

2397

PL ISSN 0303 - 4135

A k a d e m i a M e d y c z n a w G d a ń s k u

ANNALES ACADEMIAE MEDICAE GEDANENSIS

ZABURZENIA PROTOONKOGENÓW RODZINY ERBB W RAKU PIERSI

MARZENA WEŁNICKA-JAŚKIEWICZ

ROZPRAWA HABILITACYJNA

TOM XXXVI
2 0 0 6
SUPLEMENT 1



**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXVI
2 0 0 6
SUPLEMENT 1**

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Marzena Welnicka-Jaśkiewicz

**ZABURZENIA PROTOONKOGENÓW RODZINY
ERBB W RAKU PIERSI**

*Abnormalities of ERBB oncogene
family in breast cancer*

Rozprawa habilitacyjna

Klinika Onkologii i Radioterapii
Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: prof. dr hab. med. Jacek Jassem

Gdańsk 2006

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

REDAKTOR NACZELNY
PRESIDENT OF THE EDITORIAL BOARD
prof. dr Marek Grzybiak

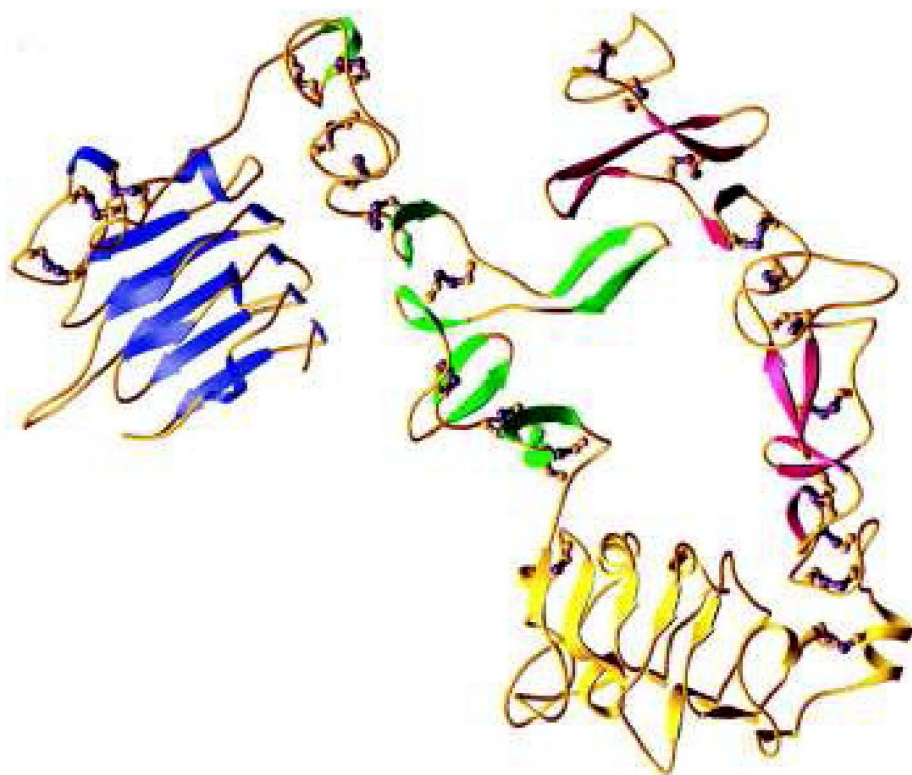
KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Marek Latoszek
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan, prof. AMG,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Lukasiak,
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
80-210 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@amg.gda.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published In Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Akademia Medyczna w Gdańsku



Moim Najbliższym

SPIS TREŚCI

1. Wstęp	13
1.1. Uwagi ogólne	13
1.2. Tradycyjne i obecnie badane czynniki rokownicze	13
1.3. Możliwości wykorzystania badań molekularnych do celów rokowniczych i predykcyjnych w raku piersi	16
1.4. Czynniki predykcyjne	17
1.5. Budowa i mechanizm działania receptorów rodziny ERBB i kodujących je genów	18
1.5.1. Gen <i>ERBB-1</i> i kodowane przez niego białko	21
1.5.2. Gen <i>ERBB-2</i> i kodowane przez niego białko HER-2	21
1.5.3. Gen <i>ERBB-3</i> i kodowane przez niego białko	22
1.5.4. Gen <i>ERBB-4</i> i kodowane przez niego białko	22
1.6. Polimorfizm mikrosatelitarny i utrata heterozygotyczności w genie <i>ERBB-1</i>	23
2. Uzasadnienie podjęcia badań	26
3. Cel pracy	28
3.1. Cele szczegółowe	28
4. Materiał i metody	29
4.1. Charakterystyka kliniczna badanej grupy chorych	29
4.2. Ocena mikroskopowa nowotworu	30
4.3. Leczenie	32
4.3.1. Leczenie operacyjne	32
4.3.1.1. Zmodyfikowana amputacja piersi	33
4.3.1.2. Leczenie oszczędzające pierś (BCT)	33
4.3.2. Systemowe leczenie przedoperacyjne	34
4.3.3. Leczenie pooperacyjne	36
4.3.3.1. Radioterapia pooperacyjna	37
4.3.3.2. Pooperacyjne leczenie systemowe	38
4.4. Grupa kontrolna	38
4.5. Metody badawcze	38
4.5.1. Gromadzenie materiału, zbieranie i opracowywanie danych	38
4.5.2. Badania immunohistochemiczne (IHC)	39
4.5.2.1. Metoda oznaczania receptorów steroidowych	39
4.5.2.2. Metoda oznaczania ekspresji receptorów ERBB-1	39
4.5.2.3. Oznaczanie ekspresji receptorów ERBB-2 (HER-2)	40
4.5.3. Badania molekularne	40
4.5.3.1. Izolacja DNA	40
4.5.3.2. Ilościowe oznaczanie średniej liczby kopii genów (AGCN) rodziny <i>ERBB</i> metodą ddPCR	41

4.5.3.3.	Oznaczanie polimorfizmu sekwencji powtórzonych (CA) _n i utraty heterozygotyczności (LOH) w genie <i>ERBB-1</i>	44
4.5.4.	Metody statystyczne.....	45
5.	Wyniki	46
5.1.	Zaburzenia liczby kopii czterech protoonkogenów rodziny <i>ERBB</i> w raku piersi	46
5.1.1.	Analiza wartości AGCN badanych protoonkogenów <i>ERBB-1</i> , <i>ERBB-2</i> , <i>ERBB-3</i> i <i>ERBB-4</i>	46
5.1.2.	Analiza zmian pojedynczych	50
5.1.3.	Analiza zmian złożonych	50
5.2.	Wzajemne zależności pomiędzy zaburzeniami w badanych genach rodziny <i>ERBB</i>	52
5.3.	Ekspresja receptorów <i>ERBB-1</i> i <i>ERBB-2</i> i jej związek z liczbą kopii genów	53
5.4.	Polimorfizm sekwencji powtórzonych (CA) _n w genie <i>ERBB-1</i> oraz utrata heterozygotyczności (LOH) w jego obrębie.....	55
5.5.	Zależność pomiędzy parametrami molekularnymi a cechami histoklinicznymi nowotworu	60
5.5.1.	Zależność pomiędzy występowaniem anomalii ilościowych w protoonkogenach rodziny <i>ERBB</i> a cechami histoklinicznymi nowotworu	60
5.5.1.1.	Zaburzenia onkogenu <i>ERBB-1</i>	62
5.5.1.2.	Zaburzenia onkogenu <i>ERBB-2</i>	64
5.5.1.3.	Zaburzenia onkogenu <i>ERBB-3</i>	65
5.5.1.4.	Zaburzenia onkogenu <i>ERBB-4</i>	67
5.5.2.	Zależność pomiędzy ekspresją receptorów <i>ERBB-1</i> i <i>ERBB-2</i> a cechami histoklinicznymi	68
5.5.3.	Zależność pomiędzy utratą heterozygotyczności (LOH) a określonymi cechami histoklinicznymi	70
5.6.	Wstępna ocena rokowniczego znaczenia zaburzeń molekularnych występujących w genach rodziny <i>ERBB</i> i ekspresji receptorów <i>ERBB-1</i> i <i>ERBB-2</i>	72
5.6.1.	Wyniki leczenia w zależności od cech histoklinicznych	73
5.6.2.	Wyniki leczenia w zależności od zaburzeń molekularnych....	76
5.6.2.1.	Zaburzenia genu <i>ERBB-1</i> i receptora <i>ERBB-1</i>	76
5.6.2.2.	Zaburzenia genu <i>ERBB-2</i> i receptora <i>ERBB-2</i>	80
5.6.2.3.	Zaburzenia genów <i>ERBB-3</i> i <i>ERBB-4</i>	83
5.6.2.4.	Analiza wieloczynnikowa.....	84
6.	Omówienie wyników.....	87
6.1.	Charakterystyka badanej grupy	87
6.2.	Zaburzenia liczby kopii czterech protoonkogenów rodziny <i>ERBB</i>	87
6.3.	Współwystępowanie zaburzeń genów rodziny <i>ERBB</i>	97

6.4. Polimorfizm sekwencji powtórzonych (CA) _n w genie <i>ERBB-1</i> oraz utrata heterozygotyczności (LOH) w jego obrębie.....	101
6.5. Polimorfizm a cechy histokliniczne	103
7. Wnioski.....	105
8. Streszczenie	106
9. Summary.....	108
10. Piśmiennictwo	110
11. Załącznik nr 1 – ankieta.....	132

Wykaz najważniejszych skrótów

A	adenina
AGCN	średnia liczba kopii genów (<i>average gene copy number</i>)
BCT	leczenie oszczędzające pierś (<i>breast conservation therapy</i>)
BLI	indeks proliferacji oceniany znakowaną bromodezoksyurydyną (<i>bromodeoxyuridine labelling index</i>)
C	cytozyna
CAP	Amerykańskie Kolegium Patologów (<i>College of American Pathologists</i>)
CEPH	Centrum Badania Ludzkich Polimorfizmów (<i>Centre d'Etude du Polymorphisme Humain</i>)
ddPCR	podwójnie różnicowa reakcja łańcuchowej polimerazy (<i>double differential PCR</i>)
DCIS	śródprzewodowy rak piersi (<i>ductal carcinoma in situ</i>)
DFS	przeżycie wolne od wznowy (<i>disease free survival</i>)
dPCR	metoda różnicowa łańcuchowej reakcji polimerazy (<i>differential PCR</i>)
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	receptor naskórkowego czynnika wzrostu (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
ER	receptor estrogenowy
<i>ERBB</i>	gen kodujący receptor czynnika wzrostowego z rodziny ERBB
ERBB	receptor czynnika wzrostowego z rodziny ERBB (<i>erythroblastosis</i>)
FISH	hybrydyzacja fluorescencyjna in situ (<i>fluorescence in situ hybridization</i>)
G	stopień zróżnicowania (<i>grade</i>)
HER	ludzki receptor nakórkowego czynnika wzrostu (<i>human EGF receptor</i>)
IHC	metoda immunohistochemiczna
LOH	utrata heterozygotyczności (<i>loss of heterozygosity</i>)
MSI	niestabilność mikrosatelitarna (<i>microsatellite instability</i>)
N	stan regionalnych węzłów chłonnych
OS	przeżycie całkowite (<i>overall survival</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (<i>polymerase chain reaction</i>)

PgR	receptor progesteronowy
R_s	współczynnik korelacji
RTK	receptory kinazy tyrozynowej
SB	<i>(Southern blot)</i>
SSR	proste powtórzone sekwencje <i>(simple sequence repeats)</i>
T	zaawansowanie guza pierwotnego <i>(tumor)</i>
TMA	mikromacierz tkankowa <i>(tissue microarray)</i>

1. WSTĘP

1.1. Uwagi ogólne

Rak piersi należy do najczęściej występujących nowotworów u kobiet w Europie i Ameryce Północnej. Według danych polskiego Krajowego Rejestru Nowotworów, w 2003 roku rak piersi był w Polsce najczęściej rejestrowanym nowotworem wśród kobiet, a zachorowalność wynosiła 38,8 na 100 000 kobiet. Rak piersi jest również najczęstszą przyczyną zgonów nowotworowych u kobiet [59].

Pomimo stale dokonującego się postępu w diagnostyce i leczeniu, przez wiele dekad wyniki leczenia raka piersi pozostawały na podobnym poziomie. Dopiero przedstawione w 2000 roku populacyjne badania epidemiologiczne przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii wykazały obniżenie umieralności z powodu raka piersi w obu tych krajach o 25% w porównaniu z rokiem 1970 [172]. Ten pozytywny wynik, obserwowany także w innych wysoko rozwiniętych krajach, przypisywany jest dwu czynnikom. Pierwszym z nich było wprowadzenie masowych badań przesiewowych, umożliwiających wykrycie nowotworu we wcześniejszym stopniu zaawansowania. Wyniki kilkunastu badań randomizowanych obejmujących blisko 500.000 kobiet wskazują, że dzięki badaniom przesiewowym umieralność z powodu raka piersi u kobiet powyżej 50 r. ż. zmniejszyła się o 20–30% [13, 155, 221]. Drugą istotną przyczyną było zastosowanie u większości chorych o niekorzystnych czynnikach rokowniczych leczenia uzupełniającego. Wyniki metaanalizy z 1998, aktualizowanej w 2005 roku, obejmującej około 200 000 chorych biorących udział w ponad 400 randomizowanych badaniach klinicznych oceniających rolę leczenia uzupełniającego, potwierdziły korzystny wpływ na wieloletnie przeżycie zarówno uzupełniającej chemioterapii, jak i hormonoterapii [64–66, 171, 179]. Na podstawie tej metaanalizy i wyników poszczególnych badań klinicznych, znacznie rozszerzono wskazania do systemowego leczenia uzupełniającego zabieg operacyjny. Według obecnych zaleceń jedynie w niewielkiej grupie chorych o bardzo dobrych czynnikach rokowniczych nie ma wskazań do pooperacyjnej chemio- lub hormonoterapii [84, 245]. Szacuje się, że obecnie aż 90% chorych na raka piersi otrzymuje systemowe leczenie uzupełniające [67].

1.2. Tradycyjne i obecnie badane czynniki rokownicze

O kwalifikacji do leczenia uzupełniającego i jego wyborze u chorych na raka piersi decyduje analiza czynników rokowniczych (określających czas przeży-

cia) i predykcyjnych (określających wrażliwość nowotworu). Wśród pierwszych najistotniejszymi są stan węzłów chłonnych, wielkość guza w piersi, stopień zróżnicowania, obecność okołoguzowego naciekania naczyń krwionośnych i chłonnych oraz wiek chorej.

Według obecnie obowiązujących kryteriów wszystkie chore, które mają przerzuty do co najmniej 4 pachowych węzłów chłonnych są zaliczane do grupy wysokiego ryzyka (*high risk*), niezależnie od innych cech demograficznych lub klinicznych. Do tej grupy zaliczają się również chore, u których przerzuty stwierdzono w 1 do 3 pachowych węzłów chłonnych, przy dodatnich receptorach HER-2. Do grupy określanej jako ryzyko niskie (*low risk*) kwalifikuje się jedynie chore w wieku powyżej 35 lat, z wysoko zróżnicowanym guzem (G1) o średnicy do 2,0 cm i bez cech naciekania naczyń. Pozostałe chore zaszeregowane są do kategorii o tzw. ryzyku pośrednim (*average risk*) [84, 111, 245] (tab. 1).

Tab. 1. Grupy ryzyka nawrotu (wg wytycznych z St. Gallen 2005)

Tab. 1. Risk categories (St. Gallen 2005 recommendations)

Niskie ryzyko <i>Low risk</i>	Pośrednie ryzyko <i>Intermediate risk</i>	Wysokie ryzyko <i>High risk</i>
N0 i równocześnie wszystkie pozostałe cechy: pT ≤ 2 cm, G1, brak naciekania naczyń, HER-2 (–), wiek ≥ 35 lat	N0 i równocześnie co najmniej jedna z cech: pT > 2 cm, lub G2–3, lub naciekanie naczyń, lub HER-2 (+), lub wiek < 35 lat 1–3 N(+) i wszystkie pozostałe: brak naciekania naczyń, HER-2 (–)	1–3 N(+) i równocześnie co najmniej jedna z cech: naciekania naczyń, lub HER-2 (+) lub niezależnie od innych cech 4 lub więcej N(+)

N0 – brak przerzutów do pachowych węzłów chłonnych/ *axillary lymph nodes negative*

HER-2 (–) – brak ekspresji receptora HER-2 / *no HER-2 expression*

HER-2 (+) – nadekspresja receptora HER-2 / *HER-2 overexpression*

Wymieniona grupa czynników (z wyjątkiem receptorów HER-2 i naciekania naczyń okołoguzowych), uzupełniona o wskaźnik mitotyczny, została zaliczona przez Kolegium Amerykańskich Patologów (*College of American Pathologists – CAP*) do tzw. I kategorii czynników rokowniczych [73]. Do czynników katego-

rii II zaliczono stan receptorów HER-2, mutację supresorowego genu *P53*, stopień naciekania naczyń krwionośnych i limfatycznych, frakcję komórek w fazie syntezy i obecność markerów proliferacji: Ki-67 i MIB-1.

W kategorii III znalazły się: zawartość DNA w komórkach guza, stopień angiogenezy, ekspresja receptorów wzrostu; naskórkowego (*epidermal growth factor receptor* – EGFR) i czynnika transformującego typu α , oraz obecność białek bcl-2 i pS2, a także enzymu proteolitycznego – katepsyny D.

Obecnie nie ma już wątpliwości, że u chorych na raka piersi uzupełniające leczenie systemowe wydłuża czas przeżycia bez nawrotu choroby i czas przeżycia całkowitego, niezależnie od obecności przerzutów do pachowych węzłów chłonnych i stanu menopauzalnego [172]. Wykazano ponadto, że większe bezwzględne korzyści z leczenia uzupełniającego odnoszą chore o niekorzystnych czynnikach rokowniczych [67]. Pomimo to istnieją znaczne różnice w skuteczności leczenia w grupach o podobnych cechach klinicznych. Może to świadczyć zarówno o znacznej niejednorodności raków piersi, jak i niedoskonałości stosowanych obecnie czynników ryzyka. Mimo że najistotniejszym czynnikiem zwiększającym ryzyko nawrotu choroby są przerzuty do pachowych węzłów chłonnych, do wznowy w ciągu 10 lat od zabiegu operacyjnego dochodzi u ponad 30% chorych z cechą N0 [51]. Uzupełniająca chemioterapia i hormonoterapia zmniejszają ryzyko wystąpienia przerzutów o około jedną trzecią, ale równocześnie szacuje się, że aż 70–80% chorych nie odnosi korzyści z tych form uzupełniającego leczenia systemowego [64–66]. W tej sytuacji istnieje konieczność poszukiwania innych, bardziej wiarygodnych czynników rokowniczych, które pozwoliłyby na bardziej precyzyjny dobór chorych do leczenia uzupełniającego oraz na jego większą indywidualizację.

Nowe nadzieje wiąże się z opublikowanymi ostatnio wynikami badań oceniającymi wartość rokowniczą cykliny E i markerów naciekania uPA/PAI-1 [115, 258]. W retrospektywnym badaniu określającym związek pomiędzy stężeniem cykliny E w komórkach nowotworowych a czasem przeżycia oceniono prawie 400 chorych na raka piersi [115]. Stwierdzono, że współczynnik ryzyka zgonu z powodu postępu choroby u chorych z wysokim stężeniem cykliny E jest wyższy niż ryzyko związane z innymi markerami biologicznymi i aż siedmiokrotnie wyższy od współczynnika ryzyka związanego z przerzutami do pachowych węzłów chłonnych. Podobnie interesujące wyniki uzyskano w odniesieniu do markera naciekania uPA i jego inhibitora PAI-1 w komórkach guza w grupie 115 chorych z cechą N0, które nie otrzymały leczenia uzupełniającego [258]. Wykazano, że wysokie stężenie uPA/PAI-1 związane jest z bardziej agresywnym przebiegiem choroby oraz krótszym czasem do nawrotu i czasem przeżycia. Wyniki obu tych badań mają szczególne znaczenie u chorych bez przerzutów do pachowych węzłów chłonnych i o innych korzystnych czynnikach rokowniczych, jednak ich kliniczna przydatność wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach.

1.3. Możliwości wykorzystania badań molekularnych do celów rokowniczych i predykcyjnych w raku piersi

Wiele danych wskazuje, że kliniczna różnorodność raków piersi jest wynikiem złożonych zaburzeń molekularnych o znacznej indywidualnej różnorodności [133, 134]. Należą do nich zarówno mutacje somatyczne, jak i zaburzenia *epigenetyczne*, tj. zmiany funkcji genu bez zmiany jego struktury. Oba typy zaburzeń, poprzez wpływ na ekspresję wielu genów, mogą pobudzać wzrost guza, naciekanie i powstawanie przerzutów. Zastosowanie nowatorskiej technologii mikromacierzy (czujników) DNA pozwoliło na równoczesową analizę wielu tysięcy genów w komórkach nowotworowych [223]. Wyniki tych badań mogą znaleźć zastosowanie w uściśleniu rozpoznania i molekularnej klasyfikacji nowotworu, w ocenie jego skłonności do tworzenia przerzutów oraz w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie [10, 105, 185]. Przełomowe znaczenie mogą mieć wyniki badań holenderskich, w których wykazano, że ekspresja wybranych 70 genów pozwala spośród ogółu chorych na wczesnego raka piersi precyzyjnie wyodrębnić grupy o korzystnym i niekorzystnym rokowaniu [234, 236]. Stosując metodę mikromacierzy DNA, z użyciem RNA wyizolowanego z komórek raka piersi, określono tzw. genetyczny podpis (*gene-expression signature*) dla poszczególnych chorych, który wiązał się z korzystnym lub niekorzystnym rokowaniem. Analizie poddano zamrożone wycinki 295 raków piersi pochodzące od chorych w wieku poniżej 55 lat, operowanych w latach 1984–1995 z powodu raka piersi w I i II stopniu zaawansowania klinicznego choroby wg skali TNM [225]. U blisko połowy z nich stwierdzono przerzuty do pachowych węzłów chłonnych. Zgodnie z obowiązującymi standardami, chore z czynnikami rokowniczymi tradycyjnie uznanymi za niekorzystne, otrzymały systemowe leczenie uzupełniające. Na podstawie metody mikromacierzy DNA dokonano oceny współczynnika ekspresji 70 wybranych genów. Na tej podstawie wyodrębniono 115 chorych o korzystnym profilu molekularnym i 180 – o niekorzystnym. Prawdopodobieństwo przeżycia 10 lat bez cech wznowy wynosiło w obu tych grupach odpowiednio 85% i 51%, a ryzyko wystąpienia przerzutów odległych w drugiej grupie było ponad 5 razy wyższe niż w pierwszej. Ta różnica pozostawała znamienna niezależnie od cechy N.

Interesujące były także wyniki dotyczące profilu molekularnego w grupie chorych bez przerzutów do pachowych węzłów chłonnych. Biorące w badaniu chore zostały podzielone na dwie kategorie; niskiego i wysokiego ryzyka nawrotu. Posłużono się dwoma kryteriami; tradycyjnym, przyjętym na konferencji w St. Gallen w 2001 roku [85] i molekularnym, opartym na profilu ekspresji badanych genów. Według tradycyjnych i molekularnych kryteriów, do grupy niskiego ryzyka zakwalifikowano odpowiednio 15% i 40% chorych. Oznacza to, że w grupie chorych kwalifikowanych na podstawie kryteriów klinicznych do

kategorii wysokiego ryzyka, wiele ma korzystny „podpis genetyczny” i niskie ryzyko niepowodzenia. Stwierdzono przy tym, że wyniki leczenia chorych zakwalifikowanych do grupy niskiego ryzyka na podstawie tradycyjnych kryteriów, ale o złym „rokowaniu genetycznym” są dużo gorsze. Wyniki tych badań wskazują, że dotychczas stosowane czynniki rokownicze w kwalifikacji chorych do pooperacyjnego leczenia systemowego mogą w przyszłości zostać zastąpione bardziej precyzyjnymi. Ponadto wydaje się, że ustalenie „genetycznego profilu” dla poszczególnych chorych na raka piersi pozwoli w przyszłości nie tylko określić stopień ryzyka nawrotu nowotworu, ale także dobrać indywidualną metodę leczenia. Zastosowanie wyników tych badań w praktyce klinicznej wymaga jednak ich potwierdzenia w dużych badaniach prospektywnych.

1.4. Czynniki predykcyjne

Receptory steroidowe przez wiele lat pozostawały jedynym powszechnie stosowanym czynnikiem predykcyjnym u chorych na raka piersi. W wielu pracach jednoznacznie wykazano, że nawet słaba ekspresja ER i/lub PgR związana jest z korzystniejszą odpowiedzią na leczenie hormonalne w porównaniu do braku receptorów, zatem guzy te powinny być zaszeregowane do receptorododatnich [52]. W ostatnich latach pojawiło się szereg doniesień na temat predykcyjnej roli koaktywatorów receptorów steroidowych oraz ekspresji onkogenu *ERBB-2* [159]. Zahamowanie nadekspresji receptorów *ERBB-2* (HER-2) stanowiło także atrakcyjny cel terapii przeciwnowotworowych. Przykładem takich terapii jest trastuzumab, monoklonalne przeciwciało, które łącząc się z receptorem HER-2, powoduje jego zablokowanie [168, 238]. Leczenie trastuzumabem pozwala uzyskać odpowiedź u ok. 20–40% chorych na zaawansowanego raka piersi z nadekspresją lub amplifikacją receptora HER-2 w komórkach nowotworu [208–210], jak również poprawia wyniki leczenia uzupełniającego w tej grupie [174, 186]. Pomimo że wczesne wyniki niektórych badań klinicznych sugerują zmniejszone prawdopodobieństwo odpowiedzi na leczenie tamoksyfenem i schematem CMF w guzach z nadekspresją lub amplifikacją receptorów *ERBB-2*, dotychczasowe dowody są niewystarczające dla uznania tej cechy za czynnik umożliwiający wybór rodzaju chemio- lub hormonoterapii [84, 195]. Duże zainteresowanie wzbudziła opublikowana w 1987 roku praca, w której wykazano, że u chorych na raka piersi amplifikacja genu *ERBB-2* wiąże się z krótszym czasem do nawrotu choroby, a w podgrupie z przerzutami do węzłów chłonnych – również z krótszym czasem przeżycia całkowitego [208]. Były to jedne z pierwszych dowodów rokowniczego znaczenia markerów molekularnych w chorobie nowotworowej. Tak więc ekspresja receptorów *ERBB-2* lub amplifikacja kodujących je genów jest nie tylko czynnikiem predykcyjnym w odniesieniu do leczenia trastuzumabem ale także czynnikiem rokowniczym. Wyniki te, potwierdzone w kolejnych badaniach [52, 227], zwiększyły zaintere-

sowanie całą rodziną genów *ERBB* i ich receptorów. W ostatnim czasie stwierdzono także, że amplifikacja *ERBB-2* w komórkach raka piersi jest związana ze zwiększeniem klinicznej odpowiedzi na leczenie schematami zawierającymi antracykliny [182].

1.5. Budowa i mechanizm działania receptorów rodziny *ERBB* i kodujących je genów

Receptory rodziny *ERBB*, zwane też receptorami naskórkowych czynników wzrostowych (*epidermal growth factor receptor* – EGFR) lub rodziną receptorów kinazy tyrozynowej RTK I (*receptor tyrosine kinase growth factor type I*), są centralnym elementem szlaków sygnałowych wiodących do wnętrza komórki. Kodujące je geny *ERBB* należą do grupy protoonkogenów, czyli genów prekursorowych, które w normalnych warunkach występują we wszystkich komórkach organizmu. Przy niezaburzonych mechanizmach kontroli nie powodują one transformacji nowotworowej [75]. Komórkowe protoonkogeny mogą być aktywowane w kierunku zmiany funkcji na onkogeną w różny sposób. Najczęstsze są zmiany strukturalne zachodzące w genomie komórki, polegające na wystąpieniu mutacji punktowej, translokacji lub amplifikacji protoonkogenów wewnątrz chromosomu. Onkogeny są bardziej aktywne w porównaniu z protoonkogenami, co sprawia, że nawet jedna kopia onkogeny wystarcza do zaburzenia prawidłowej funkcji komórki [54, 104]. Spośród około 25.000 genów zawartych w genomie diploidalnych komórek raka piersi, zaledwie kilka ma udowodniony wpływ na progresję nowotworu [54, 164]. Należą do nich przede wszystkim *c-myc* i *ERBB-2*. Rola pozostałych protoonkogenów rodziny *ERBB* w procesie nowotworzenia nie została jeszcze ostatecznie określona. Należy przy tym zwrócić uwagę, iż każdy z czterech poznanych genów rodziny *ERBB* położony jest w innym chromosomie.

Protoonkogeny *ERBB* biorą między innymi udział w regulacji wzrostu, proliferacji, apoptozy, różnicowania, wydzielania białek i migracji komórek, uczestniczą w morfogenezie organów i tkankowych procesach naprawczych [40], a także odgrywają ogromną rolę w przekazywaniu informacji zarówno w normalnych, jak i nowotworowych komórkach organizmu [27, 36, 121]. Nadmierne pobudzenie szlaku przekazywania sygnałów w wyniku podwyższonej aktywności kinaz tyrozynowych może być wynikiem różnych zaburzeń genetycznych lub biochemicznych. Należą do nich amplifikacja genu kodującego kinazy, nadmierna aktywność procesów ekspresji kinaz niezależna od liczby kopii tego genu [25] oraz nadekspresja mRNA [242]. Amplifikacja sekwencji DNA jest procesem, w którym selektywnie wzrasta liczba kopii określonej części DNA komórki [242]. Zjawisko to dotyczy głównie dwóch grup genów: genów warunkujących oporność na leki oraz protoonkogenów, do których zalicza-

ne są geny kodujące białka receptorowe ERBB. Natomiast delecja jest procesem, w którym dochodzi do utraty nukleotydu. Uważa się, że zmiany te mogą być związane z powstawaniem nowotworów, rękowaniem, a także odpowiedzią na niektóre formy leczenia. Zarówno amplifikację, jak i delecję można badać za pomocą ilościowej techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR). Metoda ta pozwala na oszacowanie liczby cząstek matrycy DNA w badanej próbce. Wartość ta podawana jest w postaci tzw. średniej liczby kopii genów AGCN (*average gene copy number*).

Receptory rodziny ERBB wykazują aktywność kinaz tyrozynowych i są najczęściej zlokalizowane w obrębie błony komórek docelowych [121, 125]. Są to glikoproteiny o podobnej budowie, którą w sposób uproszczony można przedstawić jako strukturę składającą się z trzech elementów: części zewnątrzkomórkowej, na którą składają się cztery domeny rozpoznające i wiążące ligand, przez błonową domenę helikalną i części cytoplazmatycznej o aktywności kinazy tyrozynowej, wykazującej również funkcję autoinhibitora aktywności receptora (ryc.1) [27, 108].

Domena przezbłonowa stanowi miejsce oddziaływania receptora ze zwrotnie hamującymi jego aktywność dwiema kinazami: PKC (*protein kinase C*) i erk MAP (*mitogen activated protein kinase*) [27].

DOMENY:

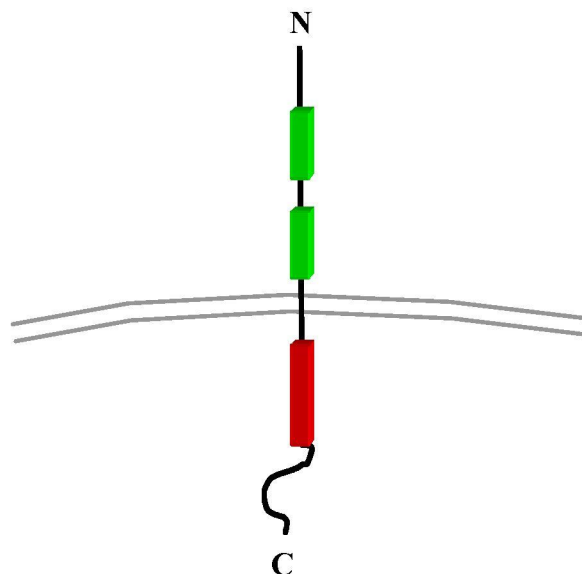
- Zewnątrzkomórkowa

- Przezbłonowa

- Wewnątrzkomórkowa

Kinaza tyrozynowa

Niść C-końcowa



Ryc. 1. Schemat budowy receptora ERBB

Fig. 1. Scheme of ERBB receptor

Ekspresja kinaz ERBB obserwowana jest na powierzchni wielu typów komórek, a proces ten jest regulowany na różnych poziomach.

Receptorowe kinazy tyrozynowe dzielą się na kilkanaście klas. Jak wspomniano, klasę I stanowią receptory naskórkowych czynników wzrostu, określane również rodziną receptorów ERBB lub HER (*human epidermal growth factor receptor*). Grupa ta obejmuje cztery znane rodzaje receptorów: receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), inaczej nazywany ERBB-1 lub HER1, receptor ERBB2 lub HER2 i receptory ERBB-3 i ERBB-4 (odpowiednio HER3 i HER4) [102]. Każdy z tych receptorów, z wyjątkiem receptora ERBB-2, ma własny wzorzec przyłączających się do niego ligandów, które determinują jego funkcję fizjologiczną [40, 185, 190]. Ligandami mogą być czynniki wzrostu, hormony i czynniki różnicowania oddziałujące na komórki docelowe za pośrednictwem swoistych receptorów. Receptor ERBB-2, jako jedyny z całej rodziny ERBB nie posiada zdolności do wiązania ligandów, co może być wynikiem typowej dla niego, odmiennej struktury wiążącej białko [157].

W prawidłowych warunkach aktywacja receptorów ERBB jest kontrolowana przez przestrzenną i okresową ekspresję ich ligandów, należących między innymi do rodziny EGF-zależnych naskórkowych czynników wzrostu [170, 190]. Ligandy, wiążąc się z receptorami ERBB, prowadzą do zmiany konformacji części zewnątrzkomórkowej receptora, która umożliwia dimeryzację. Połączenie swoistego ligandu z odpowiadającym mu receptorem może indukować dimeryzację z kolejną cząsteczką tego samego rodzaju (homodimeryzację). Partnerem dimeryzacji może być jednak także każdy z pozostałych receptorów rodziny ERBB – wówczas aktywacja domeny cytoplazmatycznej dokonuje się w wyniku heterodimeryzacji. Białkiem najczęściej uczestniczącym w tym procesie jest ERBB-2. Pomimo braku własnych ligandów, funkcjonuje ono jako heterodimer dla pozostałych receptorów tej rodziny. Powstające z jego udziałem heterodimery charakteryzują się zwiększoną siłą wiązania ligandów i przekazywania sygnałów. W efekcie dochodzi do procesu fosforylacji wewnątrzkomórkowej grupy tyrozynowej. Proces ten jest niezbędny do zainicjowania rekrutacji białek docelowych i rozpoczęcia skomplikowanych reakcji przekazywania sygnałów [5]. Reszty fosfotyrozyny są rozpoznawane przez białka substratowe posiadające domeny SH2 lub PTB. Inne zestawy substratów są wiązane i fosforylowane przez każdy z możliwych dimerów ERBB, co zapewnia im ściśle określoną funkcję przekaznikową. Tworzący się wieloskładnikowy kompleks przesyła sygnały do wnętrza komórki. Ze względu na rozległe współdziałania zachodzące pomiędzy receptorami, rodzina ERBB tworzy sieć sygnałową o ogromnym potencjale przekazywania biologicznych informacji, a każdy z receptorów spełnia odmienne, ściśle określone zadanie [27, 197]. Ciągła aktywacja kinaz receptorowych prowadzi do nadmiernej aktywacji szlaku sygnalizacyjnego. Zjawisko to może być spowodowane różnymi zaburzeniami, takimi jak mutacje czy auto-krylna aktywacja kinazy. Wydaje się jednak, że najczęstszą przyczyną nadeks-

presji kinazy jest amplifikacja. Uważa się, że taka zwiększona aktywność przewodzenia sygnałów wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju nowotworu, a także ze wzrostem jego inwazyjności [244]. Możliwość szczegółowego poznania zarówno rodziny receptorów ERBB, jak i prowadzących przez nie szlaków sygnałowych, może stworzyć możliwość odkrycia nowych celów terapeutycznych w leczeniu nowotworów. Zaburzoną aktywację receptorów rodziny ERBB stwierdza się w wielu nowotworach, zatem stanowią one potencjalny cel dla celowanej terapii przeciwnowotworowej. Wiele przeciwciał wymierzonych w kierunku zewnątrzkomórkowych domen receptorów ERBB i inhibitorów kinazy tyrozynowej stosuje się już obecnie w praktyce klinicznej, inne są nadal przedmiotem badań klinicznych [108].

1.5.1. GEN *ERBB-1* I KODOWANE PRZEZ NIEGO BIAŁKO

Pierwszym, najlepiej poznany receptorem rodziny ERBB, jest receptor naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (*ERBB-1*). Jest on przezbłonową glikoproteiną składającą się z 1186 reszt aminokwasowych. Kodujący go gen zlokalizowany jest w 7. chromosomie, w pozycji p12-13. Domena zewnątrzkomórkowa zawiera względnie dużą ilość reszt cysteiny, która jest miejscem wiązania aktywatorów mitogennych – ligandów *ERBB-1*, np. naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), transformującego czynnika wzrostu α (TGF α), wiążącego heparynę czynnika EGF-podobnego (HB-EGF) oraz betacelluliny i epireguliny [93, 184].

Uważa się, że w wielu nowotworach stan receptorów *ERBB-1* ulega zmianie w wyniku mutacji odpowiadającego mu genu. Do nadekspresji może prowadzić stosunkowo rzadko obserwowana w tym genie amplifikacja, częściej może być ona regulowana poprzez inaktywację represorów i zwiększenie ilości aktywatorów transkrypcji [116]. Delecje *ERBB-1* zdarzają się częściej niż amplifikacje i są najprawdopodobniej spowodowane rearanżacją materiału genetycznego [241].

Negatywne znaczenie rokownicze nadekspresji *ERBB-1* w raku piersi zostało po raz pierwszy opisane w roku 1985 [201] i następnie potwierdzone w innych pracach [31, 153, 228].

1.5.2. GEN *ERBB-2* I KODOWANE PRZEZ NIEGO BIAŁKO HER-2

Gen *ERBB-2* zlokalizowany jest w pozycji q21 chromosomu 17 [2, 55]. Koduje on białko receptorowe *ERBB-2*, nazywane również HER-2 lub p185. Jak wspomniano, *ERBB-2* nie posiada własnych ligandów [89] i pełni raczej funkcję koaktywatora w odniesieniu do innych białek rodziny ERBB. Istnieją również sugestie, że rolę liganda spełnia substancja białkowa ASGP-2 (*ascites sialogli-*

coprotein-2) [44]. Substancja ta prawdopodobnie moduluje heterodimeryzację ERBB-2 z innymi białkami grupy ERBB. Wydaje się jednak, że podstawowa aktywność sygnałowa tego receptora wynika przede wszystkim z możliwości oddziaływania z innymi receptorami rodziny ERBB [100, 233, 252]. Receptor ten może bowiem ulec zarówno stabilizacji, jak i transaktywacji przez ligandy swoiste przede wszystkim dla receptorów ERBB-1 i ERBB-3 [62]. Umożliwia to udział ERBB-2 w przenoszeniu sygnałów, mimo braku właściwego dla tego receptora ligandu. Wielu autorów uważa, że heterodimery powstające z udziałem ERBB-2 są szczególnie aktywne [27, 49, 129]. W warunkach klinicznych zwiększona ekspresja heterodimerów ERBB-2/ERBB-1 lub ERBB-2/ERBB-3 związana jest z bardziej agresywnym przebiegiem nowotworu [48, 50, 102, 120, 129, 142, 206].

1.5.3. GEN *ERBB-3* I KODOWANE PRZEZ NIEGO BIAŁKO

Gen *ERBB-3* zlokalizowany jest w pozycji q13 chromosomu 12. [127, 178]. Kodowane przez niego białko charakteryzuje się względnie niską aktywnością kinazy tyrozynowej. Ligandami ERBB-3 są hereguliny: neuregulina 1 i 2 (NRG-1 i NRG-2). Cechą wyróżniającą receptor ERBB-3 spośród innych receptorów rodziny ERBB jest dużo mniejsza homologiczność jego domen śródbłonowych i cytoplazmatycznych z receptorem ERBB-1 w porównaniu z receptorami ERBB-2 i ERBB-4.

Przypuszcza się, że gen *ERBB-3* nie pełni samodzielnie funkcji onkogennej, ale jego zwiększona ekspresja może wzmacniać onkogenywny efekt spowodowany nadekspresją receptora ERBB-2 [3]. Spełnianie funkcji pewnego rodzaju koaktywatora może mieć potencjalnie duże znaczenie w procesie transformacji nowotworowej i jednocześnie stanowić cel terapii przeciwnowotworowej.

Prace dotyczące klinicznego znaczenia nadekspresji genu *ERBB-3* w nowotworach piersi są nieliczne i zawierają sprzeczne wyniki [79, 118, 126, 130, 131, 230].

1.5.4. GEN *ERBB-4* I KODOWANE PRZEZ NIEGO BIAŁKO

ERBB-4 jest najmniej poznanym genem rodziny *ERBB*. Jest on zlokalizowany w pozycji q33.3–34 chromosomu 2. [261]. Istnieją dwie grupy ligandów aktywujących czynność receptora ERBB-4 zostały podzielone na dwie grupy, z których pierwszą stanowią cztery hereguliny, ale tylko NRG-3 i NRG-4 są swoiste dla tego receptora. Drugą grupę stanowią niektóre czynniki wzrostu (np. betacellulina, epiregulina, termoregulina), będące również ligandami ERBB-1.

Przekazywanie sygnałów przez ERBB-4 odbywa się w wyniku pobudzającego działania ligandu i homodimeryzacji ERBB-4 lub jego heterodimeryzacji z innymi receptorami tej rodziny, najczęściej ERBB-2 [42, 43, 46].

Ekspresja receptora ERBB-4 występuje w raku piersi znacznie rzadziej w porównaniu z białkami ERBB-1 i ERBB-2 [22, 119, 240]. Uważa się, że ekspresji ERBB-4 często towarzyszy obecność receptorów steroidowych, wyższe zróżnicowanie histologiczne nowotworu i lepsze rokowanie [213, 217], aczkolwiek nie wszystkie doniesienia potwierdzają te zależności [137]. Zaburzenie to względnie często dotyczy choroby Pageta [152]. Badania dotyczące roli receptora ERBB-4 w komórkach raka piersi są nieliczne.

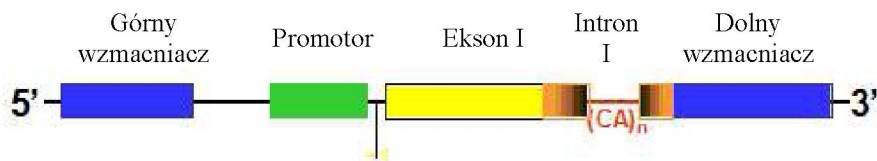
1.6. Polimorfizm mikrosatelitarny i utrata heterozygotyczności w genie ERBB-1

W odniesieniu do wielu genów, w tym także *ERBB-1*, ważną funkcję regulacyjną spełnia pierwszy intron [74, 205, 219]. W badaniach przeprowadzonych u ludzi rasy białej stwierdzono występowanie zjawiska polimorfizmu prostych powtórzonych sekwencji (*simple sequence repeat – SSR*) CA (A – adenina, C – cytozyna) zlokalizowanych w intronie 1., położonym tuż przed promotorem [47]. Zmiany polimorficzne polegają na występowaniu w populacji różnych form allelu danego genu. Allele mogą się różnić pojedynczym podstawieniem w sekwencji nukleotydów danego genu lub liczbą powtórzeń określonego motywu [12]. Różnica pomiędzy mutacją a zmianą polimorficzną jest umowna; za kryterium różnicujące przyjęto częstość jej występowania w populacji. Za polimorfizm uważa się zmianę, która występuje w populacji z częstością większą niż 10%.

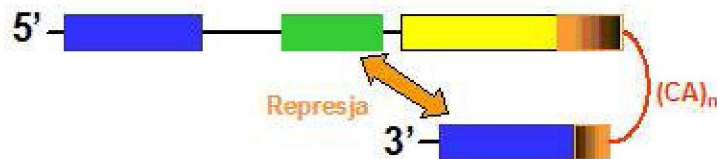
Najprawdopodobniej SSR jest wynikiem niesprawnego systemu naprawy DNA, najczęściej spowodowanego mutacjami genów naprawy [124]. Błędy powstające podczas replikacji DNA nie mogą być naprawione, co prowadzi do zmian w długości prostych powtórzonych sekwencji mikrosatelitarnych. Powstałe polimorficzne sekwencje DNA charakteryzują się różną długością lub różnicami w sekwencji w obu allelach. Za bezpośrednią przyczynę występowania tego zjawiska uważa się tzw. „ślizganie się” nici DNA w komórkach, zachodzące w trakcie replikacji. Zależnie od tego, która z nici zostanie przesunięta, liczba powtórzeń maleje (nić matrycowa) lub wzrasta (nić syntetyzowana).

Znaczenie tych powtórzeń nie jest w pełni poznane; wydaje się, że mogą one stanowić miejsca ułatwiające kontrolowaną rekombinację lub wiążące enzymy replikacyjne [124]. Jest również prawdopodobne, że takie powtórzenia mogą hamować aktywność promotora. Regulacyjna funkcja zmiennej liczby powtórzeń CA jest obecnie przedmiotem licznych badań. Uważa się również, że

CA-SSR zachodzące w obrębie genu *ERBB-1* mogą odgrywać znaczącą rolę w regulacji ekspresji naskórkowego czynnika wzrostu. Dotychczasowe badania wskazują, że nadekspresja receptora *ERBB-1* w niewielkim tylko stopniu wynika z amplifikacji genu. Najczęściej jest ona spowodowana zaburzeniami na poziomie transkrypcji, która może być regulowana poprzez długość powtarzanych sekwencji polimorficznych zlokalizowanych w pierwszym intronie *ERBB-1*. Z przeprowadzonych badań *in vitro* wynika, że aktywność transkrypcyjna genu *ERBB-1* maleje wraz ze zwiększaniem się liczby powtórzeń sekwencji dwunukleotydowych [82] (ryc. 2). Potwierdzenie tych wyników w badaniach klinicznych mogłoby wskazywać na potencjalne rokownicze znaczenie polimorfizmu mikrosatelitarnego w genie *ERBB-1* u chorych na raka piersi.



Mała liczba powtórzeń CA → Wysoka aktywność transkrypcyjna
Low number of CA repeats → High transcription activity



Duża liczba powtórzeń CA → Niska aktywność transkrypcyjna
High number of CA repeats → Transcription inhibition

Ryc. 2. Zależność aktywności transkrypcyjnej *ERBB-1* od liczby powtórzeń CA
*Fig. 2. Modulation of *ERBB-1* transcription by a number of CA repeats*

Zainteresowanie zjawiskiem polimorfizmu wzrosło po stwierdzeniu jego niestabilności genetycznej w wielu ludzkich nowotworach. W dziedzicznych, niepolipowatych rakach jelita grubego zauważono występowanie zmian długości określonych alleli mikrosatelitarnych w DNA pochodzącym z komórek nowotworowych w porównaniu z DNA wyizolowanym ze zdrowej tkanki pochodzą-

cej od tej samej osoby [110, 124]. Zjawisko to określono jako niestabilność mikrosatelitarną (*microsatellite instability* – MSI).

Analizując odpowiednio dobrane sekwencje mikrosatelitarne ściśle sprzężone z genami zaangażowanymi w procesy nowotworowe można również określić utratę heterozygocystości, w wyniku której tracony jest jeden allel (*loss of heterozygosity* – LOH). Podobnie do MSI, wykrywanie LOH opiera się na porównywaniu alleli z komórek guza i tkanek niezmienionych nowotworowo, pochodzących od tego samego chorego. Uważa się, że LOH jest wskaźnikiem somatycznej delecji będącej wynikiem utraty genów supresorowych, które przeciwdziałają procesom nowotworzenia. Odmienną sytuacją w odniesieniu do *ERBB-1* polega przede wszystkim na tym, że jest on protoonkogenem a nie genem supresorowym. Konsekwencją tego jest niewyjaśniony dotychczas wpływ LOH i MSI w genie *ERBB-1* na procesy nowotworowe.

2. UZASADNIENIE PODJĘCIA BADAŃ

Pomimo pewnej poprawy, wyniki leczenia raka piersi są nadal niezadowalające. Wydaje się, że dalszy postęp w leczeniu tego nowotworu można będzie osiągnąć między innymi przez bardziej odpowiedni dobór chorych do leczenia na podstawie precyzyjnych czynników rokowniczych i predykcyjnych.

Rozwój raka piersi jest najpewniej wynikiem współdziałania wielu czynników genetycznych, środowiskowych i hormonalnych [147]. Wydaje się, że największe znaczenie w procesie onkogenezy tego nowotworu odgrywa rodzina protoonkogenów *ERBB* i kodowanych przez nie białek receptorowych. Mogą one funkcjonować jako receptory czynników wzrostu, uczestniczyć w wewnątrzkomórkowych szlakach sygnałowych lub pełnić rolę czynników transkrypcyjnych na poziomie jądra komórkowego [58]. Komórkowe protoonkogeny mogą być aktywowane do onkogenów poprzez zmiany strukturalne zachodzące w genomie komórki: punktowe mutacje, translokacje lub amplifikacje.

Spośród receptorów rodziny *ERBB*, najlepiej poznane są receptory *ERBB-1* i *ERBB-2*. Na podstawie dotychczasowych badań sądzi się, że nadekspresja białka *ERBB-1*, a szczególnie *ERBB-2* wiąże się z niekorzystnym przebiegiem choroby [145, 154, 165, 208, 249], a w odniesieniu do *ERBB-2* – najprawdopodobniej także ze zróżnicowaną odpowiedzią na różne formy leczenia systemowego. Znacznie mniej wiadomo na temat klinicznego znaczenia nadekspresji niedawno opisanych receptorów *ERBB-3* i *ERBB-4*.

Większość badań dotyczących związku pomiędzy ekspresją receptorów *ERBB* a cechami histoklinicznymi raka piersi dotyczyła pojedynczych białek tej rodziny. Ponieważ jednak do aktywacji określonych receptorów rodziny *ERBB* może dojść jedynie w wyniku zjawiska dimeryzacji, czyli połączenia się receptorów w pary homo- lub heterodimerów, istotne wydaje się określenie zjawiska współwystępowania zaburzeń *ERBB*. Uważa się, że receptory te współdziałają w wielu mechanizmach onkogenezy raka piersi, a zdolność mitogenna heterodimerów jest znacznie silniejsza niż homodimerów [107]. Wyniki dotychczas opublikowanych badań dotyczących koekspresji receptorów rodziny *ERBB* są nieliczne. Wydaje się, że ekspresja dwóch receptorów, szczególnie z udziałem *ERBB-2*, wiąże się z bardziej agresywnym przebiegiem choroby [98, 219] i występuje częściej u chorych z przerzutami do węzłów chłonnych [107], natomiast równoczesna ekspresja *ERBB-4* wiąże się ze zniesieniem tego niekorzystnego efektu.

Na podstawie najlepiej opisanego genu *ERBB-2* można sądzić, że nadekspresja białek receptorowych najczęściej jest związana z amplifikacją kodujących je genów. Nadekspresja *ERBB-2* występuje jednak także przy jednoczesnym braku amplifikacji tego genu [99, 192]. Rzadszym zjawiskiem jest odwrotna

sytuacja, tj. brak nadekspresji białka przy obecności amplifikacji, nawet przy zwiększonej ekspresji mRNA [106].

Dotychczas opublikowano jedynie dwie prace dotyczące koekspresji wszystkich czterech receptorów ERBB u chorych na raka piersi i ich związku z cechami histoklinicznymi guza [107, 218, 219]. Zupełnie brak jest natomiast danych dotyczących współzależności pomiędzy zaburzeniami występującymi w genach rodziny *ERBB* i ich związku z cechami histoklinicznymi nowotworu.

Przedmiotem niniejszych badań są także mało poznane w raku piersi zjawiska polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych i utraty heterozygotyczności zachodzące w genie *ERBB-1*. Zmienna liczba powtórzeń CA blisko dolnego wzmacniacza w pierwszym intronie może być częściowo odpowiedzialna za obserwowane u ludzi, indywidualne różnice w ekspresji ERBB1 [38, 82]. Dotychczas udało się jedynie scharakteryzować wpływ liczby powtórzeń CA na transkrypcję *in vitro* i syntezę RNA *ERBB1* okolicy 5' [83].

Uważa się, że podstawą transformacji nowotworowej jest przede wszystkim utrata przez komórkę zdolności kontrolowania wzrostu na skutek pojawienia się zmian sekwencyjnych w jej materiale genetycznym. Z tego powodu poznanie mechanizmów molekularnych tych zaburzeń i określenie mutacji odpowiedzialnych za rozwój danego nowotworu może stworzyć nowe możliwości jego wczesnego rozpoznawania, określenia rokowania i doboru odpowiedniej terapii. Poza tym zarówno same zaburzenia genetyczne, jak i nadekspresja ich produktów białkowych stanowią atrakcyjny cel terapii z udziałem przeciwciał monoklonalnych i terapii genowych [45, 72].

3. CEL PRACY

W niniejszej pracy przeprowadzono łączną ocenę zaburzeń wszystkich czterech genów rodziny *ERBB* w raku piersi, a także oznaczenie przy wykorzystaniu techniki PCR i elektroforezy kapilarnej polimorfizmu sekwencji powtórzonych (CA)_n w genie *ERBB-1* i utratę heterozygotyczności (LOH) w jego obrębie.

Celem pracy było uzyskanie nowych danych dotyczących anomalii genów rodziny *ERBB* w raku piersi i – dotychczas całkowicie nieznanych – informacji na temat niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych genu *ERBB-1*.

Przeprowadzone badania miały charakter prospektywny i głównie poznawczy. Szczegółowe określenie rokowniczego znaczenia poszczególnych zaburzeń molekularnych będzie przedmiotem odrębnej analizy, przeprowadzonej po odpowiednio długim czasie obserwacji chorych. Obecnie dokonano jedynie wstępnej oceny tego zagadnienia.

3.1. Cele szczegółowe

1. Określenie częstości występowania zaburzeń liczby kopii genów w czterech protoonkogenach rodziny *ERBB* w raku piersi
2. Określenie współwystępowania zaburzeń w badanych genach rodziny *ERBB*
3. Oznaczenie polimorfizmu sekwencji powtórzonych (CA)_n genu *ERBB-1* oraz utraty heterozygotyczności (LOH) w obrębie tego genu w porównaniu z kontrolną grupą zdrowych kobiet
4. Określenie zależności pomiędzy zaburzeniami molekularnymi a czynnikami histoklinicznymi nowotworu
5. Określenie zależności pomiędzy wartością AGCN *ERBB-1* i *ERBB-2* a ekspresją kodowanych przez te geny białek receptorowych
6. Określenie zależności pomiędzy ekspresją receptorów *ERBB-1* i *ERBB-2* a czynnikami histoklinicznymi nowotworu
7. Wstępna ocena rokowniczego znaczenia zaburzeń molekularnych genów rodziny *ERBB* i ekspresji receptorów *ERBB-1* i *ERBB-2*

4. MATERIAŁ I METODY

4.1. Charakterystyka kliniczna badanej grupy chorych

Badaniem objęto 225 chorych na raka piersi, leczonych w latach 1999–2003 w trzech ośrodkach: Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie (99 chorych, 44%), Regionalnym Centrum Onkologii w Bydgoszczy (77 chorych, 34%) i Akademii Medycznej w Gdańsku (49 chorych, 22%). Wiek chorych zawarty był w granicach od 33 do 85 lat, średnia wieku wynosiła 56,5 lat. W momencie rozpoczynania leczenia 71 chorych (32%) było przed menopauzą. Stopień zaawansowania klinicznego choroby ustalano wg skali TNM przed rozpoczęciem leczenia [31, 70] (tab. 2).

Wszystkie chore biorące udział w badaniu wyraziły zgodę na pobranie materiału tkankowego z guza piersi i poddanie go dalszej ocenie.

Tab. 2. Stopień zaawansowania klinicznego w skali TNM

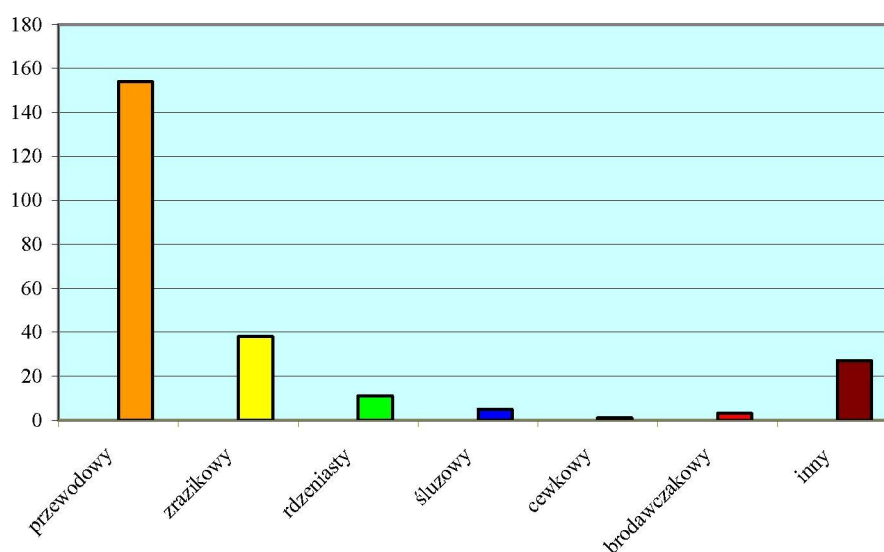
Tab. 2. *TNM clinical stage*

T \ N	0	1	2	Nie określono <i>Not assessed</i>	Łącznie (%) <i>Total</i>
1	53	7	4		64 (28)
2	50	32	5		87 (39)
3	7	15	13		35 (15,5)
4	4	11	20		35 (15,5)
x	2				2 (1)
Nie określono <i>Not assessed</i>				2	2 (1)
Łącznie (%) <i>Total</i>	116 (51)	65 (29)	42 (19)	2 (1)	225

U połowy chorych (51%) w ocenie klinicznej nie stwierdzono przerzutów do pachowych węzłów chłonnych, a jedynie u 28% chorych guz miał średnicę mniejszą od 2 cm. U 79 kobiet (35%) występowały cechy kwalifikujące je do grupy o tzw. miejscowym zaawansowaniu nowotworu (T3, T4 i/lub N2). Okres obserwacji dla celów tego badania zakończono 5.02.2005 r.

4.2. Ocena mikroskopowa nowotworu

U wszystkich chorych rozpoznanie raka piersi ustalono na podstawie badania mikroskopowego, ale u 4 (2%) było ono oparte wyłącznie na badaniu cytologicznym materiału z biopsji cienkoigłowej. U pozostałych chorych określono typ histologiczny wg klasyfikacji WHO [225]. Raka przewodowego naciekającego stwierdzono u 156 chorych (69%), raka naciekającego zrazikowego u 38 (17%), a u 27 chorych (12%) rozpoznano inne typy raka (cewkowy, rdzeniasty i śluzotwórczy) (ryc. 3).



Ryc. 3. Typy histopatologiczne w badanej grupie chorych

Fig. 3. Histological tumor types (ductal, lobular, medullary, mucinous, papillary, other)

Stopień zróżnicowania w trzystopniowej skali będącej modyfikacją skali Richardsona-Blooma [30, 70] określono u 130 chorych (83%) spośród 156 z rozpoznaniem naciekającego raka przewodowego. Stopień 1. stwierdzono u 10 chorych (8%), stopień 2. u 48 (37%), a stopień 3. u 72 (55%). W celu określenia stopnia zaawansowania według tej skali, oceniano zdolność raka do tworzenia struktur cewkowych, stopień zróżnicowania jąder komórkowych i liczbę mitoz w polu widzenia. Na tej podstawie określano stopień zróżnicowania w trójstopniowej skali, w której stopień 1. odpowiada wysokiemu zróżnicowaniu (G1), drugi – średniemu (G2), a trzeci – niskiemu stopniowi zróżnicowania (G3). U 26 chorych (17%) nie ustalono stopnia histologicznej złośliwości, najczęściej

z powodu wcześniejszego leczenia systemowego. Stopień zróżnicowania określono również u 8 chorych z rozpoznaniem naciekającego raka zrazikowego i u 3 chorych z innymi typami raka (tab. 3).

Tab. 3. Rozpoznanie histopatologiczne i stopień zróżnicowania nowotworu

Tab. 3. Histological type and grade

Stopień zróżnicowania <i>Grade</i>	Rak przewodowy <i>Ductal carcinoma (%)</i>	Rak zrazikowy <i>Lobular carcinoma (%)</i>	Inna postać raka <i>Other (%)</i>	Łącznie <i>Total</i>
1	10 (6)	0	2 (7)	12
2	48 (31)	6 (16)	1 (4)	55
3	72 (46)	1 (2)	0	73
Nie określono <i>Not assessed</i>	26 (17)	31 (82)	24 (89)	81
Łącznie <i>Total</i>	156 (69)	38 (17)	27 (12)	221

Występowanie komponentu śródprzewodowego raka piersi (*in situ* DCIS) stwierdzono u 39 chorych (17%); u 31 chorych (14%) z rozpoznaniem raka przewodowego, u 6 (3%) z rakiem zrazikowym i u 2 (1%) z inną postacią raka. W badaniu histopatologicznym materiału pooperacyjnego oceniono występowanie zatorów z komórek nowotworowych w świetle naczyń krwionośnych i/lub chłonnych oraz nacieki nowotworowe w tkance tłuszczowej otaczającej węzły chłonne (tab. 4). W 82% badanych guzów obie te cechy współistniały ze sobą.

Tab. 4. Występowanie zatorów z komórek nowotworowych w świetle naczyń krwionośnych i/lub chłonnych oraz nacieków w tkance tłuszczowej (n = 211)

Tab. 4. Lymphovascular and adipose tissue invasion

Obecność zatorów w naczyniach <i>Lymphovascular invasion</i>	Liczba chorych <i>Number of pts</i>	(%)
Tak / <i>Yes</i>	46	22
Nie / <i>No</i>	162	77
Nie oceniono / <i>Not assessed</i>	3	1

Obecność nacieków w tkance tłuszczowej <i>Adipose tissue invasion</i>	Liczba chorych <i>Number of pts</i>	(%)
Tak / <i>Yes</i>	42	20
Nie / <i>No</i>	165	78
Nie oceniono / <i>Not assessed</i>	4	2

U wszystkich chorych oznaczenie receptorów steroidowych wykonano metodą immunohistochemiczną (IHC). Za receptory ujemne uznano brak reakcji barwnej lub stwierdzenie produktu tej reakcji w mniej niż 10% komórek. Dodatkowo receptory estrogenowe (ER) stwierdzono u 106 chorych (47%) a dodatkowo receptory progesteronowe (PgR) – u 99 (44%).

Zgodnie z zaleceniami przyjętymi na konferencji w St. Gallen w roku 2003 [86] i wytycznymi dotyczącymi leczenia hormonalnego raka piersi opracowanymi przez *European Society of Mastology* (EUSOMA) [29], za guzy receptoro-dodatnie uznano takie, w których stwierdzono ekspresję przynajmniej jednej grupy receptorów steroidowych (ER lub PgR; tab. 5). Tę cechę stwierdzono u 129 chorych (57%).

Tab. 5. Stan receptorów steroidowych

Tab. 5. *Hormone receptor status*

Fenotyp <i>Fenotype</i>	Liczba chorych <i>Number of pts</i>	(%)
ER(-), PgR(-)	96	43
ER(+), PgR(+)	76	34
ER(+), PgR(-)	30	13
ER(-), PgR(+)	23	10
Łącznie / <i>Total</i>	225	100

4.3. Leczenie

4.3.1. LECZENIE OPERACYJNE

Spośród 225 chorych objętych badaniem u 211 (93%) przeprowadzono leczenie chirurgiczne, w tym zmodyfikowaną amputację piersi metodą Patey'a lub jej odmianę według Dixona – u 180 (86%). Leczenie oszczędzające piersi (*breast conserving therapy* – BCT) przeprowadzono u 27 chorych (13%), a amputację prostą – u 4 (1,5%). Zabieg operacyjny był pierwszym etapem leczenia raka piersi u 140 chorych (62%), a u 70 (31%) był on poprzedzony leczeniem systemowym, w tym u 59 (84%) chemioterapią i u 11 (16%) hormonoterapią. U 64 chorych (90%) poddanych indukcyjnemu leczeniu systemowemu wykonano zmodyfikowaną amputację piersi, a u 7 (10%) – BCT. Wszystkie zabiegi operacyjne zostały wykonane przez specjalistów w dziedzinie chirurgii onkologicznej, według jednolitego i wcześniej ustalonego protokołu. Pozostałych

14 chorych (6%), ze względu na zaawansowanie miejscowe choroby nie zakwalifikowano do operacji.

4.3.1.1. Zmodyfikowana amputacja piersi

Do zmodyfikowanej amputacji piersi kwalifikowano chore w I i II stopniu zaawansowania klinicznego (T1–3, N1, M0), w dobrym stanie ogólnym (stopień sprawności PS 0–2). W przeddzień zabiegu operacyjnego, po uzyskaniu od chorej świadomej zgody na zaproponowane leczenie, oznaczano na skórze planowane linie cięcia chirurgicznego. Każdorazowo usuwano gruczoł wraz z powięzią mięśnia piersiowego większego, w jednym bloku z zawartością dołu pachowego. W większości przypadków uzyskiwano wystarczający dostęp do pachy bez potrzeby przecinania mięśnia piersiowego mniejszego (modyfikacja Dixona w technice opisanej przez Patey'a) [161]. Starano się usuwać węzły dwóch (środkowe i dolne) lub trzech pięter pachy z zaoszczędzeniem grupy węzłów położonych powyżej żyły pachowej i poza pęczkiem piersiowo-grzbietowym oraz naczyń i nerwu piersiowego przyśrodkowego. Starano się, aby w tkankach usuniętych z dołu pachowego znajdowało się co najmniej dziesięć węzłów chłonnych.

4.3.1.2. Leczenie oszczędzające pierś (BCT)

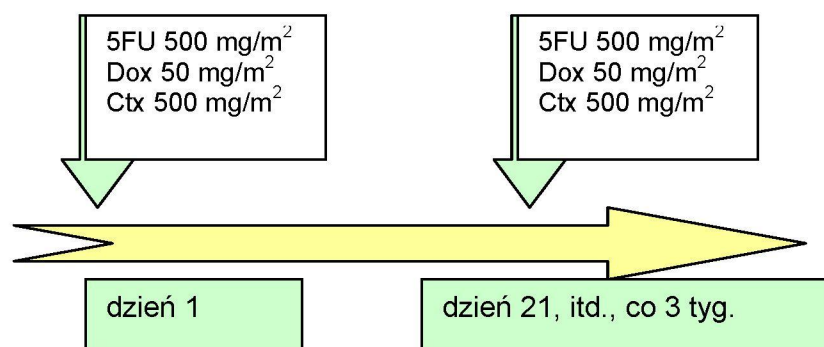
Do BCT kwalifikowano chore w I i II stopniu zaawansowania klinicznego (T1–2, N1, M0) lub chore, u których osiągnięto znaczną remisję zmian nowotworowych pod wpływem leczenia systemowego. Decyzje dotyczące leczenia oszczędzającego zawsze podejmowane były wspólnie przez zespół specjalistów onkologów, w tym chirurga i radioterapeutę.

U 18 (67%) spośród 27 chorych, u których zastosowano BCT, w trakcie zabiegu operacyjnego założono w okolicę łoży po usuniętym guzie elastyczne przewodnice, które służyły do przeprowadzenia brachyterapii PDR przy użyciu izotopu irydu (tzw. *boostu*). Miejsce wprowadzenia przewodnic, ich układ oraz liczbę dobierano indywidualnie w zależności od lokalizacji guza i warunków anatomicznych chorej. Po zakończeniu brachyterapii chore kontynuowały napromienianie na obszar całej piersi przy zastosowaniu wiązek zewnętrznych z przyspieszacza liniowego.

Standardowa dawka na pierś wynosiła 50 Gy, natomiast dodatek na łożę po usuniętym guzie wynosił od 15 do 20 Gy. Chore, u których nie zastosowano brachyterapii, otrzymały dodatkowe napromienianie wiązką elektronów. Regionalne węzły chłonne były napromieniane w zależności od indywidualnych wskazań, zgodnie z obowiązującymi wytycznymi do dawki 50 Gy [86].

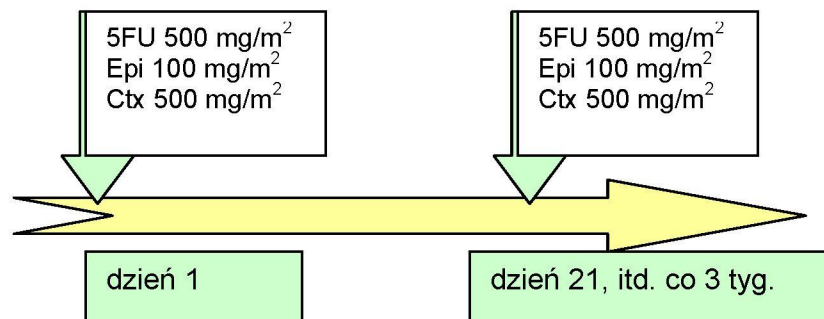
4.3.2. SYSTEMOWE LECZENIE PRZEDOPERACYJNE

U 70 chorych zabieg operacyjny był poprzedzony leczeniem systemowym. Najczęściej stosowano chemioterapię (59 chorych, 84%), rzadziej hormonoterapię (11 chorych, 16%). U 8 chorych (11%) leczenie systemowe skojarzono z napromienianiem piersi i regionalnych węzłów chłonnych. W chemioterapii przedoperacyjnej stosowano schematy: FAC, FEC, ET, AC i, u kilku chorych, CMF (ryc. 3 – 6).



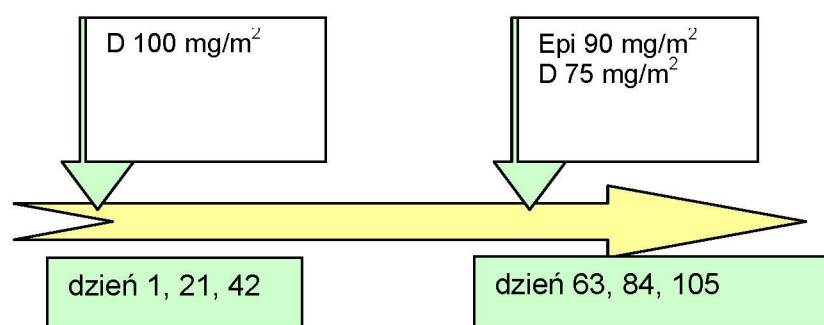
Ryc. 3. Schemat FAC (5FU – 5-fluorouracyl, Dox – doksorubicyna, Ctx – cyklofosfamid)

Fig. 3. FAC regimen (5FU – 5 fluorouracil, Dox – doxorubicine, Ctx – cyclophosphamide)



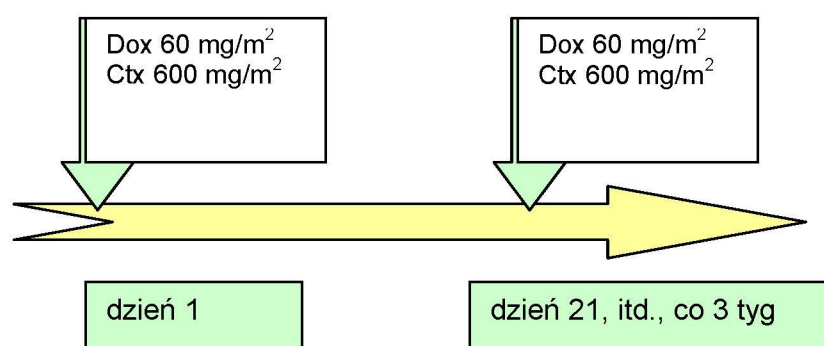
Ryc. 4. Schemat FEC (5FU – 5-fluorouracyl, Epi – epirubicyna, Ctx – cyklofosfamid)

Fig. 4. FEC regimen (5FU – 5 fluorouracil, Epi – epirubicine, Ctx – cyclophosphamide)



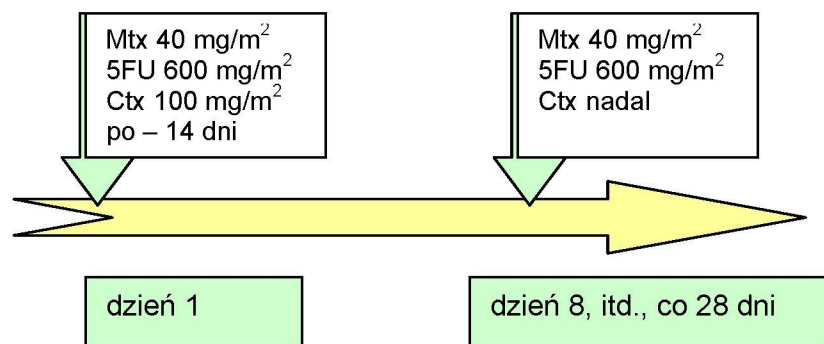
Ryc. 5. Schemat ET (Epi – epirubicyna, D – docetaksel)

Fig. 5. ET regimen (Epi – epirubicyna, D – docetaxel)



Ryc. 6. Schemat AC (Dox – dokсорubicyna, Ctx – cyklofosfamid)

Ryc. 6. AC regimen (Dox – doxorubicine, Ctx – cyclophosphamide)



Ryc. 7. Schemat CMF (Ctx – cyklofosfamid, Mtx – metotreksat, 5FU – 5-fluorouracyl)

Fig. 7. CMF regimen (Ctx – cyclophosphamide, Mtx – methotrexate, 5FU – 5 fluorouracil)

Przedoperacyjna hormonoterapia obejmowała u wszystkich chorych tamoksyfen w dawce 20 mg dziennie (tab. 6).

Tab. 6. Systemowe leczenie przedoperacyjne

Tab. 6. Neoadjuvant systemic treatment

Rodzaj leczenia / <i>Treatment type</i>	Liczba chorych (%) <i>Number of pts</i>
Hormonoterapia / <i>Hormonotherapy</i> (tamoksyfen)	11 (16)
Chemioterapia / <i>Chemotherapy</i>	59 (84)
z udziałem antracyklin / <i>anthracycline-based</i>	29
z udziałem taksoidów / <i>taxane-based</i>	13
inna (CMF) / <i>other (CMF)</i>	17

4.3.3. LECZENIE POOPERACYJNE

Leczenie uzupełniające (adiuwantowe) otrzymało 187 spośród 211 chorych poddanych zabiegowi operacyjnemu (89%) (tab. 7).

Tab. 7. Rodzaj leczenia uzupełniającego w grupie operowanych chorych (n = 211)

Tab. 7. Adjuvant treatment modality in operated patients (n = 211)

Rodzaj leczenia / <i>Treatment modality</i>	Liczba chorych (%) <i>Number of pts</i>
Wyłączna radioterapia / <i>Radiotherapy alone</i>	17 (8)
Wyłączna chemioterapia / <i>Chemotherapy alone</i>	18 (8,5)
Wyłączna hormonoterapia / <i>Hormonotherapy alone</i>	53 (25)
Chemio- i radioterapia / <i>Chemo- and radiotherapy</i>	38 (18)
Hormono- i radioterapia / <i>Hormono- and radiotherapy</i>	26 (12)
Chemio- i hormonoterapia / <i>Chemo- and hormonotherapy</i>	16 (7,5)
Chemio-, radio- i hormonoterapia / <i>Chemo- radio-and hormonotherapy</i>	20 (10)
Brak leczenia / <i>No treatment</i>	23 (11)

4.3.3.1. Radioterapia pooperacyjna

Wszystkie chore leczone metodą oszczędzającą (BCT) otrzymały uzupełniające napromienianie na pierś, zgodnie ze schematem opisanym w rozdziale dotyczącym leczenia oszczędzającego.

W grupie poddanej amputacji piersi do uzupełniającej radioterapii kwalifikowano chore o wysokim ryzyku wznowy miejscowej, zgodnie z zaleceniami konferencji w St. Gallen [86]. Tę formę leczenia zastosowano u ponad połowy ogółu chorych, które otrzymały uzupełniające leczenie. U chorych, które wymagały również uzupełniającego leczenia hormonalnego, stosowano je po zakończeniu napromieniania. Nie było natomiast jednolitego schematu postępowania w odniesieniu do sekwencji kojarzenia radioterapii z chemioterapią. Najczęściej rozpoczynano od podania 3–4 kursów chemioterapii, po czym stosowano radioterapię i na końcu pozostałe kursy chemioterapii. Rzadziej napromienianie rozpoczynano po zakończeniu chemioterapii. Obszar napromieniania u chorych po amputacji, zazwyczaj obejmował ścianę klatki piersiowej, pachę i okolicę podi nadobojczykową (ryc. 8). Ścianę klatki piersiowej najczęściej napromieniano za pomocą fotonów lub elektronów o odpowiedniej energii (zazwyczaj 6–10 MeV). Pachę obejmowano wspólnym polem z okolicą podobojczykową i nadobojczykową. Stosowano dawkę 50 Gy.



Ryc. 8. Typowe pola wlotowe wiązki promieniowania stosowane u chorych po zmodyfikowanej amputacji: (ściana klatki piersiowej, obszar węzłów nad- i podobojczykowych oraz dodatk (od tyłu) na okolicę pachy)

Fig. 8. Typical irradiation fields after modified mastectomy (chest wall and regional lymph nodes – supraclavicular region and the axilla)

4.3.3.2. Pooperacyjne leczenie systemowe

Najczęstszą formą uzupełniającego leczenia systemowego była hormonoterapia, którą zastosowano u 117 chorych (52%), w tym u 29 w skojarzeniu z radioterapią, u 16 – w skojarzeniu z chemioterapią, u 20 – w skojarzeniu z radio- i chemioterapią, i u 17 jako jedyną metodę leczenia uzupełniającego. U kobiet otrzymujących hormonoterapię i chemioterapię, leczenie hormonalne rozpoczynano po zakończeniu chemioterapii. Najczęściej stosowanym preparatem był tamoksyfen; kilka chorych otrzymało inhibitory aromatazy. Chemioterapię zastosowano u 91 chorych (49%), w tym u 38 – w skojarzeniu z radioterapią, najczęściej po zakończeniu radioterapii. Schematy stosowane w leczeniu uzupełniającym były takie same jak w leczeniu przedoperacyjnym. Wyłącznie radioterapię przeprowadzono u 16 chorych (7%).

4.4. Grupa kontrolna

W celu oceny wyników badań polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych w genie *ERBB-1*, utworzono grupę kontrolną obejmującą 180 zdrowych kobiet, mieszkankę województwa pomorskiego o porównywalnej do kobiet chorych na raka piersi strukturze wiekowej (średnia wieku 53,4 lata). DNA wyizolowano z leukocytów uzyskanych z pobranych próbek krwi obwodowej. Wszystkie chore wyraziły świadomą zgodę na pobranie i badanie krwi.

4.5. Metody badawcze

4.5.1. GROMADZENIE MATERIAŁU, ZBIERANIE I OPRACOWYWANIE DANYCH

U chorych, u których operacja stanowiła pierwszy etap leczenia, fragment guza nowotworowego do badań molekularnych pobierano bezpośrednio po zabiegu operacyjnym. Ze wskazanego przez patologa, reprezentatywnego fragmentu guza pobierano około 5 mm³ tkanki, którą natychmiast zamrażano w ciekłym azocie, a następnie, do czasu wykonania badań molekularnych, przechowywano w temp. -80 °C. U chorych nie zakwalifikowanych wyjściowo do zabiegu operacyjnego, materiał z guza uzyskiwano drogą otwartej lub gruboigłowej biopsji wykonywanej przed rozpoczęciem leczenia systemowego. Podczas rutynowego pobierania krwi do badań diagnostycznych poprzedzających rozpoczęcie leczenia pobierano również próbkę pełnej krwi do badań molekularnych. Zarówno krew, jak i uzyskaną po odwirowaniu surowicę natychmiast zamrażano w specjalnie oznakowanych probówkach i przekazywano do dalszych badań

molekularnych do Pracowni Diagnostyki Molekularnej, Katedry Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-AM w Gdańsku.

Wszystkie istotne dane dotyczące chorych, przebiegu leczenia oraz wyników badań histopatologicznych i immunohistochemicznych nanoszono na specjalnie opracowane ankiety (załącznik 1), a następnie wprowadzano do komputerowej bazy danych sporządzonej w programie Excel. Obserwacje po zakończeniu leczenia aktualizowano w bazie danych co 6 miesięcy.

4.5.2. BADANIA IMMUNOHISTOCHEMICZNE (IHC)

Wszystkie badania immunohistochemiczne były wykonywane w Zakładach Patomorfologii jednostek, w których prowadzono leczenie chorych. Wyniki badań otrzymano za zgodą i dzięki uprzejmości kierowników odpowiednich zakładów.

4.5.2.1. Metoda oznaczania receptorów steroidowych

We wszystkich trzech zakładach patomorfologii receptory steroidowe oznaczano metodą immunohistochemiczną, przyjmując takie same kryteria interpretacji wyników. Oznaczenia wykonywano z materiału pochodzącego ze skrawków parafinowych, a wynik podawano jako odsetek komórek, w których stwierdzono obecność receptorów. Zgodnie z obowiązującymi kryteriami, za wynik dodatni uznawano stwierdzenie zabarwienia w co najmniej 10% komórek, niezależnie od jego intensywności.

4.5.2.2. Metoda oznaczania ekspresji receptorów ERBB-1

Ekspresję receptorów ERBB-1 oznaczono z materiału pochodzącego z 64 blozków parafinowych uzyskanych od chorych operowanych w Regionalnym Centrum Onkologii w Bydgoszczy. Badania zostały wykonane w Instytucie Patologii Uniwersytetu w Münster, zgodnie z procedurą opracowaną przez ten ośrodek [160]. Pierwszy etap badania obejmował utworzenie mikromacierzy tkankowych TMA (*tissue microarray*) z badanych próbek guzów piersi. W drugim etapie przeprowadzono barwienie IHC z zastosowaniem przeciwciał przeciw ERBB-1 (Ventate Clone 3C6). Stopień ekspresji receptorów oceniano wg trzystopniowej skali: całkowity brak ekspresji określano jako „0”, reakcję niecałkowitego wbudowywania się przeciwciał lub ich wbudowanie się w mniej niż 10% komórek – jako „1”, a całkowitą reakcję związania przeciwciał w więcej niż 10% komórek – jako stopień 2.

4.5.2.3. Oznaczanie ekspresji receptorów ERBB-2 (HER-2)

Oznaczenie ekspresji receptorów ERBB-2 (HER-2) metodą IHC wykonywano w Zakładach Patologii Centrum Onkologii – Instytucie w Warszawie i Regionalnym Centrum Onkologii w Bydgoszczy. Stosowano przeciwciała poliklonalne c-ERBB-2 firmy DAKO (HercepTest). Stopień ekspresji receptorów oceniano wg czterostopniowej skali określającej stopień intensywności wybarwienia błon komórkowych. Wynik ujemny oznaczał brak wybarwienia (stopień 0) lub zabarwienie oceniane jako (+), (stopień 1). Wybarwienie oceniane jako (++) (stopień 2) to wynik słabo dodatni. Wynik dodatni, określający silną reakcję przejawiającą się wybarwieniem na (+++), odpowiadał stopniowi 3.

4.5.3. BADANIA MOLEKULARNE

Wszystkie badania molekularne były wykonane w Pracowni Diagnostyki Molekularnej Katedry Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-AMG.

4.5.3.1. Izolacja DNA

Proces izolacji DNA z tkankowego fragmentu guza nowotworowego i z leukocytów odbywał się zgodnie ze standardową procedurą, przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów do izolacji DNA firm QIAgen (*QIAamp DNA Tissue Kit* – używany do izolacji DNA z fragmentów guza) i Roche (*whole blood specimen preparation kit* – używany do izolacji DNA z krwi obwodowej).

Izolacja DNA z fragmentów guza składała się z kilku etapów. W pierwszym z nich niewielki wycinek z guza poddawano działaniu proteiny K powodującej lizę komórek, a następnie otrzymany lizat nanoszono na minikolumny, gdzie dochodziło do związania DNA z błoną silikonową. W kolejnym etapie DNA poddawano procesom dalszego oczyszczania, a następnie przy użyciu odpowiednich odczynników eluowano wysokiej jakości DNA. Po zakończeniu tego procesu DNA był przechowywany w zamrażarce w temperaturze -20 °C.

Izolacji DNA z leukocytów dokonywano stosując podobną procedurę. W pierwszym etapie izolowano leukocyty z uzyskanej od badanych kobiet krwi obwodowej, w kolejnym poddawano je procesowi lizy, uzyskując DNA.

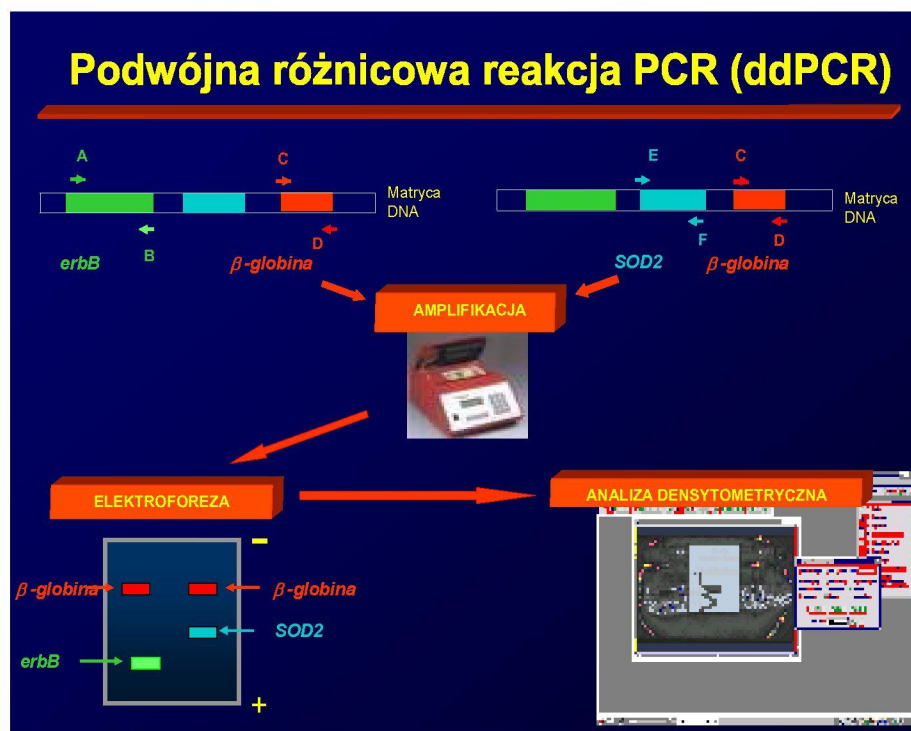
4.5.3.2. Ilościowe oznaczanie średniej liczby kopii genów (AGCN) rodziny *ERBB* metodą ddPCR

W celu określenia zaburzeń ilościowych występujących w czterech genach rodziny *ERBB* posługiwano się zmodyfikowaną techniką podwójnie różnicowej reakcji łańcuchowej polimerazy (*double differential polymerase chain reaction* – ddPCR).

Typowa reakcja PCR prowadząca do powielenia wybranego fragmentu cząsteczki DNA odbywa się w automatycznym termocyklerze i jest wielokrotnym powtarzaniem trójetapowego cyklu, na który składają się denaturacja, hybrydizacja i synteza DNA. Znajdujący się w próbówce dwuniciowy DNA jest w pierwszym etapie procesu poddawany termicznej denaturacji, w wyniku której dochodzi do powstania dwóch jednoliciowych matryc. W drugim etapie następuje przyłączenie do matrycy dwóch starterów będących zsyntetyzowanymi oligonukleotydami. Ponieważ startery muszą przyłączyć się do matrycy na obu końcach namnażanego regionu, aby przygotować odpowiednie nukleotydy konieczna jest znajomość skrajnych sekwencji matrycy. W trzecim etapie termostabilna polimeraza syntetyzuje komplementarną nić DNA. Podgrzewanie mieszaniny reakcyjnej do temperatury 90 °C powoduje oddzielenie się nowych nici od matrycowego DNA. Po ochłodzeniu i dodaniu starterów rozpoczyna się kolejny cykl syntezy DNA, a powstająca nić DNA jest wykorzystywana w kolejnych cyklach jako matryca. W każdym cyklu dochodzi do podwojenia jej ilości [28, 200, 257].

W zmodyfikowanej technice PCR, określanej jako metoda różnicowa (*differential PCR* – dPCR) stosuje się równoczesną amplifikację badanego genu i fragmentu genu kontrolnego, referencyjnego, stanowiącego rodzaj wewnętrznego standardu. Gen referencyjny powinien charakteryzować się znaczną stabilnością, występować w ludzkim organizmie w pojedynczej liczbie kopii (np. ludzkiej β -globiny, *HBB*) i pochodzić z innego miejsca DNA tej samej komórki [25]. Reakcja PCR zachodzi równocześnie w tym samym naczyniu reakcyjnym, przy zastosowaniu dwóch par starterów. W różnicowej technice PCR mierzy się stosunek liczby kopii badanego genu do liczby kopii genu referencyjnego. Wynik podawany jest w postaci tzw. średniej (dla badanej w próbówce liczby komórek) liczby kopii genu (AGCN). W normalnych komórkach AGCN wynosi 1. Z pewnym uproszczeniem, zmniejszenie stosunku ilościowego obu produktów dPCR oznacza delecję, a zwiększenie – amplifikację. W niniejszym badaniu wykorzystano zmodyfikowaną technikę dPCR, wprowadzając drugi gen referencyjny w celu uzyskania dokładniejszych wyników ilościowych. Metoda ta została opracowana przez Brandta i wsp. [34, 35] i określona terminem ddPCR (ryc. 9). W niniejszym badaniu jako genów referencyjnych użyto genu *HBB* oraz genu dysmutazy ponadtlenkowej *SOD2*. W ocenie wartości AGCN ERBB-2

dodatkowo zastosowano zmodyfikowaną technikę ddPCR, tzw. dddPCR (*direct-ddPCR*) [257].



Ryc. 9. Schemat metody ddPCR

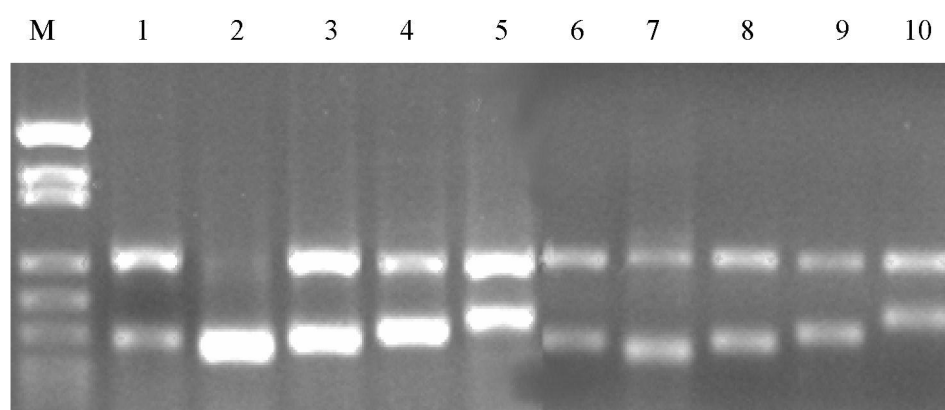
Fig. 9. Scheme of ddPCR

W każdym oznaczeniu, w identycznych warunkach reakcyjnych, w jednej próbówce przeprowadzano amplifikację onkogeny razem z jednym genem referencyjnym, a w drugiej – stanowiącej kontrolę – powielano oba geny referencyjne. Równoczesna amplifikacja obu genów referencyjnych umożliwia kontrolowanie i ewentualne wyeliminowanie błędów pomiarowych i stanowi rodzaj wewnętrznej kontroli jakości. Zastosowana w badaniu technika ddPCR umożliwia jednoczesną amplifikację czterech onkogenów *ERBB* w trakcie jednej reakcji PCR.

W analizie produktów ddPCR przede wszystkim określano stosunek ilości powstałych fragmentów DNA obu genów referencyjnych. Wartość 1:1 świadczy o prawidłowo zaprojektowanym badaniu i stężeniu starterów w reakcji oraz zrównoważonym przebiegu reakcji PCR.

Analizę produktów ddPCR przeprowadzano za pomocą rozdziału elektroforetycznego z rozdziałem na żelu agarowym i analizy densytometrycznej (ryc. 9). Wartość AGCN wyraża się w stosunku powierzchni i intensywności wybarwienia prążka DNA odpowiadającego fragmentowi badanego onkogenu do tego, który odpowiada fragmentowi DNA genu referencyjnego (*HBB*). Ilość produktów ddPCR w żelu agarowym określano stosując system Quantity One.

Średnią liczbę kopii onkogenu w komórce wyraża stosunek intensywności wybarwienia i powierzchni prążka DNA odpowiadającego fragmentowi badanego onkogenu do powierzchni prążka DNA odpowiadającego fragmentowi genu referencyjnego. Prążki są produktem ddPCR w żelu agarowym. Ryc. 10 przedstawia przykładowe zdjęcie żelu agarowego z charakterystycznym dla onkogenów *ERBB* obrazem prążków jako produktów reakcji ddPCR.



Ryc. 10. Zdjęcie żelu agarowego po rozdziale elektroforetycznym produktów ddPCR
Fig. 10. ddPCR results, the gel picture

ścieżka M – marker wielkości DNA

ścieżki 1 – 5 – produkty ddPCR dla tkanki pochodzącej z nowotworu piersi

- 1 – górny prążek – β globina (252 bp), dolny prążek – *ERBB-1* (125 bp), delecja
- 2 – górny prążek – β globina (252 bp), dolny prążek – *ERBB-2* (132 bp), amplifikacja
- 3 – górny prążek – β globina (252 bp), dolny prążek – *ERBB-3* (154 bp)
- 4 – górny prążek – β globina (252 bp), dolny prążek – *ERBB-4* (156 bp)
- 5 – górny prążek – β globina (252 bp), dolny prążek – *sod2* (188 bp)

ścieżki 6 – 10 – produkty dd PCR dla tkanki pochodzącej od zdrowej kobiety

- 6 – górny prążek – β globina (252 bp), dolny prążek – *ERBB-1* (125 bp),
- 7 – górny prążek – β globina (252 bp), dolny prążek – *ERBB-2* (132 bp),
- 8 – górny prążek – β globina (252 bp), dolny prążek – *ERBB-3* (154 bp)
- 9 – górny prążek – β globina (252 bp), dolny prążek – *ERBB-4* (156 bp)
- 10 – górny prążek – β globina (252 bp), dolny prążek – *sod2* (188 bp)

Do oceny amplifikacji i delecji badanych onkogenów stosowano przyjęte wcześniej przez Brandta i wsp. wartości graniczne AGCN (*cut-offs*) [34, 35] (tab. 8). Uzasadnieniem dla przyjęcia tych wartości były stwierdzone przez ww. autorów korelacje pomiędzy wartością AGCN dla *ERBB-1*, *ERBB-2* i *ERBB-3* a wartością rokowniczą amplifikacji lub delecji tych onkogenów u chorych na raka piersi [33].

Tab. 8. Wartości graniczne AGCN dla oznaczanych onkogenów

Tab. 8. *AGCN cut off values for oncogenes*

Onkogen <i>Oncogen</i>	Delecja <i>Deletion</i>	Brak zaburzeń <i>Lack of abnormalities</i>	Amplifikacja <i>Amplification</i>
<i>ERBB-1</i>	$\leq 0,2$	$>0,2 \leq 1,6$	$> 1,6$
<i>ERBB-2-4</i>	$\leq 0,4$	$>0,4 \leq 1,6$	$> 1,6$

Startery użyte do badania dla genów referencyjnych i trzech protoonkogenów *ERBB-1* – *ERBB-3* zostały zaprojektowane przez Brandta i wsp. [34, 35], a dla genu *ERBB-4* – przez Bielawskiego [28].

4.5.3.3. Oznaczanie polimorfizmu sekwencji powtórzonych (CA)_n i utraty heterozygotyczności (LOH) w genie *ERBB-1*

Polimorfizm sekwencji powtórzonych (CA)_n w genie *ERBB-1* oznaczano za pomocą standardowej metody PCR i elektroforezy kapilarnej. Region genu *ERBB-1* zawierający fragment polimorficzny był amplifikowany przy udziale starterów znakowanych fluorescencyjnym związkiem 6-FAM (6-karboksy-fluoresceiną). Następnie produkty PCR były poddawane rozdzielowi elektroforetycznemu przy zastosowaniu systemu ABI PRISM 310. Wszystkie badania PCR były wykonywane co najmniej dwa razy. Polimorfizm oznaczano u chorych na raka piersi oraz w grupie kontrolnej zdrowych kobiet.

Wykrywanie LOH opiera się na porównywaniu ilości produktu PCR dla *ERBB-1* otrzymanego dla DNA z guza i zdrowych komórek (leukocytów) pochodzących od tej samej chorej. W tym celu porównywano odczytane z elektroforegramów obszary szczytów odpowiadające badanym allelom w leukocytach i komórkach nowotworu. Wartości LOH określano na podstawie równań zaproponowanych przez Canziana [41], na podstawie wystandaryzowanych wcześniej warunków rozdzielu kapilarnego dla produktów PCR fragmentu genu *ERBB-1*

znakowanych fluorescencyjnie i określonych tam wartości odcięcia dla LOH (*cut-off*). Utrata heterozygotyczności była wyliczana z równania:

$$LOH = T_2 \times N_1 / T_1 \times N_2,$$

N_1 – obszar pod szczytem odpowiadający allelowi 1 w komórkach nowotworowych

N_2 – obszar pod szczytem odpowiadający allelowi 2 w komórkach nowotworowych

T_1 – obszar pod szczytem odpowiadający allelowi 1 w tkance niezmienionej nowotworowo

T_2 – obszar pod szczytem odpowiadający allelowi 2 w tkance niezmienionej nowotworowo

W niniejszym badaniu do oceny zjawiska utraty heterozygotyczności przyjęto wartości odcinające wg pracy Canziana [41]; za utratę długiego allele przyjęto wartości LOH <0,6, a za utratę krótkiego allele – wartości LOH >1,67.

4.5.4. METODY STATYSTYCZNE

Wszystkie dane dotyczące charakterystyki chorych i uzyskanych wyników zostały zakodowane i wprowadzone do komputerowej bazy danych opracowanej w programie Microsoft Excel.

W obliczeniach statystycznych posługiwano się programem statystycznym Statistica dla Windows (Statsoft Co, wersja 6,0). Ewentualną zgodność rozkładów wyników uzyskanych dla badanych parametrów z rozkładem normalnym sprawdzono za pomocą testu Shapiro-Wilka.

W celu porównania wartości AGCN i określenia różnic pomiędzy badanymi grupami posłużono się testami U Manna-Whitney’a, H Kruskala-Wallisa i Wilcoxon. Zależności pomiędzy zmiennymi nieparametrycznymi badano testem chi-kwadrat (χ^2) Pearsona, wprowadzając dla małych liczebności oczekiwanych (<10) poprawkę Yatesa. Dla porównań, w których liczebności oczekiwane wynosiły 0–5 używano testu Fishera, natomiast za pomocą testu Spearmana badano korelacje pomiędzy analizowanymi cechami. Wartość p wynoszącą $\leq 0,05$ uznawano za znamienne.

Prawdopodobieństwo przeżycia obliczano metodą Kaplana-Meiera. Wpływ badanych czynników na czas przeżycia całkowitego i wolnego od nawrotu choroby oceniano w analizie jednoczynnikowej przy zastosowaniu testu log-rank, a w analizie wieloczynnikowej – modelu Coxa.

5. WYNIKI

5.1. Zaburzenia liczby kopii czterech protoonkogenów rodziny ERBB w raku piersi

5.1.1. ANALIZA WARTOŚCI AGCN BADANYCH PROTOONKOGENÓW ERBB-1, ERBB-2, ERBB-3 I ERBB-4

Częstość występowania zaburzeń w postaci amplifikacji lub delecji w protoonkogenach rodziny *ERBB* oznaczano stosując metodę ddPCR. Materiał do badań genetycznych pochodził ze świeżo mrożonych fragmentów guzów nowotworowych uzyskanych od 225 chorych na raka piersi. U dwóch chorych nie oznaczono wartości AGCN dla *ERBB-1* z powodu złej jakości wyizolowanego DNA.

Tabela 9 przedstawia opisowe dane dotyczące wartości oznaczeń AGCN w badanej grupie chorych.

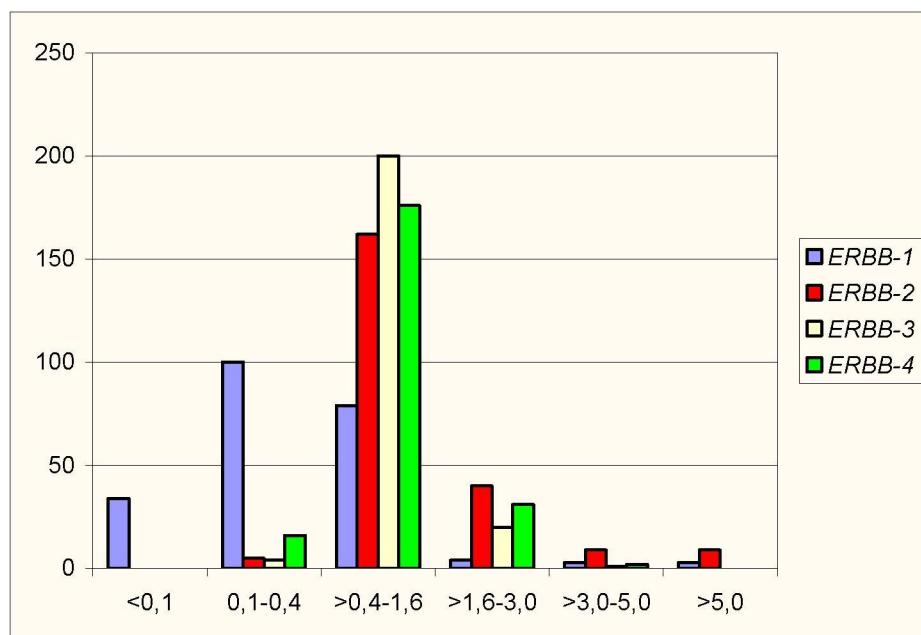
Tab. 9. Wartości AGCN badanych onkogenów z rodziny *ERBB*

Tab. 9. *ERBB 1 – 4 oncogenes AGCN values*

AGCN	<i>ERBB-1</i> (n = 223)	<i>ERBB-2</i> (n = 225)	<i>ERBB-3</i> (n = 225)	<i>ERBB-4</i> (n = 225)
średnia wartość <i>mean value</i>	0,59	1,64	1,08	1,07
mediana / <i>median</i>	0,30	1,01	1,00	0,98
odchylenie standardowe <i>standard deviation</i>	0,93	2,28	0,46	0,61
wartość minimalna <i>minimum value</i>	0,01	0,24	0,28	0,10
wartość maksymalna <i>maximum value</i>	8,19	25,48	4,7	3,92

Najwyższą średnią wartość AGCN (1,64) obserwowano dla onkogenu *ERBB-2*. Również w tej grupie stwierdzono najwyższą wartość maksymalną (25,48). Natomiast najniższą średnią wartość AGCN (0,59) dotyczyła onkogenu *ERBB-1*, przy minimalnej wartości 0,01.

Rozkład wartości AGCN (od 0 do powyżej 5) dla wszystkich badanych onkogenów przedstawiono na ryc. 11, na której zastosowano istotne klinicznie przedziały wartości AGCN zaproponowane przez Brandta i wsp. [34].



Ryc. 11. Rozkład wartości AGCN dla onkogenów rodziny *ERBB*

Fig. 11. AGCN values distribution in ERBB oncogenes

Najniższe wartości AGCN (<0,1) obserwowano jedynie dla onkogenu *ERBB-1* i dotyczyły one 34 chorych (15,2%); najwyższe (>5) stwierdzono zarówno w *ERBB-1*, jak i *ERBB-2*; odpowiednio u 3 (1,3%) i 9 (4,0%) chorych (tab. 10).

Tab. 10. Rozkład wartości AGCN dla onkogenów rodziny *ERBB*

Tab. 10. AGCN values distribution in ERBB oncogenes

AGCN	<0,1		0,1–0,4		>0,4–1,6		>1,6–3,0		>3,0–5,0		>5,0	
ERBB-1	34	15,2%	100	44,8%	79	35,4%	4	1,8%	3	1,4%	3	1,4%
ERBB-2	0	0,0%	5	2,2%	162	72,0%	40	17,8%	9	4,0%	9	4,0%
ERBB-3	0	0,0%	4	1,8%	200	88,9%	20	8,9%	1	0,4%	0	0,0%
ERBB-4	0	0,0%	16	7,1%	176	78,2%	31	13,8%	2	0,9%	0	0,0%

Występowanie amplifikacji i delecji dla *ERBB-2*, *ERBB-3* i *ERBB-4* w badanej grupie chorych oceniono zgodnie z przyjętymi kryteriami oceny stopnia anomalii wartości AGCN protoonkogenów *ERBB* („Metody”, tab. 8) i przedstawiono w tab. 11. W odniesieniu do *ERBB-1* stwierdzono, że średnia wartość AGCN tego genu badana dla matrycy pochodzącej z leukocytów grupy kontrolnej jest niska i wynosi $0,6 \pm 0,13$ (średnia $\pm$ SD). Na tej podstawie za wartość odcięcia dla amplifikacji przyjęto wartość $AGCN > 1$ (średnia + 3SD) a wartość AGCN dla delecji $< 0,2$ (średnia – 3SD).

Tab. 11. Udział anomalii ilościowych w obrębie onkogenów rodziny *ERBB*
Tab. 11. Frequency of ERBB oncogenes' abnormalities

Onkogen <i>Oncogen</i>	Delecje (%) <i>Deletions</i>	Norma (%) <i>Normal level</i>	Amplifikacje (%) <i>Amplifications</i>	Łącznie <i>Total</i>
<i>ERBB-1</i>	69 (31)	120 (54)	34 (15)	223
<i>ERBB-2</i>	5 (2)	162 (72)	58 (26)	225
<i>ERBB-3</i>	4 (2)	198 (88)	23 (10)	225
<i>ERBB-4</i>	16 (7)	176 (78)	33 (15)	225
Łącznie <i>Total</i>	94 (10,5)	656 (73)	148 (16,5)	898

Wartości AGCN dla *ERBB-1*: delecje $\leq 0,2$, norma: $0,2-1,0$, amplifikacje $> 1,0$

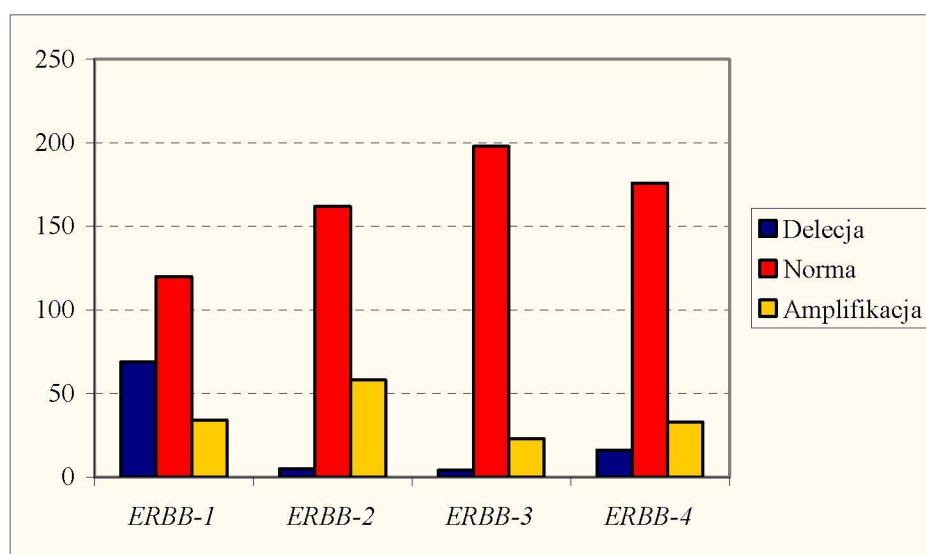
Wartości AGCN dla pozostałych genów *ERBB*: delecje $\leq 0,4$, norma: $0,4-1,6$, amplifikacje $> 1,6$

ERBB-1 AGCN value: deletion < 0.2 , normal level: $0.2-1.0$, amplification > 1.0

ERBB-2-4 AGCN value: deletion < 0.4 , normal level: $0.4-1.6$, amplification > 1.6

We wszystkich 4 badanych onkogenach stwierdzono zarówno amplifikację, jak i delecję. Ogółem występowanie zaburzeń w obrębie ocenianych onkogenów stwierdzono w 242 badanych genach (27%), dotyczyły one 146 chorych (65%). Odsetkowy udział tych nieprawidłowości był różny dla poszczególnych genów.

Amplifikacja dotyczyła najczęściej *ERBB-2* (26%), a delecja – *ERBB-1* i *ERBB-4*; odpowiednio 31% i 7% chorych (ryc. 12). Łącznie amplifikację wykryto w 148 (16,5%), a delecję w 94 (10,5%) spośród 898 badanych genów. Najwięcej zaburzeń dotyczyło genu *ERBB-1* (46%), natomiast najmniej – genu *ERBB-3* (12%).



Ryc. 12. Udział anomalii ilościowych w obrębie onkogenów rodziny *ERBB*

Fig. 12. Frequency of *ERBB* oncogenes' abnormalities

Najczęściej obserwowane wartości AGCN dla *ERBB-1* były zawarte w przedziale 0,1 – 0,4.

Delekcje tego genu stwierdzono u 69 chorych (31%) i były to najczęściej obserwowane zaburzenia jednego genu. Amplifikację *ERBB-1* obserwowano u 34 chorych (15%), z najwyższą wartością AGCN w tej grupie wynoszącą 8,19.

Najwyższą obserwowaną w całej badanej grupie wartość AGCN (25,48) stwierdzono dla genu *ERBB-2*. Poza tym u 9 chorych (4%) obserwowano wartości AGCN pomiędzy 3,0 a 5,0. Amplifikację tego genu stwierdzono ogółem u 58 chorych (26%), co stanowi 39% amplifikacji w całej badanej grupie. Wartości AGCN genu *ERBB-2* poniżej 0,4 (delekcje) stwierdzono zaledwie u 5 chorych (2%) i w żadnym przypadku wartość ta nie była niższa od 0,1.

Gen *ERBB-3* był najbardziej stabilnym z badanej rodziny *ERBB*. U 198 chorych (88%) nie obserwowano w jego obrębie żadnych zaburzeń. Delekcja występowała jedynie u 4 chorych (2%), przy czym w żadnym przypadku wartość AGCN nie była niższa od 0,1. Amplifikację w zakresie wartości AGCN od 1,6 do 4,7 stwierdzono u 23 chorych (10%).

Podobnie jak dla onkogenu *ERBB-3*, dla *ERBB-4* nie stwierdzono wartości AGCN, poniżej 0,1 i powyżej 5,0. Delekcję onkogenu *ERBB-4* wykryto w u 16 chorych (7%), a amplifikację u 33 (15%). U większości chorych z amplifikacją wartość AGCN wynosiła od 1,6 do 3,0, jedynie u dwóch była wyższa od 3,0.

Spośród 146 chorych z amplifikacją lub delecją u 76 (34%) dotyczyła ona tylko jednego onkogenu (zmiany pojedyncze), natomiast u pozostałych 70 chorych (31%) były to tzw. zmiany złożone, zlokalizowane w co najmniej dwóch genach.

5.1.2. ANALIZA ZMIAN POJEDYNCZYCH

Zmiany pojedyncze w 91% dotyczyły onkogenów *ERBB-1* i *ERBB-2*. Dominującym zjawiskiem była delecja, którą stwierdzono łącznie u 45 chorych (59%) (tab. 12). Zaburzenie to najczęściej występowało w *ERBB-1* (41 chorych). Wartość ta stanowiła 54% wszystkich zmian. Amplifikację stwierdzono u 31 chorych (41%), najczęściej w *ERBB-2* – u 11 chorych (14%).

Tab. 12. Rozkład zmian pojedynczych onkogenów *ERBB-1*

Tab. 12. *Single ERBB oncogenes' abnormalities distribution*

	<i>ERBB-1</i> (n)	<i>ERBB-2</i> (n)	<i>ERBB-3</i> (n)	<i>ERBB-4</i> (n)	Łącznie <i>Total</i> n (%)
Amplifikacja <i>Amplification</i>	16	11	1	3	31 (41)
Delecja <i>Deletion</i>	41	1	1	2	45 (59)
Łącznie <i>Total</i>	57	12	2	5	76 (100)

5.1.3. ANALIZA ZMIAN ZŁOŻONYCH

Zmiany złożone dotyczyły 70 chorych w tym u 49 chorych (70%) obejmowały one 2 onkogeny u 16 chorych (23%) – 3 onkogeny, a u 5 (7%) – wszystkie 4 geny rodziny *ERBB*. U chorych ze zmianami złożonymi dominował ten sam charakter zaburzeń; wyłączne amplifikacje stwierdzono u 37 chorych (53%), delecje u 13 (19%), a zmiany mieszane (delecja i amplifikacja) – u 20 (28%; tab. 13).

W zaburzeniach złożonych najczęstszy był udział genu *ERBB-1*, a najrzadszy – *ERBB-3* (odpowiednio 46 i 32 chorych).

Tab. 13. Rozkład zaburzeń złożonych
 Tab. 13. Complex ERBB abnormalities

ERBB-1	ERBB-2	ERBB-3	ERBB-4	Liczba chorych <i>Number of pts</i>
Amplifikacje / Amplifications				
amp	amp	amp	amp	2
amp	amp	amp		2
amp	amp		amp	4
	amp	amp	amp	6
amp	amp			7
	amp	amp		6
		amp	amp	1
amp			amp	1
	amp		amp	8
Wyłącznie amplifikacje / Amplifications only				37 (53%)
Delecje / Deletions				13
del	del	del	del	1
del	del		del	1
	del		del	1
del	del			1
del			del	1
del		del		8
Wyłącznie delecje / Deletions only				13 (18%)
Zmiany mieszane / Mixed abnormalities				20
del	amp	amp	amp	2
del	amp		amp	3
del	amp			5
del			amp	3
del		amp		3
amp		del		1
amp			del	1
	amp		del	2
Łącznie amplifikacje i delecje <i>Amplifications and deletions together</i>				20 (29%)
Łącznie / Total				70

5.2. Wzajemne zależności pomiędzy zaburzeniami w badanych genach rodziny ERBB

Stwierdzono, że wartości AGCN dla poszczególnych onkogenów były w stosunku do siebie zależne, zwłaszcza w odniesieniu do *ERBB-2* i *ERBB-3*, *ERBB-2* i *ERBB-4* oraz *ERBB-3* i *ERBB-4* (tab. 14).

Tab. 14. Zależność pomiędzy wartościami AGCN onkogenów *ERBB* (wg testu korelacji Spearmana)

Tab. 14. Correlation between ERBB oncogenes AGCN values (Spearman rank order correlation test)

	R_s	p
<i>ERBB-1</i> i <i>ERBB-2</i>	0,27	0,000036
<i>ERBB-1</i> i <i>ERBB-3</i>	0,14	0,03
<i>ERBB-1</i> i <i>ERBB-4</i>	0,26	0,000074
<i>ERBB-2</i> i <i>ERBB-3</i>	0,44	0,0000001
<i>ERBB-2</i> i <i>ERBB-4</i>	0,5	0,0000001
<i>ERBB-3</i> i <i>ERBB-4</i>	0,39	0,0000001

R_s – współczynnik korelacji

R_s – correlation ratio

Zależność pomiędzy AGCN dla poszczególnych par onkogenów *ERBB* była szczególnie silna w podgrupie chorych z obecnością przerzutów do pachowych węzłów chłonnych, w której dotyczyła ona wszystkich par badanych genów (dla pary *ERBB-1* i *ERBB-4* była to wartość graniczna). W grupie chorych z cechą N0 nie stwierdzono znamiennej zależności dla pary *ERBB-1* i *ERBB-3* (tab. 15).

Podobnych zależności nie wykazano w odniesieniu do pozostałych cech nowotworu: zaawansowania guza pierwotnego, typu histologicznego, stopnia zróżnicowania i stanu receptorów steroidowych.

Tab. 15. Zależność pomiędzy wartością AGCN onkogenów *ERBB* w grupie chorych bez przerzutów (N0) i z przerzutami (N+) do pachowych węzłów chłonnych (wg testu korelacji Spearmana)

Tab. 15. Relationship between ERBB oncogenes and AGCN values by nodal status (Spearman rank order correlation test)

	Cecha N0 N0 status		Cecha N(+) N(+) status	
	R _s	p	R _s	p
<i>ERBB-1</i> i <i>ERBB-2</i>	0,27	0,0027	0,28	0,004
<i>ERBB-1</i> i <i>ERBB-3</i>	0,1	0,27	0,25	0,01
<i>ERBB-1</i> i <i>ERBB-4</i>	0,33	0,00025	0,2	0,053
<i>ERBB-2</i> i <i>ERBB-3</i>	0,36	0,000083	0,54	0,0000001
<i>ERBB-2</i> i <i>ERBB-4</i>	0,36	0,000076	0,64	0,0000001
<i>ERBB-3</i> i <i>ERBB-4</i>	0,33	0,00025	0,52	0,0000001

5.3. Ekspresja receptorów ERBB-1 i ERBB-2 i jej związek z liczbą kopii genów

U części chorych, poza określeniem zaburzeń genetycznych metodą ddPCR oznaczono także ekspresję receptorów ERBB-1 i ERBB-2 metodą IHC. Ocenę ekspresji receptora ERBB-1 przeprowadzono u 63 chorych. U 5 z nich nie udało się ocenić badania z powodu złej jakości próbek. Ekspresję ERBB-1 stwierdzono u 10 chorych (17%), w tym u dwóch słabą; u obu tych chorych występowała również amplifikacja genu *ERBB-1* (tab. 16). U pozostałych 8 chorych z ekspresją ERBB-1 nie stwierdzono przypadków amplifikacji, natomiast u 5 wykryto delecje.

Tab. 16. Zależność pomiędzy ekspresją receptorów ERBB-1 oznaczoną metodą IHC a liczbą kopii genu

Tab. 16. Relationship between ERBB-1 expression assessed by IHC and ERBB-1 AGCN value

Wynik IHC IHC score	Liczba chorych Number of pts n = 58	Wartość AGCN dla <i>ERBB-1</i> ERBB-1 AGCN values	Liczba chorych z amplifikacją Number of pts with amplifications	Liczba chorych z delecją Number of pts with deletions
0	48 (83%)	0,59±0,97	2	29
+	2 (3%)	6,44±2,47	2	0
++	4 (7%)	0,27±0,18	0	3
+++	4 (7%)	0,61±0,63	0	2

Nie stwierdzono także występowania zależności pomiędzy ekspresją tego receptora a wartością AGCN dla innych genów rodziny *ERBB* (tab. 17).

Tab. 17. Zależność pomiędzy ekspresją ERBB-1 a wartością AGCN genów *ERBB* (test Spearmana)

Tab. 17. Relationship between ERBB-1 expression and ERBB-1–4 AGCN values

	Liczba chorych <i>Number of pts</i>	R _s	p
ERBB-1 i <i>ERBB-1</i>	58	0,11	0,41
ERBB-1 i <i>ERBB-2</i>	58	0,11	0,40
ERBB-1 i <i>ERBB-3</i>	58	0,17	0,20
ERBB-1 i <i>ERBB-4</i>	58	0,20	0,13

Ekspresję receptorów ERBB-2 metodą IHC oceniono u 176 chorych. U 32 z nich (18%), stwierdzono silną ekspresję tego receptora (wynik +++), a u 34 (19%) – pośrednią (++). Wśród chorych, u których stwierdzono ekspresję receptora ERBB-2 ocenioną na (+++) i (++), amplifikację *ERBB-2* stwierdzono odpowiednio u 13 (41%) i 14 chorych (42%; tab. 18).

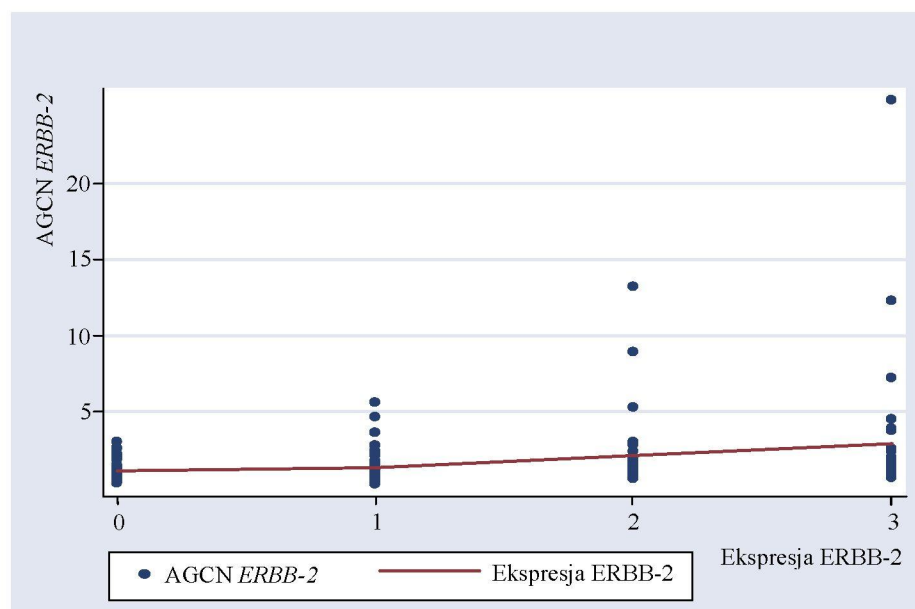
Tab. 18. Zależność pomiędzy ekspresją receptorów ERBB-2 oznaczoną metodą IHC a liczbą kopii genu

Tab. 18. Relationship between ERBB-2 expression assessed by IHC and ERBB-2 AGCN values

Wynik IHC <i>IHC</i> <i>score</i>	Liczba chorych <i>Number of pts</i> n = 177	Średnia wartość AGCN dla <i>ERBB-2</i> <i>ERBB-2 AGCN</i> <i>mean values</i>	Liczba chorych z amplifikacją <i>Number of pts</i> <i>with amplification</i>
0	64 (36%)	1,09	9 (14%)
+	47 (27%)	1,31	11 (23%)
++	34 (19%)	2,07	14 (42%)
+++	32 (18%)	2,87	13 (41%)

Wyraźną zgodność obu metod stwierdzono także w grupie chorych, dla których wynik testu IHC był ujemny („0” lub „+”). Średnia wartość AGCN dla *ERBB-2* w tej grupie wynosiła 1,23 i była wyższa od 1,6 (najniższej granicznej wartości przyjętej za amplifikację) jedynie u 9 chorych (14%) spośród 64 z ujemnym wynikiem IHC i u 9 spośród 47 chorych (19%) z wynikiem IHC (+).

Ekspresja receptorów *ERBB-2* była silnie związana z wartością AGCN dla genu *ERBB-2* ($p=0,0003$; ryc. 13).



Ryc. 13. Zależność pomiędzy wartością AGCN *ERBB-2* a stopniem ekspresji receptorów *ERBB-2*

Fig. 13. Relationship between *ERBB-2* AGCN value and *ERBB-2* receptor expression

5.4. Polimorfizm sekwencji powtórzonych (CA)_n w genie *ERBB-1* oraz utrata heterozygotyczności (LOH) w jego obrębie

Polimorfizm sekwencji powtórzonych (CA)_n w pierwszym intronie genu *ERBB-1* oznaczono u 197 kobiet chorych na raka piersi oraz u 180 zdrowych kobiet stanowiących grupę kontrolną. Występowanie polimorfizmu stwierdzono zarówno wśród kobiet zdrowych, jak i chorych. Zakres zmienności dla całej badanej grupy wynosił od 9 do 23 powtórzeń CA (tab. 19). W obu grupach najczęstszy był udział alleli zawierających 16 powtórzeń, który stanowił 41% alleli

w grupie chorych i 42,5% alleli w grupie kontrolnej. Allele zawierające 18 i 20 powtórzeń stanowiły kolejne pod względem częstości występowania podgrupy – odpowiednio 21% i 19,5% w grupie chorych na raka piersi i 21% i 18% dla kobiet zdrowych.

Tab. 19. Rozkład powtórzeń CA w grupie chorych i grupie kontrolnej

Tab. 19. Distribution of ERBB-1 repeated sequences CA in breast cancer patients and control group

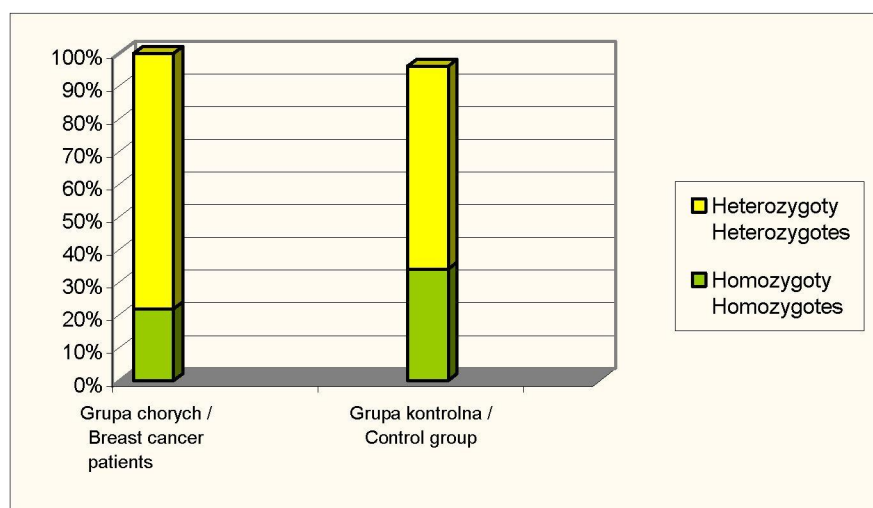
Liczba powtórzeń <i>Number of CA repeats</i>	Grupa chorych <i>Breast cancer patients</i>		Grupa kontrolna <i>Control group</i>	
	Liczba alleli <i>Number of allele</i>	%	Liczba alleli <i>Number of allele</i>	%
9 CA	1	0,3	0	0,0
14 CA	2	0,5	2	0,6
15 CA	4	1,0	4	1,0
16 CA	160	40,6	153	42,5
17 CA	28	7,2	28	7,8
18 CA	82	20,8	76	21,1
19 CA	10	2,5	6	1,7
20 CA	77	19,5	64	17,8
21 CA	25	6,3	26	7,2
22 CA	3	0,8	1	0,3
23 CA	2	0,5	0	0,0
Łącznie / <i>Total</i>	394	100	360	100

Allele skrajne, zawierające 9 i 23 powtórzeń, stanowiły zaledwie 0,8% wszystkich alleli i występowały jedynie wśród kobiet chorych. Udział homozygot wśród kobiet chorych i zdrowych wynosił odpowiednio 44 (22%) i 62 (34%; $p=0,009$). W obu populacjach najczęściej występował allel zawierający 16 powtórzeń (odpowiednio 66% i 55% u kobiet chorych i zdrowych). Natomiast wśród kobiet chorych nie występował w ogóle allel zawierający 17 powtórzeń, który stanowił 16% wszystkich alleli w grupie kobiet zdrowych (tab. 20; ryc.14)

Tab. 20. Kombinacja alleli wśród homozygot

Tab. 20. Allele combination among homozygotes

Kombinacja alleli (liczba powtórzeń CA) Allele combination (CA repeats numbers)	Grupa chorych <i>Breast cancer patients</i>		Grupa kontrolna <i>Control group</i>	
	Liczba <i>Number</i>	%	Liczba <i>Number</i>	%
15/15	0	0,0	1	2
16/16	29	66	34	55
17/17	0	0,0	10	16
18/18	6	14	7	11
19/19	1	2	0	0,0
20/20	8	18	10	16
Łączna liczba homozygot <i>Total number of homozygotes</i>	44	100	62	100



Ryc. 14. Częstość występowania homo- i heterozygot w grupie kobiet chorych i w grupie kontrolnej

Fig. 14. Frequency of homo- and heterozygotes in breast cancer patients and control group

W obu grupach kobiet wśród heterozygot najczęstsze były kombinacje zawierające 16 i 18, 16 i 20, 16 i 21 oraz 18 i 20 powtórzeń CA. Stanowiły one 64% wszystkich kombinacji występujących w grupie chorych i 81,5% w grupie zdrowych. W obu populacjach dominowały układy, w których jeden z alleli zawierał 16 powtórzeń, (odpowiednio 54% wśród kobiet chorych i 54% wśród kobiet zdrowych); (tab. 21). W obu badanych grupach stwierdzono 32 diploidalne genotypy.

Tab. 21. Kombinacja alleli *ERBB-1* wśród heterozygot
Tab. 21. ERBB-1 allele combination among heterozygotes

Kombinacja alleli <i>ERBB-1</i> (liczba powtórzeń CA) <i>ERBB-1 allele combination</i> (CA repeats numbers)	Grupa chorych <i>Breast cancer patients</i>		Grupa kontrolna <i>Control group</i>	
	Liczba <i>Number</i>	%	Liczba <i>Number</i>	%
9/16	1	0,7	0	0,0
14/18	0	0,0	1	0,8
14/19	0	0,0	0	0,0
14/20	2	1,3	0	0,0
14/21	0	0,0	1	0,8
15/16	2	1,3	0	0,0
15/17	0	0,0	0	0,0
15/18	0	0,0	1	0,8
15/19	0	0,0	1	0,8
15/20	2	1,3	0	0,0
15/21	0	0,0	0	0,0
16/17	10	6,5	1	0,8
16/18	38	24,8	39	33,1
16/19	3	2,0	1	0,8
16/20	32	20,9	27	22,9
16/21	13	8,5	16	13,6
16/22	2	1,3	1	0,8
16/23	1	0,7	0	0,0
17/18	10	6,5	1	0,8
17/19	1	0,7	1	0,8
17/20	4	2,6	1	0,8
17/21	2	1,3	4	3,4
17/23	1	0,7	0	0,0
18/19	1	0,7	1	0,8
18/20	15	9,8	14	11,9
18/21	6	3,9	5	4,2
19/20	3	2,0	2	1,7
20/21	3	2,0	0	0,0
21/22	1	0,7	0	0,0
Łącznie / <i>Total</i>	153	100,0	118	100,0

W zależności od liczby powtórzeń CA wszystkie analizowane allele genu *ERBB-1* pochodzące zarówno od kobiet chorych, jak i zdrowych zostały podzielone na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowiły allele długie, zawierające więcej niż 18 powtórzeń CA, a drugą – allele krótkie, o liczbie powtórzeń do 18. W obu porównywanych grupach przeważały allele krótkie, stanowiące 70% badanych próbek.

Układ alleli w badanych genach mógł zawierać 3 możliwości; 2 allele krótkie (kk), 2 długie (dd) i – w przypadku heterozygot – allel krótki i długi (kd). W badanym materiale w obu grupach dominowały homozygoty o krótkich allelach (49% alleli w grupie kobiet chorych i 53% w grupie kontrolnej). Najrzadziej obserwowano kombinację dwóch długich alleli; w grupie kontrolnej i w grupie chorych ich udział wynosił odpowiednio 8 i 7%.

Utratę heterozygotyczności (LOH), określoną przez porównanie alleli *ERBB-1* oznaczonych w materiale pochodzącym ze 153 heterozygotycznych guzów nowotworowych i leukocytów tych samych chorych, stwierdzono u 42 spośród 153 badanych kobiet (27%).

Zjawisko heterozygotyczności wiąże się z utratą krótkiego lub długiego allelela. Utratę długiego allelela, która odpowiadała wartości LOH <0,6, obserwowano u 5% chorych a utratę allelela krótkiego, odpowiadającą wartości LOH >1,67 – u 22%.

Spośród 197 chorych, u których oceniono polimorfizm sekwencji powtórzonych (CA)n w pierwszym intronie genu *ERBB-1*, u 58 określono również ekspresję receptora ERBB-1. W tej podgrupie zbadano zależność pomiędzy długością alleli a występowaniem zjawiska ekspresji ERBB-1 (tab. 22). Nie stwierdzono istnienia zależności pomiędzy tymi cechami ($p=0,56$).

Tab. 22. Zależność pomiędzy ekspresją receptora ERBB-1 a polimorfizmem mikrosatelitarnym

Tab. 22. Relationship between ERBB-1 receptor expression and microsatellite polymorphism

Ekspresja ERBB-1 <i>ERBB-1 expression</i>	kk (%) <i>ss</i>	kd (%) <i>sl</i>	dd (%) <i>ll</i>	Łącznie <i>Total</i>
0	19 (42)	22 (49)	4 (9)	45
1–3 (+)	5 (6)	4 (44)	0 (0)	9
Łącznie / <i>Total</i>	24	26	4	54

ss – 2 short allele, *sl* – short and long allele, *ll* – 2 long allele

U 48 chorych sprawdzono, czy ekspresja receptora ERBB-1 ma związek z utratą heterozygotyczności (tab. 23). Ekspresję stwierdzono u 40 chorych, z czego u nieco ponad połowy towarzyszyła jej LOH ($p = 0,24$).

Tab. 23. Zależność pomiędzy ekspresją receptora ERBB-1 a utratą heterozygotyczności
Tab. 23. Relationship between ERBB-1 receptor expression and loss of heterozygosity

Ekspresja ERBB-1 <i>ERBB-1 expression</i>	Brak LOH (%) <i>No LOH</i>	LOH (%)	Łącznie <i>Total</i>
0	2 (25)	6 (75)	8
1 – 3 (+)	19 (48)	21 (52)	40
Łącznie <i>Total</i>	21	27	48

5.5. Zależność pomiędzy parametrami molekularnymi a cechami histoklinicznymi nowotworu

5.5.1. ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY WYSTĘPOWANIEM ANOMALII ILOŚCIOWYCH W PROTOONKOGENACH RODZINY *ERBB* A CECAMI HISTOKLINICZNYMI NOWOTWORU

Oznaczone wartości AGCN dla poszczególnych onkogenów rodziny *ERBB* oceniono w zależności od wybranych cech histoklinicznych nowotworu, takich jak wielkość guza, przerzuty do pachowych węzłów chłonnych, typ histologiczny i stopień zróżnicowania guza, oraz obecność receptorów steroidowych (tab. 24).

W przypadku *ERBB-1* spośród cech guza jedynie obecność receptorów progesteronowych była związana z wartością AGCN. U chorych z dodatnimi receptorami progesteronowymi wartość AGCN dla *ERBB-1* była znamienne wyższa niż u chorych z ujemnymi receptorami ($p = 0,03$). Ponadto u chorych z przerzutami do pachowych węzłów chłonnych wartość AGCN dla *ERBB-1* była granicznie wyższa ($p = 0,06$) w porównaniu do chorych bez przerzutów. Nie obserwowano natomiast żadnych zależności pomiędzy wartością AGCN dla *ERBB-2* a badanymi cechami histoklinicznymi nowotworu.

W odniesieniu do onkogenu *ERBB-3* stwierdzono jedynie zależność pomiędzy wartością AGCN a stopniem zróżnicowania guza; wyższemu stopniowi zróżnicowania guza (G1–2) odpowiadała wyższa wartość AGCN.

Najwięcej zależności stwierdzono dla onkogenu *ERBB-4*. Dotyczyły one wielkości guza, obecności przerzutów do pachowych węzłów chłonnych oraz stopnia zróżnicowania. Wyższa wartość AGCN dla *ERBB-4* była związana z niekorzystnymi cechami rokowniczymi, takimi jak wyższe zaawansowanie guza (T3, T4; $p = 0,001$) i obecność przerzutów do pachowych węzłów chłonnych ($p = 0,004$). Wyższa wartość AGCN onkogenu *ERBB-4* związana była jednak równocześnie z wyższym stopniem zróżnicowania (G 1–2) nowotworu ($p = 0,002$).

Tab. 24. Zależność pomiędzy określonymi cechami histoklinicznymi nowotworu a liczbą kopii genów

Tab. 24. Relationship between *ERBB* genes AGCN values and clinicopathological variables

Cecha histokliniczna <i>Clinicopathological variable</i>	Liczba chorych <i>Number of pts</i>	Mediana wartości AGCN <i>AGCN median values</i>			
		<i>ERBB-1</i>	<i>ERBB-2</i>	<i>ERBB-3</i>	<i>ERBB-4</i>
Cecha T / <i>T stage</i>					
T1–2	153	0,3	1	1	0,91
T3–4	70	0,29	1,04	0,98	1,02
		$p = 0,91$	$p = 0,65$	$p = 0,14$	$p = 0,001$
Cecha N / <i>N stage</i>					
N0	116	0,27	1	1	0,9
N1–2	106	0,37	1,04	0,99	1,0
		$p = 0,06$	$p = 0,37$	$p = 0,16$	$p = 0,004$
Typ histologiczny <i>Histological type</i>					
przewodowy <i>ductal</i>	154	0,3	1,04	1	1
zrazikowy <i>lobular</i>	38	0,37	1,04	0,99	0,95
		$p = 0,86$	$p = 0,16$	$p = 0,86$	$p = 0,17$
St. zróżnicowania <i>Grade</i>					
G 1–2	68	0,33	1,19	1,02	1,14
G 3	71	0,31	1,03	1,0	0,96
		$p = 0,42$	$p = 0,24$	$p = 0,01$	$p = 0,002$
Receptory steroid. <i>Hormone receptor status</i>					
ER(+)	104	0,3	1,03	1	0,99
ER(–)	120	0,3	1,0	1,0	0,96
		$p = 0,52$	$p = 0,86$	$p = 0,41$	$p = 0,97$
PgR(+)	104	0,37	1,02	1	0,98
PgR(–)	120	0,27	1,0	1,01	0,97
		$p = 0,03$	$p = 0,3$	$p = 0,09$	$p = 0,37$

Uwzględniając przyjęte w niniejszej pracy wartości graniczne dla oceny zaburzeń onkogenów, zbadano związek pomiędzy występowaniem amplifikacji lub delecji a wybranymi parametrami klinicznymi i histopatologicznymi dla każdego z czterech protoonkogenów.

5.5.1.1. Zaburzenia onkogenu *ERBB-1*

Najczęstszą anomalią onkogenu *ERBB-1* była delecja, którą stwierdzono u 69 chorych (31%). Delecja występowała częściej wśród chorych bez przerzutów do pachowych węzłów chłonnych niż u chorych z przerzutami – odpowiednio 44 (39%) i 25 chorych (25,5%), ($p = 0,03$; tab. 25). Delecja w tym genie była także granicznie związana z brakiem receptorów progesteronowych w komórkach nowotworowych. Stwierdzono ją u 44 chorych (38%) z ujemnymi receptorami progesteronowymi i u 25 chorych (26%) z dodatnimi ($p = 0,06$). Takiej zależności nie obserwowano w odniesieniu do receptorów estrogenowych.

Tab. 25. Zależność pomiędzy określonymi cechami histoklinicznymi nowotworu a delecją genu *ERBB-1*Tab. 25. Relationship between clinicopathological variables and *ERBB-1* gene deletion

Cecha histokliniczna <i>Clinicopathological variable</i>	Liczba chorych <i>Number of pts</i>	Liczba chorych z delecją <i>ERBB-1</i> <i>Number of pts with ERBB-1 deletion</i>
		AGCN $\leq 0,2$
Cecha T / <i>T stage</i>		
T1–T2	144	49 (34%)
T3–T4	66	20 (30%)
		p = 0,59
Cecha N / <i>N stage</i>		
N0	113	44 (39%)
N1–2	98	25 (25,5%)
		p = 0,03
Typ histologiczny <i>Histological type</i>		
przewodowy <i>ductal</i>	144	42 (29%)
zrazikowy <i>lobular</i>	37	12 (32%)
		p = 0,69
Stopień zróżnicowania <i>Grade</i>		
G1–2	62	17 (27%)
G3	67	21 (31%)
		p = 0,62
Receptory steroidowe <i>Hormonal receptor status</i>		
ER (+)	101	32 (32%)
ER (–)	111	37 (33%)
		p = 0,79
PgR (+)	96	25 (26%)
PgR (–)	116	44 (38%)
		p = 0,06

Amplifikację genu *ERBB-1* stwierdzono u 36 chorych, stanowiła ona 34% wszystkich zaburzeń tego genu i nie miała związku z żadnymi cechami histoklinicznymi nowotworu (tab. 26).

Tab. 26. Zależność pomiędzy określonymi cechami histoklinicznymi nowotworu a amplifikacją genu *ERBB-1*Tab. 26. Relationship between clinicopathological variables and *ERBB-1* gene amplification

Cecha histokliniczna <i>Clinicopathological variable</i>	Liczba chorych <i>Number of pts</i>	Liczba chorych z amplifikacją <i>ERBB-1</i> <i>Number of pts with ERBB-1 amplification</i>
		AGCN $\leq 0,2$
Cecha T / <i>T stage</i>		
T1–T2	103	24 (23%)
T3–T4	48	9 (19%)
		p = 0,53
Cecha N / <i>N stage</i>		
N0	72	14 (19%)
N1–2	79	20 (25%)
		p = 0,38
Typ histologiczny <i>Histological type</i>		
przewodowy <i>ductal</i>	108	24 (22%)
zrazikowy <i>lobular</i>	26	5 (19%)
		p = 0,77
Stopień zróżnicowania <i>Grade</i>		
G1-2	49	12 (24%)
G3	50	12 (24%)
		p = 0,95
Receptory steroidowe <i>Hormonal receptor status</i>		
ER (+)	82	20 (24%)
ER (–)	71	14 (20%)
		p = 0,48
PgR (+)	75	16 (21%)
PgR (–)	78	18 (23%)
		p = 0,79

5.5.1.2. Zaburzenia onkogenu *ERBB-2*

Nie obserwowano żadnych zależności pomiędzy występowaniem zaburzeń genu *ERBB-2* a jakąkolwiek spośród badanych cech histoklinicznych (tab. 27).

Tab. 27. Zależność pomiędzy określonymi cechami histoklinicznymi nowotworu a amplifikacją genu *ERBB-2*Tab. 27. Relationship between clinicopathological variables and *ERBB-2* gene amplification

Cecha histokliniczna <i>Clinicopathological variable</i>	Liczba chorych <i>Number of pts</i>	Liczba chorych z amplifikacją <i>ERBB-2</i> <i>Number of pts with ERBB-2 amplification</i>
		AGCN >1,6
Cecha T / <i>T stage</i>		
T1–T2	147	37 (25%)
T3–T4	70	19 (27%)
		p = 0,75
Cecha N / <i>N stage</i>		
N0	114	27 (24%)
N1–2	104	31 (30%)
		p = 0,3
Stopień zróżnicowania <i>Grade</i>		
G1–2	151	45 (30%)
G3	37	8 (22%)
		p = 0,32
Typ histologiczny <i>Histological type</i>		
przewodowy <i>ductal</i>	66	25 (38%)
zrądkowy <i>lobular</i>	70	20 (29%)
		p = 0,25
Receptory steroidowe <i>Hormonal receptor status</i>		
ER (+)	102	26 (25,5%)
ER (–)	117	31 (26,5%)
		p = 0,85
PgR (+)	102	29 (28%)
PgR (–)	117	28 (24%)
		p = 0,44

5.5.1.3. Zaburzenia onkogenu *ERBB-3*

Występowanie amplifikacji genu *ERBB-3* było związane z brakiem przerzutów do pachowych węzłów chłonnych (p=0,02) i wysokim (G1–G2) zróżnicowaniem histologicznym nowotworu (p=0,03; tab. 28).

Amplifikacja tego genu występowała blisko trzykrotnie częściej wśród chorych bez przerzutów do pachowych węzłów chłonnych w porównaniu do chorych z przerzutami; (odpowiednio u 15% i 5,6%). Amplifikacja *ERBB-3* była także trzykrotnie częstsza w guzach G1–2 niż w G3 (odpowiednio 17,6% i 5,6%).

Tab. 28. Zależność pomiędzy określonymi cechami histoklinicznymi nowotworu a amplifikacją genu *ERBB-3*

Tab. 28. Relationship between clinicopathological variables and *ERBB-3* gene amplification

Cecha histokliniczna <i>Clinicopathological variable</i>	Liczba chorych <i>Number of pts</i>	Liczba chorych z amplifikacją <i>ERBB-3</i> <i>Number of pts with ERBB-3 amplification</i>
		AGCN $\geq 1,6$
Cecha T / <i>T stage</i>		
T1–T2	147	16 (11%)
T3–T4	70	5 (7%)
		p = 0,39
Cecha N / <i>N stage</i>		
N0	112	17 (15%)
N1–2	106	6 (6%)
		p = 0,02
Typ histologiczny <i>Histological type</i>		
przewodowy <i>ductal</i>	151	16 (11%)
zrądkowy <i>lobular</i>	37	4 (11%)
		p = 0,95
St. zróżnicowania <i>Grade</i>		
G 1–2	68	12 (18%)
G 3	71	4 (6%)
		p = 0,03
Receptory steroidowe <i>Hormonal receptor status</i>		
ER (+)	103	10 (10%)
ER (–)	117	12 (10 %)
		p=0,89
PgR (+)	103	2 (2%)
PgR (–)	117	10 (8,5%)
		p = 0,44

5.5.1.4. Zaburzenia onkogenu *ERBB-4*

Amplifikacja genu *ERBB-4* była dwukrotnie częstsza w guzach o niskim (G1–2) stopniu zróżnicowania niż o wyższym (G3) stopniu zróżnicowania (odpowiednio 29% i 15%; $p=0,047$; tab. 29). Nie stwierdzono natomiast związku amplifikacji *ERBB-4* z wielkością guza, przerzutami do pachowych węzłów chłonnych i stanem receptorów steroidowych.

Tab. 29. Zależność pomiędzy określonymi cechami histoklinicznymi nowotworu a amplifikacją genu *ERBB-4*

Tab. 29. Relationship between clinicopathological variables and *ERBB-3* gene amplification

Cecha histokliniczna <i>Clinicopathological variable</i>	Liczba chorych <i>Number of pts</i>	Liczba chorych z amplifikacją <i>ERBB-4</i> <i>Number of pts with ERBB-4 amplification</i>
		AGCN $\geq 1,6$
Cecha T / <i>T stage</i>		
T1–2	141	19 (13,5%)
T3–4	66	14 (21%)
		$p = 0,15$
Cecha N / <i>N stage</i>		
N0	108	15 (14)
N1–2	100	18 (18%)
		$p = 0,42$
Typ histologiczny <i>Histological type</i>		
przewodowy <i>ductal</i>	145	28 (19%)
zrazikowy <i>lobular</i>	35	3 (9%)
		$p = 0,21$
St. zróżnicowania <i>Grade</i>		
G1–2	65	19 (30%)
G3	67	10 (1,5%)
		$p = 0,047$
Receptory steroidowe <i>Hormonal receptor status</i>		
ER (+)	96	16 (17%)
ER (–)	112	17 (15%)
		$p = 0,76$
PgR (+)	98	19 (19%)
PgR (–)	110	14 (13%)
		$p = 0,18$

5.5.2. ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY EKSPRESJĄ RECEPTORÓW ERBB-1 I ERBB-2 A CECHAMI HISTOKLINICZNYMI

U wszystkich chorych z nadekspresją receptora ERBB-1 zarówno receptory estrogenowe, jak i progesteronowe były ujemne. Nadekspresja występowała także znamienne częściej w bardziej zaawansowanych (T3–4) guzach, ($p=0,027$) i u chorych z przerzutami do pachowych węzłów chłonnych, przy czym ta ostatnia zależność nie była znamienna ($p=0,06$). Nie obserwowano żadnych zależności w odniesieniu do innych analizowanych czynników histoklinicznych (tab. 30).

Tab. 30. Zależność pomiędzy określonymi cechami histoklinicznymi nowotworu a nadekspresją receptora ERBB-1

Tab. 30. Relationship between clinicopathological variables and ERBB-1 receptor expression

Cecha histokliniczna <i>Clinicopathological variable</i>	Liczba chorych <i>Number of pts</i>	Liczba chorych z nadekspresją ERBB-1 <i>Number of pts with ERBB-1 expression</i>
Cecha T / <i>T stage</i>		
T1–2	50	6 (12%)
T3–4	5	3 (60%)
		p = 0,027
Cecha N / <i>N stage</i>		
N0	30	2 (7%)
N1–2	24	7 (29%)
		p = 0,06
Typ histologiczny <i>Histological type</i>		
przewodowy <i>ductal</i>	40	8 (20%)
zrazikowy <i>lobular</i>	8	0 (0%)
		p = 0,32
Stopień zróżnicowania <i>Grade</i>		
G1–2	21	1 (5%)
G3	13	2 (15%)
		p = 0,54
Receptory steroidowe <i>Hormonal receptor status</i>		
ER(+)	23	0 (0%)
ER(–)	35	10 (29%)
		p = 0,007
PR(+)	28	0 (0%)
PgR (–)	30	10 (33%)
		p = 0,002

Spośród 58 chorych, u których oceniono ekspresję ERBB-1, u 55 określono także ekspresję ERBB-2. Stwierdzono występowanie odwrotnej zależności pomiędzy nadekspresją obu tych receptorów ($p=0,0001$). Nadekspresję ERBB-1 stwierdzono u 10 chorych, we wszystkich wypadkach bez nadekspresji ERBB-2.

Tab. 31. Zależność pomiędzy określonymi cechami histoklinicznymi nowotworu a nadekspresją receptora ERBB-2

Tab. 31. Relationship between clinicopathological variables and ERBB-2 receptor over-expression

Cecha histokliniczna <i>Clinicopathological variable</i>	Liczba chorych <i>Number of pts</i>	Liczba chorych z nadekspresją ERBB-2 IHC +++ <i>Number of pts with ERBB-1 expression</i>
Cecha T / <i>T stage</i>		
T1–2	109	22 (20%)
T3–4	33	10 (30%)
		$p = 0,9$
Cecha N / <i>N stage</i>		
N0	84	20 (24%)
N1–2	58	12 (21%)
		$p = 0,7$
Typ histologiczny <i>Histological type</i>		
przewodowy <i>ductal</i>	93	25 (27%)
zrazikowy <i>lobular</i>	28	5 (18%)
		$p = 0,05$
Stopień zróżnicowania G <i>Grade</i>		
G1–2	33	4 (12%)
G3	48	15 (31%)
		$p = 0,06$
Receptory steroidowe <i>Hormonal receptor status</i>		
ER (+)	64	9 (14%)
ER (–)	80	23 (29%)
		$p = 0,02$
PgR (+)	65	10 (15%)
PgR (–)	79	22 (28%)
		$p = 0,06$

W analizie zależności pomiędzy ekspresją receptorów ERBB-2 a poszczególnymi czynnikami histoklinicznymi nowotworu uwzględniono wyłącznie silną ekspresję (IHC+++). Wylaczono grupę 34 chorych o pośredniej ekspresji receptora ERBB-2. Nadekspresja receptorów ERBB-2 znacznie częściej występowała w raku przewodowym i w guzach z ujemnymi receptorami estrogenowymi niż w raku zrazikowym i u chorych z dodatnimi receptorami estrogenowymi (p odpowiednio 0,05 i 0,02; tab. 31). Nadekspresja ERBB-2 związana była także z brakiem receptorów progesteronowych, aczkolwiek różnica ta nie była znamienna ($p=0,06$). Podobnie, nadekspresja ERBB-2 wiązała się granicznie z niższym (G3) stopniem zróżnicowania histologicznego ($p=0,06$).

5.5.3. ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY UTRATĄ HETEROZYGOTYCZNOŚCI (LOH) A OKREŚLONYMI CECHAMI HISTOKLINICZNYMI

Posługując się testem chi-kwadrat przeprowadzono analizę zależności pomiędzy występowaniem LOH a najistotniejszymi cechami histoklinicznymi nowotworu (tab. 32). Jedyną znamienną zależnością była częstsza utrata heterozygotyczności w obrębie genu *ERBB-1* u chorych z ujemnymi receptorami estrogenowymi ($p=0,05$). LOH występowała także częściej w bardziej zaawansowanych guzach piersi (u chorych z guzami w stopniu T1–2 i T3–4 – u odpowiednio 26% i 34% chorych). Ta zależność okazała się bliska wartości znamiennej, kiedy średnicę guza przyjęto jako zmienną ciągłą. Mediana średnicy guza w grupie chorych, u których stwierdzono LOH wynosiła 2,85 cm w porównaniu do 2,15 cm u chorych, u których nie obserwowano tej cechy ($p=0,07$).

Tab. 32. Zależność pomiędzy określonymi cechami histoklinicznymi nowotworu a utratą heterozygotyczności (LOH) w genie *ERBB-1*

Tab. 32. Relationship between clinicopathological variables and LOH in *ERBB-1* gene

Cecha histokliniczna <i>Clinicopathological variable</i>	Liczba chorych <i>Number of pts</i>	Liczba chorych z LOH <i>Number of pts with LOH</i>
Cecha T / <i>T stage</i>		
T1–2	112	29 (26%)
T3–4	38	13 (34%)
		p = 0,32
Cecha N / <i>N stage</i>		
N0	83	22 (26,5%)
N1–2	67	19 (28%)
		p = 0,8
Typ histologiczny <i>Histological type</i>		
przewodowy <i>ductal</i>	103	29 (28%)
zrazikowy <i>lobular</i>	26	4 (15%)
		p = 0,18
St. zróżnicowania <i>Grade</i>		
G1–2	46	10 (22%)
G3	49	16 (33%)
		p = 0,23
Receptory steroidowe Hormonal receptor status		
ER (+)	66	13 (20%)
ER (–)	86	29 (34%)
		p = 0,05
PgR (+)	70	19 (27%)
PgR (–)	82	23 (28%)
		p = 0,9

W następnym etapie przeanalizowano zależność pomiędzy utratą krótkiego lub długiego allele a wybranymi cechami histoklinicznymi.

Grupa chorych, u których stwierdzono utratę długiego allele charakteryzowała się większą średnicą guza i brakiem receptorów estrogenowych, jednak obie te różnice nie były znamienne, najpewniej z powodu niewielkiej liczebności badanych grup (tab. 33).

Tab. 33. Zależność pomiędzy wybranymi cechami klinicznymi a utratą krótkiego lub długiego allela

Tab. 33. Relationship between between clinicopathological features and loss of short or long allele

	Brak LOH <i>No LOH</i>	Utrata allela krótkiego <i>Loss of shorter allele</i>	Utrata allela długiego <i>Loss of longer allele</i>
ER (+)	53	12	1
ER (-)	58	22	6
Mediana średnicy guza <i>Median tumor diameter</i>	2,15 cm	2,67 cm	3,5 cm

5.6. Wstępna ocena rokowniczego znaczenia zaburzeń molekularnych występujących w genach rodziny ERBB i ekspresji receptorów ERBB-1 i ERBB-2

Obserwacje chorych dla celów obecnego badania zakończono 10.08.2005. Mediana czasu obserwacji wynosiła 37 miesięcy. W tym okresie u 40 chorych (18%) doszło do wznowy nowotworu, a 24 chore zmarły z tego powodu. Najczęstszą przyczyną niepowodzenia leczenia były przerzuty do narządów mięsaszowych (27 chorych; tab. 34). Jedna chora zmarła z powodu niewydolności nerek, bez cech rozsiewu nowotworu.

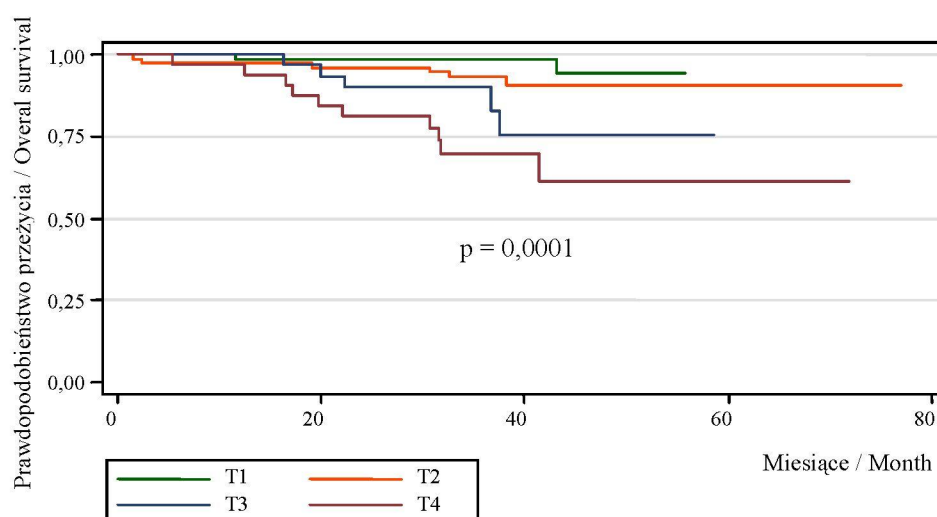
Tab. 34. Przyczyny niepowodzenia leczenia

Tab. 34. Reasons of treatment failure

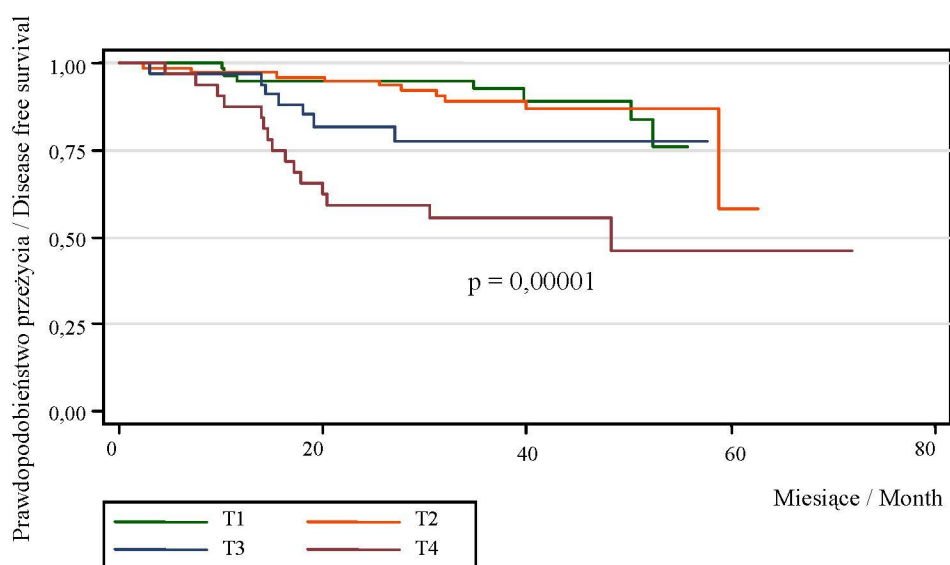
Przyczyny niepowodzenia <i>Reasons of treatment failure</i>	Liczba chorych (%) <i>Number of pts</i>
Przetrwały nowotwór <i>Persistent cancer</i>	5 (2,2)
Wznowa miejscowa / <i>Local failure</i>	6 (2,7)
Przerzuty wyłącznie do kości <i>Bone metastases only</i>	5 (2,2)
Przerzuty uogólnione (w tym mięsaszowe) <i>Distant metastases (visceral)</i>	27 (12)
Nowotwór drugiej piersi <i>Contralateral breast cancer</i>	2 (0,8)
Niezależny, drugi nowotwór <i>Second neoplasm</i>	1 (0,4)

5.6.1. WYNIKI LECZENIA W ZALEŻNOŚCI OD CECH HISTOKLINICZNYCH

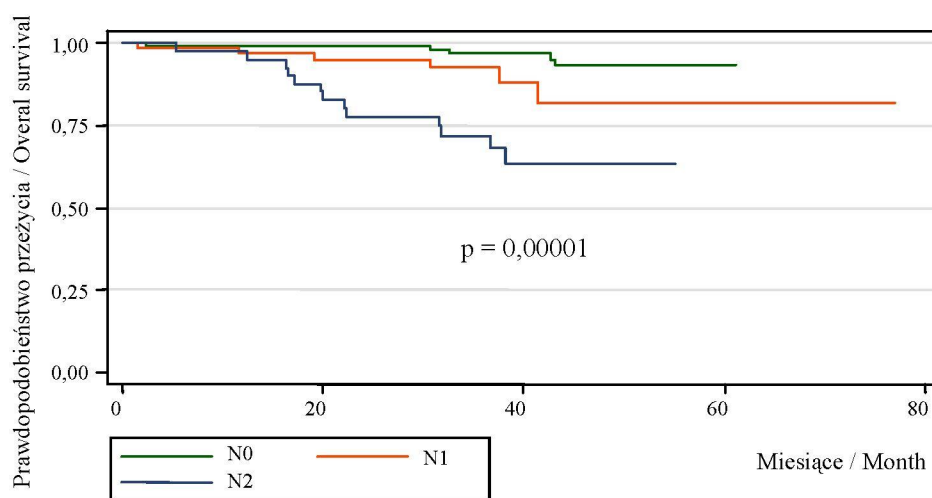
Pomimo krótkiego okresu obserwacji podjęto próbę określenia prawdopodobieństwa przeżycia całkowitego OS (*overall survival*) i niepowodzenia leczenia DFS (*disease free survival*) w zależności od najistotniejszych cech histoklinicznych i parametrów molekularnych ocenianych w pracy. Zarówno OS, jak i DFS były zależne od cech pT i pN (ryc. 15–18). Ponadto, spośród 15 zgonów wśród chorych, u których oceniono cechę G, aż 12 dotyczyło chorych z guzem o niskim stopniu zróżnicowania (G3). Zależność ta nie była jednak znamienna ($p=0,08$; ryc.19). Ryzyko wystąpienia nawrotu choroby było również najwyższe w grupie chorych z cechą G3, a różnica pomiędzy grupami z cechą G2 i G3 była znamienna ($p=0,04$; ryc. 20).



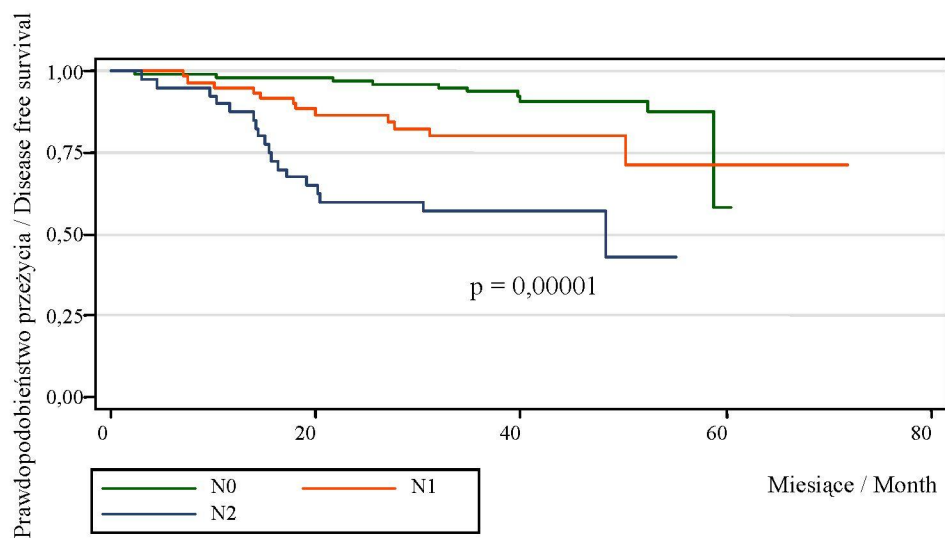
Ryc. 15. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od cechy T
Fig. 15. Probability of OS according to T stage



Ryc. 16. Prawdopodobieństwo przeżycia bez nawrotu w zależności od cechy T
 Fig. 16. Probability of DFS according to T stage

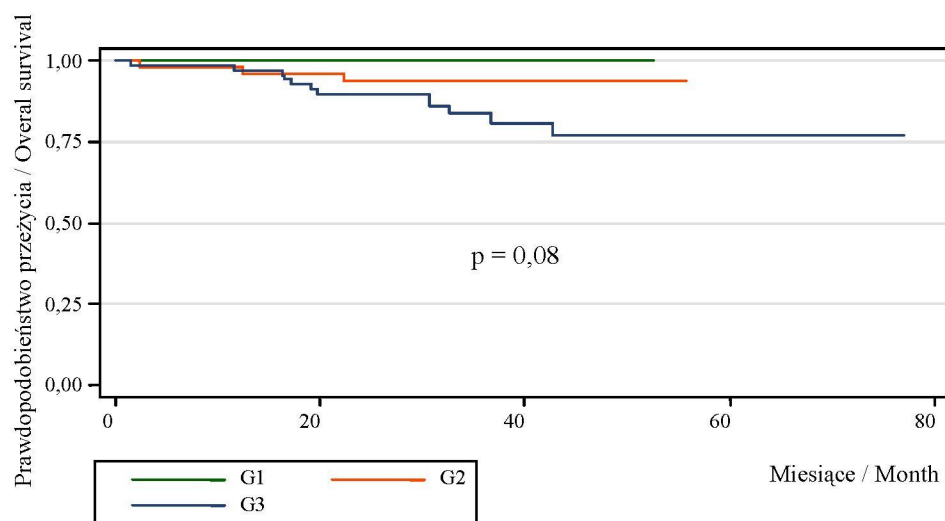


Ryc. 17. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od cechy N
 Fig. 17. Probability of OS according to N stage



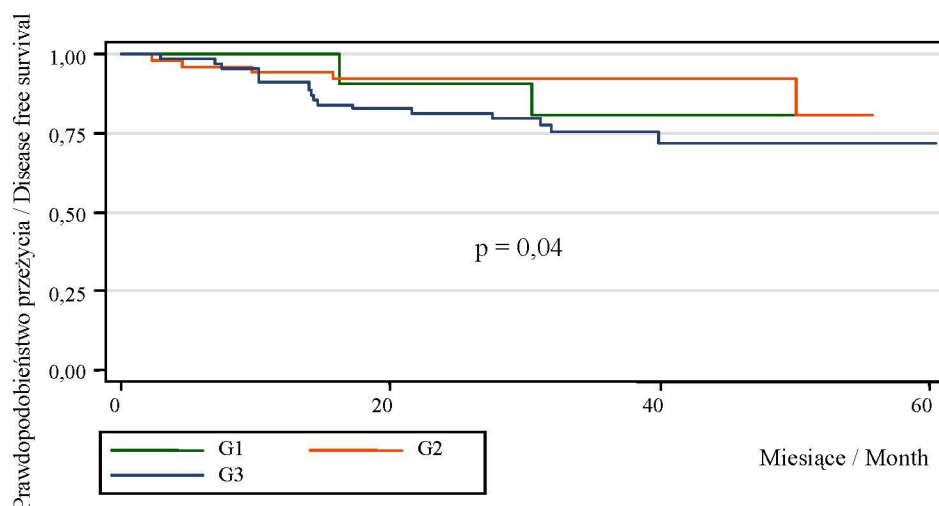
Ryc. 18. Prawdopodobieństwo przeżycia bez nawrotu w zależności od cechy N
($p = 0,00001$)

Fig. 18. Probability of DFS according to N stage



Ryc. 19. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od cechy G

Fig. 19. Probability of OS according to stage G



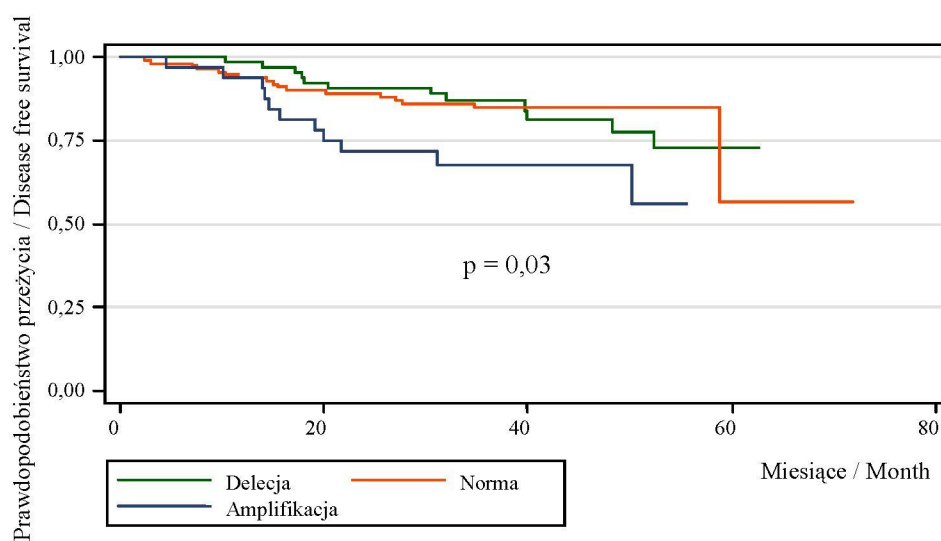
Ryc. 20. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od nawrotu w zależności od cechy G
 Fig. 20. Probability of DFS according to G stage

Nie stwierdzono znamienych różnic w czasie przeżycia całkowitego i wolnego od wznowy w zależności od ekspresji receptorów steroidowych, aczkolwiek wznowy nowotworu występowały częściej u chorych z receptorami ujemnymi (20% u chorych z ujemnymi receptorami estrogenowymi i 21% z ujemnymi receptorami progesteronowymi, w porównaniu do odpowiednio 15% i 13% u chorych z receptorami dodatnimi.

5.6.2. WYNIKI LECZENIA W ZALEŻNOŚCI OD ZABURZEŃ MOLEKULARNYCH

5.6.2.1. Zaburzenia genu *ERBB-1* i receptora *ERBB-1*

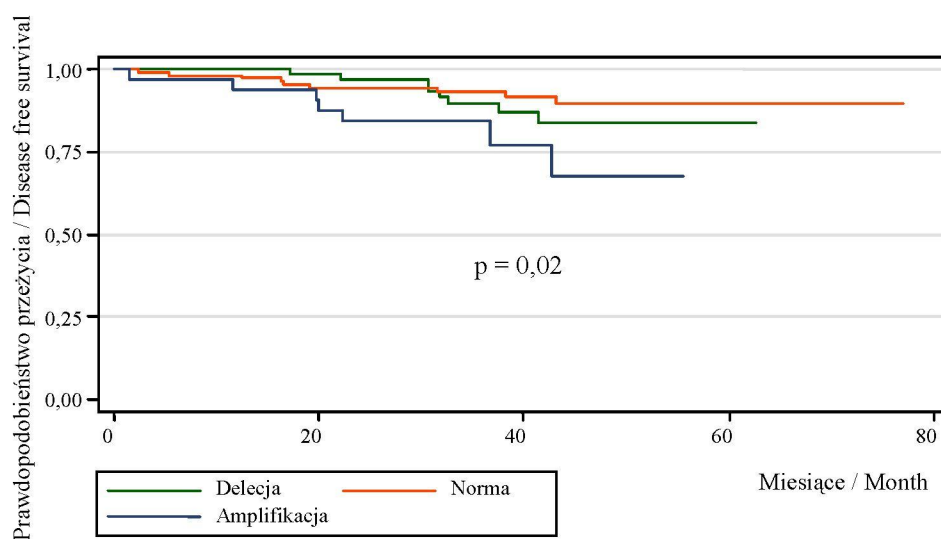
Spośród 40 chorych, u których doszło do postępu choroby, u 23 (58%) stwierdzono zaburzenia genu *ERBB-1* w komórkach nowotworowych. Ryzyko wystąpienia wznowy było znamienne wyższe wśród chorych z amplifikacją tego genu. Obserwowano ją wśród 11 chorych (31%) z amplifikacją, u 12 (18%) z delecją i u 17 chorych (14%) bez żadnych zaburzeń w obrębie *ERBB-1* ($p=0,03$; ryc. 21).



Ryc. 21. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od nawrotu w zależności od zaburzeń genu *ERBB-1*

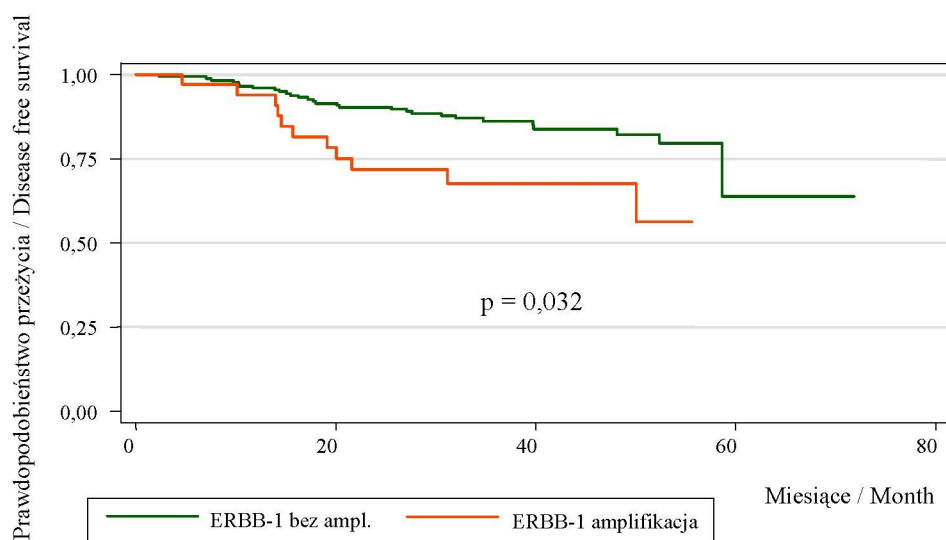
Fig. 21. Probability of DFS according to *ERBB-1* gene abnormality

Podobnie, spośród 24 chorych, które zmarły z powodu postępu nowotworu, u 63% stwierdzono delecję lub amplifikację genu *ERBB-1*. Występowanie amplifikacji tego genu wiązało się ze zwiększonym ryzykiem zgonu ($p=0,02$; ryc. 22, 23).



Ryc. 22. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od zaburzeń genu *ERBB-1*

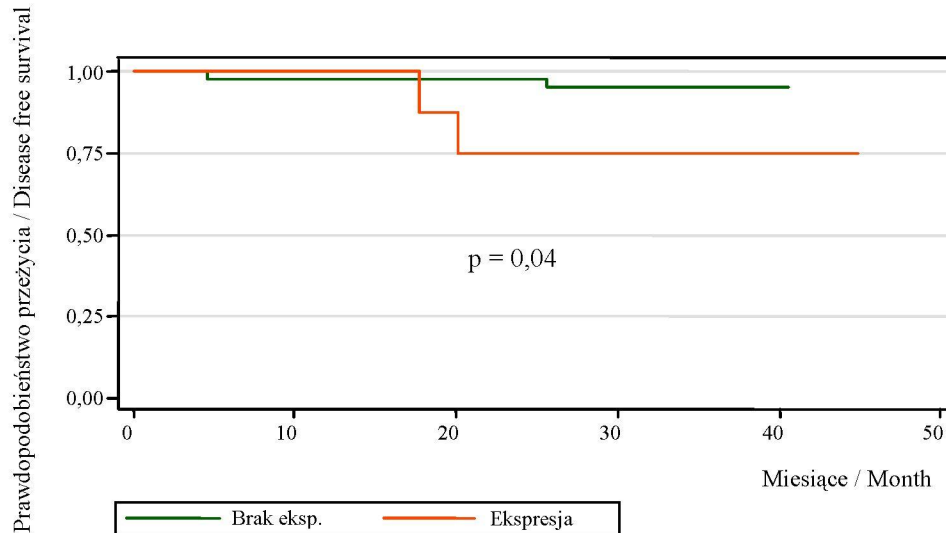
Fig. 22. Probability of OS according to *ERBB-1* gene abnormality



Ryc. 23. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od nawrotu w zależności od amplifikacji genu *ERBB-1*

Fig. 23. Probability of DFS according to *ERBB-1* gene amplification

Ekspresję receptora ERBB-1 stwierdzono jedynie u 8 spośród 56 chorych, u których wykonano to badanie. Do wznowy nowotworu doszło u 2 chorych (4%) bez ekspresji ERBB-1 i u 2 (25%) z ekspresją ($p=0,04$; ryc. 24).



Ryc. 24. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od nawotu w zależności od ekspresji receptora ERBB-1

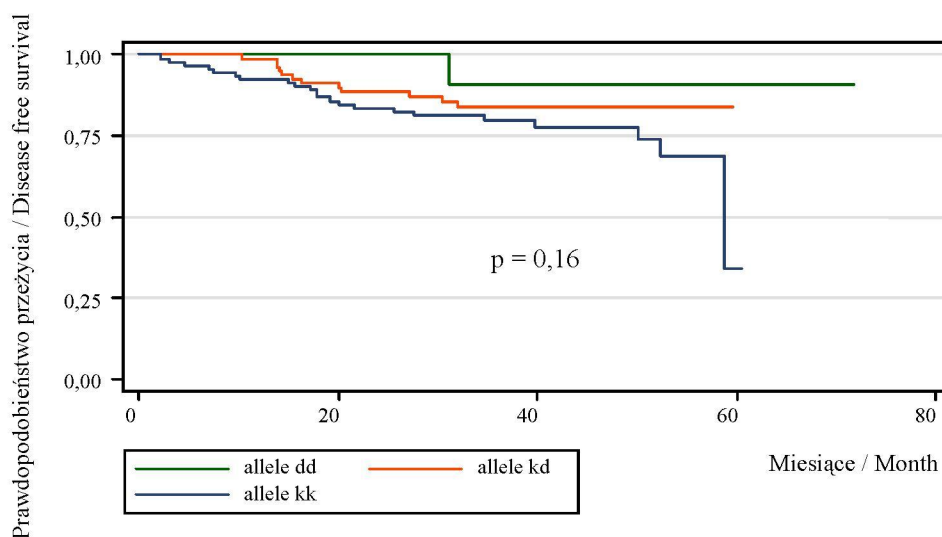
Fig. 24. Probability of DFS according to ERBB-1 receptor expression

Występowanie homo- lub heterozygot genu *ERBB-1* nie miało wpływu na ryzyko nawrotu choroby, podobnie jak utrata heterozygotyczności, niezależnie od tego, czy utracony został allel długi ($LOH < 0,6$), czy krótki ($LOH > 1,67$). Natomiast ryzyko to było wyższe w grupie chorych, u których występowały dwa allele krótsze (do 18 powtórzeń CA) w porównaniu z chorymi, u których stwierdzono kombinację allela krótkiego i długiego. Wznowę stwierdzono u 22 chorych (23%) z krótkimi allelami i u 12 chorych (14%) z mieszanymi (tab. 35, ryc. 25). Różnica ta nie była znamienna ($p=0,16$).

Tab. 35. Częstość występowania wznów w zależności od kombinacji alleli w genie *ERBB-1*
 Tab. 35. Relationship between treatment failure and *ERBB-1* allele combinations

Kombinacja alleli <i>Allele combination</i>	Liczba chorych (%) <i>Number of pts</i>	Liczba chorych ze wznową (%) <i>Number of pts with treatment failure</i>
kk / ss	96 (49)	22 (23)
kd / sl	85 (43)	12 (14)
dd / ll	16 (8)	1 (6)
Łącznie / <i>Total</i>	187 (100)	35 (19)

k – krótki; d – długi allel
 s – short, l – long allele

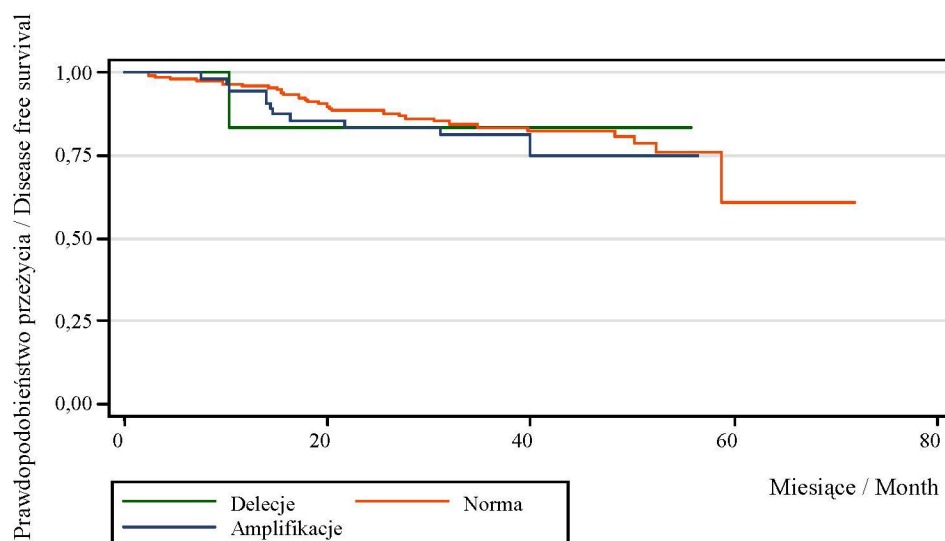


Ryc. 25. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od nawrotu w zależności od kombinacji alleli genu *ERBB-1*

Fig. 25. Probability of DFS according to *ERBB-1* gene allele combination

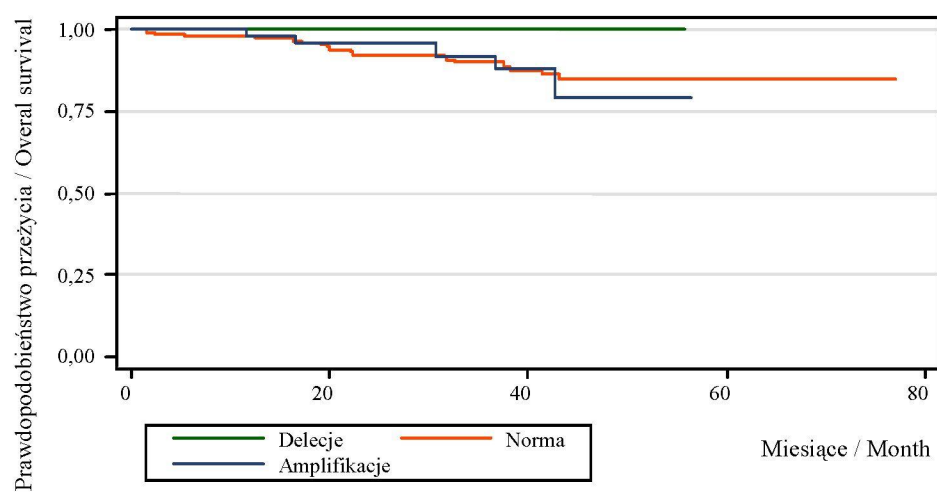
5.6.2.2. Zaburzenia genu *ERBB-2* i receptora *ERBB-2*

Spośród 40 chorych, u których doszło do wznowy nowotworu, u 12 (30%) występowały zaburzenia genu *ERBB-1* (u jednej chorej stwierdzono delecję, u wszystkich pozostałych – amplifikację) (ryc. 26).



Ryc. 26. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od nawrotu w zależności od zaburzeń genu *ERBB-2*

Fig. 26. Probability of DFS according to *ERBB-2* gene abnormality

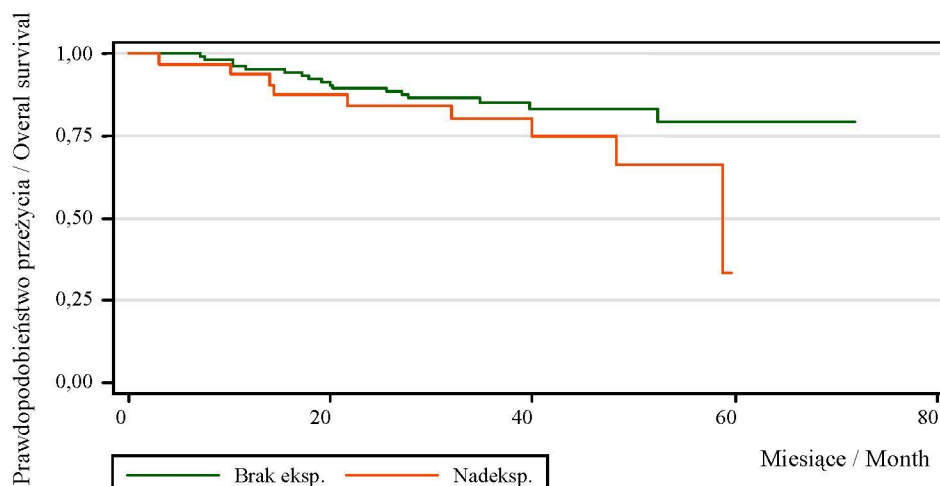


Ryc. 27. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od zaburzeń genu *ERBB-2*

Fig. 27. Probability of OS according *ERBB-2* gene abnormality

Amplifikacja *ERBB-2* nie miała związku z ryzykiem zgonu z powodu postępu choroby. Do zgonu doszło u sześciu chorych (16%), u których stwierdzono amplifikację i u 18 (15%), u których nie obserwowano żadnych zaburzeń. W grupie 68 chorych z delecją nie zanotowano zgonów (ryc. 27).

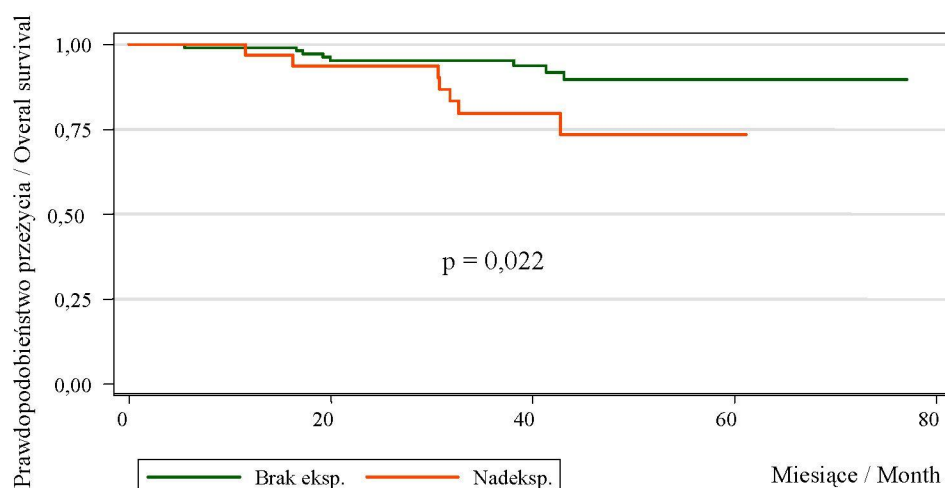
Spośród 32 chorych, u których stwierdzono nadekspresję receptora *ERBB-2*, do wznowy doszło u 9 (28%), podczas gdy w 112 osobowej grupie bez ekspresji zmarło 17 chorych (15%); różnica ta nie była znamienna (ryc. 28).



Ryc. 28. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od nawrotu w zależności od ekspresji *ERBB-2*

Fig. 28. Probability of DFS according to *ERBB-2* receptor expression

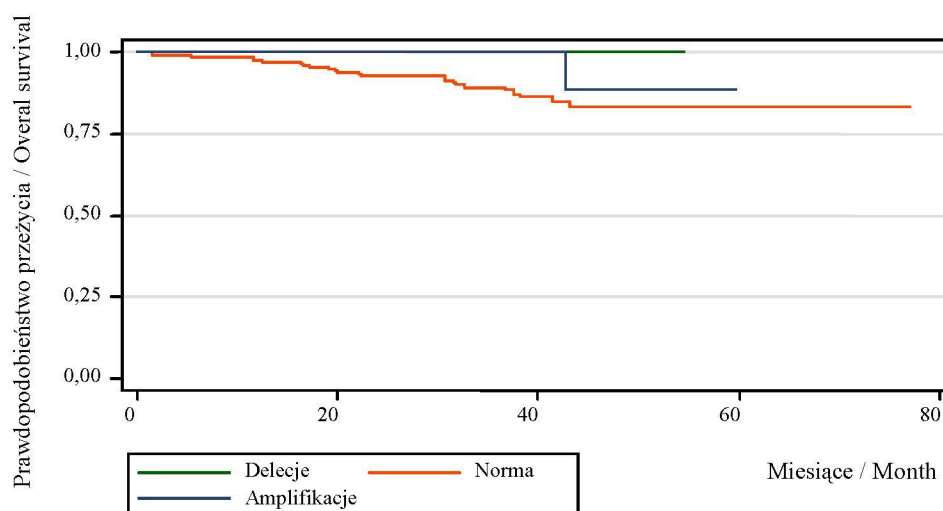
Z niekorzystnym wpływem na przeżycie była natomiast związana nadekspresja receptora *ERBB-2*. W tej grupie do zgonu w okresie obserwacji doszło u 22% chorych, podczas gdy w grupie chorych bez ekspresji – u 7% chorych ($p=0,022$; ryc. 29).



Ryc. 29. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od ekspresji receptora ERBB-2
 Fig. 29. Probability of OS according ERBB-2 receptor expression

5.6.2.3. Zaburzenia genów *ERBB-3* i *ERBB-4*

Zaburzenia występujące w pozostałych genach rodziny *ERBB* nie były związane ze zwiększonym prawdopodobieństwem wznowy lub zgonu aczkolwiek, w odniesieniu do genu *ERBB-3* spośród 24 chorych, które zmarły z powodu postępu choroby nowotworowej, u 23 nie stwierdzono jego zaburzeń (ryc. 30).



Ryc. 30. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od zaburzeń genu *ERBB-3*

Fig. 30. Probability of OS according *ERBB-3* gene abnormality

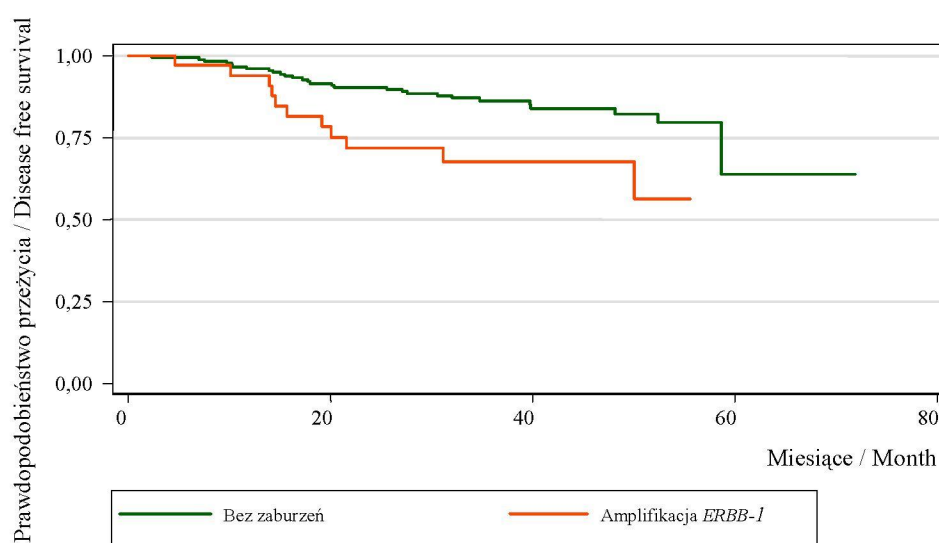
Nie stwierdzono również zwiększenia takiego ryzyka u chorych z więcej niż jednym zaburzeniem (tzw. zmiany złożone), niezależnie od tego, czy były to tylko delecje, tylko amplifikacje, czy też zmiany mieszane.

5.6.2.4. Analiza wieloczynnikowa

Wszystkie badane czynniki histokliniczne i molekularne mogące mieć wpływ na czas przeżycia bez objawów nawrotu raka piersi i czas przeżycia całkowitego poddano analizie wieloczynnikowej przy użyciu modelu Coxa. Stwierdzono, że w odniesieniu do czasu wolnego od nawrotu nowotworu niezależnymi czynnikami rokowniczymi były cechy związane z jego miejscowym zaawansowaniem – cecha T4 i N2, a także amplifikacja genu *ERBB-1* (tab. 36; ryc. 31).

Tab. 36. Analiza wieloczynnikowa ryzyka nawrotu raka piersi – model końcowy
 Tab. 36. Multivariate analysis of cancer recurrence

Zmienna Variable	Współczynnik ryzyka <i>Hazard ratio</i>	95% zakres ufności <i>95% confidence interval</i>	p
T4	2,6	(1,22 – 5,6)	0,013
N2	3,1	(1,46 – 6,7)	0,003
Amplifikacja <i>ERBB-1</i> <i>ERBB-1 amplification</i>	1,3	(1,04 – 1,7)	0,02



Ryc. 31. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od nawrotu w zależności od amplifikacji genu *ERBB-1*

Fig. 31. Probability of DFS according to *ERBB-1* gene amplification

Natomiast w odniesieniu do czasu przeżycia całkowitego niezależnymi czynnikami rokowniczymi były wyłącznie cechy związane z guzem: T4, N2 i G3 (tab. 47).

Tab. 40. Analiza wieloczynnikowa całkowitego przeżycia – model końcowy
Tab. 40. Multivariate analysis of OS

Zmienna <i>Variable</i>	Współczynnik ryzyka <i>Hazard ratio</i>	95% zakres ufności <i>95% confidence interval</i>	p
T4	3,01	(1,17 – 7,76)	0,022
N2	4,4	(1,72 – 11,0)	0,002
G3	2,8	(1,22 – 6,7)	0,015

6. OMÓWIENIE WYNIKÓW

6.1. Charakterystyka badanej grupy

Grupa chorych na raka piersi objęta niniejszym badaniem wydaje się być typowa dla polskiej populacji zarówno pod względem cech demograficznych, jak i klinicznych. Wyrazem wzrastającego wraz z wiekiem ryzyka zachorowania na ten nowotwór był większy udział chorych po menopauzie (68%) i średnia wieku wynosząca 56 lat. Stosunkowo wysoki odsetek (35%) stanowiły chore na miejscowo zaawansowanego raka piersi (guz T3 i T4 i cecha N2, niezależnie od wielkości guza). W krajach wysoko rozwiniętych, w których większość kobiet powyżej 50. lat objęta jest badaniami przesiewowymi, zaawansowany rak piersi stanowi około 5% ogółu zachorowań [175].

Najczęstszym nowotworem piersi (około 80% ogółu chorych) jest naciekający rak przewodowy [175]. W badanej grupie odsetek ten był nieco niższy i wynosił 69%, przy większym udziale raka zrazikowego, który jest drugim co do częstości występowania rakiem piersi. Wśród chorych z rakiem przewodowym u 46% nowotwór był niskozróżnicowany (G3), a u 31% – średnierzóżnicowany (G2). W niniejszym materiale obecność jednego z receptorów steroidowych stwierdzono u 57% badanych, a obu – u 34%. Te wartości są nieco niższe od podawanych w piśmiennictwie i najpewniej potwierdzają tezę o konieczności standaryzacji metody oznaczania receptorów. Istnieje również prawdopodobieństwo niedoszacowania ekspresji ER z powodu możliwej utraty receptora w procesie utrwalania materiału [7]. Z kolei ekspresja receptora ERBB-2 w komórkach nowotworu w badanej grupie chorych (silna i wątpliwa odpowiednio u 18 i 19% badanych) odpowiada podawanemu w piśmiennictwie w zakresie od 13 do 40% chorych [15, 23, 62, 90, 176].

Ze względu na duży udział przypadków miejscowo zaawansowanego raka, u 32% chorych leczenie rozpoczęto od chemio- lub hormonoterapii. BCT jako pierwsz leczenie przeprowadzono u 13% ogółu operowanych chorych i u 3% po leczeniu indukcyjnym. W polskich ośrodkach onkologicznych nadal dominującą formą leczenia operacyjnego raka piersi jest amputacja, podczas gdy światowym standardem już od lat są operacje oszczędzające narząd [125, 176, 207, 236].

6.2. Zaburzenia liczby kopii czterech protoonkogenów rodziny ERBB

Zgodnie z założonymi celami badania w jego pierwszym etapie podjęto próbę oceny zaburzeń genetycznych we wszystkich czterech onkogenach rodziny

ERBB. Dotychczasowe badania dotyczyły na ogół zaburzeń w poszczególnych genach tej rodziny, natomiast piśmiennictwo dotyczące ich zbiorczej analizy jest nieliczne. Dotyczy to nie tylko raka piersi, ale i innych nowotworów [25, 27, 33, 220].

Uważa się, że u podłoża większości mechanizmów transformacji nowotworowej znajdują się zmiany w materiale genetycznym komórki, obejmujące najczęściej amplifikację określonych sekwencji DNA. Dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod biologii molekularnej w większości nowotworów potwierdzono obecność amplifikacji określonych onkogenów, np. *c-myc* w raku piersi i raku płuca, *N-myc* w nerczaku płodowym oraz w drobnokomórkowym raku płuca, a *ERBB-1* w raku piersi, glejaku mózgu i raku przełyku [137, 148, 153, 187, 203]. Próby wytłumaczenia zjawiska występowania amplifikacji prawie wyłącznie w komórkach nowotworowych i utraty przez nie stabilności genetycznej podjął się Hamlin [97]. Opisał on model opierający się na spostrzeżeniu, że w zdrowych komórkach utworzenie przerw w DNA na skutek replikacji czy rekombinacji jednoniciowych fragmentów DNA powoduje wstrzymanie jego dalszej replikacji do czasu naprawy uszkodzeń. Funkcję regulacyjną spełnia wówczas, m.in. białko p53. Gdy jest ono uszkodzone, proces replikacji trwa jednak nadal, pomimo pęknięcia jednej z nici DNA. Może wówczas dojść do powstania dwuniciowego, całkowitego pęknięcia chromosomów i generowania wielu aberracji chromosomowych, w tym amplifikacji.

W niniejszej pracy, przy zastosowaniu techniki ddPCR oceniono jakość i ilość zaburzeń genetycznych występujących w badanych onkogenach rodziny *ERBB*. Stwierdzono dużą częstość występowania zarówno amplifikacji, jak i delecji – dotyczyły one łącznie 65% wszystkich badanych chorych. Wartość ta jest porównywalna do podanej przez Brandta i wsp. [34], ale znacznie wyższa od uzyskanej przez Bielawskiego [28]. Uwzględniając graniczne wartości AGCN przyjęte w niniejszej pracy, zbadano związek pomiędzy występowaniem zaburzeń liczby kopii czterech genów z rodziny *ERBB* a wybranymi cechami histoklinicznymi nowotworu. Sprawdzono także, czy istnieje taka zależność dla nadekspresji receptorów *ERBB-1* i *ERBB-2*.

ERBB-1 okazał się najbardziej niestabilnym z badanych genów. U blisko połowy chorych (46%) stwierdzono anomalie, z których najczęstsze były delecje (31% badanych). Wartość ta jest identyczna z uzyskaną przez Bielawskiego [28] w pracy obejmującej 173 chorych na raka piersi pochodzących z Niemiec i wyższa niż w materiale Brandta i wsp. (19%) [34]. Obaj autorzy jako delecję *ERBB-1* przyjęli AGCN $\leq 0,4$, która wcześniej została wyznaczona przez Brandta i wsp. [34, 240] w pracy oceniającej częstość aberracji zachodzących w *ERBB-1*, -2 i -3 i ich klinicznych implikacji. Autorzy ci wykazali ponadto, że wartość AGCN $\leq 0,4$ związana była ze znamienne krótszym okresem przeżycia wolnym od wznowy w porównaniu do chorych, u których wartość ta była wyższa. Natomiast w niniejszej pracy za punkt odcięcia uznano wartość AGCN $\leq 0,2$. Było to spowodowane

wane odmiennym w porównaniu z innymi genami zachowaniem się genu *ERBB-1* w procesie amplifikacji przeprowadzanej podczas standaryzacji metody. Stwierdzono, że średnia wartość AGCN tego genu badana dla matrycy pochodzącej z leukocytów grupy kontrolnej jest niska ($0,6 \pm 0,13$). Na tej podstawie za amplifikację przyjęto wartość AGCN >1 , a za delecję – wartość AGCN $<0,2$.

Zaburzenia AGCN genu *ERBB-1* opisywane są również w innych nowotworach, w tym guzach chromochłonnych i rakach tarczycy [220], ale tam znacznie częstsza jest amplifikacja. Występuje ona między innymi w raku pęcherza moczowego [87], rakach regionu głowy i szyi [193] i guzach ośrodkowego układu nerwowego [68, 202]. Udział zarówno delecji, jak i amplifikacji jest różny w różnych doniesieniach i waha się w granicach od 3 do 59%. W rakach piersi amplifikacja *ERBB-1* występuje dosyć rzadko – w granicach 1,7 – 14% [28, 191, 235]. Podobnie, przy zastosowaniu hybrydyzacji metodą *Southern blot* [211], udział amplifikacji wynosił 2 [207]. W niniejszej pracy amplifikacja *ERBB-1* dotyczyła 15% badanych chorych, przy przyjęciu za punkt odcięcia wartości AGCN >1 . Zbliżoną wartość (20%) otrzymał Brandt [34], przy punkcie odcięcia AGCN $>1,6$.

W przypadku *ERRBB-1* zależność pomiędzy wartością AGCN a cechami guza stwierdzono jedynie w odniesieniu do obecności receptorów progesteronowych i przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (tab. 24, 25). Mediana wartości AGCN była wyższa u chorych z dodatnimi receptorami progesteronowymi w porównaniu z chorymi o ujemnych receptorach PgR ($p=0,03$), a liczba delecji (najczęstszych zaburzeń w obrębie tego onkogenu) była największa wśród chorych z ujemnymi receptorami progesteronowymi ($p=0,06$). Spostrzeżenie dotyczące zwiększonego odsetka delecji w grupie chorych z ujemnymi receptorami progesteronowymi nie znajduje potwierdzenia w innych publikacjach. W pracy Bielawskiego [28], odwrotnie niż w niniejszym badaniu stwierdzono, że wartości AGCN dla ujemnych receptorów steroidowych były wyższe niż dla dodatnich. Natomiast Brandt i wsp. [35, 36], stosując również metodę ddPCR, nie obserwowali żadnej zależności pomiędzy zaburzeniami *ERBB-1* a stanem receptorów steroidowych.

Delecje obserwowano znamienne częściej wśród chorych bez przerzutów do pachowych węzłów chłonnych niż u chorych z przerzutami ($p=0,03$). Mediana wartości AGCN była wyższa (aczkolwiek nieznamiennie) również w grupie chorych z przerzutami do pachowych węzłów chłonnych ($p=0,06$), co może mieć związek z mniej korzystnym rokowaniem w tej grupie. Tego typu obserwacji nie znaleziono w dostępnym piśmiennictwie. W pracy Brandta i wsp. [35] nie znaleziono żadnych zależności pomiędzy wartością AGCN *ERBB-1* a takimi cechami, jak stan węzłów chłonnych i ekspresja receptorów steroidowych.

Większość prac dotyczących zależności pomiędzy nieprawidłowościami genów rodziny *ERBB* a cechami histoklinicznymi nowotworu opiera się na ocenie

ekspresji receptorów, a nie zaburzeń kodujących je genów. Uważa się, że w przeciwieństwie do innych receptorów ERBB, nadekspresja ERBB-1 najczęściej nie jest wynikiem amplifikacji genu, ale jest regulowana przede wszystkim na poziomie transkrypcji [82, 227, 250]. W badaniach tych autorzy najczęściej obserwowali silniejszą ekspresję receptorów estrogenowych i – rzadziej – progesteronowych wśród chorych bez ekspresji receptora ERBB-1 [20, 57, 151, 166, 201]. Podobnie, jedyną zależnością pomiędzy ekspresją receptorów a stanem receptorów hormonalnych, jaką stwierdził Lodge i wsp. [137], był odwrotny związek pomiędzy nadekspresją ERBB-1 a obecnością obu receptorów steroidowych. Te wyniki są zgodne z obserwacjami zawartymi w niniejszej pracy. Stwierdzono, że u wszystkich chorych z nadekspresją receptorów ERBB-1, receptory steroidowe, zarówno estrogenowe, jak i progesteronowe były ujemne i zależności te były znamienne (tab. 30). Doniesienia na ten temat nie są jednak zgodne; w kilku pracach nie obserwowano żadnej zależności pomiędzy wzajemną ekspresją tych białek [21, 107].

W niniejszym materiale stwierdzono także, że nadekspresja ERBB-1 występowała częściej u chorych z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych, niż u chorych bez przerzutów, ale różnica ta nie była znamienna ($p=0,06$). Taką zależność stosunkowo często obserwowano w innych badaniach [20, 31, 201]. Podobnie, w badaniu Beckmanna i wsp. [21] wykazano, że nadekspresja ERBB-1 wiązała się nie tylko ze stanem węzłów chłonnych, ale także z wielkością guza i stopniem jego zróżnicowania. Te dane potwierdziły wyniki wcześniejszej metaanalizy, opublikowanej w 1992 roku i obejmującej 40 badań [117]. Wynikało z niej, że nadekspresja ERBB-1 jest związana z aneuploidią komórek, wysokim stopniem złośliwości nowotworu i jego niskim zróżnicowaniem. Potwierdzają to także badania Lodge i wsp. [137]. Interesujące jest doniesienie Toveya, który wykazał znamienne ($p=0,024$) zależność pomiędzy nadekspresją ERBB-1 a wzrostem indeksu proliferacji ocenianym znakowaną bromodezoksyurydyną (*bromodeoxyuridine labelling index* – BLI) [229]. W doniesieniu tym prawdopodobieństwo 10-letniego przeżycia chorych z wysokim i prawidłowym indeksem BLI wynosiły odpowiednio 35% i 60%.

Zaburzenia genu *ERBB-1* są przez większość autorów uznawane za niekorzystny czynnik rokowniczy. W pracy Brandta i wsp. [35] chore z wartością AGCN poniżej 0,4, miały znamienne krótszy okres do nawrotu nowotworu niż chore z wartością wyższą od 0,4. W późniejszej pracy ci sami autorzy wykazali, że nie tylko obniżenie wartości AGCN, ale również jej podwyższenie odpowiadające amplifikacji, jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym [36]. Także nadekspresja ERBB-1 i/lub amplifikacja *ERBB-1* mają związek z częstszymi nawrotami choroby, skróceniem czasu przeżycia i gorszą odpowiedzią na leczenie [8, 19, 137, 153]. W badaniu Bucci i wsp. [37] prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia bez nawrotu nowotworu u chorych z nadekspresją ERBB-1 w porównaniu do chorych z brakiem ekspresji tego receptora wynosiło odpo-

wiednio 61% i 84%. Różnica ta była szczególnie duża u chorych z przerzutami do pachowych węzłów chłonnych. W tej grupie wykazano również krótszy czas przeżycia całkowitego w przypadkach nadekspresji *ERBB-1* [228].

W niniejszym materiale, pomimo stosunkowo krótkiego okresu obserwacji, wykazano, że zaburzenia liczby kopii genu *ERBB-1* związane są ze zwiększonym ryzykiem niepowodzenia leczenia. Zależność pomiędzy zaburzeniami genu *ERBB-1* i/lub ekspresją kodowanych białek a cechami histoklinicznymi guza była jednak niepewna. Jednocześnie silną zależność pomiędzy amplifikacją tego genu a skróceniem czasu wolnego od wznowy potwierdzono w analizie wieloczynnikowej. Wydaje się zatem, że uszkodzenia tego genu stanowią niezależny czynnik rokowniczy.

Wyniki wielu badań wskazują, że do amplifikacji onkogenu *ERBB-2* dochodzi u około 20–40% chorych na raka piersi [62, 95, 112, 128, 158, 208]. W metaanalizie przeprowadzonej przez Revillona i wsp. [189] wartość ta zawarta była w szerokim przedziale od 5 do 55%. Amplifikacja tego genu prowadzi w większości przypadków do nadekspresji kodowanego przez niego receptora, odpowiedzialnego za powstanie wielu nowotworów, w tym raka piersi [198], jajnika [209, 240], płuca [101, 243], żołądka [254] i tarczycy [220]. Cecha ta jest również czynnikiem pogarszającym rokowanie w raku piersi [196, 208].

W niniejszym badaniu amplifikację *ERBB-2* stwierdzono u 26% chorych, przy czym wartości AGCN wyższe od 3 znaleziono aż w 18 guzach (8%), w tym w połowie przypadków – powyżej 5. Dane te są zbliżone do podawanych przez innych autorów [28, 34, 112, 189, 239]. We wspomnianej metaanalizie, obejmującej 22.616 chorych na raka piersi uczestniczących w 97 badaniach wykazano, że niezależnie od zastosowanej metody amplifikacja dotyczy zbliżonego odsetka chorych [189]. Najczęściej posługiwano się metodą *Southern blot* [212], a jedynie w pięciu przypadkach zastosowano PCR. Średni udział amplifikacji dla całej badanej grupy wynosił 26%, a przy zastosowaniu techniki PCR wahał się w granicach od 19 do 55%.

Metoda hybrydyzacji według Southerna [210] jest mniej czuła w porównaniu do ddPCR, a ponadto do przeprowadzenia analizy konieczna jest większa ilość tkanki. Jest ona również bardziej kosztowna, a czas badania – kilkakrotnie dłuższy.

Obecnie, standardową metodą oceny amplifikacji *ERBB-2* dla celów klinicznych jest FISH (*fluorescence in situ hybridization*). Pozwala ona na bezpośredni pomiar amplifikacji nawet z niewielkiej ilości materiału tkankowego [61]. Metoda ta, charakteryzująca się także wysoką czułością i swoistością, jest jednak technicznie skomplikowana i droga. Wyniki niniejszej pracy, podobnie jak wielu innych wskazują, że metoda oparta na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) pozwala uzyskać wyniki porównywalne z FISH, przy niższych kosztach i mniejszym nakładzie pracy [26, 33, 56, 109, 135, 138, 156].

W przeciwieństwie do amplifikacji, delecja onkogenu *ERBB-2* jest zjawiskiem bardzo rzadkim. W niniejszym materiale przy zastosowaniu wartości odcięcia $\leq 0,4$ dotyczyła ona zaledwie 3% chorych. Nie stwierdzono natomiast żadnej delecji *ERBB-2* w przedziale o wartościach AGCN $< 0,1$. Bielawski [28], przy wartości odcinającej *ERBB-2* 0,35, nie znalazł delecji tego genu wśród chorych na raka piersi.

Gen *ERBB-2* jest najlepiej poznanym spośród całej rodziny onkogenów *ERBB*. Podobnie jak w niektórych pracach [34], w niniejszym badaniu nie stwierdzono współwystępowania zaburzeń *ERBB-2* z innymi niekorzystnymi cechami histoklinicznymi. Ta obserwacja dotyczy nie tylko raka piersi, ale i innych nowotworów, w których amplifikacja *ERBB-2* jest zjawiskiem stosunkowo częstym i związanym z gorszym rokowaniem [53, 113, 188, 220]. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych w niniejszej pracy, O'Malley i wsp. [156], oceniając amplifikację *ERBB-2* na poziomie genów stwierdzili, że jest ona związana z niskim stopniem zróżnicowania nowotworu i częściej występuje u chorych z ujemnymi receptorami steroidowymi.

Najczęściej opisywana jest odwrotna zależność pomiędzy amplifikacją genu *ERBB-2* a ekspresją receptorów steroidowych, przede wszystkim estrogenowych [123, 189, 222, 228, 239]. Zaburzenie to stosunkowo często współlistnieje także z innymi niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi, takimi jak niski stopień zróżnicowania, wyższe zaawansowanie guza, czy przerzuty do pachowych węzłów chłonnych [112]. Ta obserwacja dotyczy przede wszystkim badań, w których amplifikację oceniano metodą FISH [164, 181, 195].

W niniejszym badaniu, poza oceną amplifikacji genu *ERBB-2* metodą ddPCR, oznaczono również stopień ekspresji receptora tego genu metodą IHC. Analiza ta, podobnie jak wcześniejsze prace [146, 162, 163, 175] wykazała silny związek pomiędzy obiema cechami ($p=0,0003$; tab. 18). Również udział chorych, u których stwierdzono nadekspresję *ERBB-2* (18%) pozostaje w zgodności z wynikami innych badań [189]. Podobnie jak inni autorzy, w ocenie zależności pomiędzy ekspresją receptorów a poszczególnymi czynnikami histoklinicznymi uwzględniono wyłącznie guzy z silną (+++) ekspresją *ERBB-2* [128, 163, 232].

W większości dotychczasowych badań wykazano związek ekspresji receptora *ERBB-2* z innymi niekorzystnymi cechami rokowniczymi [15, 162, 208]. Podobnie w niniejszej pracy, nadekspresja białka była związana z kilkoma niekorzystnymi cechami nowotworu, w tym – w sposób znamieny – z brakiem receptorów estrogenowych ($p=0,02$) oraz z typem przewodowym raka ($p=0,05$), (tab. 31). Stwierdzono również, że nadekspresja częściej, choć nieznamiennie, występowała u chorych z ujemnymi receptorami progesteronowymi, z guzami o wyższym stopniu histologicznej złośliwości (G3) oraz wyższym miejscowym zaawansowaniem. Wyniki te są zbieżne z uzyskanymi przez Eppenberger-Castoro i wsp. [71]. Autorzy ci, w badaniu obejmującym ponad tysiąc chorych

na raka piersi, stwierdzili, że nadekspresja receptorów ERBB-2 związana jest z wielkością guza, niskim stopniem jego zróżnicowania i brakiem ekspresji receptorów steroidowych. Istnieją jednak także doniesienia, w których nie obserwowano żadnych zależności lub jedynie związek z brakiem ekspresji receptorów steroidowych [21, 69].

Pomimo obserwowanej w niniejszym badaniu stosunkowo wysokiej zależności pomiędzy amplifikacją i ekspresją ERBB-2, istniały znaczne różnice pomiędzy tymi zaburzeniami a cechami histoklinicznymi. Różnice te mogą być wynikiem pewnej niedoskonałości i subiektywizmu w ocenie ekspresji receptorów metodą IHC a także mniejszej liczby chorych, u których wykonano to badanie, w porównaniu z grupą, w której oceniono amplifikację.

W kluczowym badaniu Slamona i wsp. [208] wykazano, że amplifikacja genu *ERBB-2* jest niezależnym, niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w raku piersi u chorych z przerzutami do pachowych węzłów chłonnych, zarówno w odniesieniu do całkowitego czasu przeżycia, jak i przeżycia wolnego od wznowy. U chorych z cechą N0 związek pomiędzy ekspresją ERBB-2 a gorszym rokowaniem był mniej jednoznaczny, ale obecnie nie jest już kwestionowany [180, 181, 209]. W ostatnich latach większość badań potwierdzała niekorzystne znaczenie rokownicze nadekspresji lub amplifikacji ERBB-2 [62, 196, 209]. W efekcie cechy te zostały zaliczone do grupy niekorzystnych czynników rokowniczych podczas Konferencji w St Gallen w 2005 roku [84]. Ostatnio wykazano, że także słabsza ekspresja mRNA ERBB-2 jest związana z gorszym rokowaniem [167].

W niniejszym badaniu amplifikacja *ERBB-2* nie wiązała się ze znamienym skróceniem czasu wolnego od nawrotu i czasu przeżycia całkowitego, natomiast nadekspresja kodowanego przez ten gen białka zwiększała ryzyko wystąpienia wznowy nowotworu. Do nawrotu choroby doszło odpowiednio u 28% i 15% chorych z nadekspresją i bez nadekspresji ERBB-2. Stwierdzono również niekorzystny wpływ nadekspresji tego receptora na czas przeżycia ($p=0,022$; ryc. 28, 29). Te dane są zgodne z obserwacjami większości innych autorów [194, 208, 210, 213, 218]. Według analizy przeprowadzonej przez Rossa i wsp. [195] wszystkie badania, w których oceny ekspresji i amplifikacji dokonywano z zastosowaniem metody FISH, wykazały niekorzystne rokownicze znaczenie amplifikacji.

Niekorzystne rokowanie u chorych z nadekspresją/amplifikacją ERBB-2 jest kliniczną manifestacją wielu biologicznych procesów aktywowanych przy współudziale ERBB-2, między innymi przyspieszenia proliferacji, zwiększenia aktywności angiogenezy oraz naciekania i zdolności do tworzenia przerzutów [144, 260].

W ostatnich latach przedmiotem wielu badań są receptory ERBB-2 jako cel nowoczesnego leczenia przeciwnowotworowego [1, 9, 16–19, 78, 91, 132, 168,

256]. Ich zaletą jest lokalizacja na powierzchni komórek, co czyni je łatwo dostępnymi dla leków. Wśród metod zahamowania wzrostu nowotworu badano między innymi inhibitory kinazy tyrozynowej, antysensowne hamowanie *ERBB-2*, lub czynnościowe blokowanie receptorów przez hamowanie wewnątrzkomórkowej ekspresji jednołańcuchowych przeciwciał ScFvs. Wydaje się jednak, że hamowanie wzrostu guzów i linii komórkowych raka piersi jest najbardziej skuteczne przy użyciu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko zewnątrzkomórkowym domenom *ERBB-2* [63, 143]. Aktywność rekombinowanego ludzkiego przeciwciała anty-*ERBB-2*, trastuzumabu (herceptyny) w zaawansowanym raku piersi wykazano w licznych badaniach klinicznych [17, 18, 141, 169]. Ostatnio wykazano także znaczące zmniejszenie ryzyka nawrotu choroby u chorych otrzymujących trastuzumab w uzupełnieniu pooperacyjnej chemioterapii [174, 186]. Oczywistym warunkiem skutecznego działania tego przeciwciała jest ekspresja receptora *ERBB-2*, najlepiej określona metodą FISH.

Mechanizm działania przeciwciał monoklonalnych nie jest w pełni wyjaśniony i wydaje się być bardziej złożony niż proste hamowanie ekspresji *ERBB-2*. Fakt, że część chorych pomimo nadekspresji tego receptora nie odpowiada na leczenie trastuzumabem może świadczyć o istnieniu dodatkowych czynników uczestniczących w tym procesie. Najbardziej prawdopodobne wydaje się równoczesne zaangażowanie innych receptorów rodziny *ERBB* [150, 253].

Na podstawie dotychczas opublikowanych badań nie ma wątpliwości, że ekspresja *ERBB-2* jest również czynnikiem predykcyjnym dla leczenia trastuzumabem. Natomiast nadal niejasny jest związek pomiędzy ekspresją tego receptora a odpowiedzią na leczenie określonymi cytostatykami i preparatami hormonalnymi. Istnieje kilka badań wykazujących, że nadekspresja *ERBB-2* wiąże się ze z mniejszą skutecznością chemioterapii uzupełniającej wg schematu CMF [4, 95, 216, 224], jednak wyniki trzech z nich są kwestionowane [4, 216, 224] (niewielka liczebność badanych grup, niedostatki metodologiczne). Uważa się, że obecne dowody są niewystarczające, aby uznać ekspresję *ERBB-2* za czynnik predykcyjny dla wyboru schematu chemioterapii [84, 173]. Uważa się również, że nadekspresja *ERBB-2* wiąże się z gorszą odpowiedzią na leczenie tamoksyfenem, pomimo dodatnich receptorów steroidowych [112, 241]. Najprawdopodobniej jest to związane z odmiennymi ścieżkami przekazywania sygnałów.

Wyniki przedstawionych badań ukazują ogromną wagę problemu i wyzwanie, jakim jest dokładne poznanie wszystkich powiązanych ze sobą receptorów rodziny *ERBB* i mechanizmów regulujących ich ekspresję. Wiedza ta może znaleźć praktyczne zastosowanie w terapii celowanej wielu nowotworów.

W niniejszej pracy najmniej zaburzeń stwierdzono w genie *ERBB-3*. Zaledwie w czterech przypadkach (2%) były to delecje ($AGCN \leq 0,4$), przy najniższej wartości $AGCN$ wynoszącej 0,28. W pracach Bielawskiego i Brandta [28, 34],

przy takich samych wartościach granicznych AGCN przyjętych dla delekcji, obserwowano je nieco częściej (odpowiednio u 7% i u 13%). W porównaniu z innymi genami rodziny *ERBB*, również amplifikacja *ERBB-3* występowała rzadko. We wcześniejszych pracach w genie tym na ogół w ogóle nie stwierdzano tego zaburzenia [127, 131]. Ze względu na małą liczbę chorych, u których stwierdzono delekcję genu *ERBB-3*, nie analizowano tego zaburzenia w odniesieniu do cech histoklinicznych badanych nowotworów. Stwierdzono natomiast, że występowanie amplifikacji tego genu było znamienne częstsze wśród chorych bez przerzutów do pachowych węzłów chłonnych ($p=0,02$) i u chorych z guzami o wyższym (G1 i G2; $p=0,03$) stopniu zróżnicowania (tab. 28). Ta ostatnia wartość odpowiada znamiennej wyższej wartości AGCN wśród chorych o stopniu zróżnicowania guza G1 i G2 w porównaniu z guzami G3 ($p=0,01$). Wyniki te mogą świadczyć o związku pomiędzy amplifikacją *ERBB-3* a korzystnymi cechami rokowniczymi, obserwowanym również w kilku innych badaniach [34, 166, 183].

Knowlden i wsp. [119] wykazali, że ekspresja mRNA genu *ERBB-3* oraz ekspresja kodowanych przez ten gen białek oceniana metodą IHC są związane z ekspresją receptorów estrogenowych ($p=0,0003$). Zachodzi tu więc odwrotne zjawisko, niż w przypadku amplifikacji czy nadekspresji *ERBB-1* i *ERBB-2*, gdzie zaburzenia te najczęściej współistniały z ujemnymi receptorami steroidowymi. Zbliżone wyniki osiągnęli Pawlowski i wsp. [166]. Podobnie jak w niniejszej pracy, autorzy ci wykazali, że amplifikacja *ERBB-3* występuje częściej w nowotworach o niższym stopniu złośliwości. Zagadnienie to nadal budzi jednak kontrowersje. Niektórzy autorzy wskazują bowiem, że nadekspresja receptora *ERBB-3* występuje częściej u chorych z ujemnymi receptorami steroidowymi [149] lub ma związek z większym ryzykiem wystąpienia nawrotu miejscowego [230] i gorszym rokowaniem [247]. Ta sama grupa badaczy wykazała, że ekspresja *ERBB-3* była związana z wyższym indeksem proliferacji BLI [229]. Te obserwacje znalazły swoje odbicie w wynikach odległych; 10-letnie przeżycia chorych z wysokim i niskim indeksem proliferacji wynosiły odpowiednio 35% i 60% ($p=0,0174$) [229].

Z kolei wykazany w niniejszej pracy związek pomiędzy amplifikacją genu *ERBB-3* a korzystnymi cechami histoklinicznymi znalazł potwierdzenie w analizie częstości wznów i zgonów. Ryzyko zarówno nawrotu choroby, jak i zgonu było najwyższe w grupie chorych, u których nie stwierdzono żadnych zaburzeń genu *ERBB-3*, aczkolwiek różnica ta nie była znamienna. Te spostrzeżenia mogą wskazywać, że amplifikacja *ERBB-3* może być czynnikiem „ochronnym”, związanym z lepszym rokowaniem. Potwierdzają to wyniki uzyskane przez Brandta i wsp. [34]. Spośród 111 analizowanych przez nich chorych, w dwuletnim okresie obserwacji udział przeżyć wolnych od wznowy był wyższy u chorych z amplifikacją niż wśród chorych bez amplifikacji. Takiej zależności nie potwierdzono w badaniach Wittona i wsp. [247], którzy stwierdzili, że niekorzystny wpływ

nadekspresji ERBB-3 na czas przeżycia chorych na raka piersi jest podobny jak nadekspresji ERBB-1 i ERBB-2. Tak rozbieżne doniesienia w odniesieniu do związku pomiędzy zaburzeniami ERBB-3 a cechami histoklinicznymi nowotworu i ich znaczenia rokowniczego wymagają z pewnością dalszych badań.

Ponieważ gen *ERBB-4* został opisany stosunkowo niedawno [177, 261], piśmiennictwo dotyczące jego zaburzeń i funkcji w onkogenezie jest nieliczne i dotyczy przede wszystkim kodowanych przez niego białek [42, 44]. Większość autorów podkreśla, że nadekspresja ERBB-4 jest wykrywana w około 12–20% raków piersi [94, 114, 247], ale w jednym z badań aż w 82% badanych guzów stwierdzono zarówno nadekspresję receptora ERBB-4, jak i zwiększoną ekspresję mRNA [218].

W niniejszym badaniu zaburzenia tego genu stwierdzono u 22% chorych, przy czym amplifikacja była około dwukrotnie częstsza niż delecja (odpowiednio 15% i 7%). Wyniki te, w odniesieniu do amplifikacji, są podobne do uzyskanych przez Bielawskiego i wsp. [28, 239], którzy jako pierwsi opisali anomalie tego onkogenu u chorych na raka piersi. Natomiast, w przeciwieństwie do zawartych tu obserwacji, delekcje w materiale tych autorów były sporadyczne.

Badania prowadzone na dużym materiale pochodzącym zarówno z tkanek płodowych, jak i dorosłych ludzi wskazują, że nadekspresja receptorów ERBB-4 jest częstym zjawiskiem zarówno w komórkach nowotworowych, jak i zdrowych [42, 215]. Obserwowano ją w różnych nowotworach, z wyjątkiem raków płaskonabłonkowych [215]. Niektórzy autorzy stwierdzili wręcz obniżony poziom ekspresji ERBB-4 w komórkach raka piersi w porównaniu do ekspresji w komórkach pochodzących ze zmian nienowotworowych lub z tkanek otaczających guz [217].

Uważa się, że podobnie jak w przypadku genu *ERBB-3*, zaburzenia *ERBB-4* mogą mieć korzystne znaczenie rokownicze. W przeciwieństwie do nadekspresji ERBB-1 i ERBB-2, nadekspresja kodowanych przez ten gen białek jest związana z obecnością receptorów steroidowych, a także z wyższym stopniem zróżnicowania nowotworu [214]. Niniejsze badanie tylko w części potwierdza tę obserwację. Podobnie, jak w innych badaniach [114, 215] w przedstawionym materiale amplifikacja genu *ERBB-4* była dwukrotnie częstsza w guzach o wyższym stopniu zróżnicowania. Nie udało się natomiast potwierdzić opisywanego wcześniej związku ERBB-4 z ekspresją receptorów steroidowych [11, 119, 218]. Częstość amplifikacji była prawie identyczna w grupie chorych o dodatnich i ujemnych receptorach estrogenowych (odpowiednio 17% i 15%). W odniesieniu do receptorów progesteronowych wartości te wynosiły odpowiednio 19% i 13% ale różnica ta również nie była znamienna.

W niniejszym badaniu wartość AGCN dla *ERBB-4* związana była silnie z obecnością niekorzystnych cech rokowniczych – przerzutami do pachowych węzłów chłonnych i wyższym miejscowym zaawansowaniem choroby ($p=0,003$

i 0,001 odpowiednio). Przy przyjęciu jako kryterium amplifikacji wartości AGCN wynoszącej $>1,6$, różnice te nie były jednak znamienne. Związek z cechą T wykazano także w badaniu Vogta i wsp. [239], natomiast w badaniu Hudelista i wsp. [107] nie stwierdzono żadnych zależności pomiędzy stopniem ekspresji ERBB-4 a klinicznymi czynnikami rokowniczymi. Pozostali autorzy potwierdzają związek amplifikacji z korzystnymi czynnikami rokowniczymi [229, 239]. Nawet we wcześniej cytowanym badaniu Toveya i wsp. [229] stwierdzono, że w przeciwieństwie do innych receptorów ERBB, jedynie wysoka ekspresja ERBB-4 była związana z niską wartością indeksu proliferacji ($p=0,013$), a rokowanie chorych w tej grupie były znamienne lepsze ($p=0,0174$). Autorzy ci wyrazili nawet przypuszczenie, że nadekspresja receptora ERBB-4 może spełniać funkcję protekcyjną [239]. Podobne wyniki przedstawili Suo i wsp., którzy stwierdzili, że ekspresja ERBB-4 jest związana z dłuższym przeżyciem wolnym od choroby a także z dłuższym przeżyciem całkowitym [218]. Wydaje się, że ekspresja ERBB-4 w raku piersi, a być może także w kilku innych nowotworach [88, 139] może być czynnikiem związanym z korzystniejszym rokowaniem.

6.3. Współwystępowanie zaburzeń genów rodziny ERBB

Podstawową funkcją, jaką spełnia rodzina receptorów ERBB jest uczestniczenie w skomplikowanych procesach sygnalizacji komórkowej. Nie pobudzone, monomeryczne receptory stają się aktywne po przyłączeniu odpowiednich ligandów – wówczas dochodzi do ich oligo- lub dimeryzacji i w efekcie autofosforylacji. Śródbłonowa lokalizacja wszystkich czterech receptorów umożliwia tworzenie przestrzennego mechanizmu przekazywania sygnałów, dzięki czemu dimeryzacja nie jest ograniczona do tworzenia homodimerów, ale również obejmuje heterodimery [5, 107]. Najczęściej wykorzystywanym partnerem heterodimeryzacji jest nieposiadający własnych ligandów receptor ERBB-2. Uważa się, że formacje heterodimeryczne są bardziej stabilne i wykazują wyższe powinowactwo do ligandów, a co za tym idzie – wyższą aktywność biologiczną [5, 49]. Najprawdopodobniej jednoczesna ekspresja receptorów, szczególnie obejmująca receptor ERBB-2, ma znacznie wyższy potencjał transformacyjny niż nadekspresja pojedynczego, tworzącego wyłącznie homodimery receptora. Za nadekspresję receptorów w znacznym stopniu może być odpowiedzialna amplifikacja kodujących je genów [14].

Ponieważ prace oceniające równocześnie nieprawidłowości we wszystkich czterech protoonkogenach *ERBB* są nieliczne, wiedza na temat współistnienia tych zaburzeń jest uboga. W niniejszym badaniu zaburzenia w rodzinie *ERBB* stwierdzono u 65% chorych, przy czym tzw. zaburzenia pojedyncze, zlokalizowane tylko w jednym genie dotyczyły nieco więcej niż połowy chorych (52%).

Większość zmian pojedynczych (91%) była zlokalizowana w obrębie genu *ERBB-1* lub *ERBB-2*, przede wszystkim (75%) w onkogenie *ERBB-1*. Dominującymi zmianami pojedynczymi były delecje. Zmiany pojedyncze dotyczące genów *ERBB-3* i *ERBB-4* były sporadyczne (łącznie 9% chorych). W pozostałych przypadkach zaburzenia tych dwóch protoonkogenów występowały zawsze w skojarzeniu z zaburzeniami innych genów tej rodziny.

Spośród 70 chorych, u których występowały zaburzenia złożone, największy był udział zaburzeń w genach *ERBB-2* i *ERBB-1* – (73% i 66% chorych). Zaburzenia złożone najczęściej obejmowały dwa geny, rzadziej trzy i sporadycznie wszystkie cztery protoonkogeny (odpowiednio 70%, 23% i 7% chorych). Wśród zaburzeń złożonych dominowała koamplifikacja (53% chorych) lub amplifikacja współwystępująca z delecją (29% chorych). Kodelecja była zjawiskiem najrzadszym (18%). Wyniki dotyczące współwystępowania zaburzeń w protoonkogenach różnią się znacznie od prezentowanych przez Bielawskiego [28], który w grupie 173 chorych znalazł tylko jeden przypadek równoczesnej amplifikacji trzech onkogenów i żadnego przypadku koamplifikacji/delecji czterech onkogenów. Równoczesną delecję lub amplifikację obserwował on u 8% chorych, w tym w 35% przypadków była to koamplifikacja *ERBB-2* i *ERBB-4*. Zarówno w badaniu Bielawskiego, jak i w niniejszym, odsetek genów *ERBB-2* i *ERBB-4* tworzących koamplifikację był zbliżony i wynosił dla *ERBB-2* odpowiednio 15 i 19%, a dla genu *ERBB-4* – 22 i 33% wszystkich amplifikacji.

W dostępnym piśmiennictwie istnieje tylko kilka doniesień dotyczących współwystępowania ekspresji receptorów kodowanych przez geny rodziny *ERBB* [3, 50, 206] i tylko jedno odnosi się do ekspresji wszystkich czterech receptorów [107]. W badaniu przeprowadzonym przez Hudelista i wsp. [107] wykazano istotną zależność pomiędzy ekspresją receptorów *ERBB-2* i *ERBB-3* ($R=0,49$, $p=0,001$), *ERBB-2* i *ERBB-4* ($R=0,37$, $p=0,001$), *ERBB-1* i *ERBB-3* ($R=0,32$, $p=0,005$) i *ERBB-3* i *ERBB-4* ($R=0,23$, $p=0,05$). Autorzy tego badania wysunęli hipotezę, że dimeryzacja receptorów *ERBB* oraz wzajemne oddziaływanie pomiędzy kompleksem receptor/dimery i ich poszczególnymi ligandami tworzą niezwykle istotne modulatory biologicznych zachowań komórki [107]. Przedstawione wyniki w odniesieniu do wzajemnych zależności pomiędzy koekspresją mierzoną wartością AGCN dla poszczególnych par onkogenów są bardzo zbliżone do uzyskanych w niniejszej pracy. Podobnie jak w badaniu Hudelista i wsp., związek ten był szczególnie silny dla par *ERBB-2* i *ERBB-3*, a także *ERBB-2* i *ERBB-4* oraz *ERBB-3* i *ERBB-4*. W przypadku każdej wymienionej pary genów zależności te były znamienne (wartość współczynnika korelacji R_s dla każdej pary wynosiła odpowiednio 0,44, 0,5 i 0,39). Podobnie, w pracy Bielawskiego [28] stwierdzono zależność pomiędzy wartościami AGCN dla genów *ERBB-2* i *ERBB-4*, a także dla *ERBB-1* i *ERBB-2*; w obu przypadkach współczynnik korelacji R_s wynosił 0,24. W badaniach oceniających ekspresję receptorów rodziny *ERBB* stwierdzono silny związek pomiędzy

receptorami ERBB-3 i ERBB-4 ($R_s=0,55$). Natomiast odwrotną zależność stwierdzono dla par ERBB-3 i ERBB-1 ($R_s = -0,17$) oraz ERBB-4 i ERBB-1 ($R_s = -0,28$) [167]. W materiale Lodge i wsp. [137], obejmującym niewielką (66 osób) grupę chorych, znamienna koekspresja dotyczyła jedynie pary ERBB-3/ERBB-4 ($p=0,003$).

W pierwszych badaniach nad rodziną ERBB poszczególne zaburzenia analizowano jako czynniki niezależne. Dopiero poznanie zjawiska heterodimeryzacji zachodzącej pomiędzy receptorami zapoczątkowało nową erę badań, traktujących je jako współzależne i silnie ze sobą powiązane [36, 259].

Już na początku lat 1990. pojawiły się pierwsze doniesienia analizujące wspólnie zaburzenia *ERBB-1* i *ERBB-2* [118]. Większość autorów opisywała zjawisko współwystępowania amplifikacji tych dwóch onkogenów [96, 141], jednak inni obserwowali przeciwną zależność [122, 153]. W pracy Bielawskiego [28], opartej podobnie jak niniejsza, na ocenie amplifikacji metodą ddPCR, stwierdzono występowanie związku pomiędzy wartościami AGCN tych dwóch genów. Analogiczną zależność stwierdzono również w pracy Torregosa i wsp. [228]. Dodatkowo stwierdzono, że współwystępowanie amplifikacji obu onkogenów jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym. Z kolei w pracy Shackneya i wsp. [204] oceniającej związek pomiędzy onkogenami *ERBB-1*, *ERBB-2* i $p21^{ras}$ przy użyciu cytometrii przepływowej, wskazano na istnienie subpopulacji komórek raka piersi, w których równoczesna nadekspresja *ERBB-1* i *ERBB-2* prowadzi do zwiększonej ekspresji białka $p21^{ras}$ i pogarsza rokowanie.

Jak wspomniano wcześniej w niniejszej pracy, współczynnik korelacji dla wartości AGCN wszystkich par onkogenów świadczył o ich wzajemnej zależności, ale co interesujące, był on znamienne wyższy w grupie chorych z przerzutami do pachowych węzłów chłonnych w porównaniu do chorych bez przerzutów. Różnice te były szczególnie duże, gdy jednym z partnerów koamplifikacji był gen *ERBB-2* oraz dla pary *ERBB-3/ERBB-4*. Wyniki te są bardzo zbliżone do obserwowanych przez Hudelista i wsp. [107]. Autorzy ci porównali wzorce koekspresji receptorów ERBB u chorych z przerzutami i bez przerzutów do pachowych węzłów chłonnych i stwierdzili, że w tej drugiej grupie znamienna koekspresja dotyczyła tylko jednej pary receptorów – ERBB-2/ERBB-3 ($R_s=0,43$), podczas gdy w pierwszej silna koekspresja była udziałem aż trzech par: ERBB-2/ERBB3, $R_s=0,56$, ERBB-2/ERBB-4, $R_s=0,49$ i ERBB-1/ERBB-3, $R_s=0,4$. Ponadto najsilniejsza korelacja dotyczyła ekspresji ERBB-2/ERBB-3. Na tej podstawie autorzy ci wysunęli hipotezę, że obecność swoistych heterodimerów tworzonych przez receptory ERBB w wyniku ich koekspresji ma znamienny wpływ na inwazyjność i przebieg kliniczny nowotworu. Pomimo to, podobnie jak w niniejszym badaniu, nie stwierdzono dalszych zależności pomiędzy koekspresją poszczególnych genów a innymi cechami klinicznymi i demograficznymi.

Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami innych autorów, w których sugerowano znaczący udział heterodimerów ERBB-2/ERBB-3 w powstawaniu raka piersi [206]. W badaniach na transgenicznym myszom z ksenoprzeszczepami raka piersi wykazano, że ekspresja transkryptów ERBB2/ERBB-3 związana jest ze wzrostem raka piersi i powstawaniem przerzutów do płuc [208]. Wykazano w wielu badaniach, w tym również w niniejszym, silna koekspresja poszczególnych receptorów, a przede wszystkim ERBB-3 i ERBB-4 z ERBB-2 potwierdza teorię, że receptor ERBB-2 jest preferowanym partnerem heterodimerizacji [107].

W niniejszym materiale, ze względu na niewielkie liczebności w poszczególnych podgrupach nie można było określić zależności pomiędzy podgrupami chorych tworzących różne konfiguracje koekspresji receptorów a cechami histologicznymi guza i czasem wolnym od wznowy. Z tego powodu badaną populację podzielono jedynie na trzy grupy, z których pierwszą tworzyły chore bez żadnych zmian w onkogenach, drugą – chore ze zmianą ograniczoną do jednego onkogeny i trzecią – chore, u których stwierdzono zmiany w dwóch lub więcej genach. Nie udało się jednak wykazać, aby jakakolwiek z badanych cech histologicznych nowotworu znamiennej częściej występowała w którejś z podgrup lub aby jakikolwiek układ tych zaburzeń miał wpływ na zwiększenie ryzyka wystąpienia wznowy.

Rokownicze znaczenie ekspresji i koekspresji poszczególnych receptorów ERBB udało się wykazać w badaniu Wittona i wsp. [247]. W materiale tym chore z dodatnimi receptorami estrogenowymi i z ekspresją receptorów ERBB-1, ERBB-2 i ERBB-3, miały gorsze rokowanie od chorych z nadekspresją ERBB-4 lub z brakiem ekspresji pozostałych receptorów ERBB. Podobnie, Suo i wsp. [218] zauważyli, że koekspresja ERBB-2 i ERBB-4 znosi niekorzystnie wpływającą na rokowanie koekspresję ERBB-2 i ERBB-1. To spostrzeżenie pozostaje w zgodności z innymi obserwacjami dotyczącymi gorszego rokowania u chorych z współwystępowaniem ekspresji mRNA *ERBB-1* i *ERBB-2*, czemu towarzyszy często brak receptorów steroidowych i wysoki stopień złośliwości histologicznej nowotworu [166]. Natomiast nadekspresja ERBB-3 i ERBB-4 jest związana z lepszym rokowaniem i dłuższym przeżyciem [166].

W retrospektywnym badaniu obejmującym 802 inwazyjne raki piersi stwierdzono, że nadekspresja ERBB-1 jest ściśle powiązana z nadekspresją ERBB-2. Wykazano ponadto, że niekorzystne rokownicze znaczenie nadekspresji ERBB-2 występuje tylko wówczas, gdy receptor ten ulega fosforylacji lub istnieje równoczesna nadekspresja ERBB-1 [60]. Wyniki tego badania mają ważne implikacje kliniczne. Sugerują bowiem, że leki skierowane przeciwko receptorom ERBB-1 mogą być również skuteczne u chorych z nadekspresją ERBB-2, a leki skierowane przeciwko obu receptorom mogą się okazać skuteczniejsze od skierowanych jedynie przeciw ERBB-2. Lekiem o podwójnym mechanizmie działania, skierowanym zarówno przeciwko receptorom ERBB-1,

jak i ERBB-2 jest niskocząsteczkowy inhibitor kinazy tyrozynowej, lapatinib [16]. W dotychczasowych badaniach I i II fazy wykazano aktywność kliniczną tego preparatu u chorych z nadekspresją receptora ERBB-2, w tym również u chorych opornych na leczenie trastuzumabem [199, 212, 248].

6.4. Polimorfizm sekwencji powtórzonych (CA)_n w genie ERBB-1 oraz utrata heterozygotyczności (LOH) w jego obrębie

Jak już wcześniej wspomniano, przyczyną nadekspresji receptora ERBB-1 nie zawsze jest amplifikacja genu; częściej u jej podłoża znajduje się inaktywacja represorów transkrypcji i wzrost ekspresji czynników, które ten proces aktywują [116]. Uważa się, że poziom ekspresji tego receptora zależy przede wszystkim od nasilenia transkrypcji genu *ERBB-1* [250].

W 1984 laureat nagrody Nobla, Jean Dausset utworzył laboratorium badawcze CEPH (*Centre d'Etude du Polymorphisme Humain*) zajmujące się konstruowaniem map ludzkiego genomu. Pierwszy zbiór tego laboratorium – DNA pochodzący od 61 wielkich rodzin, uznany został za panel referencyjny CEPH, służący jako swoisty wzorzec w ustalaniu genetycznych map ludzkiego genomu. W referencyjnej populacji rasy białej stwierdzono występowanie heterozygotyczności u 72% badanych oraz polimorfizmu prostych powtórzonych sekwencji CA w okolicach pierwszego intronu *ERBB-1* [47]. Zakres zmienności wynosił od 14 do 21 powtórzeń dwunukleotydu CA. W jednym z badań wykazano, że podstawowa aktywność transkrypcyjna jest odwrotnie zależna od liczby powtórzeń CA [39, 81]. Uważa się, że takie powtórzenia mogą powodować hamowanie aktywności promotora i prowadzić do spadku aktywności transkrypcyjnej wraz ze wzrostem liczby powtórzeń [81]. Uzyskane *in vivo* wyniki badań wskazują na podwójną funkcję tego polimorficznego regionu. Z jednej strony może on wpływać na wzmocnienie lub osłabienie transkrypcji, z drugiej – na blokowanie wydłużania RNA, niezależnie od długości sekwencji (CA)_n [80]. Konformacyjna analiza sekwencji mikrosatelitarnych powtórzeń CA pozwala na potwierdzenie udziału tego polimorficznego regionu w zmianach struktury po związaniu czynników transkrypcyjnych. Regiony DNA posiadające obszary bogate w powtórzenia CA są bardzo elastyczne i mają zdolność do zaginania się. Stwierdzono także, że zaginanie DNA i tworzenie pętli odgrywają często ważną rolę w takich zjawiskach, jak replikacja DNA, miejscowo swoista rekombinacja i transkrypcja [232].

Wyniki niniejszej pracy dotyczące częstości powtórzeń sekwencji CA w intronie pierwszym genu *ERBB-1* pozostają w zgodności z wynikami badań w populacji referencyjnej [47]. W obu pracach najczęstszy (42%) był udział alleli

zawierających 16 powtórzeń a allele zawierające 18 i 20 powtórzeń stanowiły kolejne pod względem częstości występowania podgrupy o bardzo zbliżonym udziale odsetkowym. Dodatkowo w niniejszym badaniu w raku piersi stwierdzono obecność alleli skrajnych zawierających 22 i 9 powtórzeń CA, nie obserwowanych w grupie kobiet zdrowych i dotychczas nie opisywanych. Rozkład alleli pod względem liczby powtórzeń CA w grupie kobiet chorych i w grupie kontrolnej kobiet zdrowych był bardzo podobny, natomiast odsetek alleli homozygotycznych wśród kobiet zdrowych był znamienne wyższy ($p=0,009$) i wartość ta była zbliżona do obserwowanej w populacji referencyjnej [47]. Rozkład kombinacji alleli w niniejszym badaniu przypomina wyniki uzyskane przez Burgera i wsp. [39] w populacji kobiet niemieckich. W obu badaniach najczęstsze kombinacje alleli wśród homozygot zawierały 16 powtórzeń, a wśród heterozygot – 16/18 i 16/20 powtórzeń CA. Populacja kobiet w niniejszej pracy była bardziej jednorodna pod względem udziału liczby diploidalnych genotypów w porównaniu z badaniem niemieckim (liczba genotypów odpowiednio 32 i 44), [32].

Wszystkie analizowane allele genu *ERBB-1* pochodzące od kobiet zdrowych i chorych zostały podzielone w zależności od liczby powtórzeń CA na dwie grupy. Grupę pierwszą (ok. 30%) stanowiły tzw. allele długie, które liczyły więcej niż 18 powtórzeń, grupę drugą (ok. 70%) – pozostałe krótkie allele. W obu badanych grupach dominował układ zawierający dwa allele krótkie lub allel krótki i długi. Najrzadziej (8% chorych i 7% zdrowych kobiet) obserwowano dwa allele długie.

Zjawisko utraty heterozygotyczności (LOH) genu *ERBB-1* stwierdzono u 27% heterozygot. Również te wartości są zbliżone do uzyskanych przez autorów niemieckich (34%) [38, 227], ale niższe niż u kobiet japońskich (55%) [32]. Wyższy odsetek występowania zjawiska LOH wśród Japonek może wiązać się z większym udziałem długich alleli w tej grupie etnicznej. Uważa się, że istnieje większe prawdopodobieństwo utraty allele dłuższego niż krótszego, co może wynikać z jego szczególnej podatności na genetyczne interakcje środowiskowe [38, 227].

Jak już wspomniano, wystąpienie zjawiska LOH może być związane z utratą allele długiego lub krótkiego, przy czym wartość $LOH > 1,67$ świadczy o utracie allele dłuższego, a wartość $LOH < 0,6$ – krótszego. W niniejszym badaniu, spośród 42 chorych, u których obserwowano zjawisko LOH, znacznie częściej była utrata allele długiego (81% badanych).

Aczkolwiek nie było to przedmiotem niniejszej rozprawy, dzięki współpracy Pracowni Diagnostyki Molekularnej, Katedry Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-AM w Gdańsku z laboratorium Instytutu Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej w Münster w Niemczech możliwe było porównanie polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych (CA)_n w genie

ERBB-1 w populacji kobiet zdrowych pochodzących z Polski, Niemiec, Japonii i Tajlandii. Wyniki te wskazują na duże podobieństwo w rozkładzie poszczególnych alleli w populacjach polskiej i niemieckiej oraz w referencyjnej populacji dla rasy kaukaskiej CEPH [24]. Z kolei porównanie populacji kobiet europejskich i azjatyckich wskazuje na istotne różnice w rozkładzie alleli w tych różnych etnicznie populacjach. W populacji europejskiej przeważają kombinacje alleli krótkich, podczas gdy w azjatyckiej częściej występują kombinacje alleli długich. Wyniki te stanowią potwierdzenie wcześniejszych badań [136]. Ta cecha etnicznych różnic w rozkładzie alleli w obrębie intronu-1 *ERBB-1* może mieć istotne implikacje kliniczne, przede wszystkim w doborze odpowiednich leków. Już wcześniej stwierdzono istnienie pewnych odrębności w tolerancji niektórych preparatów, a także w odpowiedzi na leczenie w zależności od pochodzenia etnicznego chorych. Dotyczy to m.in. wyższego odsetka odpowiedzi wśród Japończyków leczonych z powodu nieoperacyjnego raka płuca inhibitorami kinazy tyrozynowej w porównaniu z chorymi rasy kaukaskiej [76, 77]. Uważa się, że zjawisko to może być wyrazem zmniejszonej ekspresji *ERBB-1* na skutek, obserwowanego u tej rasy, częstszego występowania długich alleli [77, 136]. Związek pomiędzy polimorfizmem (CA)_n a kliniczną odpowiedzią na leczenie został także wykazany u chorych na raka jelita grubego leczonych 5-fluorouracyłem i oksaliplatyną [260]. Zdecydowanie gorszą odpowiedź na leczenie obserwowano u homozygotycznych chorych o allelach zawierających 16 powtórzeń w porównaniu z chorymi o parach alleli zawierających 16/18 lub 16/20 powtórzeń (CA)_n [260]. Interesujące są również wyniki badań wskazujące na związek pomiędzy liczbą powtórzeń CA a odpowiedzią na leczenie inhibitorami receptorów *ERBB-1* [6].

6.5. Polimorfizm a cechy histokliniczne

W niniejszej analizie, podobnie jak w pracy Buergera i wsp. [38] nie udało się wykazać żadnych zależności pomiędzy cechami histoklinicznymi nowotworu a częstością występowania różnych kombinacji alleli, ani też stwierdzić ich związku z czasem przeżycia. Wykazano natomiast, że u chorych bez ekspresji receptorów estrogenowych, utrata jednego z alleli występowała znacznie częściej niż u chorych z dodatnimi receptorami estrogenowymi (tab. 38). Ta zależność jest szczególnie wyraźna, jeśli utrata dotyczy długiego allela. Utrata heterozygotyczności częściej, aczkolwiek nieznamienne, dotyczyła także chorych z bardziej zaawansowanym guzem. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono tego typu zależności. W pracy Burgera i wsp. [38] nie stwierdzono związku pomiędzy LOH a wielkością guza, stopniem zróżnicowania i typem histologicznym.

Ta sama grupa autorów wykazała, że współwystępowanie LOH z ekspresją receptora ERBB-1 może wpływać na regulację transkrypcji w intronie 1 genu *ERBB-1* [38] i pośrednio – na rokowanie w raku piersi. Stwierdzono związek pomiędzy utratą allela długiego a zwiększoną ekspresją tego receptora, nie obserwowaną przy utracie allela krótkiego. Ponadto autorzy ci stwierdzili występowanie większej liczby zaburzeń chromosomalnych, przede wszystkim amplifikacji, w guzach z utratą właśnie allela długiego [107]. Buerger i wsp. [38, 39] uważają, że LOH w regionie powtórzeń CA jest związana z występowaniem guzów o nasilonych innych zmianach genetycznych, a samo zjawisko i wynikające z niego implikacje kliniczne są istotne dla dalszego poznania procesu rozwoju raka. Jest to zgodne z obserwacjami Gebhardta i wsp. [82], którzy uważają, że liczba powtórzeń CA w polimorficznym regionie intronu-1 *ERBB-1* pełni funkcję modulacyjną w odniesieniu do aktywności transkrypcyjnej. Uważa się, że guzy zawierające allele krótkie charakteryzują się zwiększoną ekspresją receptora ERBB-1 w porównaniu z guzami o allelach z większą liczbą powtórzeń CA [82, 83, 227]. W niniejszym badaniu ekspresję receptora ERBB-1 określono w niewielkiej grupie chorych, w której nadekspresji stwierdzono tylko u 17% chorych. Badając zależność pomiędzy ekspresją tego receptora a częstością występowania poszczególnych układów alleli można jedynie stwierdzić, że kombinacja dwóch długich alleli w każdym przypadku dotyczyła chorych, u których nie stwierdzono ekspresji ERBB-1.

Zastosowany w niniejszym badaniu podział na allele dłuższe, zawierające ponad 18 powtórzeń CA, i allele krótsze odpowiadał podziałowi zaproponowanemu przez Burgera i wsp. [38]. Ich odsetkowy udział w populacji kobiet zdrowych i chorych był bardzo zbliżony i porównywalny z danymi tego autora. Nie stwierdzono żadnych zależności pomiędzy występowaniem alleli o różnej długości a cechami histoklinicznymi guza. Natomiast ci sami autorzy w badaniu obejmującym ponad 700 chorych na raka piersi i 1380 kobiet zdrowych stwierdzili, że u kobiet z dwoma długimi allelami, u których krewne I stopnia chorowały na raka piersi, znamienne wzrasta ryzyko zachorowania na ten nowotwór [32]. Ten związek jest szczególnie wyraźny u kobiet, które spożywały duże ilości czerwonego mięsa, podczas gdy dieta bogata w warzywa miała ochronny efekt [32]. Na tej podstawie autorzy cytowanego badania wysunęli dość śmiały wniosek, że liczba powtórzeń CA w intronie *ERBB-1* może zwiększać ryzyko zachorowania na rodzinny raka piersi, ale efekt ten może być modulowany poprzez dietę [32].

7. WNIOSKI

1. Amplifikacja i delacja genów rodziny ERBB jest częstym zjawiskiem w raku piersi.
2. Istnieje silna skłonność do współwystępowania zaburzeń poszczególnych genów rodziny *ERBB*, przede wszystkim onkogenów *ERBB-2* i *ERBB-3* oraz *ERBB-2* i *ERBB-4*.
3. Polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych (CA)_n w genie *ERBB-1* występuje zarówno u chorych na raka piersi, jak i u kobiet zdrowych, przy czym wśród chorych na raka piersi wyższy jest udział heterozygot.
4. Zaburzenia genów rodziny *ERBB*, a szczególnie genów *ERBB-1* i *ERBB-3*, związane są z szeregiem cech histoklinicznych nowotworu.
5. Liczba kopii genu *ERBB-2* jest silnie związana z ekspresją kodowanego przez ten gen receptora ERBB-2. Taka zależność nie istnieje w odniesieniu do genu *ERBB-1*.
6. Nadekspresja receptora ERBB-1 związana jest z niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi – obecnością przerzutów do pachowych węzłów chłonnych, brakiem receptorów estrogenowych w komórkach nowotworowych i wyższym zaawansowaniem pierwotnego guza. Zależności tych nie stwierdza się w odniesieniu do receptora ERBB-2.
7. Nadekspresja receptorów ERBB-1 i ERBB-2 i amplifikacja *ERBB-1* są u chorych na raka piersi niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi.

8. STRESZCZENIE

Większość badań dotyczących związku pomiędzy ekspresją receptorów ERBB a cechami histoklinicznymi raka piersi dotyczyła ekspresji pojedynczych białek tej rodziny. Ponieważ do aktywacji określonych receptorów rodziny ERBB może dojść jedynie w wyniku ich dimeryzacji, istotne jest określenie ekspresji i koekspresji wszystkich czterech białek ERBB. Na podstawie najlepiej poznanego genu *ERBB-2* można sądzić, że nadekspresja białek receptorowych jest najczęściej związana z amplifikacją kodujących je genów. Jeszcze mniej poznany zagadnieniem jest zjawisko polimorfizmu sekwencji mikrosatelitar-nych i utraty heterozygotyczności zachodzących w genie *ERBB-1* u chorych na raka piersi.

Celem pracy była ocena u chorych na raka piersi częstości zaburzeń genetycznych we wszystkich czterech genach rodziny *ERBB* oraz określenie ich wzajemnych zależności. Ponadto podjęto próbę oznaczenia polimorfizmu sekwencji powtórzonych (CA)_n i utraty heterozygotyczności (LOH) w genie *ERBB-1*. Określono także zależność pomiędzy poszczególnymi parametrami molekularnymi a czynnikami histoklinicznymi nowotworu, z uwzględnieniem ich wpływu na czas przeżycia i czas do nawrotu choroby.

Badaniem objęto 225 chorych na raka piersi leczonych w latach 1999–2003. Grupę kontrolną stanowiło 180 zdrowych kobiet o podobnych cechach demograficznych. W materiale pochodzącym z guzów nowotworowych oznaczono metodą ddPCR średnią liczbę kopii badanych genów (AGCN). Występowanie zaburzeń co najmniej jednego genu stwierdzono u 65% chorych; najczęściej dotyczyły one genów *ERBB-1* i *ERBB-2*. Amplifikację wykryto w 148 (16,5%), a delecję w 94 (10,5%) spośród 898 badanych genów. U 70 chorych (31%) stwierdzono występowanie zmian złożonych, zlokalizowanych w co najmniej dwóch genach. Wartości AGCN dla poszczególnych genów charakteryzowały się wzajemną zależnością, która dla każdej pary genów była znamienna i szczególnie silnie wyrażona w podgrupie chorych z przerzutami do pachowych węzłów chłonnych.

Polimorfizm sekwencji powtórzonych (CA)_n w pierwszym intronie genu *ERBB-1* oznaczono u 197 chorych na raka piersi i u 180 kobiet z grupy kontrolnej. Cecha ta występowała z podobną częstością w obu badanych grupach, podobny był również rozkład powtórzeń CA. Natomiast udział heterozygot u chorych na raka piersi był znamiennie wyższy niż w grupie kontrolnej ($p=0,009$). Utratę heterozygotyczności (LOH) stwierdzono u 42 spośród 153 badanych kobiet (27%), przy czym najczęściej była ona związana z utratą allela krótkiego.

Określono zależność pomiędzy występowaniem zaburzeń molekularnych a cechami histoklinicznymi nowotworu. Stwierdzono, że delecja *ERBB-1* częściej dotyczyła chorych bez przerzutów do pachowych węzłów chłonnych

($p=0,03$) i o ujemnych receptorach progesteronowych ($p=0,06$). Z kolei ekspresja kodowanego przez ten gen białka była związana z wyższym miejscowym zaawansowaniem guza oraz z ujemnymi receptorami steroidowymi w komórkach nowotworowych (p odpowiednio 0,027, 0,007 i 0,002). Obserwowane w niniejszej pracy zaburzenia *ERBB-2* nie miały żadnego związku z cechami histoklinicznymi ale ekspresja białka *ERBB-2* występowała częściej w raku przewodowym ($p=0,05$), w guzach z ujemnym receptorem estrogenowym ($p=0,02$) i progesteronowym ($p=0,06$) oraz niskim zróżnicowaniem guza ($p=0,06$). Stwierdzono również, że amplifikacja genów *ERBB-3* i *ERBB-4* występowała znamienne częściej u chorych z guzami o wysokim stopniu zróżnicowania (p odpowiednio 0,03 i 0,047), a w odniesieniu do genu *ERBB-3* – także u chorych bez przerzutów do pachowych węzłów chłonnych ($p=0,02$).

Utrata heterozygotyczności była częstsza wśród chorych z ujemnymi receptorami estrogenowymi ($p=0,05$) i guzami o większym miejscowym zaawansowaniu ($p=0,07$); te cechy nowotworu częściej związane były także z utratą długiego allele. Różnice te nie były znamienne, najpewniej ze względu na niewielkie liczebności badanych grup.

W analizie jednoczynnikowej wykazano, że zarówno czas do nawrotu (DFS), jak i czas przeżycia całkowitego (OS) były związane ze stopniem zaawansowania pierwotnego guza piersi i obecnością przerzutów do pachowych węzłów chłonnych, a w odniesieniu do zaburzeń molekularnych – z amplifikacją genu *ERBB-1*. Ekspresja receptora *ERBB-1* była związana z krótszym czasem do nawrotu nowotworu ($p=0,04$), a nadekspresja receptorów *ERBB-2* – z krótszym czasem całkowitego przeżycia ($p=0,02$). W analizie wieloczynnikowej wpływ na przeżycia wolne od nawrotu nowotworu miały: cechy T4 i N2 oraz amplifikacja *ERBB-1*, a na całkowite przeżycia – cechy T4, N2 i G3.

Podsumowując, amplifikacja i delecja genów rodziny *ERBB* stanowi względnie częste zjawisko u chorych na raka piersi, z silną skłonnością do współwystępowania. Polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych (CA) n genu *ERRBB-1* występuje zarówno u chorych na raka piersi, jak i u kobiet zdrowych, przy czym utrata heterozygotyczności jest częstsza wśród chorych na raka piersi. Zaburzenia genów *ERBB* oraz nadekspresja receptora *ERBB-1*, związane są z szeregiem cech histoklinicznych nowotworu, a liczba kopii genu *ERBB-2* jest związana z ekspresją kodowanego przez ten gen receptora.

Ponadto nadekspresja receptorów *ERBB-1* i *ERBB-2* i amplifikacja *ERBB-1* są u chorych na raka piersi niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi.

9. SUMMARY

The research into the relationship between ERBB receptors expression and the clinical and histological features of breast cancer has typically addressed the expression of single proteins of this family. Since the activation of certain ERBB receptors is possible only as a result of their dimerisation, determining the co-expression of all four ERBB proteins is crucial. Current knowledge of *ERBB-2* gene alterations strongly suggests that the over-expression of receptor proteins is generally related to the amplification of coding genes. What has been less frequently studied is the phenomenon of micro-satellite sequence polymorphism and the loss of heterozygosity occurring in the *ERBB-1* gene of breast cancer patients.

The aim of the present study was to estimate the frequency of genetic disorders in all four *ERBB* genes and to determine their mutual dependence in breast cancer patients. Moreover, repetitive sequence polymorphism (CA)_n in the *ERBB-1* gene and the loss of heterozygosity (LOH) in its area were investigated. Finally, the correlation between all molecular parameters and the clinical and histological features, including their impact on survival and disease-free survival, was determined.

A total of 225 breast cancer patients, treated between 1999 and 2003, were included in the study. The control group consisted of 180 healthy female volunteers. The average gene copy number (AGCN) of all *ERBB* oncogenes in breast cancer was evaluated by the ddPCR method. Genetic disorders affecting at least one gene were found in 65% of the patients. The most frequent alterations were found in the *ERBB-1* and *ERBB-2* genes. Amplification was detected in 148 (16.5%), and deletion in 94 (10.5%) of the 898 genes examined. Complex changes located in at least two genes were found in 70 patients (31%). There was a strong correlation of AGCN values for all pairs of genes, particularly in the subset of patients with axillary lymph node metastases.

Polymorphism of microsatellite sequences (CA)_n in the first intron of the *ERBB-1* gene was determined in 197 patients and in 180 controls. The frequency feature was similar in number in both groups and so was the distribution of particular repetitions. However, the proportion of heterozygotes in breast cancer patients was significantly higher than in the control group ($p=0.009$). Loss of heterozygosity was found in 42 out of the 153 patients (27%) and was most frequently connected with a loss of short allele.

The analysis of the correlation between molecular disorders and clinical and histological features showed that *ERBB-1* deletion was associated with axillary lymph node involvement ($p=0.03$) and negative progesterone receptor expression ($p=0.06$). The expression of the ERBB-1 protein was connected with local tumour advancement (T3 and T4) and with negative oestrogen and progesterone

receptors ($p=0.027$, 0.007 and 0.002 , respectively). The *ERBB-2* disorders were not associated with particular clinical and histological features but the ERBB-2 protein expression was more frequent in ductal cancers ($p=0.05$), tumours with negative oestrogen ($p=0.02$), progesterone receptors ($p=0.06$) and low (G3) tumour differentiation ($p=0.06$). Moreover, *ERBB-3* and *ERBB-4* amplification occurred significantly more frequently in patients with better differentiated tumours; ($p=0.03$ and 0.047 , respectively) and – in the case of *ERBB-3* – with the lack of metastases to axillary lymph nodes ($p=0.02$).

Loss of heterozygosity was more frequent in patients with negative oestrogen receptors ($p=0.05$) and with more advanced primary tumours ($p=0.07$). These two features were also associated with a loss of the long allele. The differences, however, were not significant, most probably due to the low number of patients examined.

The univariate analysis demonstrated that disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) were related with the stage of primary breast tumour, metastases to axillary lymph nodes and with *ERBB-1* gene amplification. ERBB-1 receptor expression proved to be correlated with shorter DFS ($p=0.04$), whereas ERBB-2 receptor over-expression with significantly shorter OS ($p=0.02$). The multivariate analysis indicated that DFS was influenced by T4, N2 and *ERBB-1* amplification, whereas OS by T4, N2 and G3.

In conclusion, abnormalities of *ERBB* family genes are a relatively frequent phenomenon in breast cancer patients and display a strong tendency to co-occurrence. Microsatellite polymorphism of (CA) n dinucleotides in the first intron of the *ERBB-1* gene occurs both in breast cancer patients and in healthy women, yet the loss of heterozygosity is more frequent in breast cancer patients. Disorders of *ERBB* genes and ERBB-1 receptor over-expression are related to a series of histoclinical tumour features and the number of gene copies of *ERBB-2* is related to the receptor expressions coded by this gene.

Moreover, ERBB-1 and ERBB-2 over-expression, and *ERBB-1* amplification are unfavourable prognostic factors in breast cancer patients.

10. PIŚMIENICTWO

1. Adjei A.A., Hidalgo M.: Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy. *J Clin Oncol*, 2005, 23, 5386
2. Akiyama T., Sudo C., Ogawara H. i wsp.: The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*, 198, 232, 1644
3. Alimandi M., Romano A., Curia M.C. i wsp.: Cooperative signaling of ErbB-3 and ErbB-2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene*, 1995, 10, 1813
4. Allred D.C., Clark G.M., Tandon A.K. i wsp.: HER-2/neu in node-negative breast cancer: Prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol*, 1992, 10, 599
5. Alroy I., Yarden Y.: The ERBB signaling network in embryogenesis and oncogenesis signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Letters*, 1997, 410, 83
6. Amador M.L., Oppenheimer D., Perea S. i wsp.: An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res*, 2004, 64, 9139
7. Andersen J.: Determination of estrogen receptors in paraffin-embedded tissue. *Acta Oncol*, 1991, 31, 6, 611
8. Arteaga C.L., Moulder S.L., Yakes F.M.: HER (erbB) tyrosine kinase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Semin Oncol*, 2002, 29 (3 suppl 11), 4
9. Arteaga C.L.: ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res*, 2003, 284, 122
10. Ayers M., Symmans W.F., Stec J. i wsp.: Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2004, 22, 1
11. Baccus S.S., Chin D., Yarden Y. i wsp.: Type 1 receptor kinase are differentially phosphorylated in mammary carcinoma and differentially associated with steroid receptors. *J Pathol*, 1996, 148, 549
12. Bal J., Bocian E.: Sekwencje powtórzone. W: Bal J. (red.): *Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie*. Springer PWN, 1998, Warszawa

13. Ballard-Barbash R., Klabunde C., Paci E. i wsp.: Breast cancer Screening in 21 countries: delivery of services notification of results and outcomes ascertainment. *Eur J Cancer Prev*, 1999, 8, 417
14. Bankfalvi A., Giffre G., Ofner D. i wsp.: Relationship between HER2 status and proliferation rate in breast cancer assessed by immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and standardized AgNOR analysis. *Int J Oncol*, 2003, 23, 1285
15. Bartlett J.M.S., Going J.J., Mallon E. i wsp.: Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. *J Pathol*, 2001, 195, 422
16. Baselga J., Arteaga C.L.: Critical update and emerging trends in Epidermal Growth Factor Targeting in Cancer. *JCO*, 2005, 23, 2445
17. Baselga J., Norton L., Albanell J. i wsp.: Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast xenografts. *Cancer Res*, 1998, 58, 2825
18. Baselga J., Tripathy D., Mendelsohn J. i wsp.: Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p 185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 1996, 14, 737
19. Baselga J.: Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist*, 2002, 7 (suppl 4), 2
20. Battaglia F., Scambia G., Rossi S. i wsp.: Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with steroid hormone receptors and axillary lymph node involvement. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1988, 24, 1685
21. Beckmann M.W., Niederacher D., Massenkeil G. i wsp.: Expression analyses of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu: no advantages of prediction of recurrence or survival in breast cancer patients. *Oncology*, 1996, 53, 441
22. Bei R., Masuelli L., Moriconi E. i wsp.: Immune response to all ERBB family receptors detectable in serum of cancer patients. *Oncogene*, 1999, 18, 1267
23. Berry D.A., Muss H.B., Thor A.: HER-2/neu and p53 expression versus Tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer. *JCO*, 2000, 18, 20, 3471

24. Bielawski K.P., Klos P., Welnicka-Jaskiewicz M. i wsp.: An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism in healthy women in Poland. *Int J Biol Markers*, 2005, 20, 185
25. Bielawski K.P., Vogt U., Brandt B.H. i wsp.: Zaburzenia funkcji receptorów ERBB (HER): mechanizmy i metody badania. Część I. Amplifikacja genów rodziny ERBB (HER). *Współczesna Onkologia*, 2000, 4, 102
26. Bielawski K.P., Żaczek A., Lisowska U. i wsp.: The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction (ddPCR) analysis; comparison of various paraffin removal and DNA isolation procedures. *Int J Mol Med*, 2001, 8, 573
27. Bielawski K.P., Vogt U., Falkiewicz B.: Budowa i funkcje receptorów ERBB (HER). *Współczesna Onkologia*, 1999, 6, 241
28. Bielawski K.P.: Zastosowanie techniki PCR w badaniach onkogenów *erbB* i receptorów hormonów steroidowych jako potencjalnych czynników prognostycznych i predykcyjnych w raku sutka (rozprawa doktorska). Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku, 1998, Gdańsk
29. Blamey R.W.: Guidelines on endocrine therapy of breast cancer EUSOMA. *Eur J Cancer*, 2002, 38, 615
30. Bloom H.J.G., Richardson W.W.: Histological grading and prognosis on breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*, 1957, 11, 359
31. Bolufler P., Miralles F., Rodrigues A. i wsp.: Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlations with cytosolic and nuclear estrogen receptors and with biological and histological tumour characteristics. *Eur J Cancer*, 1990, 26, 283
32. Brandt B., Hermann S., Straif K. i wsp.: Modification of breast cancer risk in young women by a polymorphic sequence in the *egfr* gene. *Cancer Res*, 2004, 64, 7
33. Brandt B., Vogt U., Giwatz C.: Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction. In: Rolfs A., Weber-Rolfs I Finckh U. Editors: *Methods in DNA amplification*. New York: Plenum Press, 1994, 55
34. Brandt B., Vogt U., Harms F. i wsp.: Double-differential PCR for gene dosage estimation of *erbB* oncogenes in benign and cancer tissues and comparison to cellular DNA content. *Gene*, 1995, 59, 29

35. Brandt B., Vogt U., Schlotter C.M. i wsp.: Prognostic relevance of aberrations in the erbB oncogenes from breast, ovarian, oral and lung cancers: double-differential polymerase chain reaction (ddPCR) for clinical diagnosis. *Gene*, 1995, 159, 35
36. Brandt B.H., Roetger A., Dittmar T. i wsp.: c-erbB-2/EGFR as dominant heterodimerization partners determine a mitogenic phenotype in human breast cancer cells. *FASEB J*, 1999, 13, 1939
37. Bucci B., D'Agnano I., Botti C. i wsp.: EGF-R expression in ductal breast cancer: proliferation and prognostic implications. *Anticancer Res*, 1997, 17, 769
38. Buerger H., Gebhardt F., Schmidt H. i wsp.: Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of EGFR is related to cytogenic alterations and epithelial growth factor receptor expression. *Cancer Res*, 2000, 60, 854
39. Buerger H., Packeinsen J., Boecker A. i wsp.: Allelic length of a CA dinucleotide repeats in the egfr gene correlates with the frequency of amplifications of these sequence-first results of an inter-ethnic breast study. *J Pathol*, 2004, 203, 545
40. Burden S., Yarden Y.: Neuregulins and theirs receptors: A versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron*, 1997, 18, 847
41. Canzian F., Salovarra R., Hemminki A. i wsp.: Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors. *Cancer Res*, 56, 3331-37, 1996
42. Carpenter G. ERBB-4: mechanism of action and biology. *Exp Cell Research*, 2003, 284, 66
43. Carraway K.L., Carothers C.A., Carraway K.L. 3rd.: Roles of ERBB-3 and ERBB-4 in the physiology and pathology of the mammary gland. *J Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 1997, 2, 187
44. Carraway K.L. 3rd., Weber J.L., Unger M.J. i wsp.: Neuregulin-2, a new ligand of ERBB-3/ERBB-4-receptor tyrosine kinases. *Nature*, 1997, 387, 512
45. Chen S.Y., Yang A.G., Chen J.D. i wsp.: Potent antitumour activity of a new class of tumour-specific killer cells. *Nature*, 1997, 385, 78
46. Chen X., Levkowitz G., Tzahar E. i wsp.: An immunological approach reveals biological differences between the two NDF/heregulin receptors, ERBB-3 and ERBB-4. *J Biol Chem*, 1996, 271, 7620

47. Chi D.D., Hing A.V., Helms C. i wsp.: Two chromosome 7 dinucleotide repeat polymorphisms at gene loci epidermal growth factor receptor 9EGFR) and pro alpha 2 (I) collagen (COL1A2). *Hum Mol Genet*, 1995, 1, 135
48. Chow NH, Chan SH, Tzai KT i wsp. Expression profile of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res*, 1, 7, 1957-62, 200
49. Citri A., Kochupurakkal B.S. Yarden Y.: The deaf and dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*, 2003, 284, 54
50. Cohen B.D., Kiener P.A., Green J.M. i wsp.: The relationship between human epidermal growth-like factor receptor expression and cellular transformation in NIH3T3 cells. *J Biol Chem*, 1996, 271, 30897
51. Cole B.F., Gelber R.D., Gelber S. i wsp.: Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised clinical trials with quality-adjusted survival analysis. *Lancet*, 2001, 358, 277
52. Colleoni M., Gelber R., Coates A.S. i wsp.: Influence of endocrine-related factors on response to perioperative chemotherapy for patients with node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 2001, 19, 4141
53. Coombs L.M., Pigott D.A., Sweeney E. i wsp.: Amplification and overexpression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Cancer*, 1991, 63, 601
54. Courjal F., Louason G., Speiser P. i wsp.: Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers: Evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors. *Int J Cancer*, 1996, 69, 247
55. Coussens L., Yang-Feng T.L., Liao Y.C. i wsp.: Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal localization with neu oncogene. *Science*, 1985, 230, 1132
56. de Cremoux P., Martin E.C., Vincent-Salomon A. i wsp.: Quantitative PCR analysis of c-erbB-2/neu (HER2/neu) gene amplification and comparison with p 185 (HER2/neu) protein expression in breast cancer drill biopsies. *Int J Cancer*, 1999, 83, 157
57. Delarue J.C., Friedman S., Mouriessse H. i wsp.: Epidermal growth factor receptor in human breast cancers: correlation with estrogen and progesterone receptors. *Breast Cancer Res Treat*, 1988, 11, 173
58. Diamandidis E.P.: Clinical application of tumor suppressor genes and oncogenes in cancer. *Clin Chim Acta*, 1997, 257, 157

59. Didkowska J., Wojciechowska U., Tarkowski W. i wsp.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2000 roku. Krajowy Rejestr Nowotworów. 2003
60. DiGiovanna M.P., Stern D.F., Edgerton S.M. i wsp.: Relationship of epidermal growth factor receptor expression to ErbB-2 signaling activity and prognosis in breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 2005, 23, 1152
61. Dowsett M., Barlett J., Ellis I.O. i wsp.: Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centers. *J Pathol*, 2003, 199, 418
62. Dowsett M., Cooke T., Ellis I. i wsp.: Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? *Eur J Cancer*, 2000, 36, 170
63. Drebin J.A., Link V.C., Stern D.F. i wsp.: Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell*, 1985, 41, 697
64. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 2005, 365, 1687
65. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 1998, 352, 930
66. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 1998, 351, 1451
67. Eifel P., Axelson J.A., Costa J. i wsp.: National Institutes of Health Consensus development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93, 979
68. Ekstrand A.J., Sugawa N., James C.D. i wsp.: Amplified and rearranged epidermal growth factor receptors genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci, USA* 89, 1992, 4309
69. Elledge R.M., Green S., Ciocca D. i wsp.: HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor positive breast cancer. A Southwest Oncology Group Study. *Clin Cancer Res*, 1993, 4, 7
70. Ellis I.O., Galea M., Broughton N. i wsp.: Pathological prognostic factors in breast cancer II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long follow-up. *Histopathology*, 1992, 20, 479

71. Eppenberger-Castori S., Kueng W., Benz C. i wsp.: Prognostic and predictive significance of ErbB-2 breast tumor levels measured by enzyme immunoassay. *J Clin Oncol*, 2001, 19, 645
72. Fan Z., Mandelsohn J.: Therapeutic application of anti-growth factor antibodies. *Curr Opin Oncol*, 1998, 10, 67
73. Fitzgibbons P.L., Page D.L., Weaver D. i wsp.: Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*, 2000, 124, 966
74. Franklin G.C., Donovan M., Adam G.I.R. i wsp.: Expression of the human PDGF-B gene is regulated by both positively and negatively acting cell type-specific regulatory elements located in the first intron. *EMBO*, 1991, 10, 1365
75. Friedman J. M.: Nowotwory i genetyka. W Genetyka (rad. J. Limon), Urban i Partner, Wrocław, 2000, 187-199
76. Fukuoka M., Yano S., Giaccone G. i wsp.: Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2003, 21, 2237
77. Fukuoka M., Yano S., Giaccone G. i wsp.: Final results from a phase II trial of ZD 1839 (Iressa) for patients with advanced non-small-cell lung cancer (IDEAL 1). *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2002, 21, 298
78. Gandara D.R., Gumerlock P.H.: Epidermal Growth Factor Receptor tyrosine kinase inhibitors plus chemotherapy: case closed or is the jury still out. *JCO*, 2005, 23, 5856
79. Gasparini G., Gullick W.J., Maluta S.: c-ERBB-3 and c-ERBB-2 protein expression in node-negative breast carcinoma – an immunocytochemical study. *Eur J Cancer*, 1994, 30, 16
80. Gebhard F., Zanker K.S., Brandt B.: Differential expression of alternatively spliced c-ERBB-2 m-RNA in primary tumors, lymph node metastases and bone marrow micrometastases from breast cancer patients. *Biophys Res Comm*, 1998, 247, 319
81. Gebhard F., Zanker K.S., Brandt B.: Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem*, 1999, 274, 13176
82. Gebhardt F., Burger H., Brandt B. i wsp.: Modulation of EGFR gene transcription by secondary structures, a polymorphic repetitive sequence and mutations - links between genetics and epigenetics. *Histol Histopathol*, 2000, 5, 929

83. Gebhardt F., Rotger A., Zanker K.S. i wsp.: Regulation of epidermal growth factor receptor in human carcinoma cell lines by structurally different 5'-transcripts. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, 1997, 38, 184
84. Goldhirsch A., Glick J.H., Gelber R.D. i wsp.: Meeting highlights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol*, 2005, 16, 1569
85. Goldhirsch A., Glick J.H., Gelber R.D. i wsp.: Meeting highlights: International Consensus Panel on the treatment of primary breast cancer. *J Clin Oncol*, 2001, 19, 3817
86. Goldhirsch A., Wood W.C., Gelber R.D. i wsp.: Meeting highlights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol*, 2003, 21, 3357
87. Gorgoulis V.G., Barbatis C., Poulias I. i wsp.: Molecular and immunohistochemical evaluation of epidermal growth factor receptor and c-erb-B-2 gene product in transitional cell carcinomas of the urinary bladder: a study in Greek patients. *Mod Pathol*, 1995, 7, 758
88. Graber H.U., Friess H., Kaufmann B. i wsp.: Erbb-4 mRNA expression is decreased in non-metastatic pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 1999, 84, 24
89. Graus-Porta D., Beerli R.R., Daly J.M. i wsp.: ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*, 1997, 16, 1647
90. Grodecka-Gazdecka S.: Wartość rokownicza wybranych czynników patoklinicznych i markerów immunohistochemicznych w raku gruczołu piersiowego bez przerzutów do węzłów chłonnych. Rozprawa habilitacyjna, 1997, Poznań
91. Gschwind A., Fischer O.M., Ullrich A.: The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nature*, 2004, 4, 361
92. Gullick W.J.: The c-erbB-3 receptor in human cancer. *Cancer Surveys*, 1996, 27, 339
93. Gullick W.J.: The type 1 growth factor receptors and their ligands considered as a complex system. *Endocr Relat Cancer*, 2001, 8, 75
94. Gullick W.J., Srinivasan R.: The type 1 growth factor receptor family: new ligands and receptors and their role in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1998, 52, 43

95. Gusterson B.A., Gelber R.D., Goldhirsh A. i wsp.: Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, 1992, 10, 10-49
96. Hainsworth P.J., Henderson M.A., Stillwell i wsp.: Comparison of EGFR, c-erbB-2 product and ras p21 immunohistochemistry as prognostic markers in primary breast cancer. *Eur J Surg Oncol*, 1991, 17, 9
97. Hamlin J.L.: Drug resistance. DNA Sequence Amplification. *Encyclopedia of Cancer*, Academic Press, Inc, 1997
98. Harris A.L., Nicholson S., Sainsbury S. i wsp.: Epidermal growth factor receptors (EGFR) in breast cancer: association with early relapse and death, poor response to hormones and interaction with neu. *J Steroid Biochem*, 1989, 4, 123
99. Hendrix M.J.C., Muschel J., Padarathsingh M.: Recent advances in breast cancer research: From genes to management. *Am J Pathol*, 1997, 151, 883
100. Higashiyama S., Horikawa M., Yamada K. i wsp.: A novel brain-derived member of the epidermal growth factor family that interacts with ERBB-3 and ERBB-4. *J Biochem*, 1997, 122, 675
101. Hirashima N., Takahashi W., Yoshii S. i wsp.: Protein overexpression and gene amplification of c-erbB-2 in pulmonary carcinomas: a comparative immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Mod Pathol*, 2001, 14, 556-562
102. Holbro T., Beerli R.R., Maurer F. i wsp.: The ErbB-2/ErbB-3 heterodimer function as an oncogenic unit. ErbB-2 requires ErbB-3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100, 8933
103. Holbro T., Civenni G., Hynes N.E.: The ERBB receptors and their role in cancer progression. *Experimental Cell Research*, 2003, 284, 99
104. Hoskins K., Weber B.L.: Recent advances in breast cancer biology. *Curr Opin Oncol*, 1995, 7, 495
105. Huang E., Cheng S.H., Dressman H. i wsp.: Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *The Lancet*, 2003, 361, 1590
106. Hubbard A.L., Doris C.P., Thompson A.M. i wsp.: Critical determination of the frequency of c-ERBB-2 amplification in breast cancer. *Br J Cancer*, 1994, 70, 434
107. Hudelist G., Singer C.F., Manavi M. i wsp.: Co-expression of ERBB-family members in human breast cancer: HER-2/neu is the preferred

- dimerization candidate in nodal-positive tumors. *Breast Cancer Res Treat*, 2003, 80, 353
108. Hynes N.E., Lane H.E.: ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews*, 2005, 5, 341
 109. Ito I., Yoshimoto M., Iwase T. i wsp.: Association of genetic alterations on chromosome 17 and loss of hormone receptors in breast cancer. *Br J Cancer*, 1994, 71, 438
 110. Jass J.R., Cottier D.S., Jeevaratnam P. i wsp.: Diagnostic use of microsatellite instability in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Lancet* 1995, 346, 1200
 111. Jassem J., Krzakowski M., Olszewski W. i wsp.: Rak piersi. Zalecenia diagnostyczno-terapeutyczne Polskiej Unii Onkologii. *Nowotwory*, 2003, 53, 300
 112. Jukkola A., Bloigu R., Soini Y. i wsp.: c-erbB-2 positivity is a factor for poor prognosis in breast cancer and poor response to hormonal or chemotherapy treatment in advanced disease. *Eur J Cancer*, 2001, 37, 347
 113. Kapitanovic S., Radošewicz S., Kapitanovic M. i wsp.: The expression of p185 (HER-2/neu) correlates with stage of disease and survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 1997, 112, 1103
 114. Kew T.Y., Bell J.A., Pinder S.E. i wsp.: c-erbB-4 protein expression in human breast cancer. *Br J Cancer*, 2000, 82, 1163
 115. Keyomarsi K., Tucker S.L., Buchholtz T.A. i wsp.: Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med*, 2002, 20, 1566
 116. Kitadai Y., Yasui W., Yokozaki H. i wsp.: The level of transcription factor Spl is correlated with the expression of EGF receptor in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Comm*, 1992, 189, 1342
 117. Klijn J.G.M., Berns P.M.J.J., Schmitz P.I.M. i wsp.: The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocrine Rev*, 1992, 13, 156
 118. Klijn J.G.M., Look P.M., Portengen H. i wsp.: The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of 10 year follow-up study. *Breast Cancer Res Treat*, 1994, 29, 73
 119. Knowlden J.M., Gee J.M.W., Seery L.T. i wsp.: E-ERBB3 and c-ERBB-4 expression is a feature of the endocrine responsive phenotype in clinical breast cancer. *Oncogene*, 1998, 17, 1949

120. Koeppen K., Wright B.D., Burt A.D. i wsp.: Overexpression of HER2/neu in solid tumors: an immunohistochemical survey. *Histopathology*, 2001, 38, 96
121. Kolibaba K.S., Druker B.J.: Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1333, F217
122. Kommos F., Colley M., Hart C.E. i wsp.: In situ distribution of oncogene products and growth factors in breast carcinoma: c-erbB-2 oncoprotein, EGFr, and PDGFr-beta-subunit. *Mol Cell Probes*, 1990, 4, 11
123. Konecny G., Pauletti G., Pegram M. i wsp.: Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95, 142
124. Kordek R., Bartkowiak J.: Niestabilność mikrosatelitarna w nowotworach człowieka. *Onkologia Polska*, 1999, 2, 109
125. Kozłowski W., Szacikowska E.: Receptory HER/ERBB w prawidłowym nabłonku i kancerogenezie. *Współczesna Onkologia*, 2000, 1, 7
126. Kraus M.H., Fedi P., Starks V. i wsp.: Demonstration of ligand-dependent signaling by the ERBB-3 tyrosine kinase and its constitutive activation in human breast-tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 1993, 2900
127. Kraus M.H., Issing W., Miki T. i wsp.: Isolation and characterisation of c-erbB-3, a third member of the erbB/epidermal growth factor receptor family; evidence of overexpression in a subset of human mammary tumours. *Proc Natl Acad Sci, USA* 86, 1989, 9193
128. Lebeau A., Deimling D., Kaltz C. i wsp.: Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol*, 2001, 19, 354
129. Lee H., Akita R.W., Sliwkowski M.X. i wsp.: A naturally occurring secreted human ErbB-2, ErbB-3 and ErbB-4. *Cancer Res*, 2001, 4467
130. Lemoine N.R., Barnes D.M., Hollywood D.P. i wsp.: Expression of the ERBB-3 gene product in breast cancer. *Br J Cancer*, 1992, 66, 1116
131. Lemoine N.R., Lobresco M., Leung H.: The erbB-3 gene in human pancreatic cancer. *J Pathol*, 1992, 68, 269
132. Levine A.J.: The genetic origins of neoplasia. *JAMA*, 1995, 273, 592
133. Limon J., Siedlecki A.: Choroby nowotworowe. W: J. Bal (red.) *Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Springer PWN, 1998, Warszawa

134. Limon J.: Czynniki genetyczne. W: J. Jassem (red.) Rak sutka. Podręcznik dla studentów i lekarzy. Springer PWN, 1998, Warszawa
135. Liu E., Thor A., He M. i wsp.: The HER-2 (c-erbB-2) oncogene is frequently amplified in situ carcinomas in the breast. *Oncogene*, 1992, 7, 1027
136. Liu W., Innocenti F., Chen P. i wsp.: Interethnic difference in the allelic distribution of human epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism. *Clin Cancer Res*, 2003, 9, 1009
137. Lodge A.J., Anderson J.J., Gullick W.J. i wsp.: Type 1 growth factor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. *J Clin Pathol*, 2003, 56, 300
138. Lönn U., Lönn S., Nylen U. i wsp.: Detection and temporal appearance of multiple copies of c-erbB-2 genes in advanced mammary carcinoma using fine needle biopsies and the polymerase chain reaction. *Br cancer Res Treat*, 1992, 23, 191
139. Lyne J.C., Melhelm M.F., Finley G.G. i wsp.: Tissue expression of new differentiation factor/herectin and its receptor complex in prostate cancer and its biologic effects on prostate cancer cells *in vitro*. *Cancer J Sci Am*, 1997, 3, 21
140. Marx D., Schauer A., Reiche C. i wsp.: c-erbB-2 expression in correlation to other biological parameters of breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1990, 116, 15
141. Mass R.D., Press M.F., Anderson S. i wsp.: Improved survival benefit from Herceptin (trastuzumab) in patients selected by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2001, 20, 85
142. Maurer C.A., Friess H., Kretschmann B. i wsp.: Increased expression of erbB-3 in colorectal cancer is associated with concomitant increase in the level of erbB2. *Hum Pathol*, 1998, 29, 771
143. McKenzie S.J., Marks P.J., Lam T. i wsp.: Generation and characterization of monoclonal antibodies specific for the human *neu* oncogene product, p185. *Oncogene*, 1989, 1198, 165
144. Menard S., Pupa S., Campiglio M. i wsp.: Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene*, 2003, 22, 6570
145. Miller D.L., el-Ashry D., Cheville A.L. i wsp.: Emergence of MCF-7 cells overexpressing a truncated epidermal growth factor receptor (EGFR) under estrogen-depleted conditions: evidence for a role of EGFR in breast cancer growth and progression. *Cell Growth Differ*, 1994, 5, 1263

146. Mitchell M.S., Press M.F.: The role of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization for HER-2/neu in assessing the prognosis of breast cancer. *Sem in Oncol*, 1999, 26, 108
147. Morrow M.: Identification of woman at risk for breast cancer: problem solved? *Recent Results Cancer Res*, 1998, 82, 317
148. Nahta R., Hortobagyi G.N., Esteva F.J.: Growth factor receptors in breast cancer: potential for therapeutic intervention. *The Oncologist*, 2003, 8, 5
149. Naidu R., Yadav M., Nair S. i wsp.: Expression of c-erbB-3 protein in primary breast carcinomas. *Br J Cancer*, 1998, 78, 1385
150. Neve R.M., Lane H.A., Hynes N.E.: The role of overexpressed HER2 in transformation. *Ann Oncol*, 2001, 12 Suppl 1, 161
151. Newby J.C., Johnston S.R., Smith I.E. i wsp.: Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer. *Clin Cancer Res*, 1997, 3, 1643
152. Ni C-Y, Youan H., Carpenter G. i wsp.: Role of the ERBB-4 carboxyterminus in α -secretase cleavage. *J Biol Chem*, 2003, 278, 4561
153. Nicholson R.I., Gee J.M., Harper M.E.: EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*, 2001, 37, (Suppl 4), S9
154. Nicholson S., Halcrow P., Sainbury J.R. i wsp.: Epidermal growth factor receptor (EGFr) status associated with failure of primary endocrine therapy in elderly postmenopausal patients with breast cancer. *Br J Cancer*, 1988, 58, 810
155. Nystrom L., Andersson I., Bjurstam N. i wsp.: Long-term effects of mammography screening: updated overview of the Swedish randomised trials. *Lancet*, 2002, 359, 909
156. O'Malley F.P., Parkers R., Latta E. i wsp.: Comparison of HER2/neu status assessed by quantitative polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol*, 2001, 115, 504
157. Ogiso H., Ishitani R., Nureki O. i wsp.: Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, 2002, 110, 775
158. Olszewski W.T., Olszewski W.P., Mrozkowiak A. i wsp.: HER2 status population screening of breast carcinoma in Poland-immunohistochemical evaluation of 5946 cases. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2003, 82, supp.1, S142

159. Osborne C.K., Bardou V., Hopp T.A. i wsp.: Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst Cancer Spectrum*, 2003, 95, 353
160. Packeisen J., Korsching E., Herbst i wsp.: Demystified...Tissue microarray technology. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2003, 56, 198
161. Patey D.H., Dysin W.H.: The prognosis of carcinoma of the breast in relation to type of operation performed. *Br J Cancer*, 1948, 2, 71
162. Pauletti G., Dandekar S., Rong H. i wsp.: Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: A direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol*, 2000, 18, 3651
163. Pauletti G., Dandekar S., Smith K. i wsp.: Chronology of HER-2/neu gene amplification in proliferative and malignant ductal lesions of the breast as determined by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Proc Assoc Cancer Res*, 1997, 38, 414 (abstr 2777)
164. Pauletti G., Godolphin W., Press M.F. i wsp.: Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene Res*, 1989, 3, 21
165. Pauley R.J., Gimotty P.A., Paine T.J. i wsp.: INT2 and ERBB2 amplification and ERBB2 expression in breast tumors from patients with different outcomes. *Breast Cancer Res*, 1996, 58, 763
166. Pawlowsky V., Revillion F., Hebbard M. i wsp.: Prognostic value of the type I growth factor receptors in a large series of human primary breast cancers quantified with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res*, 2000, 6, 417
167. Pawlowsky V., Revillion F., Hornez L. i wsp.: Low concentrations of c-erbB-2 mRNA (real time RT-PCR) are associated with a poor prognosis in 404 unselected primary human breast cancers. *Proc Ann Assoc Cancer Res*, 1999, 40, 204
168. Pegram M.D., Lipton A., Hayes D.F. i wsp.: Phase III study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185 HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol*, 1998, 16, 2659
169. Pegram M.D., Pietras R., Bajamonde A. i wsp.: Targeted therapy: Wave of future. *J Clin Oncol*, 2005, 23, 1776

170. Peles E., Yarden Y.: Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays*, 1993, 15, 815
171. Peto R.: Early Breast Cancer Trialists' Group-Updated results from September 2000 worldwide overview. *Eur J Cancer*, 2000, 36, 47, suppl. 5
172. Peto R.: UK and USA breast cancer death down 25% in year 2000 to ages 20-69 years. Correspondence. *Lancet*, 2000, 355, 1822
173. Piccart-Gebhart M.J., Di Leo A., Hamilton A.: HER2 a "predictive factor" ready to use in the daily management of breast cancer patients? *Eur J Cancer*, 2000, 36, 1755
174. Piccart-Gebhart M.J., Procter M., Sci M. i wsp.: Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 2005, 353, 1659
175. Pieńkowski T.: Rak piersi. W: *Onkologia Kliniczna*, red. Krzakowski M., Borgis 2001, Wydawnictwo Medyczne
176. Pieńkowski T.: Znaczenie ekspresji receptora HER-2, białek p53, bcl-2, bax, stopnia proliferacji i zawartości receptorów dla estrogenów i progestagenów jako czynników prognostycznych i predykcyjnych u chorych na raka piersi. Rozprawa habilitacyjna. *Nowotwory*, 2002, supp. 1, 52, 3
177. Plowman G.D., Culouscou J-M, Whitney G.S. i wsp.: Ligand-specific activation of HER-4/p180erbB4, a fourth member of epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 1993, 1746
178. Plowman G.D., Whitney G.S., Neubauer M.G. i wsp.: Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 1990, 4905
179. Powles T.J., Eeles R., Ashley S. i wsp.: Interim analysis of breast cancer in the Royal Marsden Hospital Tamoxifen randomized prevention trial. *Lancet*, 1998, 98
180. Press M.F., Bernstein L., Thomas P.A.: HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol*, 1997, 15, 2894
181. Press M.F., Pike M.C., Chazin V.R. i wsp.: HER-2/neu expression in node-negative breast cancer. Direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res*, 1993, 53, 4960

182. Pritchard K.I., Shepherd L.E., O'Malley F. P. i wsp.: HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *NEJM*, 2006, 354, 2103
183. Quinn C.M., Ostrowski J.L., Lane S.A. i wsp.: c-erbB-3 protein expression in human breast cancer: comparison with other tumour variables and survival. *Histopathology*, 1994, 25, 247
184. Raab G., Klagsbrun M.: Heparin-binding EGF-like growth factor. *Bioch Biophys Acta*, 1997, 333, F179
185. Ramaswamy S., Ross K.N., Lander E.S. i wsp.: A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*, 2003, 33, 49
186. Ramond E.H., Perez E.A., Bryant J. i wsp.: Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 2005, 353, 1673
187. Reinmuth N., Brandt B., Kunze W.P. i wsp.: Ploidy, expression of erbB1, erbB2, P53 and amplification of erbB1, erbB2 and erbB3 in non-small cell lung cancer. *Eur Respir J*, 2000, 16, 991
188. Reles A., Marx D., Meden H. i wsp.: C-erbB-2 oncogene expression in ovarian cancers. *Arch Gynaecol Obstet*, 1991, 250, 183
189. Revillon F., Bonnetterre J., Peyrat J.P.: ERBB oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer*, 1998, 34, 791
190. Riese D.J., Stern D.F.: Specificity within the EGF family/ERBB receptor family signaling network. *Bioessays*, 1998, 20, 41
191. Ro J., North S.M., Gallick i wsp.: Amplified and overexpressed epidermal growth factor receptor gene in uncultured primary human breast carcinoma. *Cancer Res*, 1988, 48, 161
192. Robertson K.W., Rivees J.R., Smith G. i wsp.: Quantitative estimation of epidermal growth factor receptor and c-ERBB-2 in human breast cancer. *Cancer*, 1996, 56, 3823
193. Rodrigo J.P., Ramos S., Lazo P.S.: Amplification of ERBB oncogenes in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Eur J Cancer*, 1996, 11, 2004
194. Rosenthal S.I., Depowski P.L., Sheehan C.E. i wsp.: Comparison of HER-2/neu oncogene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in lobular and ductal breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2002, 10, 40

195. Ross J., Fletcher J.A., Linette G.P. i wsp.: The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003. Biomarker and target therapy. *The Oncologist*, 2003, 8, 307
196. Ross J.S., Fletcher J.A.: The HER2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cell*, 1998, 16, 413
197. Rowinsky E.K.: Signal events: cell signal transduction and its inhibition in cancer. *The Oncologist*, 2003, 8 (suppl. 3), 5
198. Rubin I., Yarden Y.: The basic biology of HER2. *Ann Oncol*, 2001, 12, suppl. 1, S3
199. Rusnak D.W., Lackey K., Affleck K. i wsp.: The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*, 2001, 1, 85
200. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F. i wsp.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230, 1350
201. Sainsbury J.R., Malcolm A.J., Appleton D.R. i wsp.: Presence of epidermal growth factor receptors as an indicator of poor prognosis in patients with breast cancer. *J Clin Pathol*, 1985, 38, 1225
202. Schlegel L., Stumm G., Brandle K. i wsp.: Amplification and differential expression of members of the erbB-gene family in human glioblastoma. *J Neurooncol*, 1994, 22, 201
203. Schwechheimer K., Huang S., Cvenec W.K.: EGFR gene amplification-rearrangement in human glioblastomas. *Int J Cancer*, 1995, 62, 145
204. Shackney S.E., Pollic A.A., Smith C.A. i wsp.: Intracellular coexpression of epidermal growth factor receptor, Her-2/neu and p21^{ras} in human breast cancers: evidence for the existence of distinctive patterns of genetic evolution that are common to tumors from different patients. *Clin Cancer Res*, 1998, 4, 913
205. Sica A., Tan T., Rice N. i wsp.: The c-rel protooncogene product c-Rel but not NF-kappa B binds to the intronic region of the human interferon-gamma gene at a site related to an interferon-stimulable response element. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89, 1740
206. Siegel P.M., Ryan E.D., Cardiff R.D. i wsp.: Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of

- mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *EMBO J*, 1999, 18, 2149
207. Sinacki M., Welnicka-Jaśkiewicz M., Jassem J.: Conservative local treatment versus mastectomy after induction chemotherapy in locally advanced breast cancer (LAMANOVA, EORTC 10974/22002). Why this study failed? *Eur J Cancer*, 2004, 2 (suppl), 139
 208. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G. i wsp.: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987, 235, 177
 209. Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A. i wsp.: Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 1989, 244, 707
 210. Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S. i wsp.: Use of chemotherapy plus monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 2001, 344, 783
 211. Southern E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975, 98, 503
 212. Spector N.L., Xia W., Burris H. i wsp.: A study of the biological effects of lapatinib (GW572016), a reversible inhibitor of ErbB-1 and ErbB-2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol*, 2005, 23, 2502
 213. Spizzo G., Obrist P., Ensinger C. i wsp.: Prognostic significance of Ep-CAM and Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer. *Int J Cancer*, 2002, 98, 883
 214. Srinivasan R., Gillett D.M., Barnes W.J. i wsp.: Nuclear expression of the c-erbB-4/HER4 growth factor receptor in invasive breast cancer. *Cancer Res*, 2000, 5, 1483
 215. Srinivasan R., Poulson H.C., Hurst W.J. i wsp.: Expression of the c-erbB-4/HER4 protein and mRNA in normal human fetal and adult tissues and in a survey of nine solid tumour types. *J Pathol*, 1998, 185, 236
 216. Stal O., Sullivan S., Wingren S. i wsp.: c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 1995, 330, 1260
 217. Stanisław A. *Przystępny kurs statystyki*. StatSoft Polska. Sp.z o.o. 1998, Kraków,

218. Suo Z., Emilsen E., Yarden Y. i wsp.: Type I protein tyrosine kinases in benign and malignant breast lesions. *Histopathology*, 1998, 33, 514
219. Suo Z., Risberg B., Kalsson M.G. i wsp.: EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol*, 2002, 196, 17
220. Sworczak K. Anomalie liczby kopii genów protoonkogenów rodziny erbB w rakach gruczołu tarczowego i w guzach chromochłonnych u ludzi. Rozprawa habilitacyjna, 2004, Gdańsk
221. Tabar L., Yen M.F., Vitak B. i wsp.: Mammography service screening and mortality in breast cancer patients: 20-year follow-up before and after introduction of screening. *Lancet*, 2003, 361, 1405
222. Tagliabue E., Menard S., Robertson J.F. i wsp.: c-erbB-2 expression in primary breast cancer. *Int J Biol Marcers*, 1999, 14, 16
223. Tamayo P. i wsp.: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 1999, 286, 531
224. Tetu B., Brisson J.: Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. The influence of the pattern of immunostaining and adjuvant therapy. *Cancer*, 1994, 73, 2359
225. The World Health Organization Histological Typing of Breast Tumors - 2nd edition. The World Health Organization. *Am J Clin Pathol*, 1982, 78, 806
226. Thor A.D., Liu S., Edgerton S. i wsp.: Activation (tyrosine phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/neu): A study of incidence and correlation with outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2000, 18, 3230
227. Tidow N., Boecker A., Schmidt H. i wsp.: Distinct amplification of an untranslated regulatory sequence in the egfr gene contributes to early steps in breast cancer development. *Cancer Res*, 2003, 63, 1172
228. Torregosa D., Bolufer P., Lluch A. i wsp.: Prognostic significance of c-erbB-2/neu amplification and epidermal growth factor receptor (EGFR) in primary breast cancer and their relation to estradiol receptor (ER) status. *Clin Chim Acta*, 1997, 262, 99
229. Tovey S.M., Witton C.J., Barlett J.M.S. i wsp.: Outcome and human epidermal growth factor receptor (HER) 1-4 status in invasive breast carcinomas with proliferation indices evaluated by bromodeoxyuridine labeling. *Breast Cancer Res*, 2004, 6, 246

230. Travis A., Pinder S.E., Robertson J.F.R. i wsp.: c-ERBB-3 in human breast carcinoma: expression and relation to prognosis and established prognostic indicators. *Br J Cancer*, 1996, 74, 223
231. Trawers A.A., Klug A.: in DNA topology and its biological effects (Cozzarelli N.R., Wang J.C. eds), 57-106, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990, Cold Spring Harbor, NY
232. Tubbs R.R., Pettay J.D., Robertson J.F. i wsp.: Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false in positives do not get the message. *J Clin Oncol*, 2001, 15, 2714
233. Tzahar E., Yarden Y.: The ERBB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1377, M25
234. van de Vijver M.J., He Y.D., van't Veer L.J. i wsp.: A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*, 2002, 347, 1999
235. van de Vijver M.J., Nusse R.: The molecular biology of breast cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1072, 33
236. van Dongen J.A., Voogd A.C., Fentiman I.S. i wsp.: Long term results of a randomized trial comparing breast-conserving therapy with mastectomy: European Organization for Research and Treatment of Cancer 10801 Trial. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92, 1143
237. van't Veer L.J., Dai H., Chen Y. i wsp.: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 2002, 415, 530
238. Vogel C.L., Cobleigh M.A., Tripathy D. i wsp.: Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER-2 overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 2002, 20, 719
239. Vogt U., Bielawski K.P., Schlotter C.M. i wsp.: Amplification of ERBB-4 oncogene occurs less frequently than that of ERBB-2 in primary breast cancer. *Gene*, 1998, 223, 375
240. Vogt U., Falkiewicz B., Bielawski K.P. i wsp.: Relationship of *c-myc* and *erbB* oncogene family gene aberrations and other selected factors to *ex vivo* chemosensitivity of ovarian cancer in the modified ATP-chemosensitivity assay. *Acta Biochim Pol.* 2000, 47, 157
241. Voldborg B.R., Damstrup L., Spang-Thomsen M. i wsp.: Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol*, 1997, 8, 1197

- 242. Von Hoff D.D.: New mechanisms of gene amplification in drug resistance (the episome model). *Cancer Treat Res*, 1991, 57, 1
- 243. Weiner D.B., Nordberg J., Robinson R. i wsp.: Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res*, 1990, 50, 421
- 244. Wells A.: EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999 31, 637
- 245. Welnicka-Jaśkiewicz M., Jassem J.: Nowe zalecenia dotyczące leczenia wczesnego raka piersi. Ustalenia IX Międzynarodowej Konferencji w St. Gallen. *Nowotwory*, 2005, 56, 80
- 246. Werkmeister R., Brandt B., Joos U.: The erbB oncogenes as prognostic markers in oral squamous cell carcinoma. *Am J Surg*, 1996, 172, 681
- 247. Witton C.J., Reeves J.R., Coke T.G. i wsp.: Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinase in breast cancer. *J Pathol*, 2003, 200, 290
- 248. Wood E.R., Truesdale A.T., McDonald O.B. i wsp.: A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW57016 (lapatinib): relationship among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res*, 2004, 64, 6652
- 249. Wrba F., Reiner A., Ritzinger E. i wsp.: Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) on breast carcinomas in relation to growth fractions, estrogen receptor status and morphological criteria. An immunohistochemical study. *Pathol Res Pract*, 1988, 183, 25
- 250. Xu Y., Richert N., Ito S i wsp.: Characterization of epidermal growth factor gene expression in malignant and normal cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81, 7308
- 251. Yamauchi H., O'Neill A., Gelman R. i wsp.: Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast cancer patients by pretreatment circulating levels of extracellular domain of the HER-2/c-neu protein. *J Clin Oncol*, 1997, 15, 2518
- 252. Yarden Y., Ulrich A.: Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, 1988, 57, 443
- 253. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *E J Cancer*, 2001, 37, S3
- 254. Yokota J., Yamamoto T., Miyajima N. i wsp.: Genetic alterations of the c-erbB-2 oncogene occur frequently in tubular adenocarcinoma of stomach

- and are often accompanied by amplification of the v-erbA homologue. *Oncogene*, 1988, 2, 283
255. Yu D., Wang S.S., Dulski K.M. i wsp.: c-ERBB-2/neu overexpression enhances metastatic potential of human lung cells by induction of metastasis-associated properties. *Cancer Res*, 1994, 54, 3260
256. Żaczek A., Brandt B., Bielawski K.P.: The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches. *Histol Histopathol*, 2005, 20, 1005
257. Żaczek A., Welnicka-Jaśkiewicz M., Buerger H. i wsp.: Modified direct-double-differential PCR for gene dosage quantification of HER2. *Oncol Rep*, 2005, 13, 5, 971
258. Zemzoum I., Kates R.E., Ross J.S. i wsp.: Invasion factors uPA/PAI-1 and HER2 status provide independent and complementary information on patient outcome in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 2003, 21, 1022
259. Zhang W., Stoecklacher J., Park D.J. i wsp.: A polymorphic dinucleotide repeat in intron 1 of *EGFR* (*epithelial growth factor receptor*) gene is associated with clinical response to platinum based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2003, 21, 134
260. Zhou B., Hung M.: Dysregulation of cellular signaling by HER2/neu in breast cancer. *Semin Oncol*, 2003, 30, 38
261. Zimonjic D.B., Alimandi M., Miki T. i wsp.: Localization of the human *HER4/ERBB-4* gene to chromosome 2. *Oncogene*, 1995, 10, 1235

11. ZAŁĄCZNIK NR 1 – ANKIETA

1. Numer ewidencyjny chorej
2. Imię i Nazwisko
3. Data urodzenia
4. Stan menopauzalny
 - 1) przedmenop. 2) pomeop. 3) okołomen. 4) sztuczna menop.
 - a. przyczyna nieonkologiczna
 - b. kastracja w przebiegu choroby neo
 - c. inna
5. Stopień zaawansowania klinicznego

T	N
---	---
6. Stan receptorów steroidowych

1) ujemne	2) dodatnie	3) nieznane
ER	PgR	
7. Droga ustalenia rozpoznania

1) bac	2) biopsja gruboigłowa	3) badanie doraźne
--------	------------------------	--------------------
8. Leczenie przedoperacyjne
 - 1) CMF
 - 2) AC
 - 3) FEC/FAC
 - 4) inna
 - 5) hormonoterapia
 - 6) nie było
9. Liczba podanych kursów leczenia
10. Ocena kliniczna odpowiedzi na leczenie
 - 1) PR
 - 2) S
 - 3) CR
 - 4) P

-
11. Data zabiegu operacyjnego
12. Rodzaj zabiegu operacyjnego
- 1) zmodyfikowana amp. Patey'a 2) BCT 3) inna
13. Wynik badania mikroskopowego
- 1) rak przewodowy 2) rak zrazikowy 3) inny, jaki
14. Stopień zróżnicowania
- 1) G1 2) G2 3) G3 4) nie oceniono
15. Średnica guza w cm
16. Obecność nacieków w tkance tłuszczowej
- 1) tak 2) nie 3) nie oceniono
17. Obecność nacieków w naczyniach
- 1) tak 2) nie 3) nie oceniono
18. Ekspresja receptorów HER (IHC)
19. Liczba usuniętych węzłów chłonnych
20. Liczba zajętych węzłów chłonnych
21. Leczenie uzupełniające
- 1) tak 2) nie
22. Jeżeli radioterapia, data rozpoczęcia
- 1) ściana kl. piersiowej (piers) 2) regionalne węzły chłonne
- Dawka
- Data zakończenia
23. Jeżeli chemioterapia uzupełniająca, schemat leczenia
- 1) CMF
- 2) AC
- 3) FEC/FAC
- 4) inna
- 5) hormonoterapia
- 6) nie było

24. Data rozpoczęcia, data zakończenia

25. Jeżeli hormonoterapia

 Data rozpoczęcia

26. Rodzaj hormonoterpii

 1) Tam 2) IA 3) kastracja 4) inna

27) Daty badań kontrolnych

28) Wynik badania kontrolnego

 1) bez wznowy 2) wznowa - data

29) Charakter wznowy

 1) miejscowa 2) narządy mięszone 3) kości 4) CUN 5) kilka lokalizacji

30. Data ew. zgonu

31. Przyczyna zgonu

 1) postęp choroby 2) inna, pozanowotworowa 3) nieznana