenterol*. 2007, 42: 874–880.
16. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249–257.
17. Muc-Wierzgon M, Nowakowska-Zajdel E, Kokot T *et al*. Genetic dysregulation of TNF alpha and TNF alpha type II receptors in colon cancer at the II and III stage of disease. *J Biol Regul & Homeost Agents* 2006; 20: 10–14.
18. Chwaliński M, Nowacki MP, Rutkowski A *et al*. Prognostyczne znaczenie przedoperacyjnych oznaczeń CEA i CRP u chorych na raka jelita grubego. *Nowotwory* 2000; 50: 33–34.

**Adres do korespondencji (Address for correspondence):**

dr n. med. Robert Partyka  
Clinical Division of Anesthesiology and Intensive Treatment of the Department of Anesthesiology, Intensive Treatment and Emergency Medicine SUM in Katowice  
Plac Medyków 1, 41–200 Sosnowiec  
e-mail: anestsos@sum.edu.pl  
tel./faks: 32 368 27 39, 602 446 808, faks: 32 368 20 26  
e-mail: robertpartyka@op.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 16.04.2014